

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FOKAL SEREBELLAR ENFARKTLI FARE HAYVAN
MODELİNDE RHO-KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNİN ETKİNLİĞİ**

Dr. Sanem Aslıhan AYKAN DİLMEN

**Fizyoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2018**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FOKAL SEREBELLAR ENFARKTLI FARE HAYVAN
MODELİNDE RHO-KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNİN ETKİNLİĞİ**

Dr. Sanem Aslıhan AYKAN DİLMEN

**Fizyoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. İsmail KARABULUT**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. Cenk AYATA**

**ANKARA
2018**

ONAY SAYFASI

FOKAL SEREBELLAR ENFARKTLI FARE HAYVAN MODELİNDE RHO-KİNAZ

İNHİBİTÖRLERİNİN ETKİNLİĞİ

Dr. Sanem Ashhan Aykan Dilmen

Danışman: Doç. Dr. İsmail Karabulut

İkinci Danışman: Doç. Dr. Cenk Ayata

Bu tez çalışması 20 Haziran 2018 tarihinde jürimiz tarafından “FİZYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Lamia Pınar

(imza)

(Gazi Ü., Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD)

Üye:

Prof. Dr. Sibel Dinçer

(imza)

(Gazi Ü., Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD)

Üye:

Prof. Dr. Ethem Gelir

(imza)

(Hacettepe Ü., Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD)

Üye:

Doç. Dr. Bilge Pehlivanoglu

(imza)

(Hacettepe Ü., Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD)

Üye:

Doç. Dr. Meltem Tuncer

(imza)

(Hacettepe Ü., Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD)

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

10 Temmuz 2018


Prof. Dr. Diclehan ORHAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

o Tezimin/Raporumun 20/07/2021 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

10.07.2018


İmza

ETİK BEYAN SAYFASI

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Doç. Dr. İsmail Karabulut danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Dr. Sanem Aslıhan AYKAN DİLMEN



ÖZET

Aykan Dilmen SA, Fokal Serebellar Enfarktlı Fare Hayvan Modelinde Rho-Kinaz İnhibitörlerinin Etkinliği, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2018. Amerikan Kalp Derneği'nin 2015 verilerine göre inme, ölümün beşinci, uzun dönem ve ciddi fiziksel sakatlığın ilk nedeni olarak gözükmektedir. Serebellar enfarktüs ise, inmelerin %3' ünü oluşturmaktadır. Beynin posterior sirkülasyonunu etkileyen inmelerde yanlış tanı konulması ölüm veya ciddi sakatlığa neden olabilmektedir. Serebellumun sadece motor ve koordinasyon dışında kognitif özellikleri de bulunduğundan hastaların semptomları farklı şekillerde kendi gösterebilir. Serebellar enfarktın medikal tedavisi diğer tüm inme tedavileriyle aynıdır ve trombolitiklerdir. Bu ilaçların en büyük etkisi intraserebral kanamaya neden olup; ciddi anlamda yaşamsal tehlike yaratmasıdır. Yeni gelişmekte olan Rho-bağımlı protein kinaz veya Rho-kinaz (ROCK) inhibitörleri inme tedavisi olarak ortaya atılmıştır. Bu çalışmada amacımız, fokal serebellar iskemi oluşturup, daha sonra Rho-kinaz inhibitörü olan fasudil tedavisini iskemiden 24 saat sonra iki hafta boyunca 12 saatte bir uygulayarak nörolojik iyileşme ve enfarkt hacmi üzerine olan etkinliği araştırmaktır. Fokal serebellar iskemi lobül IV-V lokasyonunda nitrik oksit sentetaz inhibitörü ile oluşturulmuştur. Enfarkt oluşturulduktan sonra yapılan 2., 3. ve 4. gün, 1., 2. ve 4. hafta analizlerde yürüme analizi, ızgara teli yürüme testi (özellikle ön ayaklarda) ve statik rod testinde serebellar enfarkt grubunda (n=17) sham (n=21) grubuna göre denge ve motor koordinasyonu bozacak anlamlı değişiklikler bulunurken Morris su tankı, Barnes labirent testi ve yeni obje tanıma testi gibi kognitif testlerde farklılık bulunmamıştır. Fasudil tedavisi (n=10) alan farelerde aracılı gruba (n=9) göre ızgara teli yürüme testinde düzelme ve enfarkt hacminde %32 azalma görülmüştür. Sonuç olarak, literatürde ilk defa yapılmış olan serebellar enfarkt modelinin nörolojik bulgulara yol açtığı görülmüş ve iskemiden 24 saat sonra uygulanan fasudil tedavisi ile hem nörolojik hem de histolojik iyileşme etkileri gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: serebellum, iskemi, fasudil, inme

Destekleyen Kurumlar: Türkiye Fulbright Komisyonu

ABSTRACT

Aykan Dilmen SA, The Effect Of Rho-Kinase Inhibitors In Focal Cerebellar Infarct Mouse Model, Hacettepe University Institute Of Health Sciences Physiology Doctor Of Philosophy Thesis, Ankara, 2018. According to AHA 2015, stroke is the fifth leading cause of death and is a major cause of serious and long term disability. Cerebellar strokes are account for 3% of all strokes. Early diagnosis and treatment of strokes affecting posterior circulation of the brain is very important. Misdiagnosis may cause serious disability or death. Since cerebellum has cognitive functions beyond motor and coordination functions, patients with cerebellar stroke may present with wide and different kind of symptoms. Thrombolytics is the major medical treatment in stroke which is the same treament for cerebellar stroke. The major side effect of thrombolytics is intracerebral hemorrhage which creates serious life threat. Newly developing ROCK inhibitors have been put forward as a treatment for stroke. In our study, we aimed to investigate the effect of focal cerebellar ischemia on the neurological recovery and infarct volume by applying the ROCK inhibitor, fasudil, 24 hours after ischemia for twice a day and continued for 2 weeks. Focal cerebellar ischemia was induced by nitric oxidase synthetase inhibitor enjection into lobule IV-V. In focal cerebellar ischemia mice (n=17, sham group n=21), significant changes were observed in footprint, gridwalk (especially in the forefoot), and static rod test, which shows altered balance and motor coordination compared to shame, but there was no difference in cognitive tests such as morris water maze, Barnes maze and and new object recognition test. In mice receiving Fasudil treatment (n=10, vehicle group n=9), improvement in gridwalking test and a 32% reduction in infarct volume were observed. In conclusion, the cerebellar infarct model that we have made for the first time in the literature gives neurological findings, and the effects of neurological and histologic recovery are observed with fasudil therapy applied 24 hours after ischemia.

Keywords: cerebellum, ischemia, fasudil, stroke

Supporting Instutions: Turkish Fulbright Committee

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca mesleki tecrübeleriyle çalışmalarına titizlikle destek veren, her tür koşulda sonsuz hoşgörüsü, saygısını ve sevgisiyle daima bana yol gösteren, doktora eğitimimin her aşamasında şehirlerarası veya ülkelerarası fark etmeksizin desteğini esirgemeyen, değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. İsmail Karabulut'a

Evrensel olarak mesleğinde zirveye ulaşmış, sadece mesleki açıdan değil hayat tecrübesini mesleki tecrübesi ile bütünleştirip mesleki olgunluğa erişmiş, bütün bu tecrübelerini doktora eğitimim süresince tarafıma tevazuyla yol gösterici olarak sunan, saygı ve hayranlıkla izleyerek bilgi ve ilminden faydalanmaya çalıştığım, öğrencisi olmaktan gurur ve onur duyduğum çok sevgili hocam Doç. Dr. Cenk Ayata'ya;

Tüm doktora eğitimim süresince bilgileriyle yol gösteren birlikte çalışmaktan ve tanımaktan mutluluk duyduğum değerli hocam Doç. Dr. Meltem Tuncer'e;

Doktora ve tez sürecimde güler yüzüyle ve bilgisiyle kendisinden çok şey öğrendiğim kıymetli hocam Prof. Dr. Lamia Pınar'a;

Doktora sürecimde eğitimime katkı sağlayan değerli hocalarım Doç. Dr. Bilge Pehlivanoğlu, Doç. Dr. Esin İleri Gürel, Doç. Dr. Ayşe Erdem, Doç. Dr. Murat Timur Budak, Doç. Dr. Sibel Bayrak, Prof. Dr. Neslihan Dikmenoğlu Falkmarkenn, Prof. Dr. Dicle Balkancı ve anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Ethem Gelir'e;

Bana her zaman güvenen ve inanan, bugünlere gelmemde en büyük emeği olan, en büyük destekçim olan, doktorayı başlamak için bana yol gösteren ve büyük özverileri sayesinde bugün doktora tezini tamamlamamı sağlayan sevgili annem MM.Sosyolog Hasret Aykan'a, babam Doç.Dr.Gökhan Aykan'a ve kardeşim Acıbadem Üni. Tıp Fak.Öğr. Orhan Aykan'a;

Mutluluk kaynağım ve uğurum canım kızım Belinda'ya

Tez döneminde bana destek olan Türkiye Fulbright Komitesi'ne;

Bilgi Birleştirir, Bilim Bütünleştirir diyerek emeği geçene herkese

Teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLOLAR	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Serebellum	3
2.2. Rho kinaz	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Deneyin Protokolü	32
3.2. Serebellar Enfarktın Oluşturulması	34
3.3. Serebellar Enfarkta Fasudil Tedavisi	34
3.4. Nörolojik Değerlendirme	35
3.5. Histoloji ve Mikroskopî	44
3.6. İstatistiksel Analiz	44
4. BULGULAR	45
4.1. Serebellar Enfarkt Modeli Nörolojik Test Sonuçları	45
4.2. Serebellar Enfarkt Modeli Histolojik Sonuçlar	54
4.3. Serebellar Enfarkta Fasudil Tedavisi Test Sonuçları	56
4.4. Serebellar Enfarkta Fasudil Tedavisi Histoloji Sonuçları	64
5. TARTIŞMA	68
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	75
7. KAYNAKLAR	76
8. EKLER	
EK-1: Tez Çalışması İle İlgili Etik Kurul İzinleri	

9. ÖZGEÇMİŞ



SİMGELER VE KISALTMALAR

±	Artı-eksi
%	Yüzde
©	Derece
μL	Mikrolitre
AICA	Anterior inferior sereberllar arter
akt	Aktivasyon
aPTT	Aktif parsiyel tromboplastin zamanı
BT	Bilgisayarlı tomografi
BTA	Bilgisayarlı tomografi anjiyogram
cm	Santimetre
DALY	Disability-adjusted life year
dk	Dakika
DMPK	Yapısı miyotonik distrofi kinaz
dpi	Dots per inch (inç başına düşen nokta sayısı)
DWI	Difüzyon ağırlıklı görüntüleme
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentetaz
GEE	Generalized estimating models
GLM	Generalized linear models
H&E	Hematoksilen-eozin
INR	International normalized ratio
inh	Inhibisyon
KBB	Kan beyin bariyeri
mg/kg	Miligram/kilogram
ml	Mililitre
MLC	Myosin light chain
mm	Milimetre
mM	Milimol
MR	Manyetik rezonans görüntüleme
MRA	Manyetik rezonans Anjiyogram

MRCK	Miyotonik distrofi kinaz-bağlı CDC42-binding kinaz
MYPT1	Miyozin fosfataz-targeting subunit 1
N2O	Nitrik oksit
O2	Oksijen
OLAE	Orolingual anjioödem
PAI	Plasminojen aktivator inhibitörü
PICA	Posterior inferior serebellar arter
PKN	Protein kinaz N
PMNL	Polimorf nüveli lökosit
ROCK	Rho-bağımlı protein kinaz
rt-PA	Rekombinan doku plazminojen aktivatörü
SCA	Superior serebellar arter
SKA	serebral kan akımı

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Serebellar korteksin lob ve lobüllerinin şematik resmi	4
2.2. Snider ve Stowell' in serebellar fonksiyonel haritası	7
2.3. Kan akımı ve etkilenen sahaların gruplandırılması.	13
2.4. Rho kinaz'ın yapısı	17
2.5. ROCK aktifleşmesi	18
2.6. ROCK'un izoformlarının yıkımının gösterilmesi	20
2.7. Stres filaman yapımında ROCK'un rolü	22
3.1. Çalışma protokolü diyagramı	33
3.2. Örnek yürüme analizi (Normal C57/B6J Fare)	36
3.3. Yürüme analizinin gösterilmesi	37
3.4. Rotarod cihazı (Columbus Instruments Rota Rod Rotamex-5 Mouse 4)	37
3.5. Izgara telinde yürüme testinin videosundan kesit	40
3.6. Barnes platformu	42
3.7. Yeni obje bulma testi	43
4.1. Yürüme analizinde serebellar enfarkt ve sham grubundaki sağ ve sol adım uzunluğu ortalamaları	46
4.2. Yürüme analizinde serebellar enfarkt ve sham grubundaki ön ve arka ayak adım genişliği ortalamaları	46
4.3. Yürüme analizinde serebellar enfarkt ve sham grubunda sağ ve sol adımlarının üstüste gelme uzaklığının ortalamaları	47
4.4. Yürüme analizinde serebellar enfarkt ve sham grubunda adım uzunluğu, genişliği ve adımların üst üste gelme uzaklığının standart deviasyonlarının ortalaması	47
4.5. Rotarod testinde zamana karşı düşme latansı grafisi	48
4.6. Serebellar enfarktüs ve sham grubu farelerde statik rod testinde 6mmlik sopada düşmeden bitirme oranları	49
4.7. Serebellar enfarktüs ve sham grubunun ızgara teli üzerinde yürüme testinde sağ ve sol ön ayak hata ortalamaları ve standart hataları	50

4.8.	Serebellar enfarktüs ve sham grubunun ızgara teli üzerinde yürüme testinde sağ ve sol arka ayak hata ortalamaları ve standart hataları	50
4.9.	Serebellar enfarktüs ve sham grubunun ızgara teli üzerinde yürüme testinde toplam sağ ve sol ayak hata ortalamaları ve standart hataları	51
4.10.	Morris su tankı testinin zamana göre platformu bulma süresi grafiği	52
4.11.	Barnes labirent testinin zamana göre platformu bulma süresi grafiği	53
4.12.	Serebellar enfarkt ve sham grubunda yeni obje tanıma testi sonuçları	54
4.13.	Serebellumdaki enfarkt alanının histolojik olarak bregmaya göre lokasyonu	55
4.14.	Serebellumun histolojik kesitleri	56
4.15.	Yürüme analizinde tedavi, aracı ve sham grubundaki adım uzunluğu ortalamaları ve standart hataları	57
4.16.	Yürüme analizinde tedavi, aracı ve sham grubundaki ön ve arka ayak adım genişliği ortalamaları ve standart hataları	58
4.17.	Yürüme analizinde tedavi, aracı ve sham grubundaki adımların üst üste gelme uzaklığının ortalamaları ve standart hataları	59
4.18.	Yürüme analizinde aracı, tedavi ve sham grubunda adım uzunluğu, genişliği ve adımların üst üste gelme uzaklığının standart deviasyonlarının ortalaması	60
4.19.	Aracı, tedavi ve sham grubu hayvanlarda statik rod testinde 6mmlik sopada düşmeden bitirme oranları	61
4.20.	Tedavi ve aracı grubun ızgara teli üzerinde yürüme testinde sağ ve sol ön ayak hata ortalamaları ve standart hataları	62
4.21.	Tedavi ve aracı grubun ızgara teli üzerinde yürüme testinde sağ ve sol arka ayak hata ortalamaları ve standart hataları	62
4.22.	Tedavi ve aracı grubun ızgara teli üzerinde yürüme testinde total sağ ve sol ayak hata ortalamaları ve standart hataları	63
4.23.	Yeni obje tanıma testi sonucunun grafiği	64
4.24.	Aracı grupta serebellumdaki enfarkt alanının histolojik olarak bregmaya göre lokasyonu	65
4.25.	Tedavi grubunda serebellumdaki enfarkt alanının histolojik olarak bregmaya göre lokasyonu	65

4.26.	Aracılı ve tedavi grubunun H&E ile boyanmış histolojik kesitler	66
4.27.	Aracılı ve tedavi grubunun DAPI ve “luxol fast blue” ile boyanmış ve üst üste getirilmiş histolojik kesitleri	67



TABLÖLAR

Tablo		Sayfa
2.1.	Trombolitik Kontrendikasyonları	12
2.2.	ROCK inhibitörleri ve kullanım alanları	27
2.3.	ROCK inhibitörlerinin yararları	31



1. GİRİŞ

Akut iskemik inme, beynin bir bölgesinde (tipik olarak vasküler alan) ani başlangıçlı kan akımının durması ve kan akımının durmasının neticesinde ilgili alanın işlevlerinin bozulmasına bağlı olarak ortaya çıkan klinik tablodur. Akut iskemik inme, serebral ya da serebellar arterin trombotik veya embolik tıkanması nedeni ile gelişmektedir.

İnme erişkin ölümünün 5. nedenidir ve engellilik nedeni ile önemli sosyal ve ekonomik maliyetleri olan bir hastalıktır. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 800.000 insan inme geçirmekte ve bu inmelerin 20.000'i serebellar inme olarak gözükmektedir.

İskemik inmenin modern acil tedavisinde, rekanalizasyon stratejileri önemli yer tutmaktadır. Alteplaz veya rekombinan doku plazminojen aktivatörü (rt-PA) ile yapılan tromboliz ile, tıkanan artere erken revaskülarizasyon sağlanarak iskemik penumbranın (metabolik olarak aktif, kan akımının azaldığı, fakat hücrelerin canlılığını koruduğu iskeminin periferindeki alan) korunması hedeflenmektedir. Trombolizin geniş kontrendikasyon penceresi, olası katastrofik yan etki profili ve inme geçirilmesinden sonra hızlı uygulama zorunluğu ise araştırmacıları yeni ilaç ve ilaç kombinasyonları aramaya itmektedir. Bu alanda en çok araştırılan ilaçlardan biri de Rho-bağımlı protein kinaz (ROCK) inhibitörleridir.

ROCK, hücrede stres fiber formasyonu, düz kas kasılımı ve hücre göçü gibi görevlerden sorumludur. Son dönemde yapılan çalışmalarda; ROCK'un serebral vazospazm, vasküler inflamasyon, hipertansiyon ve arteriolosklerozda önemli rol oynadığı öne sürülmüştür (1, 2). Bu yüzden; bir ROCK inhibitörü olan fasudilin iskemik inme tedavisinde yararlı etkileri olabileceğine inanılmaktadır. Yapılan deneysel çalışmada; doku plazminojen aktivatörü ve fasudil kombinasyon tedavisinin reperfüzyon sonrası ilk 7 günde iskemik inmede kullanılmasının, hemorajik transformasyondan koruduğu, mortaliteyi azalttığı ve lokomotor aktiviteyi arttırdığı gösterilmiştir (3). Literatürde fasudilin serebral inme üzerine etkileri araştırılmışken, serebellar inme üzerinde etkileri hiç incelenmemiştir. Biz de bu çalışmamızı, farelerde

oluşturulan fokal serebellar enfarkt modelinde, fasudilin inme tedavisinde yararlı etkileri olup olmadığını araştırmak için planladık.



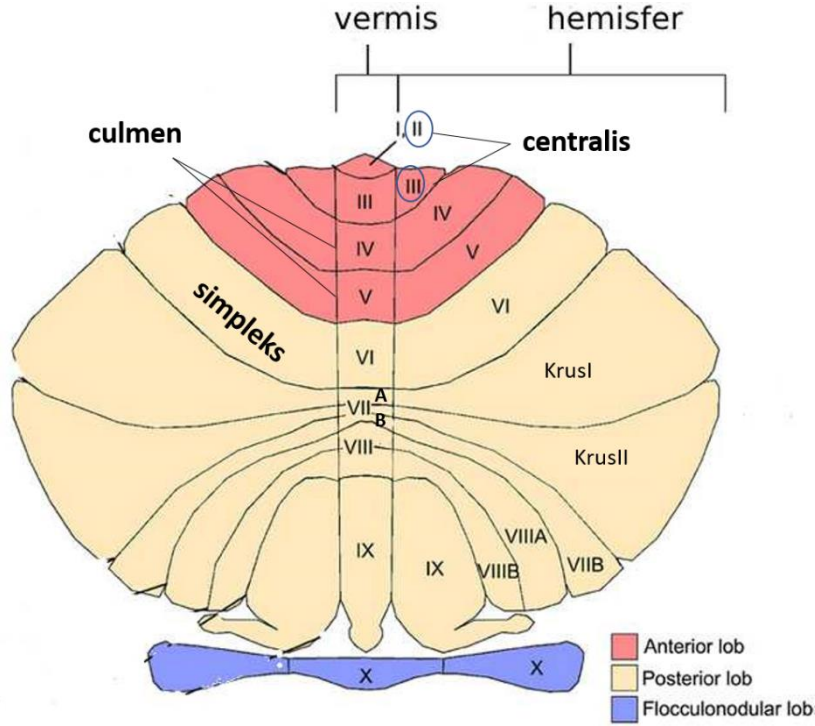
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serebellum

2.1.1. Serebellum Anatomisi ve Organizasyonu

Memelilerde serebellum, orta beyin ile arka beyinin birleşme yerindeki nöroepitelyal dokudan gelişmektedir. Anatomik olarak beyin sapının üstünde ve oksipital lobun arkasında yer almaktadır. Memelilerin serebellumunun ortasındaki vermis bölgesi ile en dıştaki flokkulus bölgesi birbirinden ayrı olarak gelişim göstermektedir. Vermis korpustan gelişmekte iken, flokkulus kulakçık ve hemisferlerden gelişmiştir. Vermis ve hemisferler birbirinin devamı yapılar halindedir. Bir teoriye göre hemisferler vermisin lateral uzantıları olduğudur (4).

Serebellar korteks, anteroposterior ve mediolateral akslarda anatomik yapılar bölünmüş olarak bulunmaktadır. Serebellum anterioposterior olarak incelendiğinde lob ve lobüllere bölünmektedir. Memelilerin vermisindeki folialar fissürlerle ayrılmış 10 lobüle bölünmüştür. Lobüller; anterior lob (I-V), posterior lob (VI-IX) ve flokulonodüler lob (X) olmak üzere üç lobda gruplanmıştır. Anterior lob spinoserebellum, posterior lob serebroserebellum, flokulonodüler lob ise vestibuloserebellum olarak da adlandırılmaktadır. Bu bilgiler ışığında, vermisin serebellar korteksi, dört yatay bölgeden oluşmaktadır: Anterior bölge (lobül I-V), santral bölge (lobül VI-VII), posterior bölge (lobül VII-VIII) ve nodüler bölge (lobül IX-X) (5). Bu dört bölge parasagittal şeritlere ayrılmaktadır (6). Hemisferlerde benzer bir düzen görülmektedir. Lobül II-III santral lobül, lobül IV-V kulmen ve lobül VI ise lobül simpleks olarak adlandırılmaktadır. Lobül VII ise lateral hemisferde krus I ve II olarak ayrılmaktadır. (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Serebellar korteksin lob ve lobüllerinin şematik resmi
 Şekilde serebellar korteksin katlanmamış hali resmedilmiştir. Bu resim "adil kullanım prensibi" altında D'Mello ve arkadaşları (2015) tarafından izin alınmasına gerek kalmaksızın kullanıma açılmıştır (7). Adil kullanım prensibi; araştırma, kritik etme, haber ve öğrenim kullanımları kapsar.

Serebellar korteks her ne kadar kompartmanlara ayrılrsa da, serebral korteksteği gibi bir yapılanma bulunmamaktadır. Tüm serebellar korteks üç hücre katmanından oluşmaktadır. En dıştaki molüker tabakada, Purkinje hücrelerin dendritleri ve granül hücrelerin paralel-lif aksonları bulunmaktadır. En içteki granüler tabaka, yoğun bir şekilde granül hücrelerin gövdeleri ve arada golgi hücrelerinden oluşmaktadır. Ortadaki tabakada ise, Purkinje hücrelerinin gövdeleri yer almaktadır. Bu üç tabakanın altında afferent ve efferent serebellar aksonları içeren beyaz madde bulunmaktadır.

Serebellar korteksin altında serebellar nükleuslar bulunmaktadır. Bu nükleuslar medialden laterale doğru; nükleus fastigii, nükleus emboliformis, nükleus globosus ve nükleus dentatus olarak sıralanmaktadır. Serebellar nükleuslar, serebellar korteksten gelen efferent uzantıları içerirler. Vermis fastigial nükleusa, vermis ve hemisferler arasındaki alan olan paravermis emboliform nükleusa ve lateral hemisferler dentat nükleusuna efferent uzantılarını göndermektedir.

2.1.2. Serebellumun Fonksiyonu ve Fonksiyonel Haritası

Serebelluma gelen afferent yolaklar inferior serebellar pedinkül ve medial serebellar pedinkül üzerinde ulaşmaktadır. En büyük afferent yolaklar yosunsu liflerdir ve dört ana kaynağı vardır:

1. Spinoserebellar yol: Medulla spinalis ve dış kuneat nükleus, vermisin anterior lobuna (lobül I-V) ve lobül VIII'e ipsilateral ve kontralateral afferent uzantılar göndermektedir.

2. Pontoserebellar yol: Pontin nükleusundan tüm serebelluma dağılan afferent yolaktır. Vermiste özellikle lobül VI-VIII' de sonlanmaktadır.

3. Vestibüloserebellar yolak: Birincil vestibüler kök lifleri, flokulonodüler lob ve vermisin lobül IX-X' da sonlanmaktadır.

4. Retiküloserebellar yolak: Lateral retiküler nükleus, serebelluma inferior serebellar pedinkül vasıtasıyla girerek tüm serebellar kortekse uzanmaktadır. Spinoserebellar ve vestibüloserebellar sistemlerin dağılımlarını benzer bir dağılımı vardır (8).

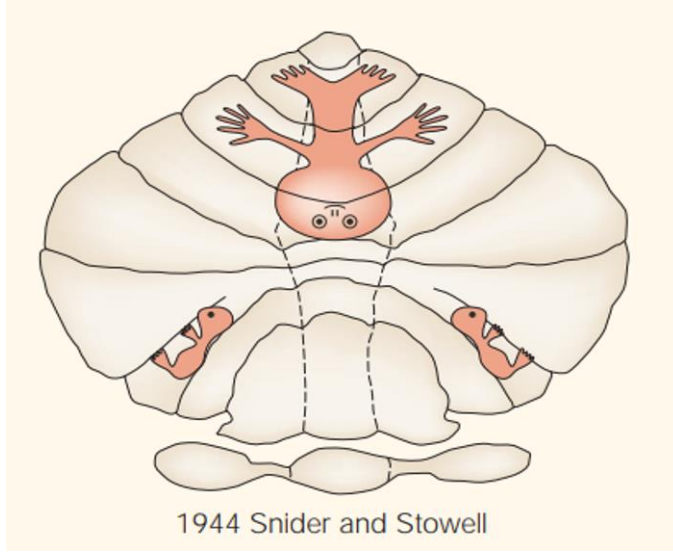
Yukarıda anlatılan bu yosunsu lifler, *sinaptik glomerül* adı verilen granüler katmandaki hücresiz adacıklarda son bulmaktadır. Yosunsu lifler glomerül içinde granül hücrelerin dendritleri ile glutamaterjik sinapslar yaparak, Purkinje hücrelerin dendritlerinin sinaps yapmasını sağlarlar.

İkincil en büyük afferent yolak inferior oliver nükleusa giden *tırmanan liflerdir*. Tırmanan lifler, beyin sapının tabanından karşıya geçerek inferior serebellar pedinkülden serebelluma giriş yaparlar. Daha sonra granül tabakasını çaprazlayarak direk moleküler tabakadaki Purkinje hücre dendritleri ile sinaps yaparlar. Bu liflerin iki önemli özelliği vardır. İlki, olivoserebellar yolağın parasagittal şerit organizasyonu vardır ki, her bir inferior oliver nükleus kendine özel parasagittal şeritteki Purkinje hücrelerini uyarmaktadır (9). İkincisi ise, her bir Purkinje hücresi sadece bir *tırmanan lif* tarafından uyarılmaktadır (10).

Serebellumun temel döngüsü, *tırmanan lifler* ve yosunsu liflerden oluşmaktadır. Bu iki lif de serebellar nükleuslarda eksitasyona neden olmaktadır. Bu eksitasyonun en güçlü inhibisyonu serebellar korteksten aşağı inen Purkinje hücre aksonlarıdır. Aynı şekilde bu lifler, serebellar ve vestibular nükleuslar tarafından da düzenlenmektedir. Bu düzenleme, Purkinje hücresinin bu nükleuslar üzerine gönderdiği inhibitör sinyallerle sağlanmaktadır.

Geleneksel olarak serebellar korteksin fonksiyonel haritalanması, çoğunlukla yosunsu liflerin geldiği alanlara tekabül etmektedir. Buna örnek olarak lobül I-V, spinoserebellar yolak ile uyarılmaktadır ve uzuvların hareketinden sorumludur. Lobül VI-VII, potinoserebellar yolak ile uyarılmaktadır ve serebral korteksten aldığı afferentler sayesinde hareketin planlanması, başlatılması ve zamanlaması ile ilgili bilgileri düzenlemektedir. Flokulonodüler lob ise vestibüler labirint ve vestibüler reflekslerden uyarı almakta, denge ve postürde görev almaktadır (8).

Bolk (1904), 60'dan fazla türün serebellumunu inceleyerek ilk defa serebellumun fonksiyonel haritası için ilk adımları atmıştır (11, 12). Daha sonraları Adrian (1943), kedilerde ve maymunlarda yaptığı serebellar kayıtlarda santral lobül (lobül II-III)'ün arka ayaklarla, kulmen (lobül IV-V)'in ön ayaklarla ve simpleks lobül (lobül VI)'ün ise yüz ile ilişkili olduğu bulmuştur (13). Snider ve Stowell (1944) ise, bu bilgilere ek olarak, işitsel ve görsel uyarıların lobül VI-VII ile ilişkili olduğunu saptamıştır (Şekil 2.2). Duysal liflerin kulmen, simpleks lobül ve santral lobülde sonlandığı gözükmemektedir (14). Yapılan son elektrofizyolojik çalışmalar geçmişte bulunan yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu işaret etmektedir. Aynı zamanda simpleks lobülün boyun kaslarını da kontrol ettiği ortaya çıkmış ve Bolk (1904)'un krus I ve II'nin ön ve arka ayakların koordinasyonunda rol aldığı bilgisinin artık doğru olmadığı ortaya konulmuştur (11).



Şekil 2.2. Snider ve Stowell' in serebellar fonksiyonel haritası
Şekilde işitsel ve görsel işlevlere yer verilmemiştir (11). Telif hakkı *Nature Reviews Neuroscience* dergisinden *Copyright Clearance Center* aracılığı ile 8 Temmuz 2018 de alınmıştır (Kullanma İzin hakkı numarası: 4384111434150).

Son yapılan çalışmalar, serebellumun motor fonksiyonları yanında motor olmayan -kognitif- fonksiyonları olduğunu da göstermektedir (15). Serebellumun posterior lobu, kognitif ve limbik işlevlere katkısı olduğu ve özellikle lobül VI - VII (krus I ve II)' nin motor olmayan işlevlerde düzenleyici görev aldığı düşünülmektedir (16). İnsanlarda yapılan çalışmalarda, hipokampusün krus I ile ilişkisi olduğu bulunmuş ve krus I'in çalışan ve uzaysal hafıza gibi öğrenme üzerine katkıları olduğu saptanmıştır (17).

2.1.3. Serebellar İnme

Fizyopatolojisi

Serebellum üç ana arter tarafından kanlanmaktadır. Distal vertebral arterden oluşan posterior inferior serebellar arter (PICA) serebellumun posterior yüzeyinin, baziller arterin dalından çıkan anterior inferior serebellar arter (AICA) iç işitme kanalının, baziller arterin sonlanmasıyla oluşan süperior serebellar arter (SCA) ise, serebellumun üst ve anterior yüzeyinin kanlanmasını sağlamaktadır (18). Literatürde serebellar enfarkt ile ilgili yapılan çalışmalarda, serebellumun SCA kanlanma bölgesinin daha fazla etkilendiği göstermektedir (19). Bu arterlerin oklüzyonuna bağlı

oluşan enfarkt alanın büyüklüğüne bağlı olarak serebellar enfarktlar, bölgesel ve mikroenfarktlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Bu üç arterlerden birisinin oklüzyonuyla, serebellumda 1,5 cm'den daha büyük oluşan enfarkt alanlarına "bölgesel enfarktlar" denilmektedir. Bölgesel enfarktlar, kalp veya arterioskleroza bağlı tromboembolilerde görülmektedir. Son yıllarda yapılan magnetik rezonans görüntüleme (MRG) çalışmaları, enfarkt alanı 1,5 cm ve daha küçük olan mikroenfarktların, bölgesel enfarktlardan daha sık olduğunu göstermektedir. Mikroenfarktların birçoğu serebellar kortekste yer almakta ve aterosklerotik veya tromboemboli nedenli oluşmaktadır. Bu mikroenfarktlar, büyük arterlerin distal kortikal alanında bulunmaktadır (20).

Serebellar enfarktların fizyopatolojisini anlamak için diffüzyon MRG ile yapılan çalışmalarda; enfarktın ilk üç gününde beyin ödeminin en yoğun olduğu dönem olup gerçek enfarkt büyüklüğünü göstermediği görülmektedir. Birinci haftanın ortalarına doğru, enfarkt büyüklüğü azalmakta ve 10. güne doğru psödo-normal (ödem belirgin azalmasıyla) hale gelmektedir. 10. günde nekroz, anjiogenez ve mikrogliya/makrofaj infiltrasyonu belirgin olarak gözükmemektedir. Birinci ve dördüncü haftalar arasında kontrastlı tutulumda enfarkt alanı gözükmemektedir. Dördüncü haftadan sonra hem bölgesel enfarktlarda hem de mikroenfarktlarda "kavitasyon" ile iyileşme görülmektedir (20).

Serebellar enfarktın etkilediği bölgeye bağlı olarak, klinik bulgular değişmektedir. Serebellumun anterior lobunun etkilendiği enfarktlarda, denge bozukluğu, ataksi, dismetri ve dizartri gibi motor bulgular ön planda gözükürken, posterior lobun etkilenmesinde yönetici işlev (planlama, değişme, sözel akıcılık, soyut akıl yürütme, çalışma belleği), uzaysal biliş (görsel uzamsal örgütlenme ve bellek) ve dilbilimsel sürece (agrammatizm ve disprosodiya) bağlı bulgular gözükmemektedir. Serebellumun posterior lobunun etkilenmesi ile pasif davranışlar, disinhibisyon, duygusal tutarsızlık, uygunsuz davranış, patolojik gülme ve ağlama nöbetleri gibi duygusal süreçlerin etkilendiği bozukluklar da görülmektedir (21).

Epidemiyoloji ve Klinik Bulgular

Dünyada her yıl 16,9 milyon insan inme geçirmektedir (22, 23). İnme geçiren hastaların yıllık insidansı, yaklaşık olarak 66-220/ 100.000'dir. Düşük ve orta gelirli ülkelerde inme daha sık görülmektedir (24, 25). Avrupa verilerinde yaşa göre düzenlenmiş insidansa göre, erkekler kadınlara göre 1,5 kat daha fazla inme geçirmektedir (26-28). İnme iskemik ve hemorajik olarak ikiye ayrılmaktadır. En sık görülen inme iskemik tipte olmaktadır ve bütün inmelerin %55-90'ından sorumludur (28-31).

Serebellar inmeler ise nadirdir ve bütün inmelerin %1-4'ünü kapsar (32-34). Amerika'da her yıl 20.000 hasta serebellar inme geçirmektedir. Genellikle vasküler topolojiyi izleyen bu inme türü; SCA, PICA ve AICA alanlarını ayrı ayrı veya kombine olarak etkileyebilmektedir (34, 35). PICA enfarktları, SCA enfarktlarından daha sık gözlemlenmektedir. AICA enfarktları ise çok nadirdir. Serebellar enfarktlı hastalarda en sık görülen semptomlar; baş dönmesi, dengesizlik, bulantı ve kusmadır (34, 36). Bulantı ve kusma, hastaların yarısında başdönmesi ve dengesizliğe eşlik etmektedir (34). Nistagmus, hastaların yarısında mevcuttur. Genellikle horizontal nistagmus gözlemlense de vertikal nistagmus da rastlanabilir. Hastaların %30-50'sinde, ipsilateral oksipital alanda baş ağrısı saptanır (34-36). Baş ağrısı, muhtemelen intrakraniyel ağrıya hassas bölgelerin akut distansiyon veya esnemesine bağlıdır. Baş ağrısının derecesinin artması, ödemin genişlemesi veya hemorajik transformasyonu düşündüren bir bulgudur. Ensede lokalize olan şiddetli baş ağrısı, vertebral arter veya PICA diseksiyonuna işaret edebilir.

Uzuvlardaki koordinasyon bozukluğu önemli bir bulgudur ve hastaların %60-70'inde meydana gelebilmektedir (35, 36). Serebellar enfarkta bağlı dizartri, süperior paravermal lezyonu göstermektedir. Dizartri bu sebep ile SCA enfarktlarında PICA enfarktlarına göre daha baskın ve siktir. AICA oklüzyonu, ilk olarak Adams (1983) tarafından tanımlanmıştır (37) ve SCA ile PICA oklüzyonundan farklı bir seyir izlemektedir. Hastalarda; vertigo, ataksi ve dizartri yanında tinnitus, ipsilateral fasiyal paralizi, işitme kaybı, trigeminal duyu kaybı ve Horner sendromu gözlemlenebilir.

Kontralateral uzuvlarda duyu kaybı veya hemiparezi, lateral pons etkilendiğinde beklenebilmektedir.

Prognoz

PICA alanını etkileyen enfarktların prognozu görece olarak benignedir. Kase ve arkadaşlarının (1993) yaptığı çalışmada PICA alanının tamamını etkileyen 36 hasta incelenmiş, dokuz hastada beyin kökü basısı, yedi hastada akut hidrosetalus saptanmış ve dört hasta serebellar ödemden dolayı kaybedilmiştir (32). Geniş enfarktlı hastalarda uzun süren başdönmesi veya yürüme dengesizliği olabilir. Parsiyel PICA alanı enfarktları hemen her zaman benign bir seyir izlemektedir ve vertigo veya başdönmesi haftalar veya aylar içinde kaybolmaktadır (38, 39). AICA veya SCA enfarktlarının eşlik ettiği PICA alanlarının enfarktlarının klinik prezentasyonu daha ağırdır ve sıklıkla pseudotumoral patern olarak kendini göstermektedir (40). PICA alanlarını etkileyen enfarktlarının beyin köküne kapsamı durumunda ise prognozu, beyin kökü etkilenimi belirlemektedir.

SCA alanı enfarktlarında pseudotumoral prezentasyon otopsi serilerinin %21'inde tespit edilmiştir (41). Kase ve ark.larına göre (1993)(35) hastaların %7'sinde psödotumoral prezentasyon koma ve ölüme neden olmuştur (32). Birçok hastada lezyon SCA alanını kısmen etkilemekte ve hem medial hem lateral SCA enfarktlarında prognoz benign seyretmektedir.

Yapılan bir otopsi serisinde AICA alanının enfarktlarından etkilenen hastaların %20'sinde pontisin masif ventromediyal etkilenimine sekonder olarak koma ile beraber tetrapleji geliştiği gösterilmiştir (34). Bu bulguya zıt olarak BT ve MR çalışmalarında izole AICA alanının enfarktlarında masif ödem gözlenmemiştir ve hastaların prognozu daha benignedir (42, 43). AICA bölgesinin enfarktlarında sıklıkla kayda değer alt bazal arter ateroskleroza yatmaktadır (44). Yaşayan hastalarda sıklıkla periferik fasiyal palsi, trigeminal duyu semptomları veya işitme kaybı gözlemlenir.

Tedavi

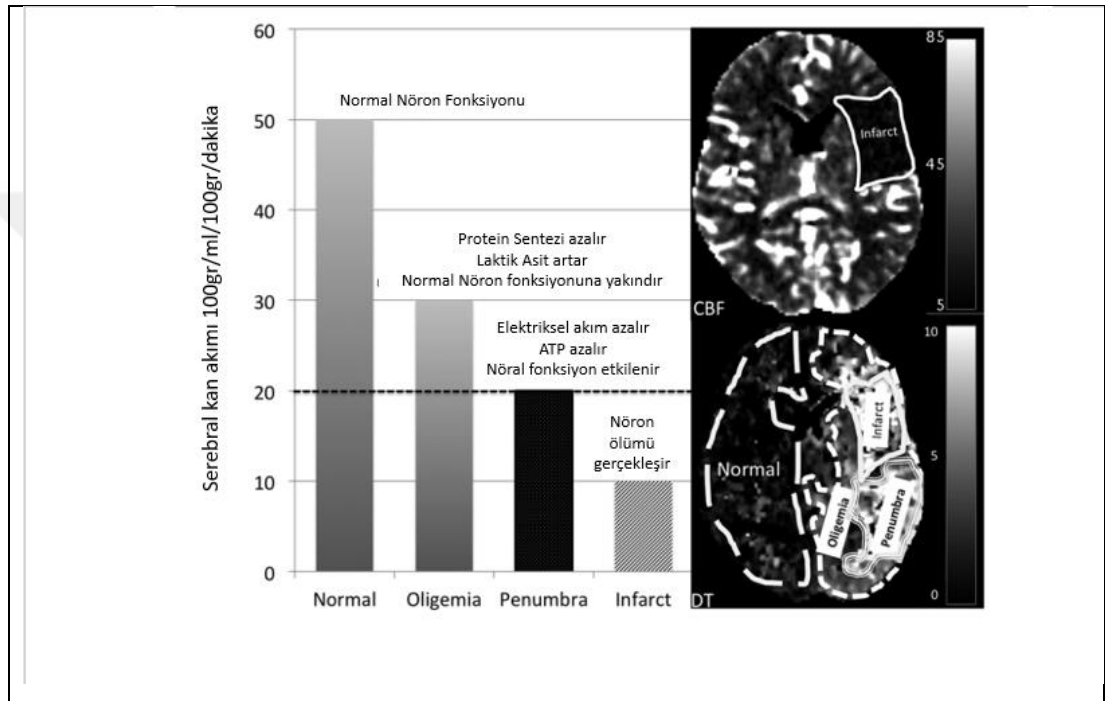
Serebellar enfarktın tedavisi tüm inmelerin tedavisi ile aynıdır. Akut iskemik inme hastalarında, hastaların prognozuna olumlu etki eden kanıtlanmış tek tedavi rekombinan doku plazminojen aktivatörü (rt-PA) ile yapılan intravenöz (i.v) trombolizdir (45). Trombolitik ajan pıhtının dağılmasına yardımcı olmakta ve iskemik beyin dokusuna kan akımını zamanında restore ederek nöronların ölümünü engellemekte ve klinik iyileşme sağlamaktadır. Rekombinan doku plazminojen aktivatörünün başarısından ötürü başka litik ajanlar da klinik çalışmalarda test edilmektedir. Randomize kontrollü çalışma ve meta analizler ile sağlanan kanıtlara rağmen akut iskemik inme ile başvuran hastalara ilk 3 saatte trombolitik verilme oranı çok düşüktür (7%) (46). rt-PA'nın kullanımının bu kadar düşük olmasındaki ana etmenler ajanın dar teropatik penceresi ve dahil etmeme/ hariç tutma kriterlerinin (Tablo 2.1) keskin olmasıdır.

Tablo 2.1. Trombolitik Kontrendikasyonları (47)

Kesin dışlama kriteri: İV tPA verilmez	Göreceli (bazı şart/durumlarda) dışlama kriteri, ama hastaların çoğu için İV tPA uygundur. İV tPA verilebilir
*Tedaviye semptom başlamasından sonraki 4,5 saat içinde başlanamayacak ise *Görüntülemeye herhangi bir tip akut (intraserebral, subaraknoid, subdural) kanama *BT'de demarke ve geniş hipodansite *Sistolik kan basıncı >185 mmHg veya diastolik kan basıncı >110 mmHg *Trombositopeni < 100.000/mm³ *INR > 1,7 *aPTT >40 saniye	*Başlangıç zamanının belirlenmemiş olması *Uyanma anında fark edilen inme *Son 3 ay içinde kraniyal/spinal cerrahi *Son 3 ay içinde kraniyal/spinal travma *Son 3 ay içinde iskemik inme *Son 3 hafta içinde gastrointestinal kanama *Son 3 hafta içinde genitoüriner kanama *Son 3 hafta içinde majör cerrahi *Son 2 hafta içinde majör sistemik travma *Son 1 hafta içinde komprese edilemeyecek arterlere ponksiyon *İntrakraniyal kanama öyküsü *Non-vitamin K antagonisti oral anti-koagülan kullanımı (son 48 saatte) *Son evre böbrek yetmezliği, diyaliz *İleri karaciğer yetmezliği, siroz *Aort diseksiyonu *İnfektif endokardit *Sistemik malignite *İntrakraniyal intraaksiyel tümör veya kitle *İntrakraniyal arteriovenöz malformasyon *Yaygın ön duvar ST elevasyonlu miyokard infarktüsü *Perikardit Son 7 gün içinde dural ponksiyon

Herhangi bir serebral arterin tam veya parsiyel tıkanmasına sekonder gelişen inme tüm iskemik inmelerin %80'inin nedenidir (48). Oklüzyon in-situ arteriyel tromboz, kardiyak veya daha proksimal arteriyel kaynaktan gelişen tromboemboli,

foramen ovale veya pulmoner arteriyo-venöz fistula varlığında venöz kaynaklı emboliye sekonder gelişmektedir. Pıhtının distalindeki beyin dokusunda kan akımı aniden ve ileri derecede azalmaktadır. Yapılam çalışmalarda etkilenen arteriyel alandaki serebral kan akımının değişken oranlarda düştüğü saptanmıştır. Etkilenen saha kan akımının azalmasına göre 4 bölgeye ayrılabilir. 1.Normal kan akımının olduğu bölge 2.Oligemi bölgesi 3.Penumbra bölgesi 4.Enfarkt bölgesi (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Kan akımı ve etkilenen sahaların gruplandırılması.

Şekilde: Farklı serebral kan akımının iskemik serebral hemisferdeki etkileri ve düşük kan akımının beyin dokusundaki etkileri gösterilmiştir (49). Telif hakkı *Ischemic Stroke Therapeutics* kitabının yayımcısı Springer Nature' den *Copyright Clearance Center* aracılığı ile 8 Temmuz 2018 de alınmıştır (Kullanma İzin hakkı numarası: 4384130989723).

Tıkanan arteriyel sahanın enfarkt bölgesinde nöronlar ve destek hücreleri oksijen ve glukoz yetersizliğinden ötürü ölür. Penumbra bölgesinde serebral kan akımı azalmıştır fakat nöral hücre ölümüne neden olabilecek kritik seviyeye düşmemiştir. Penumbra sahasının hacmi zaman ile azalmakta ve yerini infarkt alanına bırakmaktadır. Penumbra dokusunun kaderi serebral kollateral dolaşımın yeterliliği, serebral hücrelerin iskemiye toleransı ve pıhtının genişliğine bağlı olarak değişmektedir.

Streptokinaz (50-52), rt-PA (53-57), Tenecteplase (58) ve Desmoteplase (59-61) trombolitik ajan olarak inmede kullanılmıştır.

Rt-PA ikinci jenerasyon bir ajandır ve Ulusal Nörolojik Bozukluklar Enstitüsünün yapmış olduğu (NINDS) inme çalışmasından elde edilen veriler doğrultusunda FDA onayı alan tek trombolitiktir (62). Bahsedilen diğer trombolitiklerin klinik çalışmaları sürmekte veya deneysel olarak kullanılmaktadır. Akut iskemik inmede i.v. tromboliz zaman bağımlıdır.

Anterior ve Posterior Dolaşım İnmelerinde Tromboliz

İskemik inmelerin %20'si posterior dolaşım sahalarını etkilemesine rağmen Hastaların NINDS çalışma örnekleminde %5'i ve 3. Uluslararası İnme Deneyi (IST-3) çalışma örnekleminin %8'inde posterior dolaşım inmesi olan hasta tespit edilmiştir (38, 63). Ulusal Sağlık Enstitüsü İnme Skalası (NIHSS), posterior dolaşım inmeleri için sensitif değildir (64). Ataksi, nistagmus, diplopi ve disfaji gibi minör semptomları olan hastalara yapılan i.v. tromboliz uygulamasının etkinliği tartışmalıdır (38). IST-3 çalışmasında anterior ve posterior dolaşım inmeleri olan hastaların prognozu arasında fark görülmemiştir (49). Yapılan bir gözlemsel çalışmada ise posterior ve anterior dolaşım inmeleri karşılaştırılmış ve posterior dolaşım inmelerinde trombolizin daha iyi prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (65).

BT veya MR anjiyografi ile noninvazif olarak vasküler görüntülemenin posterior inme hastalarında da elde edilmesi ile posterior inmede tromboliz oranlarının artması beklenmektedir. MR-DWI görüntülemesi posterior dolaşım inmelerinin tanısının konmasında önemli bir araçtır ve erken trombolize karar vermeyi artırabilir.

Tedavi Komplikasyonları

1. İntraserebral Hemoraji

İntraserebral hemoraji intravenöz trombolizin en korkulan ve hayatı tehdit eden olası bir komplikasyondur ve kötü prognozludur. rt-PA uygulanmasının sonrasında geçen ilk 36 saat kritik olarak kabul edilmektedir. Çalışmalar plasebo ile

karşılaştırıldığında intravenöz tromboliz uygulanan hastalarda intraserebral hemorajinin daha sık olduğunu göstermektedir. NINDS çalışmasında intraserebral hemoraji, inme sonrası 36 saat içinde plasebo grubunda % 0,6, tromboliz grubunda ise % 6.4 hastada gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara rağmen ilk 3 ayda iv tromboliz alan hastalarında mortalite değişmemiştir. Alteplaz ile yapılan İnme Tedavilerinin Güvenli Uygulaması ve Uluslararası İnme Tromboliz Kayıtlarının İnternet Tabanlı Denetimi (SITS-ISTR) çalışmasında intraserebral hemoraji oranları ilk 3 saatte %1,5, 3-4.5 saatte %1.8 ve 4.5-6 saatte %2.6 olarak bulunmuş ve alteplase kullanımı onaylanmıştır (66). rt-PA kullanımında intraserebral hemoraji gelişimi için tanımlanan risk faktörleri yaş, BT’de gösterilen erken iskemik değişimler, antiplatelet tedavi, ve prezentasyondaki nörolojik defisitler olarak sayılabilir (67). Bahsedilen risk faktörleri olan hastalarda dahi rt-PA tedavisinin yararları risklerinden fazladır ve trombolitik tedavinin verilmemesini tek başına gerektirmez. İntraserebral hemoraji tromboliz uygulanırken ve sonrasında nörolojik durumları bozulan her hastada düşünülmelidir. Tanı için seçkin görüntüleme acil beyin BT’dir. Tedavi semptomlara yöneliktir (67) .

2. Sistemik Hemoraji

Ciddi sistemik hemoraji, NINDS çalışmasında i.v. rt-PA alanlarda %1,6 oranında görülmüştür (62). İ.v. trombolize, müdahale eden doktorun klinik kararı ile devam edilebilir. Kompartman sendromu ve ileri kan kaybı sıkı gözlem ve ileri müdahale gerektirebilir. Gastrointestinal veya retroperitoneal majör kanama şüphesinde ise trombolitik tedavi sonlandırılmalıdır (62).

3. Reperfüzyon Hasarı

Başarılı rekanalizasyon sonrasında görülen nadir bir komplikasyon da serebral reperfüzyon hasarıdır. Bu hiperperfüzyon erken dönemde görüldüğünde klinik öneme sahip değildir (62).

4. Orolingual Anjiyoödem

Orolingual anjiyoödem (OLAE) i.v. rt-PA uygulaması sonrası görülen görece nadir bir komplikasyondur ve hastaların %1,3-5,1’ini etkileyebilir. OLAE’nin angiotensin dönüştürücü enzim inhibitörü kullanımında riski 13,6 kat arttırmaktadır

(68). Hastaların bir bölümünde uygulama anında, bir bölümünde ise uygulama sonrasında semptomlar gelişebilir. Hastalarda genellikle dilin veya dudakların tek tarafında geçici ödem ve şişlik görülmektedir. İlk yapılacak tedavi hala daha tam belirlenmemiştir bu yüzden standart anafilaksi tedavi uygulanması önerilmektedir. Bu tedavi seçenekleri litik tedavinin kesilmesi, oksijen verilmesi, kortikosteroid, antihistaminergik ilaç ve adrenalın uygulamasıdır (62).

2.2. Rho kinaz

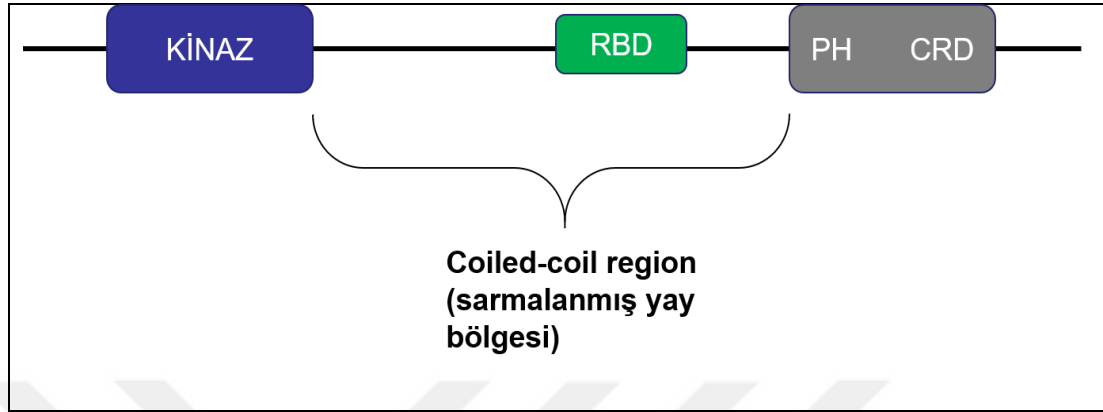
2.2.1. Giriş

Rho kinaz ilk olarak küçük GTP'azların efektörü olarak tanımlanmıştır ve aktinomiyozin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinde majör role sahiptir (69, 70). Rac ve Cdc42 gibi Rho ailesi küçük GTP'azlar, hücre iskeletinin reorganizasyonunu farklı yollar ile düzenlemektedir (71, 72). Bu GTP'azların işlevleri, aktin filamanları üzerine olan etkileri göz önünde bulundurularak araştırılmaktadır. Rho, stres fiber formasyonu ve hücre kontraksiyonunda rol alırken, Rac ve Cdc42 ise lamellipodya ve filopodya formasyonunun düzenlenmesinde görev alırlar (54). Rho ailesi GTP'azları, mikrotübül dinamiğini ve hücre polaritesini de modüle eder. Rho-kinaza ek olarak miyozin fosfataz subunit 1 (MYPT1), miyozin hafif zincir (MLC) fosfataz mDia, protein kinaz N (PKN), sitron, sitron-kinaz, Rhotekin, ve Rhophilin gibi birçok Rho efektörü tanımlanmıştır. Bu efektörler Rho aktivasyonunu takiben senkronize olarak etkilerini göstermektedir. Bu etkileşimlere örnek olarak MYPT1 ve mDia'nın Rho aktivasyonu sonrası stres fiber ve fokal adezyon formasyonuna katılması verilebilir (73, 74).

2.2.2. Domain yapısının aktivasyon ve inhibisyonunun yapısı ve modelleri

Rho-kinaz, protein kinazların AGC ailesine ait bir serin/treonin kinazdır. Yapısı miyotonik distrofi kinaz (DMPK) ve miyotonik distrofi kinaz-bağlı CDC42-binding kinaz ile ilişkilidir (MRCK). Rho-kinazın iki üyesi vardır ve bunlar Rho-kinaz a/ROCK2/ROK α ile Rhokinaz b/ROCK1/ROK β 'dir. Her iki üyede Rho-Kinaz ismi verilmektedir. Rho kinaz; N-terminal katalitik bölge, ortada sarmalanmış yay bölgesi ve sisteinden zengin bölge ile kesintiye uğrayan C-terminal PH bölgesinden

oluşmaktadır (Şekil 2.4). Rho, Rho-kinazı, sarmalanmış yay bölgesi C-terminal parçasına bağlanarak etkinleştirmektedir.



Şekil 2.4. Rho kinaz'ın yapısı

Şekilde: Her domaini belirleyen amino asit sekansları gösterilmiştir. RBD: Rho-bağlayıcı bölge, PH CRD: Karboksi terminal

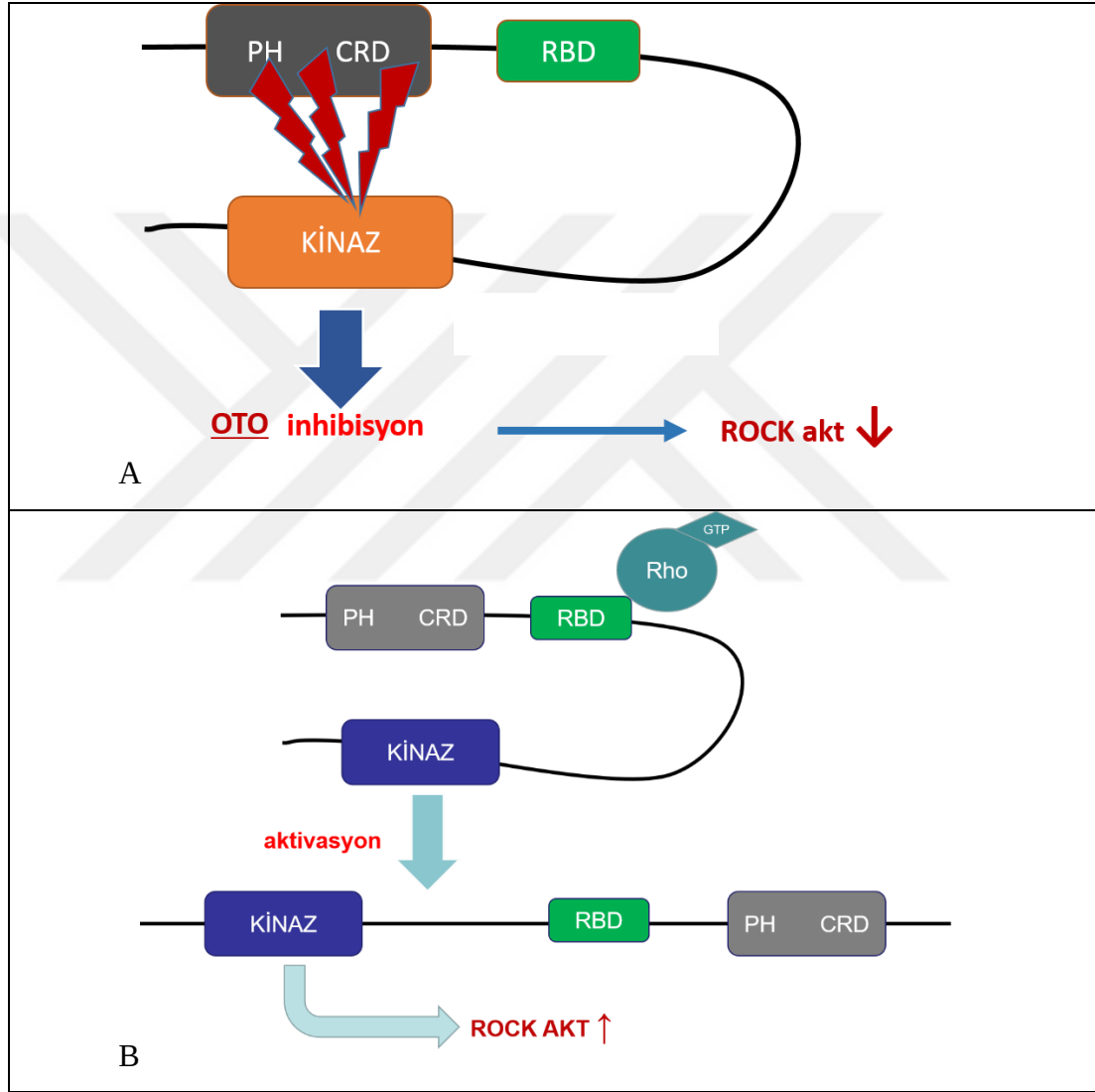
2.2.3. Kristal Yapısı

Rho-kinaz katalitik domainin eşsiz özellikleri kristal yapılar üzerine yapılan çalışmalar ile ortaya çıkarılabilmektedir. Rho-kinazın katalitik domainin dışında yer alan N ve C terminal eklentileri intermoleküler başabaş homodimer oluşturmakta ve bu homodimeri aktif yapıda tutmaktadır (75, 76). Rho-kinazın Rho-bağlanma yeri de rho-kinazın paralel şekilde dimerize olduğu düşüncesini destekler şekilde, paralel sarmalanmış yay yapı olduğunu göstermektedir (77, 78). Bu bağlamda Rho-kinaz hücrede multimer olarak bulunmaktadır (79).

2.2.4. Aktivasyonu ve İnaktivasyonu

Rho-bağlanan bölgeyi içeren C-terminal ve PH bölgeleri, Rho-kinazın negatif düzenleyici bölgeleridir. Aktif Rho (RhoGTP) ve Rho-bağlanan bölgenin inhibisyonu iki yolla gerçekleşebilir: (1) Rho kinazın aktivasyonu ile sonuçlanan C-terminal kısmının delesyonu (53, 80) (2) hem in-vitro hem in-vivo çalışmalarla gösterilen asli aktif katalitik fragmanın C-terminal segmenti tarafından inhibisyonu (81). Rho'ya ek olarak arşidoinik asit gibi bazı lipidler Rho-kinazı PH bölgesi aracılığı ile aktive edebilir (Şekil 2.5-A-B) (82). C-terminalinin kaspaz-3 ve granzim-3 ile proteolitik yıkımı da ROCK1 ve ROCK2'yi aktive ederek, apoptoz süresince plasma membran

kabarcıklanmasına neden olabilir (83). Rho - Rnd3/RhoE, Gem ve Rad'ın yanısıra diğer küçük GTPazlar da Rho-kinazdaki Rho-bağlanan bölge dışından bağlanarak işlevini inhibe edebilmektedir (84, 85). PDK1'in RhoE ile yarışmacı olarak ROCK1'e doğrudan bağlandığı ve ROCK1'in RhoE'den ayrılmasına yol açarak ve aktive ettiği gösterilmiştir (86).

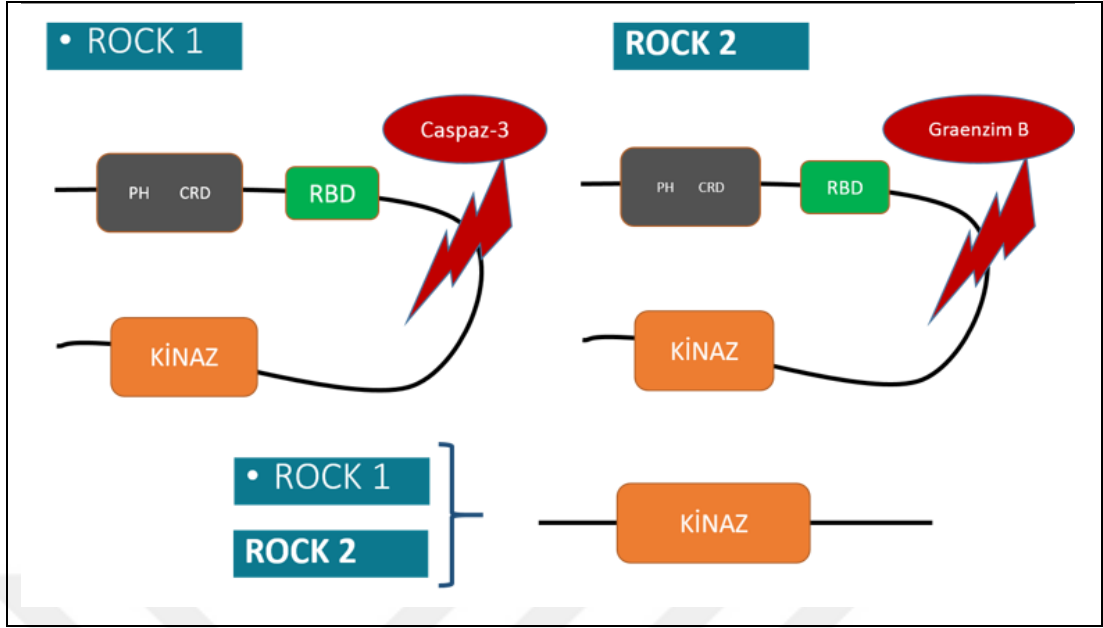


Şekil 2.5. ROCK aktifleşmesi

Şekilde A: Rho'nun katalitik amino terminali ile otoinhibitör karboksil terminali arasındaki ilişki gösterilirken; B: Aktif Rho'nun bağlanmasıyla katalitik amino terminali ile otoinhibitör karboksil terminali arasındaki etkileşimi bozulması gösterilmektedir. RBD: Rho-bağlayıcı bölge, ROCK:Rho-kinaz, PH CRD:Karboksi terminal.

2.2.5. Rho-kinaz 1 ve Rho-kinaz 2

ROCK1 ve ROCK2'nin yapılarında %64 oranında amino asitleri aynıdır. Kinaz bölgesinde ise bu benzerlik %83'e çıkmaktadır. Bu durum ROCK1 ve ROCK2'nin substrat spesifitesini düşündürmektedir. Her iki Rho-kinaz proteinleri birçok hücrede devamlı olarak üretilmektedir. ROCK2 seviyeleri, beyin ve kaslarda daha yüksek gözlenirken, ROCK1 seviyeleri karaciğer, akciğer ve testis gibi nöron dışı dokularda daha sık gözlemlenmektedir (87, 88). Günümüzde ROCK1 ve ROCK2'nin işlevlerindeki birtakım farklılıklar tanımlanmıştır. ROCK1 özellikle caspase-3, ROCK2 ise granenzim B tarafından yıkılmaktadır (c-terminal inhibitör bölgesi çıkarılır) (89, 90) (Şekil 2.6). RhoE daha çok ROCK1'e bağlanmayı tercih etmekte, MYPT1 ise sadece ROCK2'ye bağlanmaktadır (91, 92). ROCK1 stres fiberlerinin formasyonu için esansiyeldir ve ROCK2 fagositoz ve hücre kontraksiyonu için gereklidir. Her iki işlev de MLC fosforilasyonuna bağımlıdır (79). Homozigot ROCK1 veya ROCK2 alellerinde delesyonu olan farelerde embryonik veya postnatal ölüm görülür. Heterozigot fareler ise fertildir ve normal görünümündedir (93, 94). Bu farklı Rho-kinaz proteinlerinin neden hücrelerde farklı miktarda ve tipte üretildiği ortaya konamamıştır.



Şekil 2.6. ROCK'un izoformlarının yıkımının gösterilmesi
RBD: Rho-bağlayıcı bölge, ROCK1: Rho-kinaz1, ROCK2: Rho-kinaz2, PH CRD: Karboksi terminal.

2.2.6. ROCK işlevleri

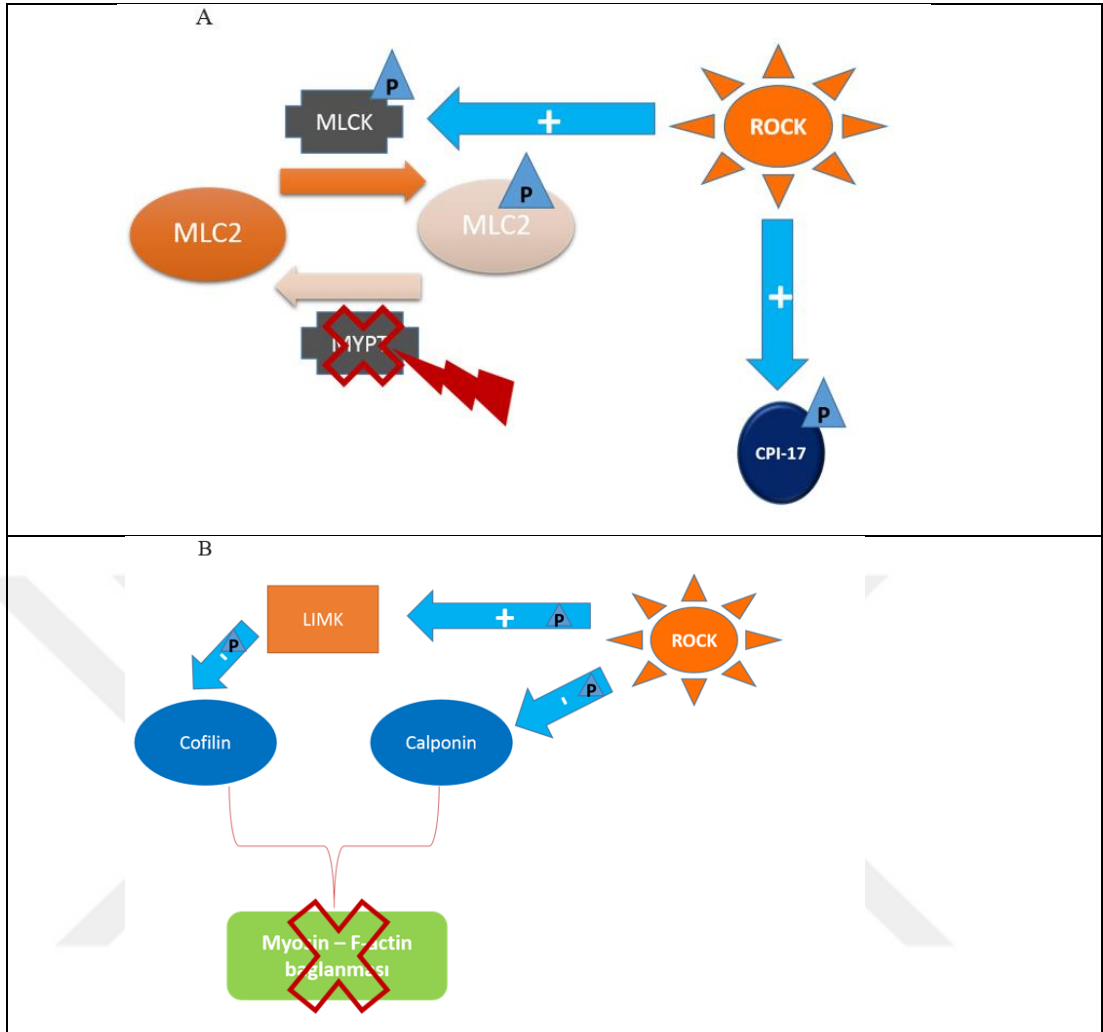
Aktin Hücre İskeleti

Aktin özellikle ökaryotlarda bol miktarda bulunan bir proteindir. Hücre fizyolojisinin çeşitli alanlarında etkisi olan bu proteinin hücre migrasyon, proliferasyonu, nöron uzaması ve vezikül trafiğini düzenlediği bilinmektedir. Hücrelerde monomerik/globüler G-aktin veya polimerik/filamentöz F-aktin olarak bulunabilmektedir. Aktin filamanları helikal yapıda çift sarmal polimer oluşturmak üzere birleşen G-aktin ipliklerinden oluşur. Aktin filamanları çok dinamik yapılardır ve hücresel olaylara paralel olarak sürekli polimerize ve depolimerize olurlar. Hücrede, aktin iskeletinin sağladığı dinamik morfolojik değişimlere ek olarak, aktin psödo-stabil stres lif yapısı da oluşturabilmektedir.

Stres lifleri aktin çapraz bağlanmış proteinlerin ve miyozin II moleküler motorların birbirlerine bağlanması ile meydana gelen F aktin demetlerinden oluşan makro-moleküler birleşimlerdir. Bu yapılar plazma membranına fokal adezyonlar ile bağlanmakta ve F-aktinin-miyozin antiparalel hareketi ile kasılma gücü oluşturmaktadır. ROCK proteinleri, ürünleri ile beraber, stres lif birleşiminin ve diğer

işlevlerinin regülasyonu için önemli efektörlerdir. Dominant negatif ROCK1 veya ROCK2 ekspresyonu (82, 95) veya küçük molekül inhibitörü olan Y-27632 uygulanması; lizofosfatidik asit bağımlı stres fiber formasyonunu ve fokal adezyonu inhibe etmektedir (96).

ROCK 'un özellikle damar düz kası üzerindeki fonksiyonu çok önemlidir. ROCK'ların miyozin II'yi fosforile etmesi, aktivitesini ve F-aktine bağlanmasını artırmaktadır. ROCK, hem miyozin hafif zincir kinazı direkt fosforile ederek hem de CPI-17'i fosforilasyonu üzerinden miyozin fosfatidazı inhibe ederek miyozin hafif zincirin defosforile olmasını engeller. Her iki yolla da ROCK damar düz kasın kontraksiyonunu sağlar (Şekil 2.7 - A). ROCK damar düz kası üzerine etkisi sadece miyozin hafif zincirin fosforile olması ve fosforilasyonunu korumasıyla sınırlı değildir. Normalde cofilin ve calponin adlı iki molekül miyozin ve aktin bağlanması inhibe etmektedir. ROCK ise calponin'ni fosforile ederek inhibisyonunu, LIMK'ı fosforilere ederek cofilin inhibisyonunu sağlamakta ve myozin aktin bağlanmasını sağlamaktadır (Şekil 2.7 - B) (97).



Şekil 2.7. Stres filaman yapımında ROCK'un rolü
MLCK: Miyozin hafif zincir kinaz, MLC2: Miyozin hafif zincir 2, MYPT: Miyozin fosfatofataz, LIMK: LIM kinaz.

Hücre Göçü

Hücre göçü hücresel progresif hücre hareketini meydana getiren bir çok önemli olay neticesinde gerçekleşmektedir (98). Bu basamaklar öncü kenar jenerasyonun ile hücresel polaritenin sağlanması, aktin ve tubülden zengin bir yol açıcı yapının oluşması (bu yapı ile adhezyon kompleksleri aracılığı ile substratum kancalanmaktadır), hücre gövdesinin aktinomyosin kompleksi ile kasılmasıdır. Kasılma ile hücrenin anterograde hareketi sağlanır. Rho-ROCK sinyallerinin hücre göçüne katılımı, çalışılan hücre serisine bağımlı olarak değişmektedir. Bir küçük molekül inhibitörü olan Y-27632 kullanılarak ROCK1 ve ROCK2 inhibisyonun sağlanması ile monosit (99), makrofaj, nötrofil (100), insan umbilikal ven endoteli

(101), düz kaslar (102), trofoblastlar(103) ve prostat hücrelerinin (104) göçü azalmakta fakat HeLa veya Vero hücrelerine (105) Y-27632'nin bir etkisi olmamaktadır. Bu bulgulara zıt olarak ROCK1 ekspresyonunun azalması makrofaj ve nötrofil migrasyonunu artırmaktadır. ROCK proteinlerinin hücre göçünün önemli bir prosesi olan, aktinomyozin bağımlı hücre kasılmasının bilinen indükleyicileri olmasına rağmen monosit ve prostat hücre göçünün düzenlenmesindeki görevleri aktivitelerinden bağımsızdır (106).

Hücre göçü veya göç ilişkili birçok ROCK substratı tanımlanmıştır. Tanımlanan bu substratların fosforilasyonu hücre şeklinin değişimini migratuar hücre fenotipleri ile paralel olarak indüklemektedir ve hücrelerin birçoğunda hücre göçünün ROCK'lar tarafından desteklendiği düşünülmektedir. Günümüzde araştırmalar daha çok ROCK aktivitesini düzenleyen küçük molekül inhibitörlerine yönelmiştir.

Hücre Proliferasyonu

DNA bütünlüğünün sağlanması ve doku homeostazının korunmasının gerekli olduğu ökaryotik hücre bölünme siklusu yaşamın devamında esansiyel bir süreçtir. Birçok çalışmada ROCK proteinlerinin hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde rolü olduğu ve ROCK'un özellikle hücre siklusunun G1/S fazı ve mitozda aktive olduğu gösterilmiştir (107).

ROCK aktivasyonu c-myc'in hedef molekülü olan b-katenin ekspresyonunun artışı indüklemekte ve fare epidermisinde hücre proliferasyonunu tetiklenmektedir. Bu bilgilere zıt olarak ROCK aktivitesinin inhibisyonu sitokinezi ertelemekte ve G1 fazında sentriyollerin aberan segregasyonunu ve prematür sentrozom migrasyonunu mitoz süresince artırmaktadır (108, 109). Bu veriler ROCK aktivitesinin hücre siklusunun spasyotemporal düzenlenmesinde önemli olduğunu göstermektedir.

Hücre siklusunun G1-fazı kontrol noktasıdır. Bu kısıtlama noktasında DNA entegritesi değerlendirilmekte ve hücrenin hücre siklusuna mı yoksa sessiz G0 fazına mı döneceği belirlenmektedir. NIH-3T3 fibroblastlardaki Ektopik ROCK

ekspresyonu hücrenin S fazına girmesini stimüle etmekte ve G1/S fazı bağımlı siklin D1 protein seviyelerini artırmaktadır (110).

ROCK aktivitesinin inhibisyonu ise kornea epiteli ve gastrik hücrelerde G1/S faz geçişini bozmaktadır (111). Kardiyomiyositler üzerine yapılan çalışmalarda da bu gözlem desteklenmiş ve ROCK inhibisyonunun G1/S fazı geçişine bağımlı proteinler olan siklin D3, siklin-bağımlı kinaz 6 ve p27'nin ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (112).

ROCK proteinleri sitokineзде aktive olmaktadır ve aktinden zengin bölünme çizgisi formasyonuna katılmaktadır (98). ROCK protienleri ayrıca bölünme çizgisi altındaki intermediate filamanların yıkımını da sağlayabilmektedir (113). ROCK etkinliğinin inhibisyonu kardeş hücre segregasyonunu inhibe etmekte (98) ve ROCK aktivitesinin düzenlenmesinin sitokinezin tamamlanmasındaki önemli rolü olduğu düşüncesini desteklemektedir. Bazı ROCK substratları da hücre proliferasyonunun kontrolünde etkilidir.

2.2.7. ROCK inhibitörleri

ROCK aktivitesinin çeşitli patolojik durumlarda arttığına dair birçok rapor olmasına rağmen ROCK aktivitesine etki eden moleküler mekanizmalar ve ROCK'un bütün akış yönündeki hedefleri netleştirilememiştir. ROCK delesyonlarına doku spesifik gen hedefleme yolu ile genetik yaklaşımın, ROCKların patofizyolojik rollerini daha net göstermesi beklenmektedir. ROCK'ların kardiyovasküler ve merkezi sinir sisteminin gelişimine olan kritik etkisi nedeni ile hem ROCK1-/- hem de ROCK2-/- farelerde embriyonik evrede ölüm görülmektedir. Bu iki farenin ölüm fenotipi ise birbirinden farklıdır. ROCK1 -/- farelerde, filamentöz aktin birikimin bozulması nedeni ile omfalosel gelişimine bağlı olarak fareler doğumdan hemen sonra ölmektedir. ROCK1-/- fare gözü aynı zamanda aktin filamanların göz kapağı epiteline olan olumsuz etkisi dolayısı ile açıktır. ROCK2 farede ise plasentanın labirent tabakasında yaygın trombüs oluşumuna bağlı olarak intrauterin büyüme geriliği nedeni ile fare ölmektedir (114).

Mevcut bulgular ROCK1 ve ROCK2'nin kaskad yönündeki hedeflerinin ve dokulardaki dağılımının farklı olduğunu göstermektedir. Yapılan ilk çalışmalarda ROCK1 inhibitörlerinin kardiyak hipertrofiyi engellediği düşünülürken, ROCK1-/- farelerde kardiyak hipertrofi görülmekte ama kardiyak fibrosis görülmemektedir (115-118). ROCK2 ise kardiyak hipertrofiden sorumlu olabilir. Non selektif ROCK inhibitörlerinin sistemik kan basıncını düşürdüğü bilinmektedir (119).

ROCK'ın vasküler işlev ve inflamatuvar durumunlarla olan çeşitli ilişkilerinden ötürü selektif ve nonselektif ROCK inhibitörlerinin geliştirilmesi farmosötik sanayinin ilgisini çekmektedir. Günümüzde Y-27632 ve fasudil non-izofom selektif ROCK inhibitörleri olarak kullanılmakta ve bu ajanlar ATP-bağımlı kinaz bölgelerini hedeflemektedir. Fasudil ve Y27632, ROCK1 ve ROCK2 ayırımını yapamamaktadır. Yüksek dozlarda ise bahsedilen ROCK inhibitörleri PKA ve PKC gibi serin-threonin kinazları da inhibe edebilmektedir (120). Diğer kinazlar ile karşılaştırıldığında fasudil ve aktif metaboliti olan hidroksifasudil ROCKlar için daha selektiftir ve hidroksifasudil de fasudil ve Y27632'ye nazaran daha selektiftir(112). ROCK'lar ile karşılaştırıldığında PKA'nın IC50 (maksimal inhibisyonu sağlayacak konsantrasyonunun yarı değeri) değeri fasudil için 5 kat hidroksifasudil için ise 50 kat daha yüksektir (112).

ROCK İnhibitörlerinin Hastalıklardaki Yeri

Fasudil gibi nonizofom selektif ROCK inhibitörlerinin subaraknoid kanama sonrası vazospazmdan koruduğu gösterilmiştir (121). Y-27632 ile yapılan hayvan çalışmalarında ise bu ajanın vasküler yaralanma sonrası ateroskleroz ve arteriyel remodelling gelişimini inhibe ettiği tespit edilmiştir (122). Hiperglisemi, ROCK aktivitesini arttırarak PAI-1 ekspresyonu azaltır ve bu nedenle ROCK diyabetik hastalardaki kardiyovasküler hasarın temel nedenlerinden biri olabilir (123). RhoA/ROCK yolunun anjiogenez, serebral iskemi, erektil disfonksiyon, glomeruloskleroz, hipertansiyon, miyokard hipertrofisi, miyokardiyal iskemi/reperfüzyon hasarı, neointima formasyonu, pulmoner hipertansiyon ve vasküler “remodelling” ile ilişkisini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (124). ROCK inhibitörlerinin Alzheimer hastalığı, bronşiyel astım, kanserler, demiyelinizasyon

hastalıkları, glukom ve osteoporoz ile sistemik hipertansiyon, pulmoner hipertansiyon, vazospastik anjina, stabil efor anjina, inme ve kronik kalp yetmezliği tedavisinde kullanımı ile klinik gelişim görülmüştür (124). Yapılan birçok çalışmada inhibitörlerin, ROCK'un her iki izoformu üzerine olan inhibisyonunun yararlı etkisi gösterilmiş olsa da hangi izoformun inhibe olması ile hangi yararın görüldüğü bilinmemektedir. Potansiyel klinik önemine rağmen insan kullanımı için Japonya'da onaylanan tek ROCK inhibitörü fasudildir.

Fasudilin klinik gelişimi kuinolin veya izokuinolin türevlerinin kalmodulin inhibisyonuna olan etkisinin araştırılmasına dayanmaktadır. Fasudil normal ve spastik arterlerin vazodilatör aktivitesini ölçen ve izokuinolin sulfonamid türevlerinin kimyasal taraması ile bioassayler kullanılarak geliştirilmiştir. Fasudilin hidroksil formu olan hidroksifasudil, fasudil ile aynı ROCK aktivitesine sahiptir. Fasudilin insanlardaki yarı ömrü yaklaşık olarak 30 dakika, hidroksifasudilin ise 5 saatin üzerindedir. Günde iki kere alınan fasudil ile yeterli ROCK inhibisyonu olduğu gözlemlenmiştir. İnsan plazmasında fasudil ve hidroksifasudilin proteine bağlanmayan serbest kısmının oranı %50'nin üzerinde saptanmıştır. Serbest formun yüksek miktarlarda olması ilacın hedef organlara daha kolay yayılmasını sağlamakta ve efikasisini artırmaktadır. 1995 yılında Japonya ve Çin'de subaraknoid kanama sonrası gelişen serebral vazospazmın giderilmesi için kullanımı onaylanan fasudil, Japonyada 100.000'inin üzerinde hastanın tedavisinde kullanılmıştır (125).

Fasudil, iskemik inmede kullanımında da plasebo ile karşılaştırıldığında anlamlı bir yan etki profili sergilememiştir (126). Günümüzde selektif ROCK inhibitörü olarak akut inme ve pulmoner arter hipertansiyonu gibi patolojilerde kullanımı geliştirilmektedir. ROCK inhibisyonun hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıklara olan faydaları prelinik çalışmalarla ortaya konması üzerine biyoteknoloji ve farmasotik şirketleri yeni selektif ve nonselektif ROCK inhibitörleri geliştirmektedir (Tablo 2.2). Bu ajanların birçoğu henüz keşif aşamasındadır. Gelecekte ROCK inhibisyonunun kardiyovasküler riski olan insanlardaki etkisine yönelik verilerin artacağı beklenmektedir.

Tablo 2.2. ROCK inhibitörleri ve kullanım alanları (125)

İnhibitör İsmi	Selektiflik	Tedavi Alanı	Fazı
Fasudil	NS	Serebral vazospazm, akut inme, anjina, pulmoner hipertansiyon	Serebral vasospazm (Japonya). Diğer faz 2.
Y27632	NS	Reperfüzyon hasarı, hipertansiyon inme, astım, kanser	İnsan kullanımı yok
Y39983	B	Glokom	Faz 1
Wf-536	B	Kanser	Keşif Fazı
Slx-2119	NS	Ateroskleroz, fibrosis, solid tümörler	Keşif Fazı
Azabenzimidazole-aminofurazans	NS	Hipertansiyon, antiinflamasyon	Keşif Fazı
DE-104, Olefinler, Isoquinolineler, Indazoller, pyridinealkene türevleri	NS	Glokom	Keşif Fazı
H-1152	NS	Glokom	Keşif Fazı
ROCK α inhibitör	B	Astım, Kardiyovasküler hastalık, erektil disfonksiyon, glokom, HIV, osteoporoz	Keşif Fazı
XD-4000	ROCK2	Ateroskleroz, fibrosis, solid tümörler	Keşif Fazı
HMN-1152	B	İşitme kaybı, tinnitus, hipertansiyon, serebrovasküler hastalık	Keşif Fazı
4-(1-aminoalkyl)-N-(4-pyridyl) cyclohexane-carboxamideleri (Oral)	NS	Nörodejeneratif Hastalıklar	Keşif Fazı
Rhostatin (İlaç implantı, rekombinan protein)	B	Solid tümörler	Keşif Fazı
BA-210	B	Maküler dejenerasyon, spinalyaranma, glokom, kanser	Faz 2
BA-207, BA-215, BA-285, BA-1037	B	Kardiyovasküler, maküler dejenerasyon, kanser	Keşif Fazı
Ki-23095	B	Kardiyovasküler ve renal hastalıklar	Keşif Fazı
VAS-012	B	Kanser	Keşif Fazı
ROCK İnhibitor (quinazoline)	B	Kanser	Keşif Fazı

NS: non-selektif, B: bilinmiyor

ROCK İnhibitörlerinin Serebral İskemideki Rolü

ROCK inhibisyonunun iskemiden koruma mekanizmaları, muhtemelen iskemi paradigmalarına göre değişmektedir. Fokal serebral iskemide en önemli doku ve işlev prognozunu belirleyen serebral kan akımı azalmasının süresi ve ciddiyetidir. Diğer faktörler ise nöral ve glial hücrelerin iskekiye sensitivitesi, inflamasyon ve iskemik ödemin seviyesi, plasitite aracılığı ile işlevin geri kazanılma kapasitesidir.

Birçok çalışma, ROCK inhibitörlerinin serebral kan akımını tek bir doz sonrası yükselttiğini göstermiştir. ROCK inhibisyonunun akut serebral hiperemik etkisi doz bağımlı hipotansif etkileri nedeni ile sınırlanmaktadır. Düşük dozlar hipotansiyona neden olmaz iken yüksek dozlarda serebral kan akımı sistemik kan basıncının düşmesi nedeni ile azalmaktadır (127). Serebral kan akımındaki azalma sistemik kan basıncındaki düşmenin beklenen seviyede olmamasından ötürü ROCK inhibitörlerinin serebral damarlarda sistemik damarlara göre daha potent vazodilatörler olduğunu düşünülmektedir(127, 128).

ROCK inhibisyonunun vasküler düz kas, endotel ve kan hücreleri üzerine etkisi iskemik beyindeki artan kan akımı ile senkronize seyretnmektedir. Bu durum ile paralel olarak ROCK inhibitörlerinin, fMCAO rat ve fare, dMCAO fare ve intrakaratid Na laurat enjenksiyonlu ratlarda serebral kan akımını doppler ve speckle flowmetre, hidrojen klirensi ve ¹⁴C]-iodoantipridin oto-radyografi gibi yöntemler ile ölçümlerde yükselttiği tespit edilmiştir. Hem preiskemik hem post iskemik tedavilerde etkin olsa da post iskemik tedavilerin daha az verimli olduğu gösterilmiştir (127). Ağır iskemik beyinde vasküler tonus iskemik depolarizasyonların doğrudan düz kas üzerine etkisi ve ROCK aktivasyonunun endotel fonksiyonunu bozması nedeni ile artmıştır (127, 129, 130). Bu nedenle ROCK inhibisyonu kollateral serebral kan akımını iskemik damarları genişleterek destekleyebilir.

İnfarkt hacminde ve serebral kan akımındaki olumlu gelişmeler Enos knock-out farelerde ve farmakolojik Enos inhibisyonunda görülmemektedir (112, 127, 131). Fokal serebral iskemi kan viskozitesini hızlıca yükseltmektedir. Bu durumun nedeni

olarak ise kan hücrelerinin hücre iskeletlerinin özelliklerinin değişmesine ve hematokritin artmasına bağlanmaktadır (132).

Hiperviskosite ve hemokonsantrasyon iskemik kortekste, serebrovasküler direnci artırır ve serebral kan akımını düşürür. Fasudil ilk 30 dakika içinde doz bağımlı olarak hayvan modellerinde kan hiperviskositesini ve hemokonsantrasyonu geri döndürmektedir (132, 133).

ROCK inhibisyonu plasminojen aktivatör inhibitör 1 ekspresyonunu azaltmakta (134-136) ve endotel hücrelerinde inme sonrası 6 saatlik dönemde Von Willebrand faktörün upregülasyonunu (137) önlemekte ve böylece trombosit aktivasyonu ile agregasyonunu engelleyerek, stabil trombosit trombüsünden korunmaktadır (138, 139).

İnflamasyon

ROCK inhibitörleri nötrofil infiltrasyonunu mikroembolik ve mikrovasküler trombotik inme modellerinde azaltmaktadır (133, 140, 141). Özellikle fasudil ve hidroksifasudil hayvan modellerinde fokal serebral iskemide faydalı bulunmuştur (133, 140). Lökosit yapışma ve yerleşiminin inhibisyonu mikrovasküler direnci azaltarak indirekt olarak serebral kan akımını artırabilir.

İskemik Beyin Ödemi

ROCK inhibisyonu fokal iskemide kan beyin bariyeri yıkımını doğrudan serbest radikal bağımlı aktin hücre iskeletlerinin polimerizasyonu ve endotelial hücre kasılmasını engelleyerek önlemektedir (142). Hayvan modellerinde fasudilin bu etkisi mikroembolik inme sonrası ortaya konmuştur (143, 144).

Nöron Koruma

İn vitro çalışmalarda glutamat maruziyetinin nöronlardaki ROCK aktivitesini upregüle ettiği gösterilmiştir (145), ve ROCK inhibitörlerinin primer nöron kültürlerde çeşitli modellerde glutamat eksitotoksitesini geciktirdiği bildirilmiştir (146). Bazı *in vitro* modellerde ise rho bağımlı eksitotoksik hücre ölümünün ROCK'tan bağımsız

olduğu ortaya konmuştur (147). Bu konuda daha çok çalışma yapılması gerekmektedir.

Optik sinir ve spinal kord yaralanmalarında ROCK inhibisyonunun nörit büyümesi ve aksonal rejenerasyon ile işlevsel düzelmeye katkıda bulunduğu gösterilmiştir (148-150). Fakat serebral doku üzerine olan rehabilitasyon üzerine literatürdeki bilgiler yeterli değildir.

İnmede Rho-Kinaz İnhibitörlerinin Kullanımı

ROCK inhibitörlerinin beyin penetrasyonu iyi değildir (112, 144). Uzun dönem tedavide ise ROCK inhibitörlerinin beyin dokusundaki seviyesinin özellikle kan beyin bariyerinin bozulduğu iskemik bölgelerde artması beklenmelidir. Hangi kan düzeyinin optimum olduğuna yönelik detaylı çalışma yoktur.

ROCK inhibitörlerinin doz bağımlı hipotansif etkisi insanlar dahil olmak üzere bazı türlerde gözlemlenmiştir. Deneysel hayvanlarda hipotansiyon dakikalar içinde başlamakta ve doz bağımlı olarak saatler içinde sonlanmaktadır (143, 151). Yavaş intravenöz infüzyonlar ise hipotansiyonu minimize etmektedir. Hipotansif etki, bu modellerde ROCK aktivitesinin upregüle olması ile paralel olarak hipertansif hayvanlarda daha belirgindir. Hipotansiyon sistemik vasküler dirençteki düşüş nedeni ile gerçekleşmekte ve nabız ile kardiyak output artışı ile beraber olmaktadır. Yüksek dozlarda intravenöz uygulama sonrasında, deney hayvanların sık görülen bir yan etkidir (152). ROCK inhibitörlerinin yararları Tablo 2.3'te özetlenmiştir.

Tablo 2.3. ROCK inhibitörlerinin yararları (152)

Serebral kan akışını sağlar	Düşük dozlarda SKA %10-30 arası artırdığı gösterilmiştir. Yüksek dozlarda kan basıncındaki %30' luk bir düşüşte SKA'nı %10-20 arasında düşürmektedir. Yüksek dozlarda beklene düşüş daha az olmasının nedeni sistemik damarlara göre serebral damarlarda daha potent olmasıdır. İskemik bölge ve penubrada SKA artırır. Hipoksi, ROCK aktivasyonunu sağlar ve eNOS inhibisyonuna neden olur. Bu nedenle ROCK inhibitörleri vazodilatasyon sağlar. Fokal iskemi kan viskozitesini artırır, hücre iskeleti bozar daha fragil hale getirir. ROCK, PAI1 inhibe ederek protrombotik ve antifibrinolitik etkiye sahiptir.
İnflamasyonu engeller	PMNL infiltrasyonu engeller. Lökosit adhesyonu azalması mikrovasküler direnç azaltır. SKA artırır.
İskemik beyin ödemi azaltır, kan beyin bariyerini korur	Serbest radikal ROCK aktivasyonunu yaparak aktin hücreiskeleti polimerizasyonu ve endotelial hücre kontraksiyonu neden olarak kan beyin bariyerinin bozulmasına neden olur.
Nöron korunması	In vitro, glutamat nöronlara ROCK aktive ederek eksitotoksititeye neden olmakta, rock inhibisyonu engellemektedir.
Rejenerasyon	Myelin bağlı nöron büyüme inhibitörleri (NOGO, Omgp), ROCK aktivasyonuna bağlı olarak nöron retraksiyonu ve büyüme plağı kolapsına neden olur. Özellikle spinal kord yaralanmasında Rock inhibisyonu, nöron büyümesi ve regenerasyonu sağlar.

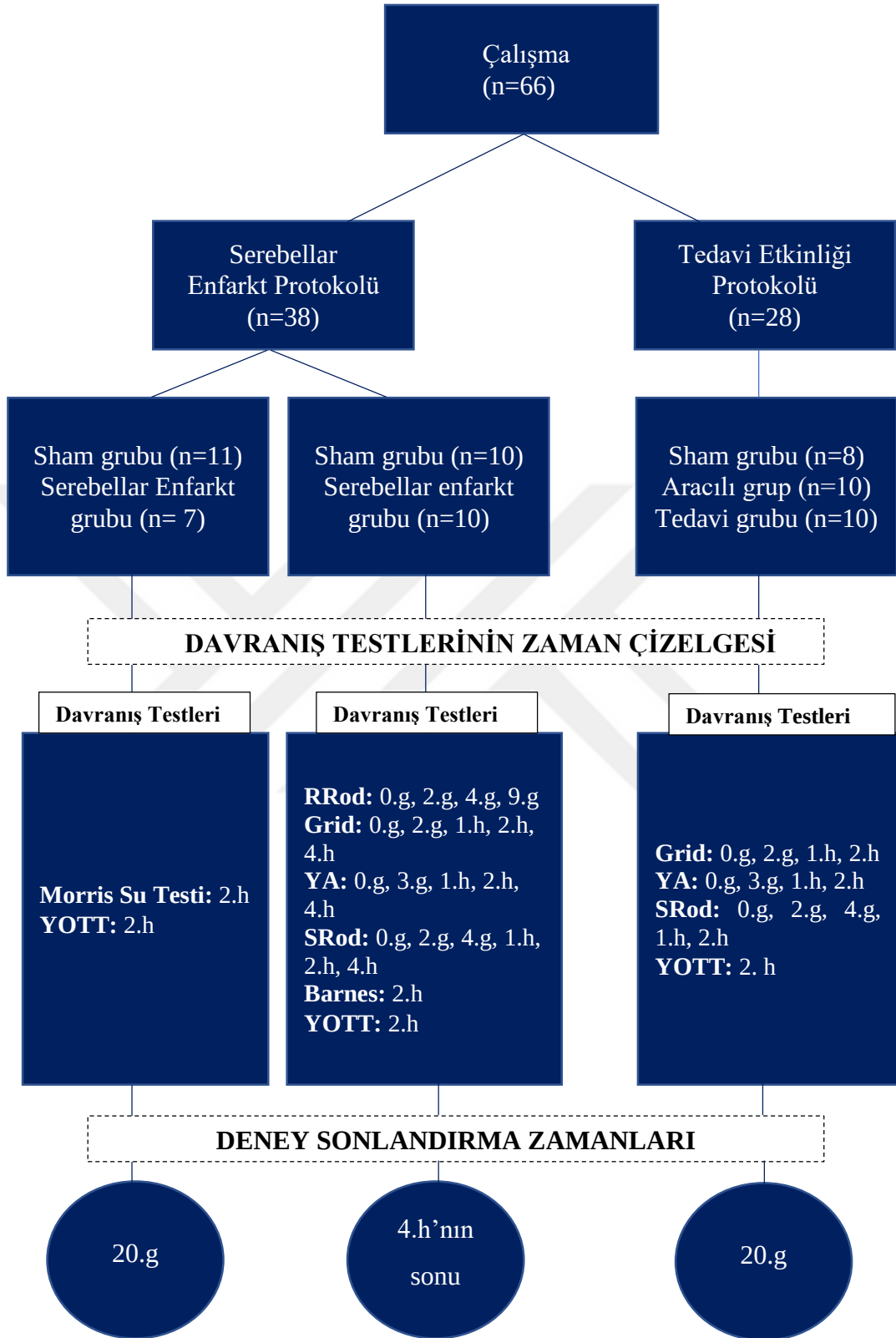
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deneyin Protokolü

Deneyler, Massachusetts General Hospital’da bulunan Deney Hayvanları Koruma ve Kullanma Komitesi tarafından etik onayı alınarak ve Ulusal Sağlık Enstitüsünün “Laboratuvar Hayvanlarının Koruma ve Kullanımı Hakkında Rehber” kullanılarak yapıldı. Deney için C57BL/6J fareleri (erkek, 9-10 haftalık, Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) rastgele tahsis edildi ve bias oluşturmamak amaçlı bir araştırmacı tarafından kör bir şekilde gruplara randomize edildi. Fareler *ad libitum* şeklinde beslendi, dört kişilik kafeslerde gündüz-gece uygun ışıklandırma yapılarak konaklatıldı. Çalışmamız serebellar enfarktın oluşturulması ve daha sonrasında fasudil ile tedavi edilmesi üzerine kuruldu.

Serebellar enfarkt deney grubu sham ve hasta grup olmak üzere iki grup olarak oluşturuldu. 7’si sham ve 11’i serebellar enfarkt grubu olmak üzere toplam 18 fare; ikinci haftada morris su tankı ve yeni obje bulma testi yapılarak 20. günde sakrifiye edildi. 10’u sham ve 10’u serebellar enfarkt grubundaki fareye, rotarod, ızgara telinde yürüme testi, yürüme analizi, statik rod, barnes testi ve yeni obje bulma testleri yapıldı ve 4. Haftanın sonunda sakrifiye edilerek histolojik açıdan değerlendirildi.

Serebellar enfarktın tedavisi grubunda 8’i sham, 10’u aracı (ilacın çözündüğü maddenin verildiği grup) ve 10’u fasudil tedavisi grubunda olmak üzere (aracılı gruptan bir hayvan kafesinde ölü bulunduğundan deney dışı bırakılmıştır) toplam 28 fareye ızgara telinde yürüme testi, yürüme analizi, statik rod ve yeni obje bulma testleri yapıldı ve 20. günde sakrifiye edilerek histolojik açıdan değerlendirildi. Çalışma protokolünün diyagramı Şekil 3.1’de özetlenmiştir.



Şekil 3.1. Çalışma protokolü diyagramı

h: hafta, g: gün, YOTT: yeni obje tanıma testi, RRod: Rotarod, Grid: Izgara Telinde yürüme testi, YA: yürüme analizi, SRod: Statik rod, Barnes: Barnes labirent testi

3.2. Serebellar Enfarktın Oluşturulması

Fareler isofloran ile anestezi (indüksiyon için %2, devamı için %1, %70 N₂O ve %30 O₂) edildi. Deneklerin derin anestezide olduğu kuyruğa verilen ağırlı uyaran ile test edildi. Rektal sıcaklık cerrahi süresince termostatik ısıtıcı mat (FHC, Brunswick, ME, USA) vasıtası ile 37C⁰ de stabilize edildi.

Cilt ve cilt altı doku kesilerek oksipital kemiğe ulaşıldı. Serebellar enfarkt oluşturmak için oksipital kemikte mikromatkap ile iğnenin geçebileceği kadar delik açıldı. Nörolojik testlere erken başlamak için boyun kas dokusuna zarar vermemek ve SCA' nın kanlanma bölgesinde enfarkt oluşturmak amacıyla serebellumun 4 ve 5. lobülleri hedeflenerek vazokonstriktör madde olan N5- (1-İminoetil) -L-ornitin dihidroklorür (100mM, Tocris) mikroenjektörle (34G, 0,460mm çapında Hamilton) yardımıyla ve dik bir açıyla serebelluma lateromedial enjeksiyon yapıldı. Bu prosedür sayesinde enjeksiyon yerinde vasokonstriksiyon ve fokal iskemi hedeflenmiştir. N5- (1-İminoetil) -L-ornitin dihidroklorür enjeksiyonu 2,4µL volümünde ve dakikada 0,5µL hızında iken 76 derecelik açıyla enjeksiyon koordinatları bregmaya göre: Antero-posterior -5,5 mm, medio-lateral -0,6 (sağda) ve dorso-ventral -1,0 olarak yapıldı. Mikropipet in situ olarak 5dk içinde bırakılarak ilacın iyi diffüze olması sağlandı. Sham grubunda yukarıda bahsedilen aynı prosedür yapılarak intrakranial olarak N5- (1-İminoetil) -L-ornitin dihidroklorür yerine serum fizyolojik verildi.

3.3. Serebellar Enfarkta Fasudil Tedavisi

Serebellar enfarktlı fareler bir araştırmacı tarafından rasgele ve kör olarak tedavi (fasudil 10mg/kg, Tocris) ve aracı (serum fizyolojik 1ml (fasudil, serum fizyolojikte çözünerek hazırlandığı için verilmiştir.) olarak ikiye ayrıldı ve bu gizlilik çalışması sonuna kadar sürdürüldü. Tedavi grubunda fasudil, serum fizyolojik içerisinde çözünerek 100mM çözelti hazırlandı ve serebellar enfarkttan 24 saat sonra intraperitoneal olarak 12 saatte bir, iki hafta boyunca uygulandı. Aracı grupta serum fizyolojik intraperitoneal olarak 12 saatte bir, iki hafta boyunca uygulandı. Farelerin kilo takibi haftalık olarak yapıldı ve dozaj planlandı. Aynı zamanda bölüm 3.2'de bahsedilen sham grubu kontrol amaçlı burda da oluşturuldu.

3.4. Nörolojik Değerlendirme

Fareler sensorimotor ve kognitif performansları açısından cerrahiden önce, N5-(1-İminoetil) -L-ornitin dihidroklorür veya serum fizyolojik (sham) enjeksiyonundan sonra 2. gün (enfarktten 48 saat sonra), 3. gün, 1. hafta, 2. hafta ve 4. haftada (sadece serebellar enfarktüsün oluşturulması deneyinde) değerlendirildi. Kullanılan testler: yürüme analizi, ızgara telinde yürüme testi, statik rod ve rotarod, morris su tankı ve Barnes labirent (uzaysal hafıza) ve yeni obje tanıma testi (kısa süreli hafıza) davranış testleri yapıldı.

3.4.1. Yürüme Analizi (Footprint):

Yürüme analizi testi, farenin yürümesi hakkında bilgi verirken detaylı bir protokol içermez ve yüksek teknoloji araç kullanımı gerektirmez. Yürüme analizi, yüksek kaliteli video ya da basit bir cetvel ile de yapılabilir. Yürüme analizi protokolü ve analizi, Brooks 2012 protokolüne göre yapılmıştır (151).

Gerekli Materyaller:

- %70 etanol alkol
- İki adet A4 beyaz kağıt
- 60 cm uzunluğunda 5 cm genişliğinde yüksek duvarlı koridor
- Yürüme sonunda kaçabileceği karanlık bir kutu
- İki farklı renkte toksik olmayan su bazlı boya,
- Boyaları dökmek için kap.

Testin Yapılışı:

Testin yapılışından 30 dk önce fareler, test yapılacak odaya çevre adaptasyonu için getirildi. Adaptasyon sonrası boyama yapılmadan önce koridorun başından karanlık kutuya kadar 3 defa yürütülerek alıştırma yürüyüşü yapıldı. Sonrasında ön ayakları bir kaptaki boyaya (kırmızı boya), sonra arka ayakları diğer kaptaki boyaya (mavi boya) sokuldu. Koridorun başından bırakılarak koşmadan veya durmadan karanlık kutuya yürümesi sağlandı. Doğru analiz için yürüme testi 3 defa yapıldı (Şekil

3.2). Her testten sonra kullanılan materyaller %70 etanol alkol ile temizlendi ve kuruması beklendi.



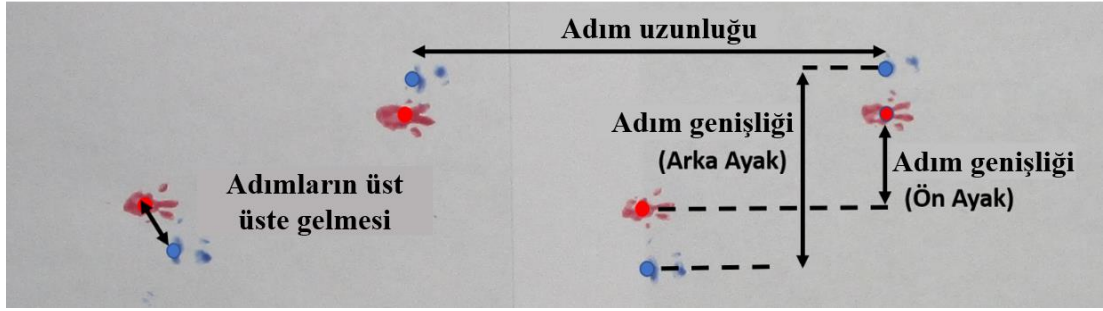
Şekil 3.2. Örnek yürüme analizi (Normal C57/B6J Fare)

Şekilde kırmızılar ön ayak, maviler ise arka ayağı temsil etmektedir.

Analiz:

Farenin, koştuğu veya durduğu zamanlar işaretlenerek analizden çıkarıldı. Daha sonra bir cetvel yardımıyla kağıttaki adımlar analiz edildi. Birden fazla analiz yapılarak ortalaması ve varyansları hesaplandı.

- I. **Adım uzunluğu (Stride Length):** Aynı adımdaki aynı taraftaki arka ayaklarının tabanlarının merkezleri arasındaki uzaklıktır.
- II. **Adım genişliği (Base Width):** Ön veya arka ayakların lateral uzaklığının ölçülmesidir.
- III. **Adımların üst üste gelmesi (Overlap):** Ön ayağın tabanının merkezi ile aynı taraftaki arka ayağın tabanının merkezinin arasındaki uzaklıktır. Başarılı bir adımlamada aynı taraftaki arka ayak ön ayağın bastığı yere denk gelmelidir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Yürüme analizinin gösterilmesi

3.4.2. Rotarod:

Rotarod, özellikle motor ve denge fonksiyonunun ölçümü için ivmeli bir şekilde hızlanan sopa üzerinde farelerin düşme süresinin hesaplandığı bir yöntemdir (153). Aynı anda birden fazla fareyle yapılabilmesi, herhangi bir davranış testi tecrübesi olmayan kişiler tarafından uygulanabilmesi tercih nedeni olmuştur. Rotarod protokolü Carter (2001) çalışmasından alınarak yapılmıştır (154).

Gerekli Materyaller:

- Rotarod cihazı (Columbus Instruments Rota Rod Rotamex-5 Mouse 4) (Şekil 3.4)
- Rotamex 5 yazılımı yüklü bilgisayar
- %70 etanol
- Temiz kafes



Şekil 3.4. Rotarod cihazı (Columbus Instruments Rota Rod Rotamex-5 Mouse 4)

Testin Yapılışı:

Fareler testin olduğu odaya yarım saat önce getirildi. İki gün test adaptasyonu yapıldı. Adaptasyonda, 4 devir/dk'da 300 saniye boyunca ivme olmaksızın çalıştırıldı. Deney safhasında başlangıç hızı 4 devir/dk, maksimum devir hızı 50 devir/dk olmak üzere 300 saniye boyunca çalıştırıldı. 2 gün fareler, herhangi bir işlem görmeden önce, başlangıç değerleri alındı. Her testten sonra kullanılan materyaller %70 etanol alkol ile temizlendi ve kuruması beklendi.

Analiz:

Rotamex -5 programına kayıtlı süreler alınarak analiz edildi.

3.4.3. Statik Rod:

Statik rodlar ve denge tahtaları, koordinasyon ve denge ölçmek için kullanılmaktadır. Denge tahtalarını kullanırken farenin karanlık kafese doğru gitmesi için ekstra bir motivasyon (farenin aç bırakılıp kafese yiyecek konulması vs.) gerekmektedir. Araştırmacı Robert M.J. Deacon bu problemi bir ucu açık bir ucu ise kafese bakan tahta sopalar ile çözmüştür (155). Fareler bu şekilde hem dönme hareketini düzgünce tamamlayıp hem de sopa üzerinde düşmeden yürüme işlemini tamamlayabilmektedir. Değişik protokoller tanımlansa da hızlı ve ayırt edici olması için üç sopa yöntemini (28,5mm, 16mm, 6mm) kullandık (155-157).

Gerekli Materyaller:

- 60 cm uzunluğunda üç sopa (çapları: 28,5mm, 16mm, 6mm)
- Yerden 60 cm yüksekliğinde raf
- Raf üstünde karanlık oda
- %70 Etanol

Testin Yapılışı:

Üç sopa, son 10cm' lik kısmı rafın üstünde olacak şekilde çivi ile çakıldı. Sopaların raf kısmına farelerin gireceği karanlık kutu koyuldu. Fareler testin olduğu odaya yarım saat önce getirildi. Bir gün önce ortama adaptasyon yapıldı. Deney

başlamadan önce fare 2 dk karanlık kutuda dinlendirildi, daha sonra yüzü açıklığa bakar bir şekilde sopanın üzerine yerleştirildi. Farenin 180 derece dönmesi ve bitirmesi için 120 saniye verildi. Her testten sonra kullanılan materyaller %70 etanol alkol ile temizlendi ve kuruması beklendi.

Analiz:

Farenin 180 derece dönmesi ve bitirmesi için zaman tutuldu. Fare ilk 5 saniye içinde düşerse araştırmacı tarafından kaynaklandığı düşünülerek düşmemesi için toplamda 3 hak verildi ve yine de düşerse düştü olarak not edildi. Düşen veya dönmeyenlerde süre 120 saniye olarak not edildi.

3.4.4. Izgara Teli Yürüme Testi:

Basitçe tel ızgara üzerinde yürüme testidir. Motor defisitlerde ve motor koordinasyon defisitini tespit etmekte (158) etkili olduğu gibi inme sonrası rehabilitasyonun izlenmesinde de etkili olduğu gösterilmiştir (159). Ancak bu etkinin 30-60 günde sona erdiği görülmektedir (160).

Gerekli Materyaller:

- Yerden yüksekte tel ızgara (1,5x1,5 tel arası açıklığı olan)
- Karanlık oda
- Video kamera
- %70 etanol alkol

Testin Yapılışı:

Fareler testin olduğu odaya yarım saat önce getirildi. Tel ızgara üzere konuldu ve serbest bir şekilde 5dk boyunca yürümesi beklendi (Şekil 3.5). Her testten sonra kullanılan materyaller %70 etanol alkol ile temizlendi ve kuruması beklendi.



Şekil 3.5. Izgara telinde yürüme testinin videosundan kesit

Analiz:

Videolar izlenerek her 100 adımda kaç kere boşluğa bastığı (ayak kayması) her uzuv için kaydedildi.

3.4.5. Morris Su Tankı:

Morris su tankı, rodentlerde uzaysal öğrenmeyi test etmek için yapılan, deneğin başlangıç noktasından dış ipuçları vasıtasıyla çıkış platformunu bulduğu bir yüzme testidir. Uzaysal öğrenme tekrarlayan denemeler ile ilişkilidir ve uzaysal öğrenme bozukluklarını tespit etmekte etkilidir (161). Serebellumun, postür ve dengeyle ilgili olduğu bilinmekle birlikte literatürde uzaysal öğrenme ile ilişkisi olduğu da görülmektedir (162-164). Morris su tankı testinin protokolü Morris (1984) çalışmasından alınmıştır (165).

Gerekli Materyaller:

- 83 cm çapında 60 cm derinliğinde, içi 29 cm derinliğinde ılık su ile dolu havuz
- Havuz duvarına asılı suyun üstünde görsel ipuçları
- Plexiglas platform (10 cm çapında, suyun 0,5 cm altında, merkezde)
- Kamera
- Any-maze tracking system (Stoelting)

Testin Yapılışı:

Fareler testin olduğu odaya yarım saat önce getirildi. Fareler günde 2 tur olmak üzere test edildi. Her turda fareler başlangıç yerleri için random (kuzey, güney, doğu, batı) edilip havuz duvarına dönük bir şekilde başlatıldı. Platformu bulma süresi

maksimum 60 saniye olarak ayarlandı. Prob testi (araştırma testi), son testten 24 saat sonra platformun kaldırılıp platformun nerde olduğunu hatırladığını ölçmek için yapıldı.

Analiz:

Any-maze takip cihazı (video) ile platformu ne kadar zamanda bulduğu ve prob testinde hedef kadranda ne kadar gezdiği ölçüldü.

3.4.6. Barnes Labirent Testi:

Carol Barnes, 1979 yılında kuru arazi labirent testini uzaysal öğrenme ve hafızayı test etmek için geliştirdi. Bu testte, hayvanlar yuvarlak açık bir platform üzerinde parlak bir ışık ile uyarı verilerekten hedef yuvarlağa ulaşip karanlık kaçma kutusunu bulmaya çalışmaktadırlar. Morris su tankı testi şiddetli uyarılar (su ya da şok) içermekte iken Barnes labirent testinde ise hafif uyarılar (ışık ya da ses) içermektedir (166). Bu tür şiddetli uyarılar, hayvanda stres yaratıp performansını kötü etkileyebilmektedir (167). Barnes labirent testinin protokolü Sunyer (2007) çalışmasından alınmıştır (166).

Gerekli Materyaller:

- 92 cm çapında beyaz ahşap daire, 5 cm çapında 20 delikten oluşuyor, delikler arası uzaklık 7,5cm (Şekil 3.6)
- 1 karanlık tünele çıkan kaçış deliği
- 2 adet parlak ışık
- Karanlık başlangıç silindiri
- Duvara asılı görsel ipuçları
- Kamera
- %70 Etanol alkol
- Any-maze tracking system (Stoelting)



Şekil 3.6. Barnes platformu

Testin Yapılışı:

Fareler testin olduğu odaya yarım saat önce getirildi. Teste başlanmadan önce tünelin olduğu yeri öğretmek için fare, platformun ortasına konuldu ve üzeri siyah başlangıç silindiri ile kapatıldı ve 10 sn beklendi. Daha sonra parlak ışık açılıp fare nazikçe kaçış tüneline yönlendirildi ve tünelde 2dk kalması sağlandı. Fare tünele adapte olduktan sonra uzaysal öğrenme testlerine başlandı. Uzaysal öğrenme gününde günde 4 defa olmak üzere 4 gün art arda test edildi. Platformun ortasındaki siyah başlangıç silindiri ile üzeri kapatıldı ve 10 sn beklendi. Daha sonra parlak ışık açıldı ve fare kaçış tüneline bulana kadar ya da 3 dk teste devam edildi. Tünelde 1 dk kalması sağlandı. Referans hafıza testi (prob testi), son testten 24 saat sonra yapıldı. Kaçış tüneli kapatıldı ve fareye 90 sn verildi. Bütün kayıtlar kamera eşliğinde alındı. Her testten sonra kullanılan materyaller %70 etanol alkol ile temizlendi ve kuruması beklendi.

Analiz:

Any-maze takip cihazı (video) ile kaçış tüneline ne kadar zamanda bulduğu ve prob testinde hedef çeyrek dairede ne kadar gezdiği ölçüldü.

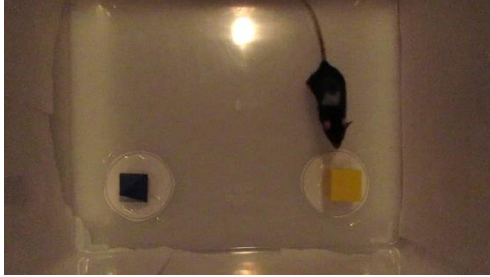
3.4.7. Yeni Obje Tanıma Testi:

1950 yılında Berlyne, ratların yeni objelerle eski objelere göre daha fazla etkileşim gösterdiğini bulmuştur (168). Bu etkileşim, koklama ya da objeye yanaşma gibi görülebilir. İki fazdan oluşur; tanıma ve yeni obje testi. Tanıma fazında iki adet aynı obje konulur ve 10 dk süre ile farenin tanınmasına izin verilir. Daha sonra 1 saat fare bekleme kafesine alınır ve 1 saat sonunda 2-5 dk sürecek olan yeni obje testine

başlanır. Serebellumun, motor özellikleri dışında kognitif özelliğinin olduğu ve özellikle çalışan bellek üzerine etkileri olduğu literatürde gözükmektedir (21, 169, 170). Bu testi, bu bağlamda özellikle kısa süreli bellek ya da çalışan belleği ölçmek için kullanılmaktadır (171). Yeni obje tanıma testinin protokolü Bevins (2006) çalışmasından alınmıştır (172).

Gerekli Materyaller:

- Eni 29 cm boyu 32 cm olan, beş çeperi beyaz kağıtla kaplı, üstü açık kutu (Şekil 3.7)
- Renkli objeler, yüksekliği 4cm, yüzey her bir kenarı 4cm (sarı ve mavi)
- Loş ışık
- Kamera
- %70 Etanol alkol



Şekil 3.7. Yeni obje bulma testi

Testin Yapılışı:

Adaptasyon için fareler 4 gün boyunca günde 10 dk olmak üzere tarif edilen kutuya konuldu. Adaptasyondan 24 saat sonra fareler, iki adet sarı objenin bulunduğu kutuya 10 dk süre ile tanıma fazı için konuldu. 1 saat kendi kafesinde dinlendirildi. Yeni obje testi için sarı objelerden birisi mavi obje ile değiştirildi ve farenin keşfetmesi için 5 dk süre verildi. Her testten sonra kullanılan materyaller %70 etanol alkol ile temizlendi ve kuruması beklendi.

Analiz:

Videolar, zaman tutucu yardımıyla analiz edildi. Sadece yeni objenin olduğu videolar değerlendirildi. Fare objenin 2 cm çevresindeki alana objeye doğru koklama ya da yönelme amaçlı girdiği zamanlar analize dahil edilirken objenin üzerine çıktığı zamanlar analize dahil edilmedi.

3.5. Histoloji ve Mikroskopi

Belirlenen sürelerde, fareler izofloran anestezisi (%4 indüksiyon) ile uyutulup, dekapitasyon yöntemi ile sakrifiye edilip, beyinleri çıkartılarak -30°C İzopentan solüsyonu ile donduruldu. Serebellum daha sonra kryosection cihazı ile 20- μm kalınlıkta ve 100- μm aralıkta dilimlere ayrıldı, luxol fast blue (miyelin), hematoxylin and eosin ve DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride, nükleus boyanması) ile boyandı. Görüntüler, Nikon Super Coolscan 9000 ED Scanner ve a Nikon TE-2000 epiflorosanslı mikroskop ile alınıp, ImageJ software (NIH) ile analiz edildi. Kamera ile fotoğrafları çekilen görüntüler bilgisayar ortamında ImageJ software kullanılarak enfarkt hacmi hesaplandı.

3.6. İstatistiksel Analiz

Veri analizi için SPSS 20.0 ve Prism 5 Software (GraphPad Software, San Diego, CA) kullanıldı. Verilerin tanımlanmasında, sayı, yüzde, standart sapma, ortalama değerler kullanıldı. Sürekli değişkenlerin normal dağılımına uygunluğu “Kornogrow-Smirrow” testi ile ölçüldü. Tekrarlayan ölçümlerde sayısal verilerin karşılaştırmasında “generalized estimating equations”, kategorik verilerin karşılaştırılmasında “Cochran Q Mantel Hanzel” testi kullanıldı. İki grup karşılaştırılmasında normal dağılıma uyan değişkenler için “Student’s T” testi, uymayan değişkenler için “Mann Whitney U” testi kullanıldı ve bonferroni düzeltmesi uygulandı. $p < 0,05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

38'i serebellar enfarkt modelinde, 28'i serebellar enfarktın tedavisi modelinde olmak üzere 66 adet C57BL/6J fareleri (erkek, 9-10 haftalık, Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) üzerinde deney yapıldı. Bir hayvan kafesinde ölü bulunduğundan (aracılı grubundaki) deney dışı bırakıldı. Deney bulguları aşağıdaki gibidir.

4.1. Serebellar Enfarkt Modeli Nörolojik Test Sonuçları

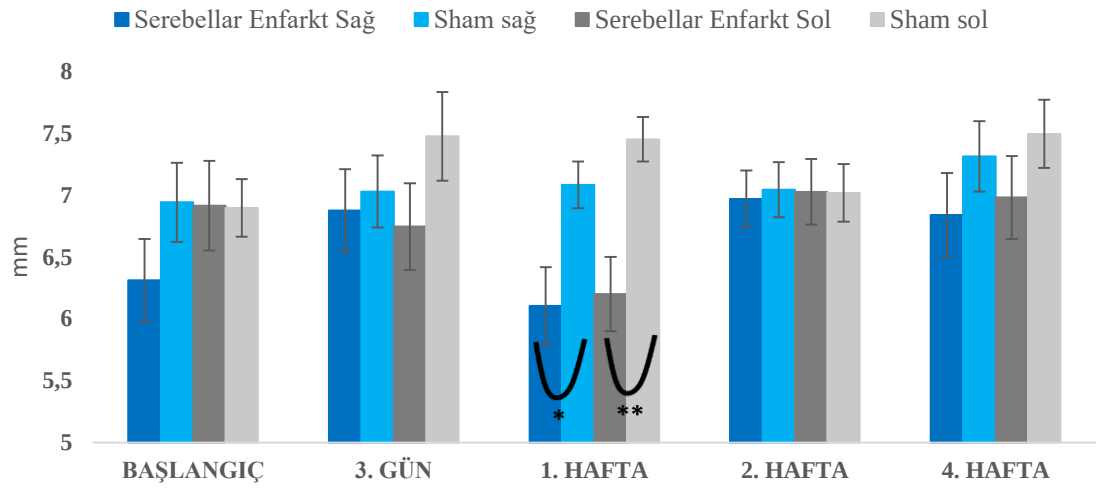
4.1.1. Yürüme Analizi:

Yürüme analizi testinde, 10 sham ve 10 serebellar enfarktlı fare başlangıçta (herhangi bir işlem yapılmadan önce), 3. gün, 1. hafta, 2. hafta ve 4. haftada karşılaştırıldı. 1. haftada sağ adım uzunluğu ve sol adım uzunluğu serebellar enfarktlı grupta sham grubuna göre daha kısa olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterildi ($p=0,035$, $p=0,004$) (Şekil 4.1).

Dört hafta boyunca iki grup arasında, ön ($p=0,729$) ve arka ayak ($p=0,307$) adım genişliği (Şekil 4.2) ve sol adımların üst üste gelmesinin uzaklığının ortalamaları ($p=0,704$) bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur (Şekil 4.2).

Serebellar enfarkt grubunda sham grubuna göre 1. haftada sağ adımların üst üste gelme uzaklığında artış görülmüştür ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,024$) (Şekil 4.3).

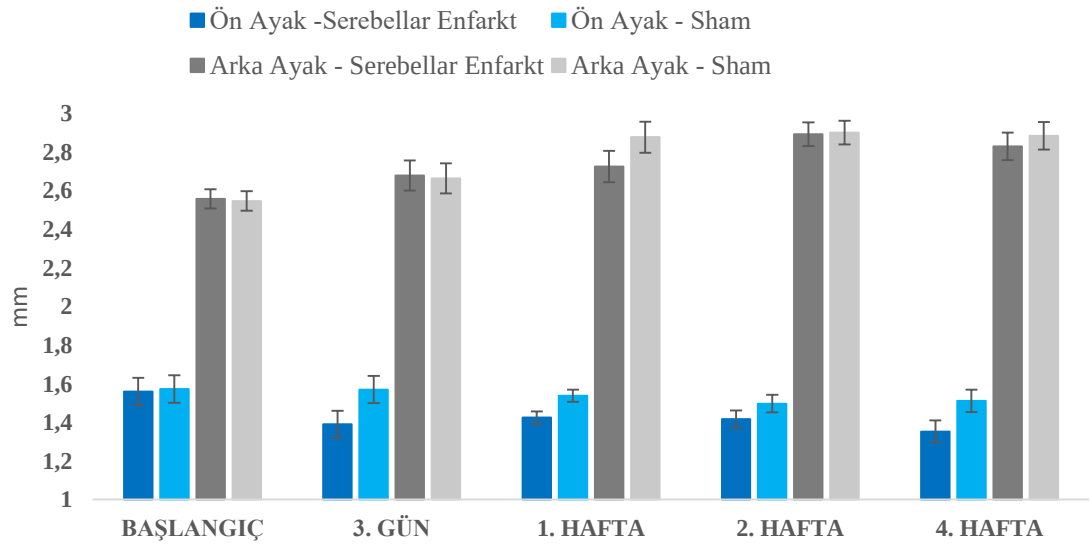
Sham grubu ve serebellar enfarkt grubu arasında yürüme testi parametreleri varyansları (standart deviasyon) karşılaştırıldığında adımların üst üste gelme uzaklığının değişkenliği başlangıçtan ikinci haftaya kadar artıp sonra azalarak ($p=0,004$) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde sham grubundan farklı çıkmıştır (Şekil 4.4).



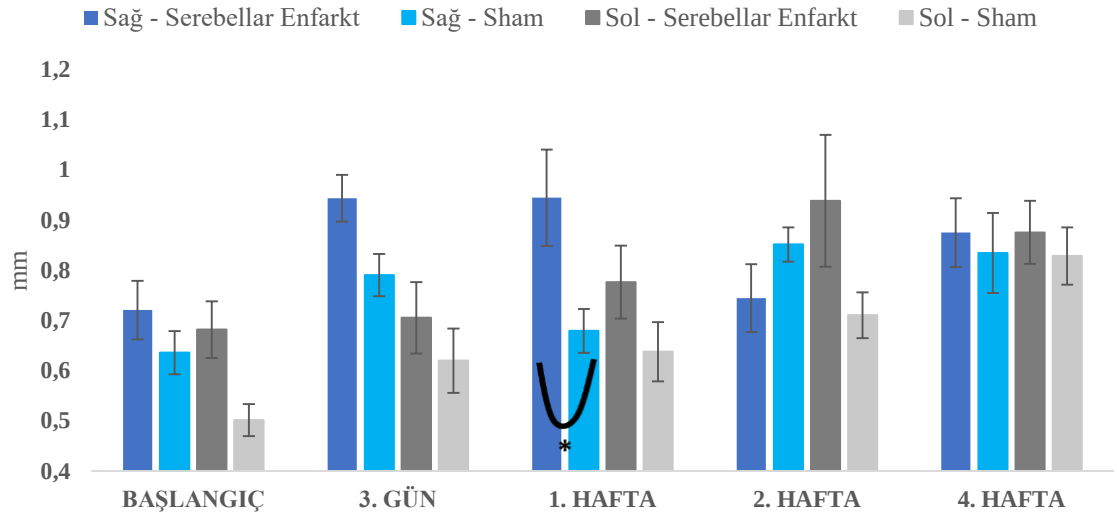
Şekil 4.1. Yürüme analizinde serebellar enfarkt ve sham grubundaki sağ ve sol adım uzunluğu ortalamaları

* Serebellar enfarkt ve sham grubu arasındaki fark gösterilmiştir $p < 0,05$.

** Serebellar enfarkt ve sham grubu arasındaki fark gösterilmiştir $p < 0,005$.

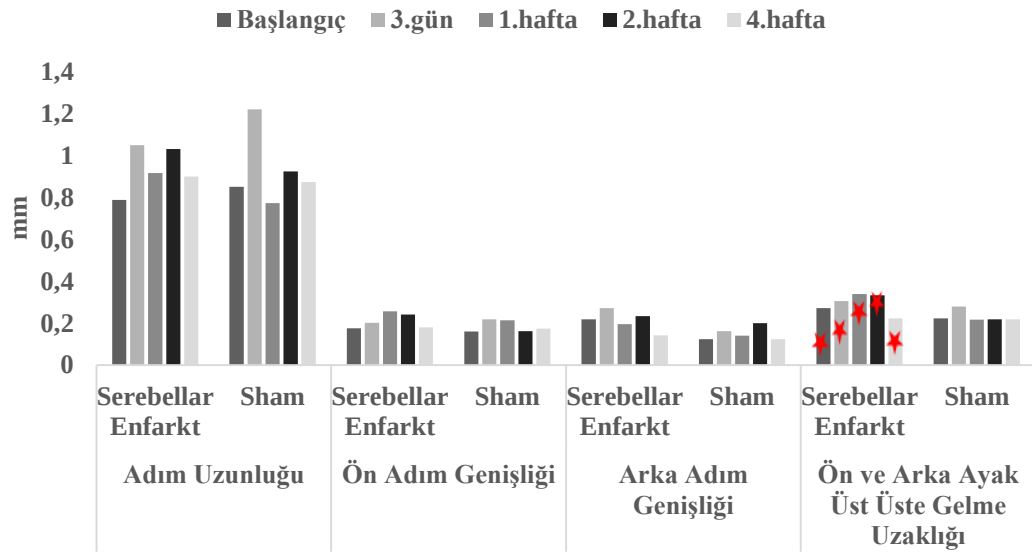


Şekil 4.2. Yürüme analizinde serebellar enfarkt ve sham grubundaki ön ve arka ayak adım genişliği ortalamaları



Şekil 4.3. Yürüme analizinde serebellar enfarkt ve sham grubunda sağ ve sol adımlarının üstüste gelme uzaklığının ortalamaları

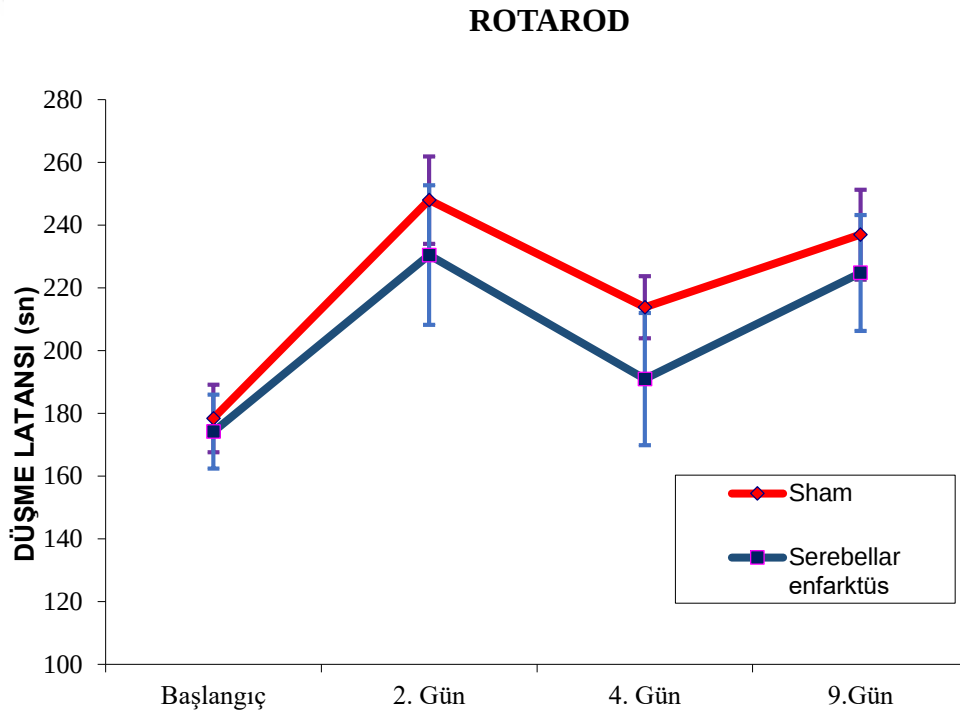
* Serebellar enfarkt ve sham grubu arasındaki fark gösterilmiştir $p < 0,05$.



Şekil 4.4. Yürüme analizinde serebellar enfarkt ve sham grubunda adım uzunluğu, genişliği ve adımların üst üste gelme uzaklığının standart deviasyonlarının ortalaması
Kırmızı yıldız: Serebellar enfarkt grubunda başlangıçtan ikinci haftaya kadar artıp azalmayı göstermektedir $p < 0,005$.

4.1.2. Rotarod

Rotarod testinde, 10 sham ve 10 serebellar enfarktlı fare başlangıçta (herhangi bir işlem yapılmadan önce), 2. gün, 4. gün ve 9. gün karşılaştırıldı. Dokuzuncu günden itibaren iki grupta da benzer sonuçlar elde edildiği için test durduruldu. Sham grubunun düşme latans ortalamaları ve standart hataları zamana göre sırasıyla $178,37 \pm 10,74$ sn, $247,96 \pm 13,94$ sn, $213,78 \pm 9,88$ sn ve $236,93 \pm 14,31$ sn idi. Serebellar enfarkt grubunun düşme latans ortalamaları ve standart hataları zamana göre sırasıyla $174,16 \pm 11,79$ sn, $230,42 \pm 22,24$ sn, $190,92 \pm 21,07$ sn ve $224,72 \pm 18,43$ sn idi. İstatistiksel olarak iki grupta da anlamlı fark saptanmadı (Şekil 4.5).

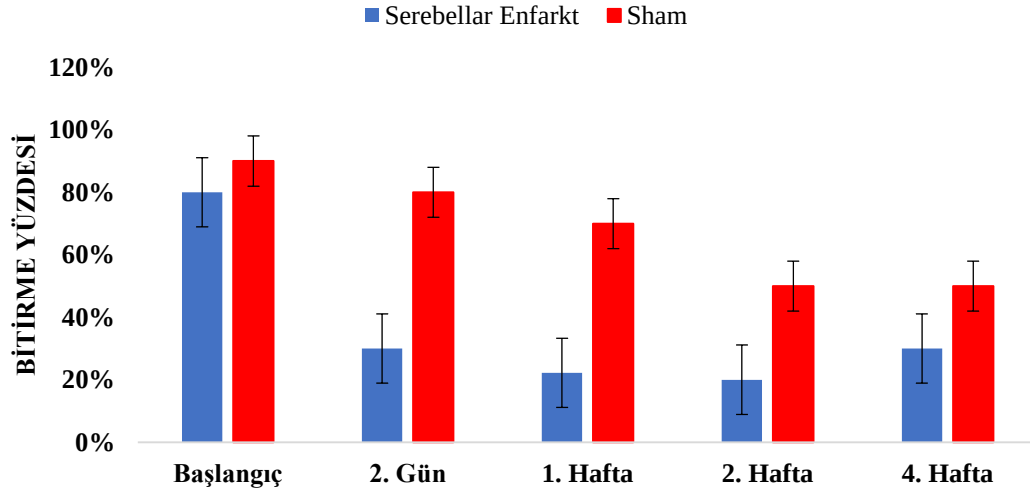


Şekil 4.5. Rotarod testinde zamana karşı düşme latansı grafisi
Noktalar düşme latansının ortalamasını çizgiler ise standart hatayı göstermektedir.

4.1.3. Statik Rod

Statik rod testi, 10 sham ve 10 serebellar enfarktlı fare başlangıçta (herhangi bir işlem yapılmadan önce), ikinci gün, birinci hafta, ikinci hafta ve dördüncü hafta karşılaştırıldı. 6 mm'lik sopada düşmeden bitirme oranları Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Serebellar enfarktüs grubu, sham grubuna göre istatistiksel olarak daha fazla düştü ve

bu fark zamanla sabittir (Cochran-Mantel-Haenszel testi, Kikare: 9,805 d.f.:1 p = 0,00174). Dönme zamanı ve toplam zaman ölçümlerinde zamanla iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (MANOVA F=0,566 P=0,805).



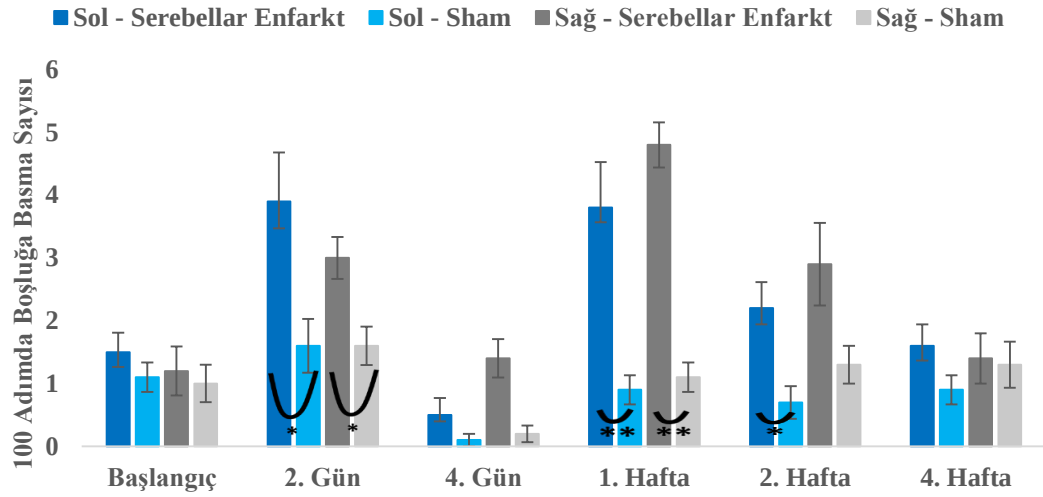
Şekil 4.6. Serebellar enfarktüs ve sham grubu farelerde statik rod testinde 6mmlik sopada düşmeden bitirme oranları

4.1.4. Izgara Telinde Yürüme Testi

Izgara Telinde yürüme testi, 10 sham ve 10 serebellar enfarktli fare başlangıçta (herhangi bir işlem yapılmadan önce), ikinci gün, dördüncü gün, birinci hafta, ikinci hafta ve dördüncü haftada ayak düşme sayıları karşılaştırıldı. Sağ ve sol ön ayak, arka ayak ve toplam hata grafileri

Şekil 4.7,

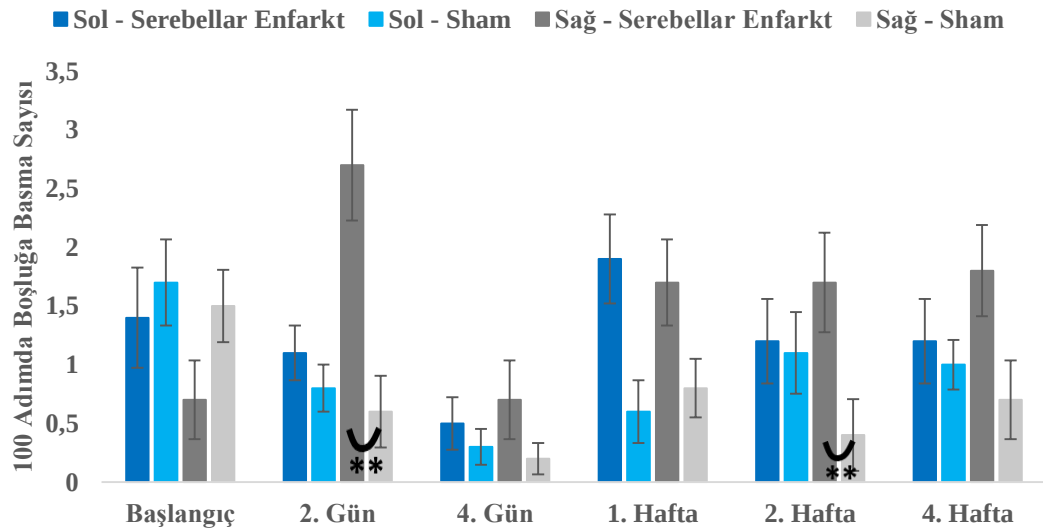
Şekil 4.8 ve Şekil 4.9’de gösterilmiştir. Sham ve serebellar enfarkt grubu zaman içinde boşluğa basma sayıları bakımından karşılaştırıldığında arka sol ayak (p=0,163) açısından farklı çıkmazken ön sağ ayak (p=0,000), ön sol ayak (p=0,020) ve arka sağ ayak (p= 0,005) açısından istatistiksel olarak farklı çıkmıştır (GEE). Posthoc analizlerde, serebellar enfarkt grubunda sham grubuna göre 2. günde (ön sağ ve sol ve arka sağ ayak), 1. haftada (ön sağ ve sol ayak) ve ikinci haftada (ön sol ve arka sağ ayak) daha fazla boşluğa bastığı görülmüştür. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır. Ön ayaklar, arka ayaklara göre daha fazla etkilenmektedir (p=0,007).



Şekil 4.7. Serebellar enfarktüs ve sham grubunun ızgara teli üzerinde yürüme testinde sağ ve sol ön ayak hata ortalamaları ve standart hataları

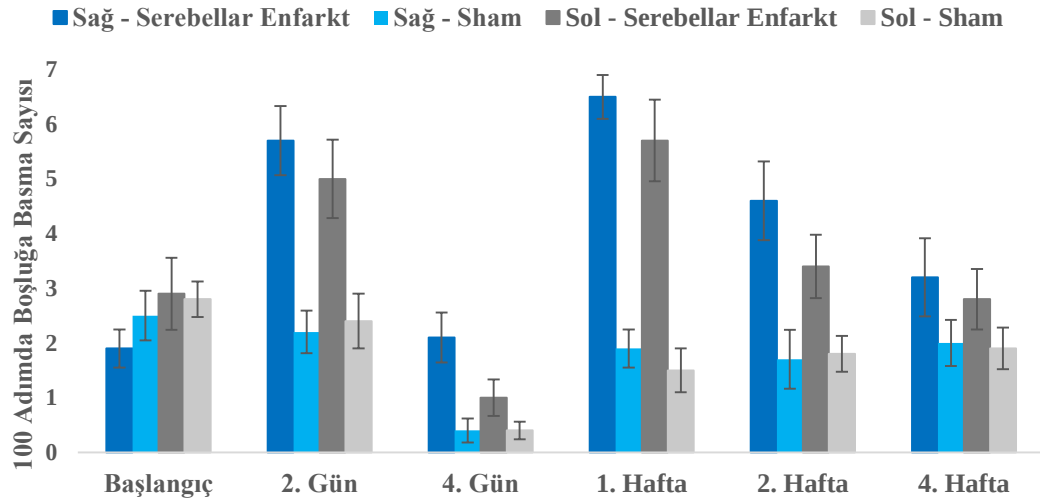
* Serebellar enfarkt ve sham grubu arasındaki fark gösterilmiştir $p < 0,05$.

** Serebellar enfarkt ve sham grubu arasındaki fark gösterilmiştir $p < 0,005$.



Şekil 4.8. Serebellar enfarktüs ve sham grubunun ızgara teli üzerinde yürüme testinde sağ ve sol arka ayak hata ortalamaları ve standart hataları

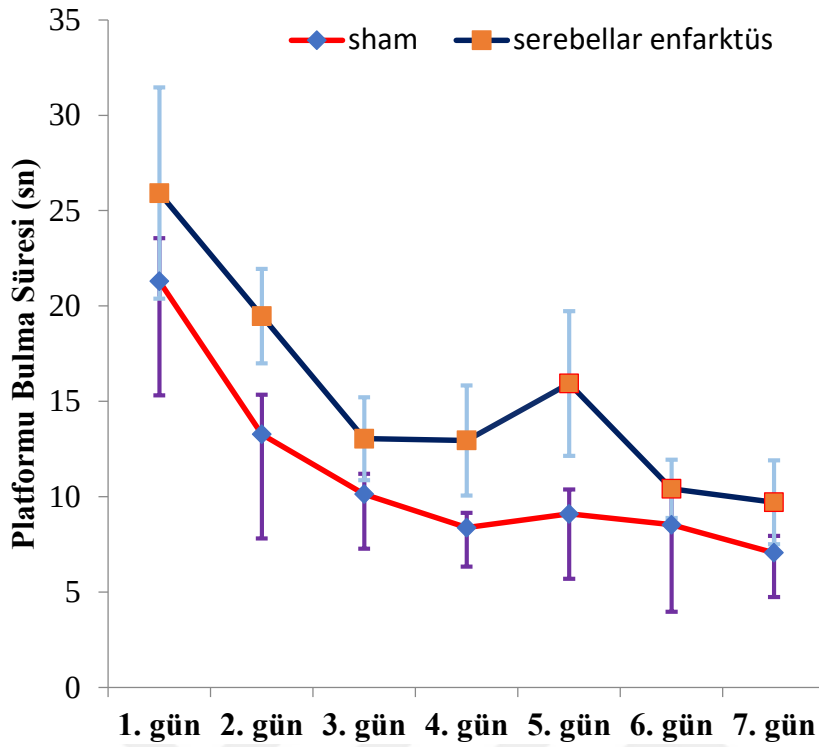
** Serebellar enfarkt ve sham grubu arasındaki fark gösterilmiştir $p < 0,005$.



Şekil 4.9. Serebellar enfarktüs ve sham grubunun ızgara teli üzerinde yürüme testinde toplam sağ ve sol ayak hata ortalamaları ve standart hataları

4.1.5. Morris Su Tankı Testi

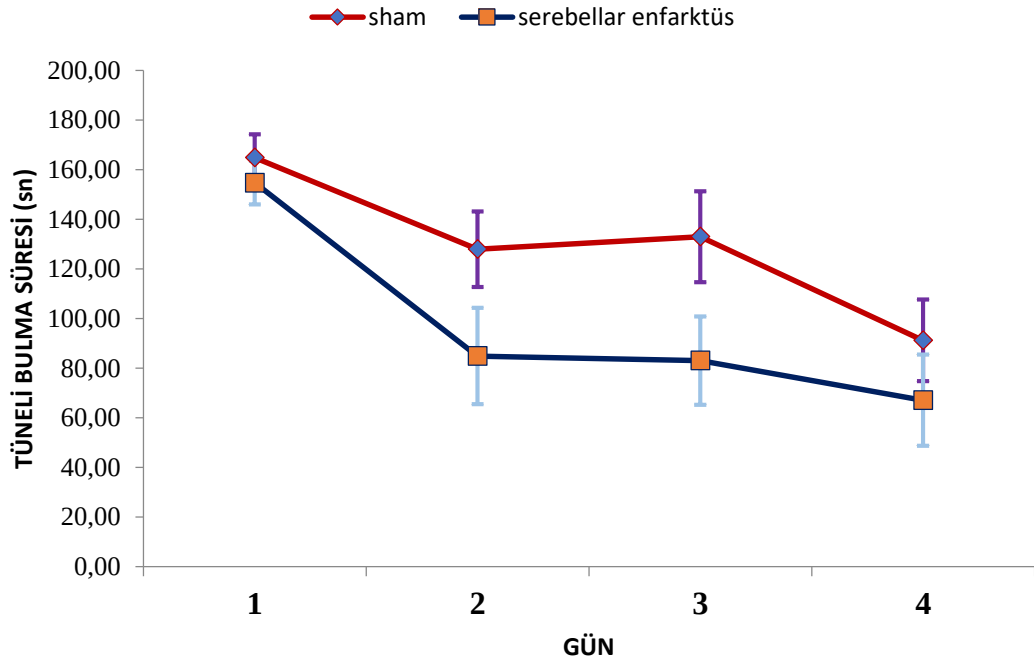
Morris su tankı testi, 7 sham ve 11 serebellar enfarktüs fare deneyin ikinci haftasında (operasyon sonrası) karşılaştırıldı. Günde dört defa test yapıp her bir günün platformu bulma süresinin (latansı) ortalaması alınarak analiz yapıldı. Sham grubunun platformu bulma süresinin ortalamaları ve standart hataları günlere göre sırasıyla $21,29 \pm 2,26$ sn, $13,27 \pm 2,07$ sn, $10,13 \pm 1,08$ sn, $8,38 \pm 0,77$ sn, $9,1 \pm 1,28$ sn, $8,53 \pm 1,73$ sn ve $7,06 \pm 0,88$ sn idi. Serebellar enfarktüs grubunun platformu bulma süresinin ortalamaları ve standart hataları günlere göre sırasıyla $25,92 \pm 5,54$ sn, $19,47 \pm 2,48$ sn, $13,04 \pm 2,18$ sn, $12,95 \pm 2,89$ sn, $15,94 \pm 3,79$ sn, $10,41 \pm 1,53$ sn ve $9,71 \pm 2,2$ sn idi (Şekil 4.10). İstatistiksel olarak iki grupta da anlamlı fark saptanmadı. Testin bitiminden 24 saat sonra yapılan prob testinde (platformun kaldırıldığı testte), hedef çeyrek dairede geçirilen zaman sham ve serebellar enfarktüs için ortalama ve standart hatası sırasıyla $9,44 \pm 1,01$ sn ve $8,76 \pm 1,47$ sn idi. İstatistiksel olarak iki grup arasında anlamlı fark saptanmadı (Mann Whitney U test, $p=0,465$).



Şekil 4.10. Morris su tankı testinin zamana göre platformu bulma süresi grafiği
Noktalar platformu bulma süresinin ortalamasını, çizgiler ise standart hatayı göstermektedir.

4.1.6. Barnes Labirent Testi

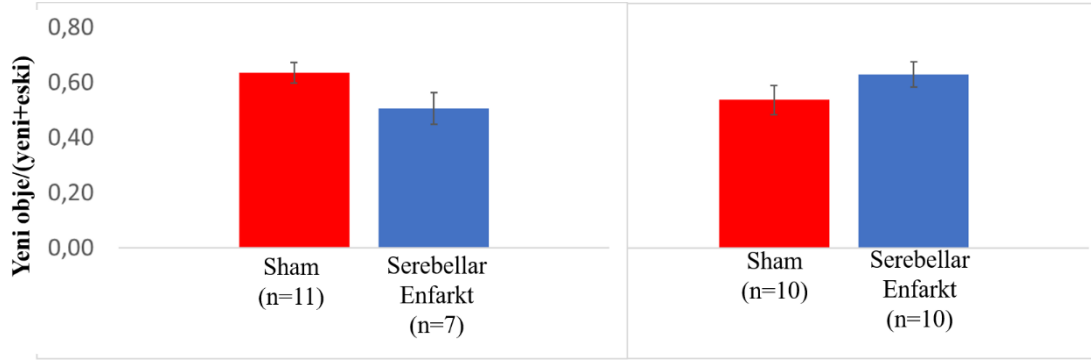
Barnes labirent testi, 10 sham ve 10 serebellar enfarktli fare deneyin ikinci haftasında (operasyon sonrası) karşılaştırıldı. Günde dört defa test yapıp her bir günün kaçış tüneline bulma süresinin (latansı) ortalaması alınarak analiz yapıldı. Sham grubunun tüneli bulma süresinin ortalamaları ve standart hataları günlere göre sırasıyla $164,875 \pm 9,4$ sn, $128 \pm 15,25$ sn, $133 \pm 18,28$ sn ve $91,225 \pm 16,45$ sn idi. Serebellar enfarktüs grubunun tüneli bulma süresinin ortalamaları ve standart hataları günlere göre sırasıyla $154,75 \pm 8,78$ sn, $84,9 \pm 19,42$ sn, $83,125 \pm 17,81$ sn ve $67,1 \pm 18,36$ sn idi (Şekil 4.11). İstatiksel olarak iki grupta da anlamlı fark saptanmadı (İki Yönlü Anova, $p=0,201$). Testin bitiminden 24 saat sonra yapılan referans hafıza testinde (kaçış tüneline kapatıldığı testte), hedef çeyrek dairede geçirilen zaman sham ve serebellar enfarktüs için ortalama ve standart hatası sırasıyla $0,27 \pm 0,07$ sn ve $0,33 \pm 0,07$ sn idi. İstatistiksel olarak iki grup arasında anlamlı fark saptanmadı (Student t testi, $p=0,534$).



Şekil 4.11. Barnes labirent testinin zamana göre platformu bulma süresi grafiği
Noktalar tüneli bulma süresinin ortalamasını, çizgiler ise standart hatayı göstermektedir.

4.1.7. Yeni Obje Tanıma Testi

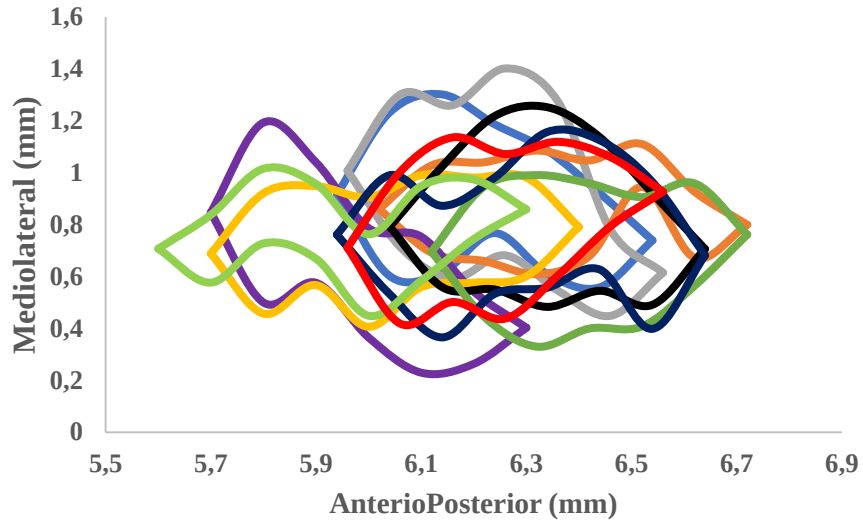
Yeni obje tanıma testi, deneyin ikinci haftasında (operasyon sonrası) yapıldı. Farelerin yeni objeyi inceleme sürelerinin yüzdesinin (Yeni Obje/[Yeni Obje + Eski Obje]*100) ortalamaları ve standart hataları incelendiğinde 7 sham ve 11 serebellar enfarkt grup için sırasıyla % $63,43 \pm 3,77$ ve % $50,47 \pm 5,86$ iken, 10 sham ve 10 serebellar enfarkt grubundakiler için sırasıyla % $53,88 \pm 5,32$ ve % $63,11 \pm 4,65$ idi (Şekil 4.12). İstatiksel olarak iki grup arasında anlamlı fark saptanmadı (Student t testi), p değerleri sırasıyla: 0,876 ve 0,207).



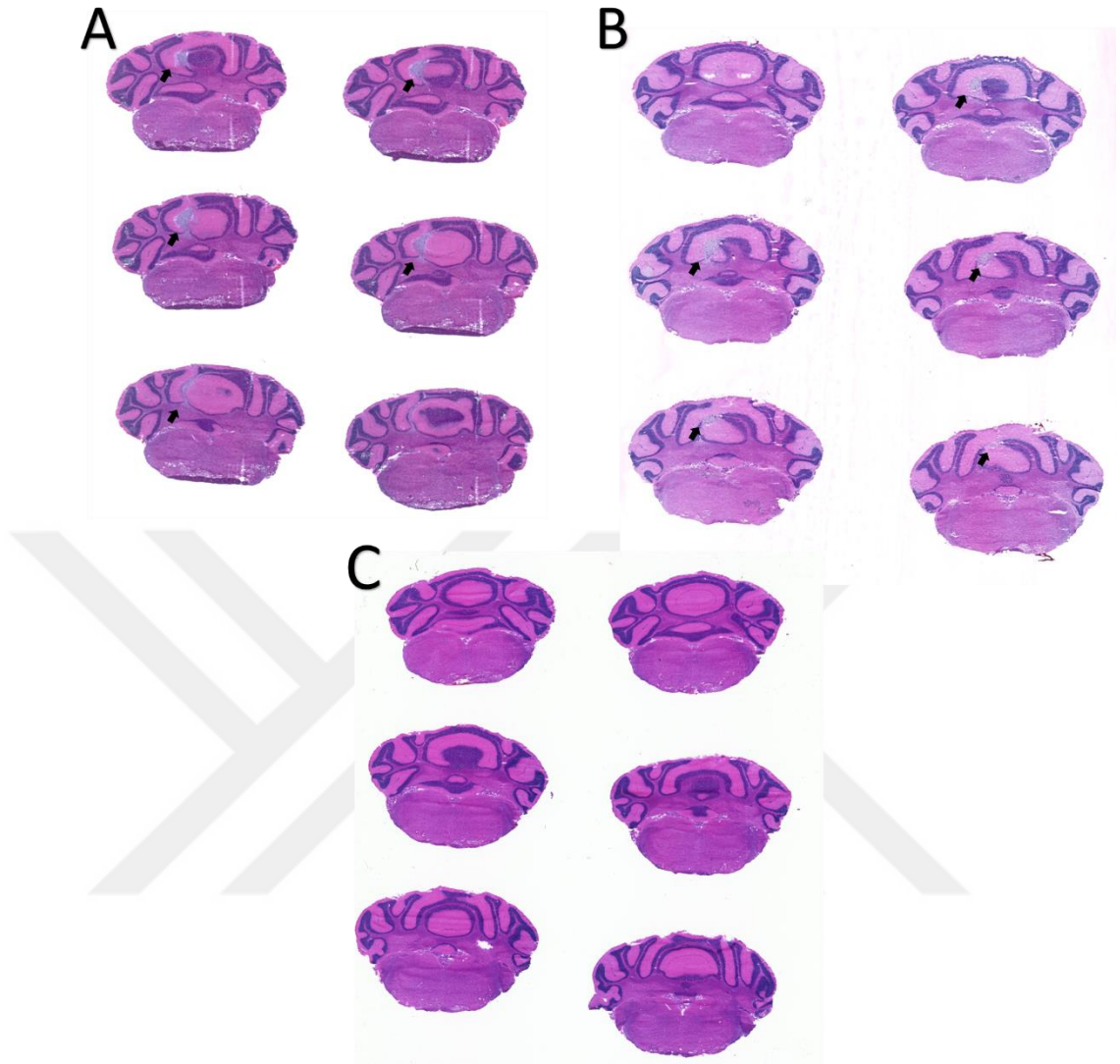
Şekil 4.12. Serebellar enfarkt ve sham grubunda yeni obje tanıma testi sonuçları

4.2. Serebellar Enfarkt Modeli Histolojik Sonuçlar

Farelerin dördüncü hafta sakrifiye edilip soğuk kesim yapıldığı serebellar kesitlerde enfarkt alanı bregmanın 0,229mm – 1,4mm mediolateralinde, -5,6mm ile - 6,62mm anterioposteriorunda bulunmaktadır (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14). Enfarkt volümü ortalama standart deviasyonu $0,089 \text{ mm}^3 \pm 0,013 \text{ mm}^3$ (maksimum – minimum $0,103 \text{ mm}^3 - 0,073 \text{ mm}^3$). İkinci hafta (15-20. gün) sakrifiye edilen farelerin serebellar kesitlerde enfarkt volümü ortalama ve standart deviasyonu $0,102 \text{ mm}^3 \pm 0,038 \text{ mm}^3$ (maksimum - minimum $0,196 \text{ mm}^3 - 0,050 \text{ mm}^3$). Serebellar enfarkt grubunda lezyon oluşurken sham grubunda herhangi bir lezyon oluşmamıştır ($p=0,0001$).



Şekil 4.13. Serebellumdaki enfarkt alanının histolojik olarak bregmaya göre lokasyonu
Her renk bir farenin kuşbakışı enfarkt alanını göstermektedir.



Şekil 4.14. Serebellumun histolojik kesitleri

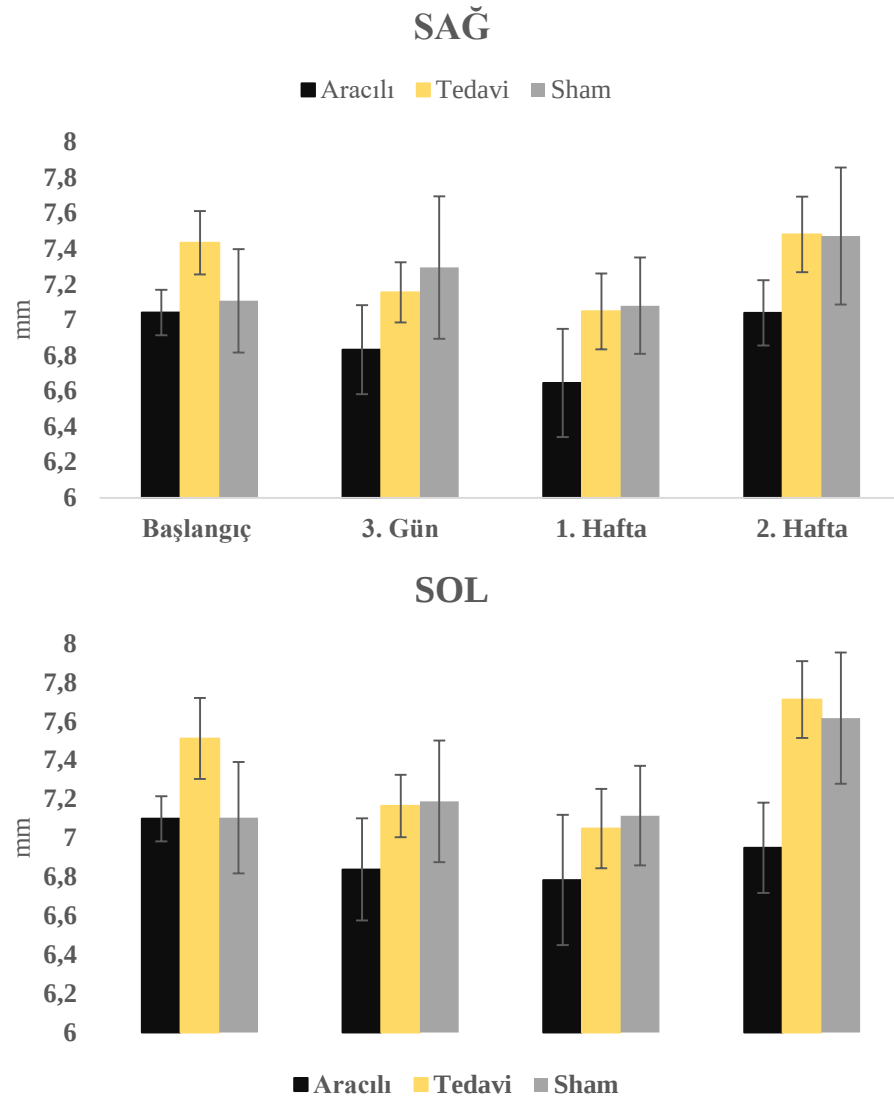
Şekilde H&E ile boyanmış, 20- μ m kalınlıkta ve 100- μ m aralıkta kesilmiş posteriordan anteriora doğru (soldan sağa, yukarıdan aşağıya doğru sıralanmış) serebellum kesitleri, 4000 dpi çözünürlükte lazer tarayıcı ile fotoğraflanmış görüntüler yer almaktadır. Ok işareti enfarkt alanlarını göstermektedir. Şekil A ikinci haftada (15-20. gün) sakrifiye edilen serebellar enfarkt grubundaki bir fare, B ise dördüncü haftada (30-35.gün) sakrifiye edilen serebellar enfarkt grubundaki bir fare, C ise sham grubundaki bir fareye ait kesitlerdir.

4.3. Serebellar Enfarktta Fasudil Tedavisi Test Sonuçları

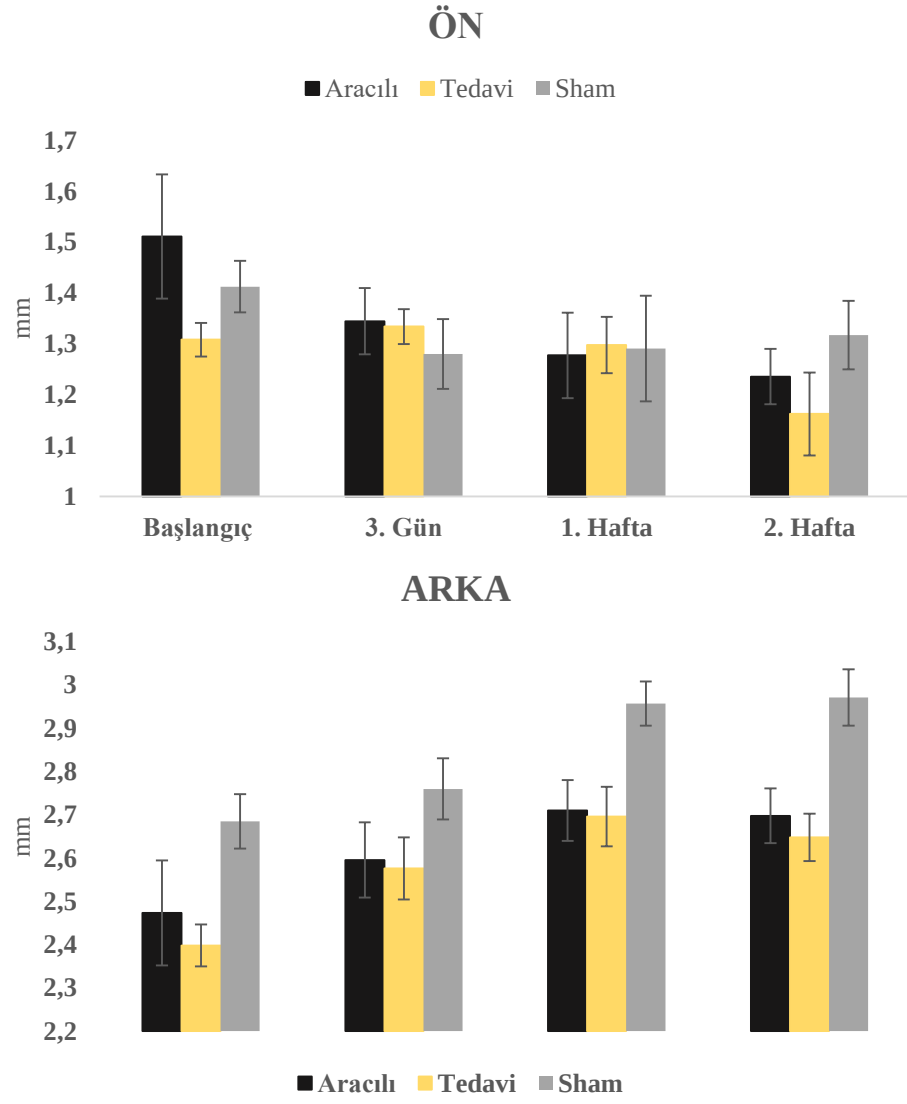
4.3.1. Yürüme Analizi

Yürüme analizi, 9 aracı grup, 10 fasudil tedavi grubu ve 8 sham grubu fare, operasyondan önce başlangıçta, operasyondan sonra 3. gün, 1. hafta ve 2. haftada karşılaştırıldı. Adım uzunlukları, genişlikleri ve üst üste gelmesinin ortalamalarının

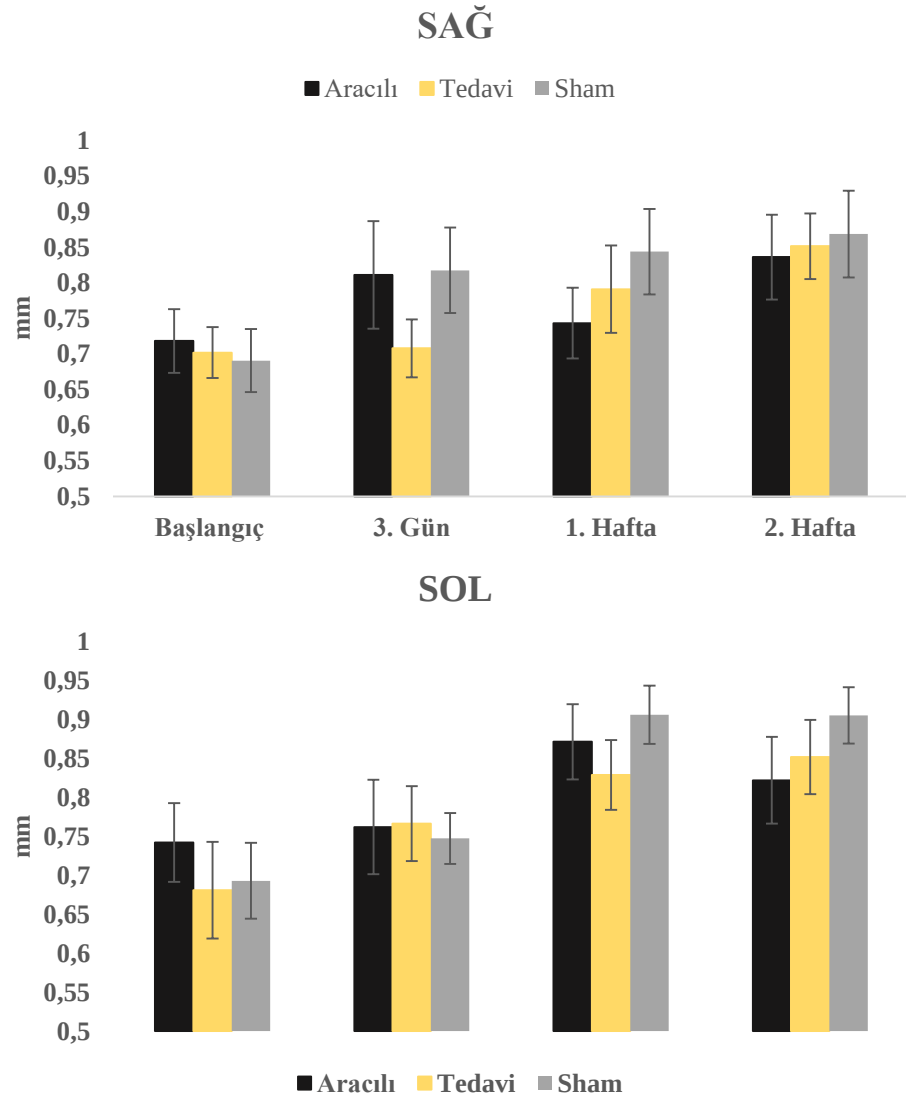
grafikleri Şekil 4.15, Şekil 4.16 ve Şekil 4.17 gösterilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.



Şekil 4.15. Yürüme analizinde tedavi, aracılı ve sham grubundaki adım uzunluğu ortalamaları ve standart hataları

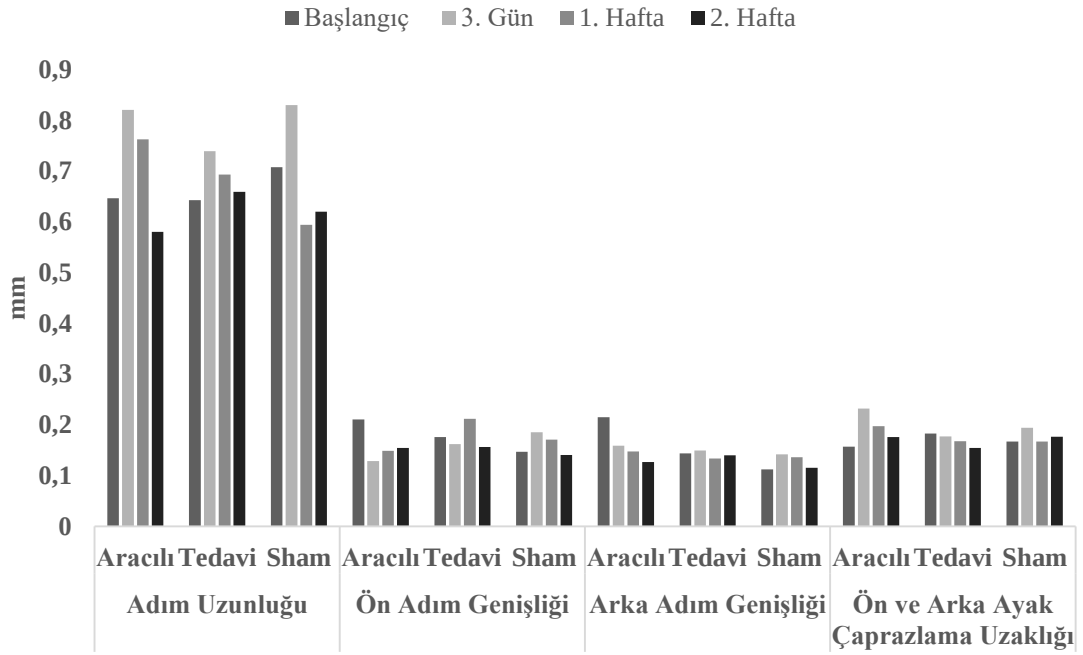


Şekil 4.16. Yürüme analizinde tedavi, aracılı ve sham grubundaki ön ve arka ayak adım genişliği ortalamaları ve standart hataları



Şekil 4.17. Yürüme analizinde tedavi, aracılı ve sham grubundaki adımların üst üste gelme uzaklığının ortalamaları ve standart hataları

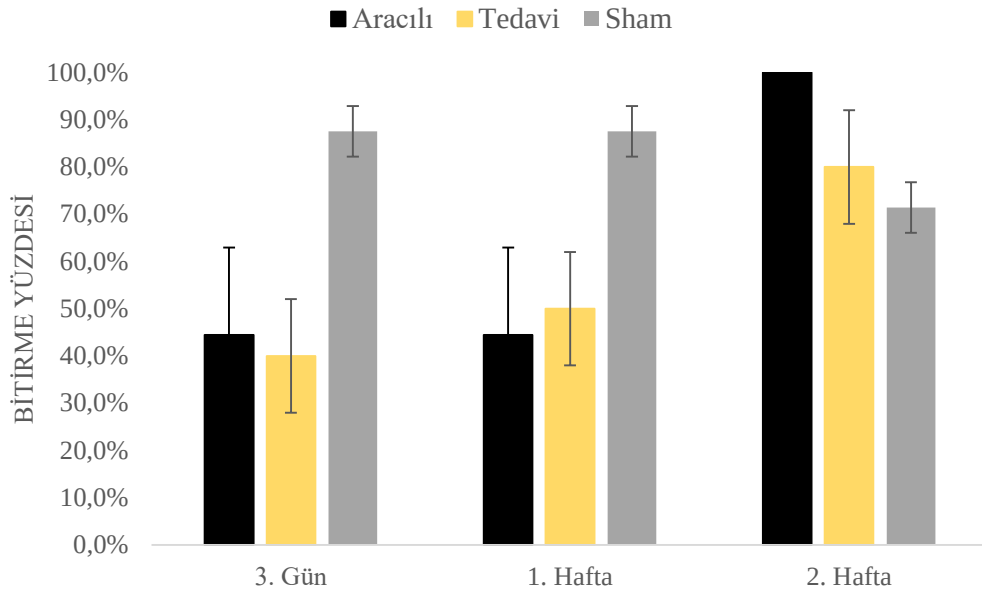
Aynı şekilde yürüme analizinde değişkenliği görmek amaçlı adım uzunluğunun, genişliğinin ve üst üste gelmesinin uzaklığının standart deviasyonu alınarak gruplar arasındaki farklılık bakıldı (Şekil 4.18) ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı.



Şekil 4.18. Yürüme analizinde aracılı, tedavi ve sham grubunda adım uzunluğu, genişliği ve adımların üst üste gelme uzaklığının standart deviasyonlarının ortalaması

4.3.2. Statik Rod

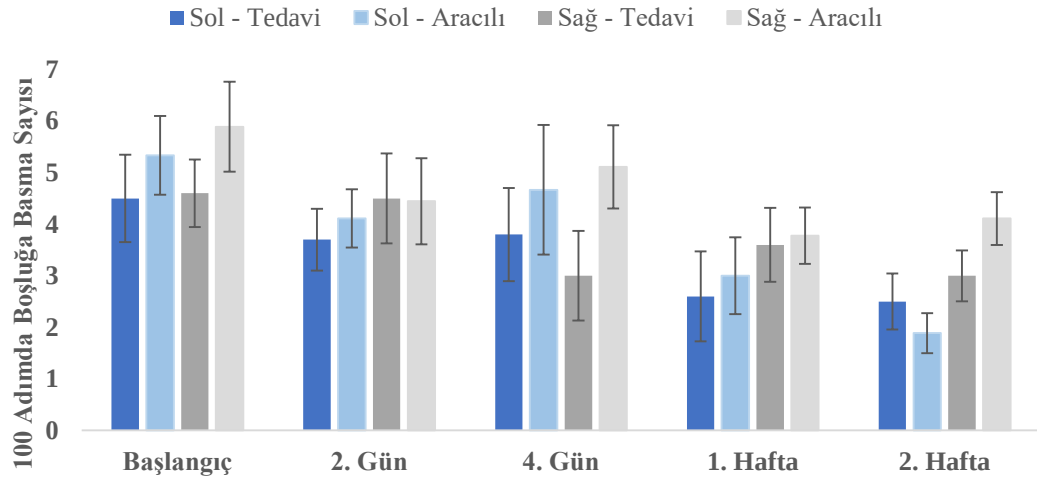
9 aracılı, 10 tedavi ve 8 sham grubundaki fare, operasyondan sonra üçüncü gün, birinci hafta ve ikinci haftasında karşılaştırıldı. 6mmlik sopada düşmeden bitirme oranları Şekil 4.19'de gösterilmiştir. Üç grup arasında üçüncü gün, birinci hafta ve ikinci haftada istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (Sırasıyla Fisher Exact testi p değerleri: 0,103, 0,158, 0,335 dir). Dönme zamanı ve toplam zaman ölçümlerinde zamanla iki grup arasında anlamlı farklılık saptanmadı (MANOVA $F=0,566$ $P=0,805$).



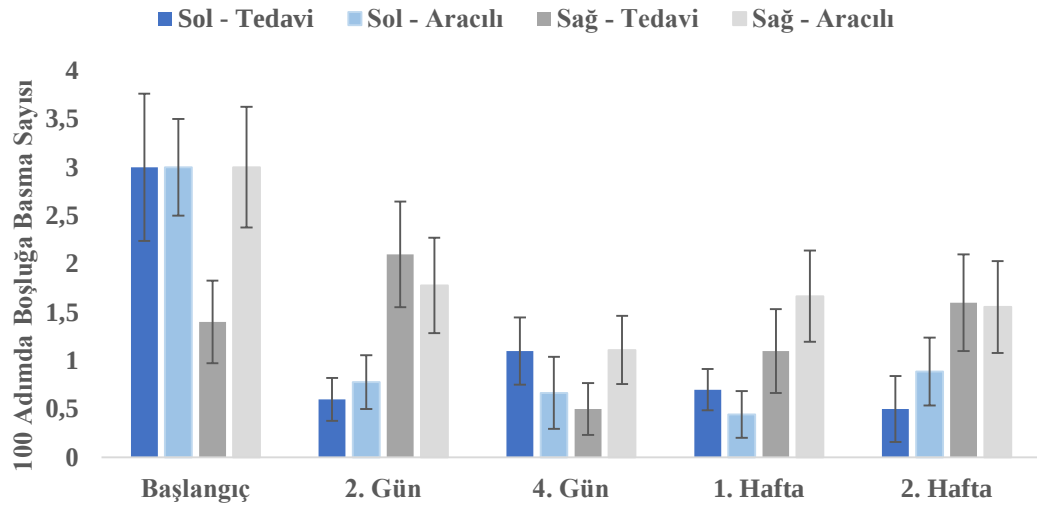
Şekil 4.19. Aracılı, tedavi ve sham grubu hayvanlarda statik rod testinde 6mmlik sopada düşmeden bitirme oranları

4.3.3. Izgara Telinde Yürüme Testi

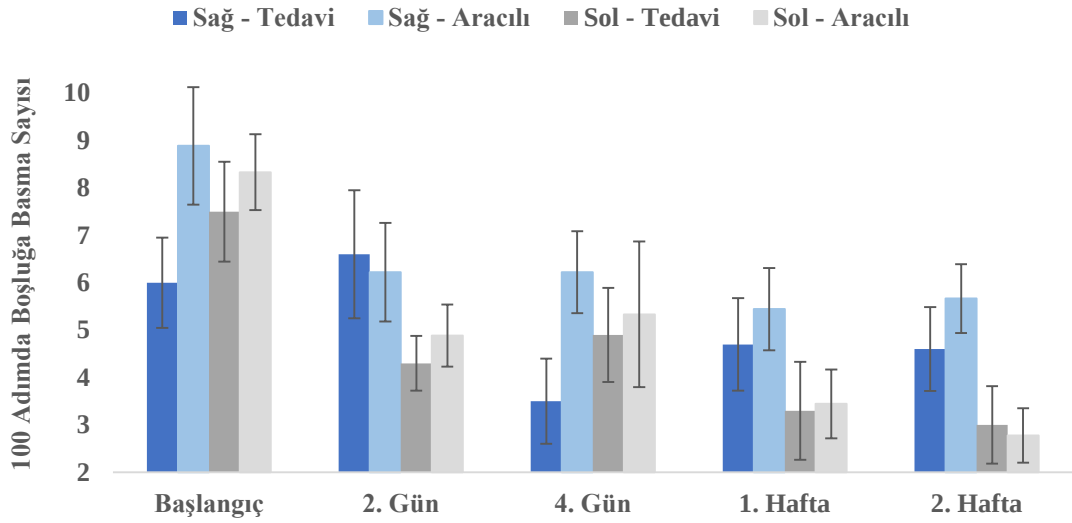
Izgara Telinde yürüme testi, 9 aracılı grup ve 10 fasudil tedavisi alan fare, operasyondan önce başlangıçta, operasyondan sonra 2. gün, 4. gün, 1. hafta ve 2. hafta da karşılaştırıldı. Sağ ve sol ön ayak, arka ayak ve toplam hata grafilere Şekil 4.20, Şekil 4.21 ve Şekil 4.22’ de gösterilmiştir. Arka sağ ayak düşme sayısında tedavi grubunda aracılı gruba göre düzelme açısından istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p=0,018$) (GEE).



Şekil 4.20. Tedavi ve aracılı grubun ızgara teli üzerinde yürüme testinde sağ ve sol ön ayak hata ortalamaları ve standart hataları



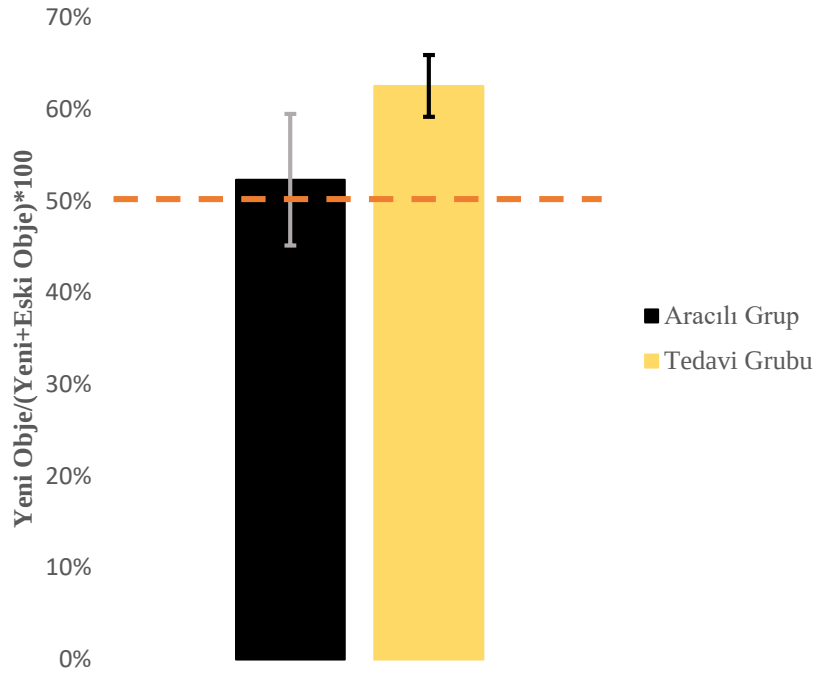
Şekil 4.21. Tedavi ve aracılı grubun ızgara teli üzerinde yürüme testinde sağ ve sol arka ayak hata ortalamaları ve standart hataları



Şekil 4.22. Tedavi ve aracılı grubun ızgara teli üzerinde yürüme testinde total sağ ve sol ayak hata ortalamaları ve standart hataları

4.3.4. Yeni Obje Tanıma Testi

9 aracılı grup alan 10 fasudil tedavisi alan fare, deneyin ikinci haftasında (operasyon sonrası) karşılaştırıldı. Farelerin yeni objeyi inceleme sürelerinin yüzdesi (Yeni Obje/[Yeni Obje + Eski Obje]*100) ortalamaları ve standart hataları, aracılı grup için $52,31 \pm 7,17$ iken, tedavide $62,54 \pm 3,36$ idi. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. (Mann Whitney U test, $U = 29$ $p=0,204$) (Şekil 4.23).



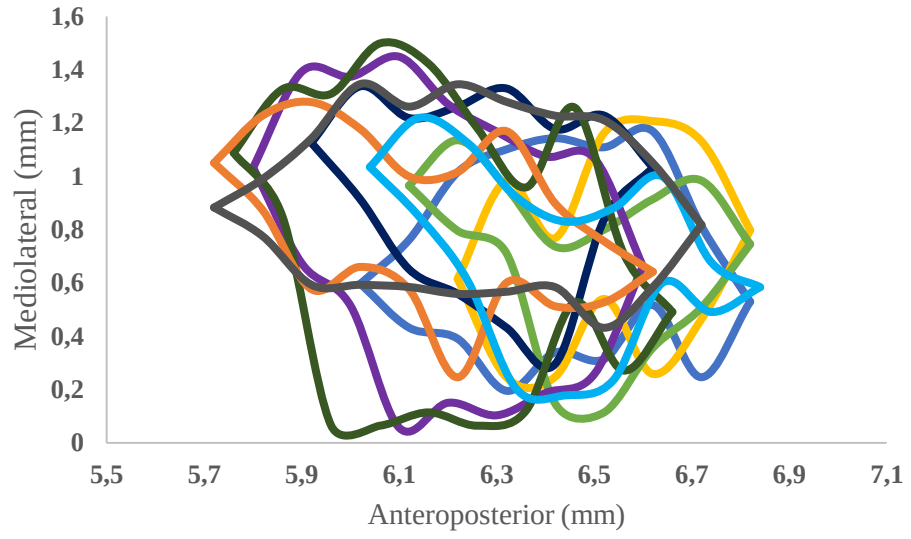
Şekil 4.23. Yeni obje tanıma testi sonucunun grafiği

Grafikte sütunlar ortalamayı, çizgiler ise standart hatayı ve kesikli çizgi yeni objeyi inceleme şans oranını göstermektedir.

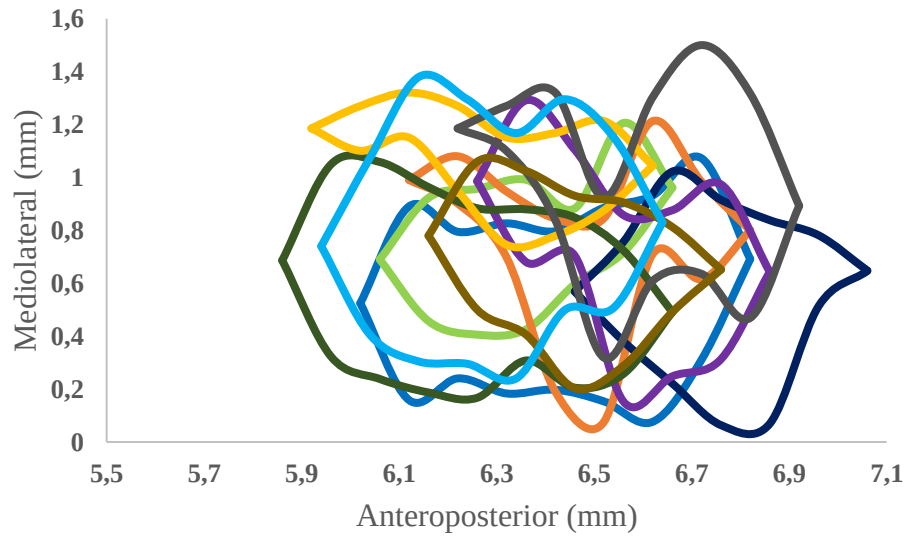
4.4. Serebellar Enfarktta Fasudil Tedavisi Histoloji Sonuçları

Fareler 19-20. günlerde sakrifiye edilip soğuk kesim yapılarak elde edilen serebellar kesitlerde aracılı grupta enfarkt alanı bregmanın 0,065 mm – 1,499 mm mediolateralinde, -5,72 mm ile -6,84 mm anterioposteriorında bulunmaktadır. Enfarkt volümü ortalama ve standart deviasyonu $0,193 \text{ mm}^3 \pm 0,056 \text{ mm}^3$ (maksimum – minimum $0,314 \text{ mm}^3$ - $0,139 \text{ mm}^3$). Tedavi grubunda ise bregmanın 0,064 mm – 1,5 mm mediolateralinde, -5,86 mm ile -7,06 mm anterioposteriorında bulunmaktadır. Enfarkt volümü ortalama standart deviasyonu $0,131 \text{ mm}^3 \pm 0,051 \text{ mm}^3$ (maksimum – minimum $0,211 \text{ mm}^3$ - $0,078 \text{ mm}^3$). Tedavi grubunda aracılı gruba göre enfarkt volümü %32 azalmıştır (Veriler normal dağılıma uyması için log10 dönüşümü yapılmış ve bağımsız gruplarda t testi uygulanmıştır, $p=0,015$). Şekil 4.24 ve Şekil 4.25 enfarkt alanlarının bregmaya göre lokasyonu gösterilmiştir. Enfarkt volüm hesaplamasında H&E boyalı kesitler kullanılmıştır, Şekil 4.26’de gösterilmiştir.

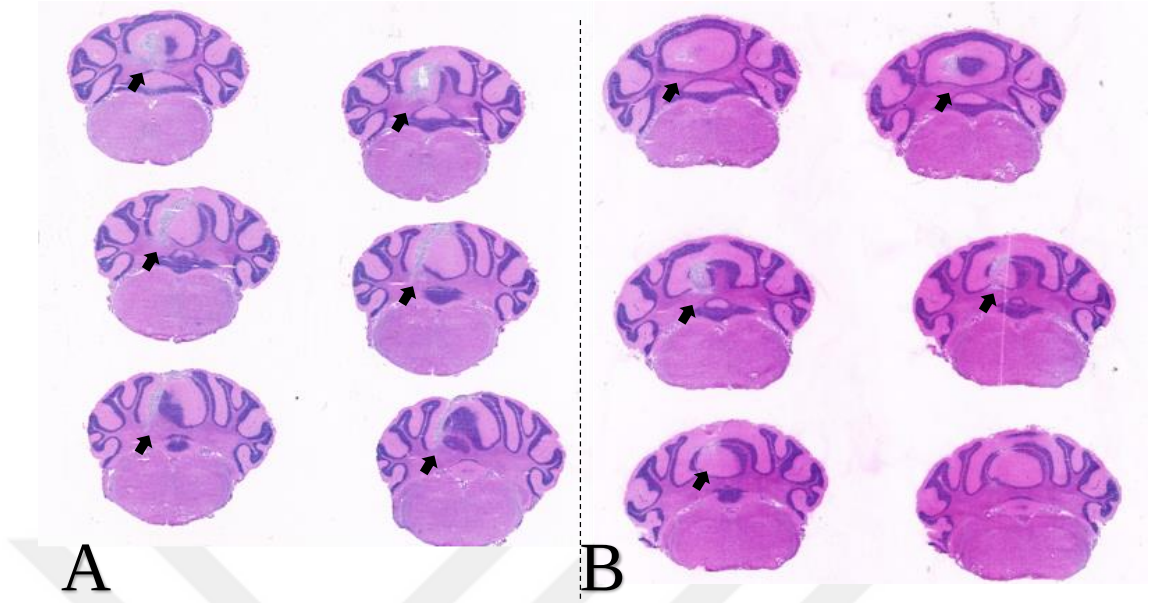
Miyelindeki iyileşmeyi göstermek amaçlı luxol fast ile myelin boyaması yapıldı ve görüntüler DAPI boyaması ile üst üste getirilerek gözlemsel analiz yapıldı. İki grupta da enfarkt yerinde yeni miyelin oluşumu gözlenmemiştir (Şekil 4.27).



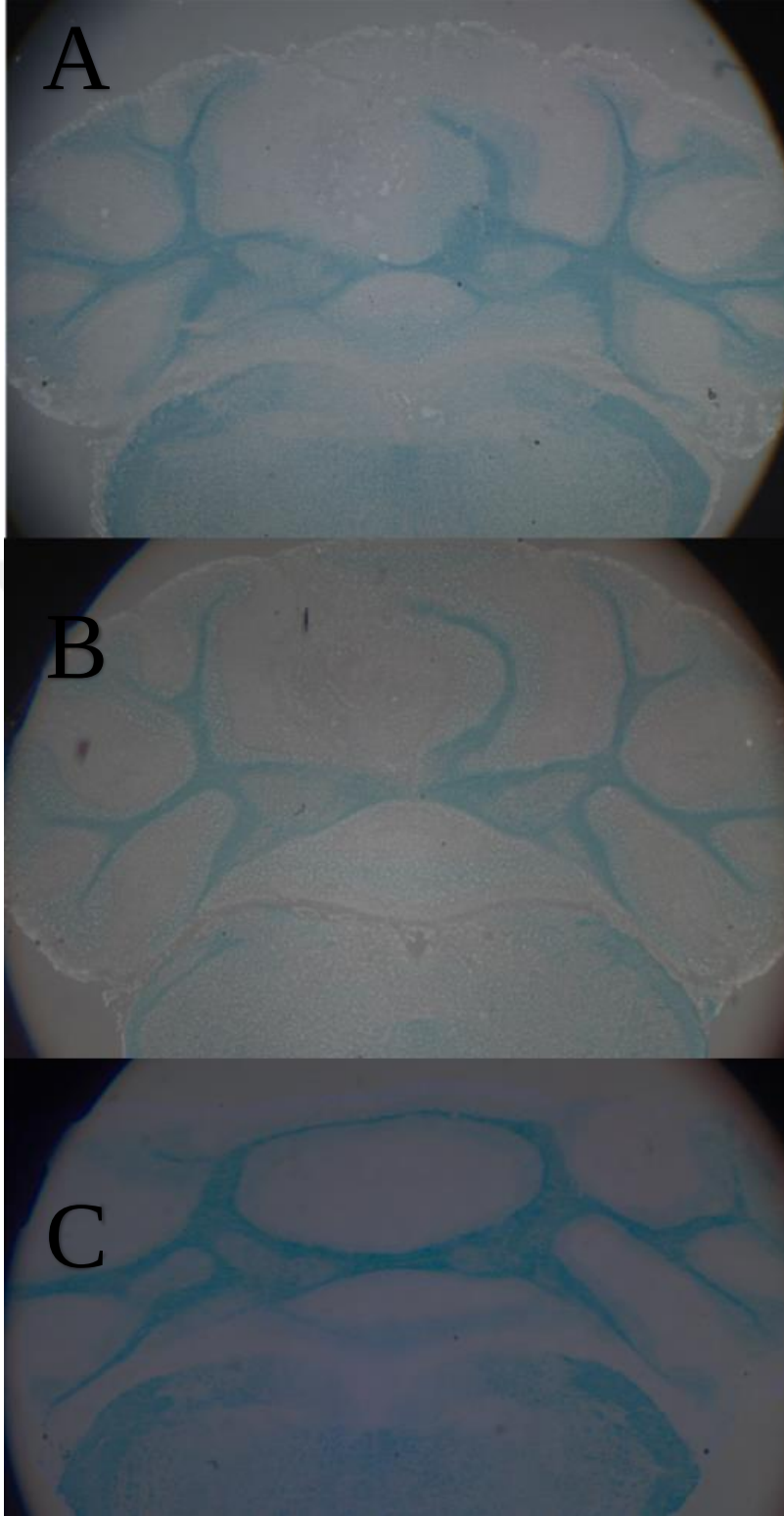
Şekil 4.24. Aracılı grupta serebellumdaki enfarkt alanının histolojik olarak bregmaya göre lokasyonu
Her renk bir farenin kuşbakışı enfarkt alanını göstermektedir.



Şekil 4.25. Tedavi grubunda serebellumdaki enfarkt alanının histolojik olarak bregmaya göre lokasyonu
Her renk bir farenin kuşbakışı enfarkt alanını göstermektedir.



Şekil 4.26. Aracılı ve tedavi grubunun H&E ile boyanmış histolojik kesitler
 Şekilde H&E ile boyanmış, 20- μ m kalınlıkta ve 100- μ m aralıkta kesilmiş posteriordan anteriora doğru (soldan sağa, yukarıdan aşağıya doğru sıralanmış) serebellum kesitleri, 4000 dpi çözünürlükte lazer tarayıcı ile fotoğraflanmış görüntüler yer almaktadır. Ok ile işaretli alan enfarkt alanlarını göstermektedir. Şekilde A aracılı grubundaki bir farenin histolojik kesiti, B ise tedavi grubundaki bir farenin histolojik kesitlerini göstermektedir.



Şekil 4.27. Aracılı ve tedavi grubunun DAPI ve “luxol fast blue” ile boyanmış ve üst üste getirilmiş histolojik kesitleri

Şekilde A ile gösterilen aracılı, B ile gösterilen ise tedavi grubunun, C ile gösterilen ise sham grubunun 2x büyütmede serebellar histolojik kesitidir. Mavi renk, miyelini göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Güncel literatürde, farelerde bizim çalışmamıza benzer fokal serebellar enfarkt çalışmalarına rastlanmamıştır. Ratlarda yapılan serebellumla ilgili iskemik çalışmalar; arterial kan infüzyonu ile hemorajik enfarkt oluşturma (173), hemiserebellectomi (174), intrakranial endotelin-1 infüzyonu (serebral iskemi oluşturarak serebellumdaki etkisini incelemek) (175) gibi konularla ilgilidir. Ancak fareler üzerinde fokal serebellar iskemik lezyon çalışması bulunmamaktadır.

Bizim çalışmamızda fokal serebellar enfarkt, N5- (1-İminoetil) -L-ornitin dihidroklorür ile steriotaksik enjeksiyon ile oluşturulmuştur. N5- (1-İminoetil) -L-ornitin dihidroklorür, vazokonstriktör bir maddedir ve beyaz madde inme modellerinde Charmicel ve ark. (2013) tarafından daha önce kullanmış ve başarılı bir şekilde enfarkt oluşturulmuştur (176, 177). Literatürde fokal serebral iskemik lezyon N5- (1-İminoetil) -L-ornitin dihidroklorür dışında intrakranial endothelin-1 enjeksiyonu, anterior koroidal arter oklüzyonu ve L-NAME ile oluşturulmaktadır (178-182). Endotelin-1 kullanımının enfarkt volümünde tutarsız sonuçlara yol açtığı görülürken arjinin analogu ve nitrik oksit sentetaz inhibitörü olan L-NAME ile birlikte kullanıldığında her seferinde enfarkt oluşturduğu fakat enfarkt volümünün beklenenden daha küçük olduğu ve türe göre değiştiği görülmüştür (183, 184). Hatta L-NAME'nin tam tersine, serebral iskemide nöroprotektif etkisi ve iskemik beyin hasarını azalttığına dair çalışmalar bulunmaktadır (185, 186). Bu sebeplerden dolayı biz çalışmamızda iskemik lezyon oluşturmak için nitrik oksit sentetaz inhibitörü olan N5- (1-İminoetil) -L-ornitin dihidroklorür kullandık.

Literatürde serebellum çalışmalarında davranış testleri (nörolojik testler) bizim çalışmamızdaki gibi kullanılmıştır. Stroobants ve arkadaşlarının (2013) yaptığı deneyde bregmanın -5,5mm ve -6,5mm posterioruna, 2mm latereline ve 1,5mm dorsoventraline yapılan elektrolitik enjeksiyonlar sonucunda krus I ve II'de lezyonlar meydana gelmiş, bu fareler yürüme analizi ve rotarod testi ile değerlendirilmiştir. Bu çalışmada yürüme analizinde lezyonlu farelerde sham'e göre her hangi bir farklılık izlenmezken (153) bizim çalışmamızda sağ - sol adım uzunluğunda azalma ve sağ adımların üst üste gelmesinin uzaklığında artma saptanmıştır. Yine Stroobants ve

arkadaşlarının çalışmasında yürüme analizinde ön adım genişliği ve adım uzunluğunun değişkenliği lezyonlu farelerde artarken; bizim çalışmamızda serebellar enfarktlı fare grubunda shame göre adımların üst üste gelmesinin uzaklığının değişkenliği başlangıçtan ikinci haftaya kadar artıp sonra azalma göstermiştir (153). Schmähmann ve arkadaşlarının (2010) serebellum enfarktlı hastalarda yaptığı çalışmada anterior lobu tutulan hastaların motor bozukluk puanı (Uluslararası Ataksi Sıralama Skalası-ICARS) yüksek olup lobül VII-X'nunki normal, lobül VI'nunki ise minimal motor bozukluk göstermiştir (21). Bizim çalışmamızla Stroobants ve arkadaşlarının çalışması arasındaki bu farkın, onların krus I ve II'de (Lobül VI ve VII ile ilişkilidir) elektrolitik lezyon yapmaları, bizim deneyimizde ise lobül IV ve V'te (ön lob) iskemik lezyon oluşturulmasından dolayı ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Yürüme analizini, fasudil tedavisinde değerlendirmek üzere yaptığımız çalışmamızda, fasudil tedavisi ve sham grubu arasında adım genişliği, adım uzunluğu ve adımların üst üste gelmesinin uzaklığının ortalaması ya da değişkenliği (varyansı) açısından anlamlı fark bulmadık.

Rotarod testi, motor-denge ve öğrenme komponentlerinden oluşan bir test olup denge bozukluklarında da kullanılabilir. Bizim çalışmamızda bu amaçla rotarod testini kullandık. Stroobants ve arkadaşları (2013), serebellumda krus I ve II bölümünde elektrolitik lezyonlu farelerde sham' a göre rotarod testinde anlamlı farklılık bulmamışlardır (153). Goddyn ve arkadaşları (2006), farelerde 1mm'lik pipet kullanarak aspirasyon yöntemiyle yaptıkları bilateral serebellar lezyonda rotarod testinde bozulma saptamışlardır (187). Bizim çalışmamızda serebellar enfarkt ve sham grubu arasında rotarod testi açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır. Çalışmamızda Rotarod testinde serebellar enfarkt ve sham grubu arasında anlamlı bir farkın çıkmamasının nedeni çalışmamızdaki serebellar lezyonların diğer çalışmalardaki lezyonlardan küçük olması olabilir. Bu da bize rotarod testinin küçük serebellar lezyonlarda sensitivitesinin daha az olduğunu düşündürmektedir.

Cerrahi öncesi veya sonrası alıştırma fazının olmasının serebellectomili farelerde rotarod testi sonuçlarına etki edebileceği gösterilmiştir. Çünkü rotarod

testinin öğrenme komponenti vardır (188). Statik rod testi, deneye başlamadan önce öğrenme ve hazırlık komponenti olmamasından dolayı denge ve koordinasyonda kullanılan bir testtir (155). Biz de çalışmamızda, statik rod testini farelerin denge ve koordinasyonunu ölçmek için kullandık. Çalışmamızda statik rod testinde serebellar enfarktüs grubunun sham grubuna göre daha fazla düştüğünü tespit ettik. Bu durum farelerde fokal serebellar lezyonlarda da denge ve koordinasyonun bozulduğunu göstermektedir.

Rotarod testinde serebellar enfarktlı grup ile sham grubu arasında fark olmamasının diğer bir sebebi de rotarod testinde öğrenme faktörünün de etkili olması olabilir. Stoodley ve arkadaşlarının yapmış olduğu meta-analizde fonksiyonel nörogörüntüleme raporlarında uzaysal, işlevsel ve çalışan hafıza kullanımında serebellumun posterior lobunun (lobül VI ve VII, krus I ve II dahil) aktive olduğu görülmektedir (21). İnsanda fonksiyonel MRG ile yapılan çalışmada serebellumun lobül VIIa KrusI bölgesinin hipokampus ile bağlantıda olduğu gösterilmiştir (189). Bizim çalışmamızda krus I ve II etkilenmediği için öğrenme komponenti olan rotarod testinin sonuçlarının normal geldiği düşünülmektedir.

Fasudil tedavisinin statik rod testi ile değerlendirilmesinde, fasudil tedavisi ve aracılı grup arasında düşme sıklığı veya dönme/total zaman açısından anlamlı farklılık saptamadık.

Izgara telde yürüme testi, rodentlerde piramidotomi, medulla spinalis hasarı, somatosensoryal korteks lezyonu ve iskemik inmelede sensorimotor koordinasyonu değerlendirmek amaçlı kullanılabilen bir testtir (190). Literatürde, bu testin serebellar lezyon üzerinde yapılmış bir çalışması yoktur. Lukong ve arkadaşları (2008), serebellumda çok bulunan Sam68 RNA-bağlayıcı proteini olmayan bir farede, ızgara telde yürüme testi kullanmış ama anlamlı sonuç bulamamışlardır. Sam68, RNA tek transdüksiyon aktivatörü (STAR) ailesinin bir üyesi olup, minigen bölünmesinin düzenlenmesinde ve koaktivatör proteinlerin başlatılmasından sorumludur. Farelerde homozigot delesyonlarda, erkeklerde sterilite ve dişilerde ise meme bezi gelişim bozukluğu gelişmektedir. Sam68 proteini santral sinir sisteminde özellikle serebellum,

hippokampus ve striatumda sık bulunduğundan bu çalışmada Sam68 protein yokluğunun ataksi benzeri özellikler gösterdiği tespit edilmiştir (191). Northup çalışmasında (1976) etanolün purkinje hücrelerini hasara uğratmak amaçlı serebellar mutant (“nervous”, nr/nr, purkinje hasarlı) olan ve olmayan farelere değişen dozlarda etanol veya serum fizyolojik intraperitoneal olarak (1,4g/kg veya 1,8g/kg dozunda) verilmiştir. İnfüzyondan iki dakika sonra ızgara telinde yürüme testi yapılmış ama skorlanması bizim çalışmamızdan farklı olarak 0= hata yok, 1= 1 ya da 2 kayma, 2= üç veya daha fazla kayma, 4=majör vücut kayması ve 5=platformdan düşme olarak belirlenmiştir. Serum fizyolojik alan mutant ve düşük doz etanol alan mutant olmayan farelerin de aynı şekilde düştükleri anlamlı olarak bulunmuştur (192). Çalışmamızda ön sağ, ön sol ve arka sağ ayağın serebellar enfarktlı grupta daha fazla düştüğü, hatta ön ayağın arka ayağa göre düşme sayısının arttığı saptanmıştır. Serebellar somatotrofi haritalandırmak üzere memelilerde anterografik/retrografik aygıt ile elektrofizyolojik kayıt yapılarak elde edilen çalışmalarda arka ayakların lobus centralis (lobül II ve III) tarafından, ön ayakların ise kulmen (lobül IV ve V) tarafından temsil edildiği gösterilmiştir (11). Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak serebellum lobül IV ve V iskemik lezyonunda ön ayağın arka ayağa göre daha fazla etkilendiği ortaya çıkmaktadır. Ayrıca sonuçlarımız farelerde veya rodentlerde serebellar lezyon çalışmalarında ızgara teli yürüme testininin kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Izgara telinde yürüme testini fasudil tedavisinde değerlendirmek üzere yaptığımız çalışmamızda, fasudil tedavisi ve aracılı grup arasında sağ ön ayak, sol ön ayak ve sol arka ayakların düşmelerinde anlamlı farklılık çıkmazken sağ arka ayak düşmesinin fasudil tedavisinde aracılı gruba göre zamanla düzeldiği görülmüştür. Liu ve arkadaşları (2016) ratlarda, orta serebral artere iskemi-reperfüzyon uygulamış, fasudil tedavisi işleminden bir gün sonra verilmiş ve total ön ayak düşme yüzdesi (hasta olan ön ayak kayma sayısı – hasta olmayan ön ayak kayma sayısı /bilateral total ön ayak hareketi sayısı) olarak hesaplanmıştır. Fasudil tedavisi alan grupta aracılı gruba göre düzelme gözlenmiştir. Bu çalışmada iskemi her ne kadar serebellumda değil serebrumda olsa da ızgara yürüme testinin tedaviye cevapta kullanılabileceğini göstermektedir (193).

Literatürde yapılan çalışmalarda serebellumun motor koordinasyon görevleri yanında kognitif işlevlerinin de olduğu görülmüştür (194). 1998 yılında Schmähmann ve Sherman, çeşitli nedenlerde serebellumda lezyon oluştuktan sonra serebellar motor sendrom olmadan sadece nörodavranışsal bozukluklar gösteren Serebellar Kognitif Etkileme Sendromunu (CCAS) tanımlamışlardır. Bu bozukluk, serebellumun posterior lobunda olduğunda, yönetici işlev (planlama, değişme, sözel akıcılık, soyut akıl yürütme, çalışma belleği), uzaysal biliş (görsel uzamsal örgütlenme ve bellek) ve dilbilimsel süreçte (agrammatizm ve disprosodiya) bozulmalar olduğu gözükmetedir (195).

Serebellumun kognitif özelliklerini göstermek için literatürde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Petrosini ve arkadaşlarının (1996) yaptıkları çalışmada; vakumlama yöntemiyle serebellumun bir hemisferinde lezyon yarattıkları ratlarda Morris su tankı testinde kontrole göre platformu bulma başarısında azalma ve latans sürelerinde uzama görülmüştür (196). Joyal ve arkadaşlarının (1996) rat serebellumunda aspirasyon ile lezyon oluşturup morris su tankı ile test ettikleri deneyde, lateral serebellum lezyonlu grubun kontrole göre uzaysal oryantasyonunda bozulma, bilateral vermis ve fastigius lezyonu olanlarda ise koordinasyonunda bozulma saptanırken; fastigial nükleus lezyonlu hayvanların prob testinde, latanslarda uzama ile beraber, tekrar eden testler ile performanslarını geliştirdikleri görülmüştür (197). Hilber ve arkadaşları (1998) ise Lurcher mutant farelerde uzaysal hafızayı test etmişlerdir. Lurcher mutant fareler; serebellar kortekste ve inferior olivar nükleusta massif nöron kaybı ile giderken, derin serebellar nükleusların korunmasıyla karakterize bir mutasyon tipidir. Bu araştırmada, mutant ve kontrol grubu fareler; Morris su tankı testinin öğrenme fazında (platformun olduğu faz) serebellektomiden sonra ve önce olacak şekilde iki grupta incelenmiştir. Lurcher mutant farelerin kontrol grubunda, serebelloktomiden sonra probu bulma süreleri (öğrenme fazı) arasında fark yokken; serebellektomiden önce ise platformu bulmada ciddi anlamda zorluk yaşadıkları görülmüştür (198). Hatta ratlarda hemiserebellektomi sonrası sadece uzaysal öğrenme ile ilişkili Morris su tankındaki bozulmalar dışında çalışan hafızayı etkileyen testlerde (radial kol labirent testi) de bozulmalar gözükmetedir (199). Biz de çalışmamızda bu bilgiler ışığı altında yola çıkarak, uzaysal öğrenme için Morris su tankı ve Barnes labirenti, çalışan hafıza için

ise yeni obje tanıma testini kullandık. Serebellar enfarkt ve sham grubu arasında ikinci haftada Morris su tankı testi, yeni obje tanıma testinde ve Barnes labirent testinde anlamlı fark yoktu. Tedavi kohortunda fasudil ve aracılı gruplar arasında yeni obje tanıma testinde anlamlı fark yoktu. Bunun nedeni, yapmış olduğumuz serebellar iskemiden sonra ikinci haftada, nörolojik belirti vermemesi (yürüme analizi ve ızgara yürüme testi ikinci haftada düzelmeye başlamaktadır) ya da öğrenme fazının enfarkt oluşumundan sonra olması ile açıklanabilir.

Fasudil tedavisi, Japonya’da subaraknoid kanama için onayı alınmış ve hali hazırda kullanılan bir tedavi şeklidir (200). Akut iskemik inmede insanlarda yapılmış bir çalışmada, ilk 48 saat içinde fasudil tedavisi başlanıp; tedavi günde iki defa iki hafta boyunca sürdürülmüştür. Hastaların tedaviye cevabı; tedavi bitimi sonrası ve inmeden bir ay sonra değerlendirilmiştir. Hastaların nörolojik durumu, Japon İnme Skalası Motor Sistemleri (el, kol ve bacaklardaki parezi durumunun şiddetini ölçen skala) ile ve klinik durumu, modifiye Rankin Skalası ile değerlendirilmiştir. Bu çalışmada akut iskemik inmeden 48 saat sonra başlanan fasudil tedavisinin hem ikinci haftada hem de bir ay sonra nörolojik ve klinik sonucu iyileştirdiği görülmüştür (201).

Rikitake ve arkadaşlarının (2005) farelerde yaptığı çalışmada; filament orta serebral arterin oklüzyonu ile oluşturulan fokal serebral iskemiden iki gün önce başlanan fasudil tedavisi sonrası hem enfarkt hacminde %33 azalma hem de nörolojik skorlamada azalma saptanmıştır (202). Shin ve arkadaşlarının (2007) çalışmasında distal orta serebral arter oklüzyonundan 1 saat önce ve 5 dakika sonra başlanan fasudil tedavisinden 48 saat sonra fareler sakrifiye edilmiş ve histolojik açıdan incelenmiştir. İskemiden 1 saat önce başlanan tedavide enfarkt volümünde %45 azalma saptanırken 1 saat sonra başlananda herhangi bir farklılık bulunamamıştır (203). Chan ve arkadaşları (2017), sıçanlarda geçici orta serebellar oklüzyonu yapıp sakrifiye etmeden 10 dakika önce (reperfüzyon olmadan 10 dakika önce, reperfüzyondan sonra hızlı sakrifiye edilmiş) fasudil tedavisi uygulanmış ve enfarkt hacmi üzerine anlamlı bir etki görülmemiştir (204). Liu ve arkadaşları (2016) sıçanlarda orta serebral arter oklüzyonu ile yaptıkları serebral iskemiden 1 gün sonra fasudil tedavisine başlamış ve iki hafta boyunca devam etmişlerdir. Sıçanlar 28. günde sakrifiye edilerek, enfarkt

volümü hesaplamış ve gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmazken ızgara teli yürüme testinde fasudil grubunda düzelme görülmüştür. Bu çalışmada sadece kontrol ve fasudil grubu değil, aynı zamanda hareket tedavisi tek başına ve fasudil grubuyla birlikte kullanılmıştır (193). Bizim çalışmamızda fasudil tedavisi grubu ve sham grubunda yürüme analizi, statik rod ve yeni obje tanıma testi açısından anlamlı fark çıkmadı. Fakat fasudil tedavisi alan grupta hem ızgara teli yürüme testinde (sağ arka ayakta) hem de enfarkt volümünde %32 oranında iyileşme görüldü. Bunun nedeni olarak diğer çalışmalara göre daha uzun ve yüksek dozda fasudil tedavisi verilip; Liu ve arkadaşlarının (193) çalışmasında uyguladıkları dördüncü hafta değil, ikinci haftada sakrifiye edilip histolojik olarak incelenmesi olabilir. Başka bir nedende, daha önce fasudil tedavisi fokal serebellar iskemide denenmediğinden serebellumun nörorejeneratif etkisinin serebruma göre farklı olabilmesidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Serebellar enfarktlı fare hayvan modelinde rho-kinaz inhibitörlerin etkinliği adlı çalışmamızda ilk önce lobül IV-V hedefleyen fokal iskemi oluşturduk. Yürüme analizi, ızgara telinde yürüme testi ve statik rod testi ile modelin davranış test bozuklukları gösterildi. Serebellar enfarktlı farelerde fasudil tedavisinin etkinliği, enfarkt hacmindeki küçülme ve ızgara teli yürüme testindeki düzelme ile gösterildi. Yaptığımız analizler sonucunda serebellumda lobül IV-V'in motor ve denge üzerine katkısı var iken, uzaysal ve çalışan hafıza ile alakalı kognitif işlevlere katkısının olmadığı anlaşıldı. Serebellar iskemiden 24 saat sonra başlanılan fasudil tedavisinin hem fonksiyonel hem de histolojik olarak iyileşmeye katkısı gösterildi. Bu bilgiler ışığında, fare serebellumunda lobül IV-V'in başka kognitif işlevlere katkısının olup olmadığının, farklı davranış testleri (örneğin korku şartlandırma deneyi) ile denenmesi ve fasudil tedavisinin daha uzun sürede enfarkt hacmi ölçümü ve çeşitli histolojik işaretlerle iyileşme üzerine katkılarının test edilmesi gerekmektedir. İleriki çalışmalarımızda bunlar hedeflenmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Zhou Q, Gensch C, Liao JK. Rho-associated coiled-coil-forming kinases (ROCKs): potential targets for the treatment of atherosclerosis and vascular disease. *Trends in pharmacological sciences*. 2011;32(3):167-73.
2. Dong M, Yan BP, Liao JK, Lam YY, Yip GW, Yu CM. Rho-kinase inhibition: a novel therapeutic target for the treatment of cardiovascular diseases. *Drug discovery today*. 2010;15(15-16):622-9.
3. Ishiguro M, Kawasaki K, Suzuki Y, Ishizuka F, Mishiro K, Egashira Y, Ikegaki I, Tsuruma K, Shimazawa M, Yoshimura S, Iwama T, Hara H (2012) A Rho kinase (ROCK) inhibitor, fasudil, prevents matrix metalloproteinase-9-related hemorrhagic transformation in mice treated with tissue plasminogen activator. *Neuroscience* 220:302–312.
4. Hawkes R. *Cerebellum: Anatomy and Organisation*. e LS. John Wiley & Sons Ltd. 2012
5. Ozol K, Hayden JM, Oberdick J, Hawkes R. Transverse zones in the vermis of the mouse cerebellum. *Journal of Comparative Neurology*. 1999;412(1):95-111.
6. Apps R, Hawkes R. Cerebellar cortical organization: a one-map hypothesis. *Nature reviews Neuroscience*. 2009;10(9):670-81.
7. D'Mello AM, Stoodley CJ. Cerebro-cerebellar circuits in autism spectrum disorder. *Frontiers in neuroscience*. 2015;9:408.
8. Hawkes R. *Cerebellum: Anatomy and Organisation*. eLS.
9. Voogd J, Ruigrok TJ. The organization of the corticonuclear and olivocerebellar climbing fiber projections to the rat cerebellar vermis: the congruence of projection zones and the zebrin pattern. *Journal of neurocytology*. 2004;33(1):5-21.
10. Sotelo C, Chedotal A. Development of the olivocerebellar system: migration and formation of cerebellar maps. *Progress in brain research*. 2005;148:1-20.
11. Manni E, Petrosini L. A century of cerebellar somatotopy: a debated representation. *Nature reviews Neuroscience*. 2004;5(3):241-9.
12. Bolk L. Entwicklungsvorgänge in der occipitalen Region des Primordial-Craniums beim Menschen. *Petrus Camper* 1904;2:3.
13. Adrian ED. Discharges from vestibular receptors in the cat. *The Journal of physiology*. 1943;101(4):389-407.
14. Snider RS, Stowell A. Receiving Areas Of The Tactile, Auditory, And Visual Systems In The Cerebellum. *Journal Of Neurophysiology*. 1944;7(6):331.
15. Balsters J, Robertson IH, Whelan C, Ramnani N, Balsters JH, Whelan CD, et al. *Cerebellum and Cognition: Evidence for the Encoding of Higher Order Rules*.
16. Koziol LF, Budding D, Andreasen N, D'Arrigo S, Bulgheroni S, Imamizu H, et al. Consensus Paper: The Cerebellum's Role in Movement and Cognition. *The Cerebellum*. 2014(1):151.

17. Iglói K, Doeller CF, Paradis AL, Benchenane K, Berthoz A, Burgess N, et al. Interaction Between Hippocampus and Cerebellum Crus I in Sequence-Based but not Place-Based Navigation. *Cerebral cortex* (New York, NY : 1991). 2015;25(11):4146-54.
18. Icardo J, Ojeda J, Garcia-Porrero J, Hurle J. The cerebellar arteries: cortical patterns and vascularization of the cerebellar nuclei. *Cells Tissues Organs*. 1982;113(2):108-16.
19. De Cocker LJJ, Geerlings MI, Hartkamp NS, Grool AM, Mali WP, Van der Graaf Y, et al. Cerebellar infarct patterns: The SMART-Medea study. *NeuroImage: Clinical*. 2015;8:314-21.
20. De Cocker LJJ, Lövblad KO, Hendrikse J. MRI of Cerebellar Infarction. *European Neurology*. 2017;77(3-4):137-46.
21. Stoodley CJ, Schmahmann JD. Evidence for topographic organization in the cerebellum of motor control versus cognitive and affective processing. *Cortex*. 2010;46(7):831-44.
22. World Health Organization. Burden of diseases statistics. Geneva, Switzerland: World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/healthinfo/bod/en/index.html> (accessed July 18, 2012).
23. Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, Mensah GA, Connor M, Bennett DA, et al. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* (London, England). 2014;383(9913):245-54.
24. Mihalka L, Smolanka V, Bulecza B, Mulesa S, Bereczki D. A population study of stroke in West Ukraine: incidence, stroke services, and 30-day case fatality. *Stroke*. 2001;32:2227–2231.
25. Feigin VL, Wiebers DO, Nikitin YP, O'Fallon WM, Whisnant JP. Stroke epidemiology in Novosibirsk, Russia: a population-based study. *Mayo Clin Proc*. 1995;70:847–852.
26. Manobianca G, Zoccolella S, Petruzzellis A, Miccoli A, Logroscino G. Te incidence of major stroke subtypes in southern Italy: a population-based study. *Eur J Neurol*. 2010;17:1148–1155.
27. Heuschmann PU, Di Carlo A, Béjot Y, et al. Incidence of stroke in Europe at the beginning of the 21st century. *Stroke*. 2009;40:1557–1563.
28. Kelly PJ, Crispino G, Sheehan O, et al. Incidence, event rates, and early outcome of stroke in Dublin, Ireland: the North Dublin Population Stroke Study. *Stroke*. 2012;43:2042–2047.
29. Anderson C, Carter KN, Hackett ML, et al. Trends in stroke incidence in Auckland, New Zealand, during 1981 to 2003. *Stroke*. 2005;36:2087–2093.
30. Cabral NL, Gonçalves AR, Longo AL, et al. Incidence of stroke subtypes, prognosis and prevalence of risk factors in Joinville, Brazil: a 2 year community based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009;80:755–761.

31. Lavados PM, Sacks C, Prina L, et al. Incidence, 30-day case-fatality rate, and prognosis of stroke in Iquique, Chile: a 2-year community-based prospective study (PISCIS project). *Lancet*. 2005;365:2206–2215.
32. Kase CS, Norrving B, Levine SR, et al. Cerebellar infarction. Clinical and anatomic observations in 66 cases. *Stroke* 1993; 24(1):76–83.
33. Bogousslavsky J, Van Melle G, Regli F: The Lausanne stroke registry: Analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke* 1988;19:1083–1092.
34. Tohgi H, Takahashi S, Chiba K, Hirata Y: Cerebellar infarction. Clinical and neuroimaging analysis in 293 patients. The tohoku cerebellar infarction study group. *Stroke* 1993;24:1697–1701.
35. Feigin VL, Lawes CMM, Bennett DA, Anderson CS. Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence and case-fatality in the late 20th century. *Lancet Neurol* 2003;2:43–53.
36. Macdonell RA, Kalnins RM, Donnan GA: Cerebellar infarction: natural history, prognosis, and pathology. *Stroke* 1987;18:849–855.
37. Adams RD: Occlusion of the anterior inferior cerebellar artery. *Arch Neurol Psychiatry* 1983;49:765.
38. Amarenco P, Levy C, Cohen A, et al. Causes and mechanisms of territorial and nonterritorial cerebellar infarcts in 115 consecutive patients. *Stroke* 1994;25(1):105–12.
39. Barth A, Bogousslavsky J, Regli F. Infarcts in the territory of the lateral branch of the posterior inferior cerebellar artery. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57(9):1073–6.
40. Amarenco P. The spectrum of cerebellar infarctions. *Neurology* 1991;41(7):973–9.
41. Amarenco P, Hauw JJ. Cerebellar infarction in the territory of the superior cerebellar artery: a clinicopathologic study of 33 cases. *Neurology* 1990;40(9):1383–90.
42. Kumral E, Kisabay A, Atac C. Lesion patterns and etiology of ischemia in the anterior inferior cerebellar artery territory involvement: a clinical – diffusion weighted – MRI study. *Eur J Neurol* 2006;13(4):395–401.
43. Amarenco P, Rosengart A, DeWitt LD, et al. Anterior inferior cerebellar artery territory infarcts. Mechanisms and clinical features. *Arch Neurol* 1993;50(2):154–61.
44. Masdeu JC, Irimia P, Asenbaum S, et al. EFNS guideline on neuroimaging in acute stroke. Report of an EFNS task force *Eur J Neurol* 2006; 13: 1271–83.
45. Jauch EC, et al. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2013;44(3):870–947.
46. Schwamm LH, et al. Temporal trends in patient characteristics and treatment with intravenous thrombolysis among acute ischemic stroke patients at get with the guidelines-stroke hospitals. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2013;6:543.

47. Topçuoğlu MA, Arsava EM, Özdemir AÖ, Gürkaş E, Necioğlu Örken D, Öztürk Ş. Akut İnme Tedavisinde İntravenöz Trombolitik Tedavi: Sorunlar ve Çözümler. *Türk Nöroloji Dergisi*. 2017;23(4):162-75.
48. del Zoppo GJ, et al. Recombinant tissue plasminogen activator in acute thrombotic and embolic stroke. *Ann Neurol*. 1992;32(1): 78–86.
49. Mahesh P. Kate RP, Ashfaq Shuaib. Intravenous Thrombolysis and Anti-thrombotics. In: Bruce Ovbiagele TNT, editor. *Ischemic Stroke Therapeutics A Comprehensive Guide* London: Springer International Publishing; 2016. p. 14.
50. Donnan GA, et al. Streptokinase for acute ischemic stroke with relationship to time of administration: Australian Streptokinase (ASK) Trial Study Group. *JAMA*. 1996;276(12):961–6.
51. Randomised controlled trial of streptokinase, aspirin, and combination of both in treatment of acute ischaemic stroke. Multicentre Acute Stroke Trial--Italy (MAST-I) Group. *Lancet*, 1995; 346(8989): 1509–14.
52. Thrombolytic therapy with streptokinase in acute ischemic stroke. The Multicenter Acute Stroke Trial--Europe Study Group. *N Engl J Med*, 1996; 335(3): 145–50.
53. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med*, 1995; 333(24): 1581–7.
54. Hacke W, et al. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA*. 1995;274(13): 1017–25.
55. Clark WM, et al. Recombinant tissue-type plasminogen activator (Alteplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset. The ATLANTIS Study: a randomized controlled trial. Alteplase thrombolysis for acute noninterventional therapy in Ischemic stroke. *JAMA*. 1999;282(21):2019–26.
56. Hacke W, et al. Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators. *Lancet*. 1998;352(9136):1245–51.
57. Hacke W, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2008;359(13):1317–29.
58. Parsons M, et al. A randomized trial of tenecteplase versus alteplase for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2012;366(12):1099–107.
59. Hacke W, et al. The Desmoteplase in Acute Ischemic Stroke Trial (DIAS): a phase II MRI-based 9-hour window acute stroke thrombolysis trial with intravenous desmoteplase. *Stroke*. 2005;36(1): 66–73.
60. Furlan AJ, et al. Dose Escalation of Desmoteplase for Acute Ischemic Stroke (DEDAS): evidence of safety and efficacy 3 to 9 hours after stroke onset. *Stroke*. 2006;37(5):1227–31.

61. Hacke W, et al. Intravenous desmoteplase in patients with acute ischaemic stroke selected by MRI perfusion-diffusion weighted imaging or perfusion CT (DIAS-2): a prospective, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet Neurol.* 2009;8(2): 141–50.
62. Miller DJ, Simpson JR, Silver B. Safety of thrombolysis in acute ischemic stroke: a review of complications, risk factors, and newer technologies. *The Neurohospitalist.* 2011;1(3):138-47.
63. I.S.T.c. group. The benefits and harms of intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator within 6 h of acute ischaemic stroke (the third international stroke trial [IST-3]): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2012;379(9834):2352–63.
64. Kate M, Shuaib A. Hyperacute Posterior Circulation Ischemic Stroke: shed DWI light. *Can J Neurol Sci.* 2014;41(2):139–40.
65. Sarikaya H, et al. Outcomes of intravenous thrombolysis in posterior versus anterior circulation stroke. *Stroke.* 2011;42(9):2498–502.
66. Ahmed N, Kellert L, Lees KR, et al. Results of intravenous thrombolysis within 4.5 to 6 hours and updated results within 3 to 4.5 hours of onset of acute ischemic stroke recorded in the Safe Implementation of Treatment in Stroke International Stroke Thrombolysis Register (SITSISTR): an observational study. *JAMA Neurol.* 2013;70:837–84.
67. Whiteley WN, Slot KB, Fernandes P, Sandercock P, Wardlaw J. Risk factors for intracranial hemorrhage in acute ischemic stroke patients treated with recombinant tissue plasminogen activator: a systematic review and meta-analysis of 55 studies. *Stroke.* 2012;43(11):2904-9.
68. Hill M, Lye T, Moss H, Barber P, Demchuk A, Newcommon N, et al. Hemiorolingual angioedema and ACE inhibition after alteplase treatment of stroke. *Neurology.* 2003;60(9):1525-7.
69. Leung T, Manser E, Tan L, Lim L. A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem* 1995; 270:29051–29054.
70. Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Okawa K, Iwamatsu A, Fujita A, Watanabe N, Saito Y, Kakizuka A, Morii N, Narumiya S. The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J* 1996;15:1885–1893.
71. Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Ann Rev Biochem* 1999;68:459–486.
72. Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2005;21:247–269.
73. Narumiya S, Tanji M, Ishizaki T. Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2009; 28:65–76.
74. Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K. Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res* 2000;261:44–51.

75. Yamaguchi H, Kasa M, Amano M, Kaibuchi K, Hakoshima T. Molecular mechanism for the regulation of rho-kinase by dimerization and its inhibition by fasudil. *Structure* 2006;14:589–600.
76. Jacobs M, Hayakawa K, Swenson L, Bellon S, Fleming M, Taslimi P, Doran J. The structure of dimeric ROCK I reveals the mechanism for ligand selectivity. *J Biol Chem* 2006;281:260–268.
77. Dvorsky R, Blumenstein L, Vetter IR, Ahmadian MR. Structural insights into the interaction of ROCKI with the switch regions of RhoA. *J Biol Chem* 2004;279:7098–7104.
78. Shimizu T, Ihara K, Maesaki R, Amano M, Kaibuchi K, Hakoshima T. Parallel coiled-coil association of the RhoA-binding domain in Rhokinase. *J Biol Chem* 2003;278:46046–46051.
79. Chen XQ, Tan I, Ng CH, Hall C, Lim L, Leung T. Characterization of RhoA-binding kinase ROKalpha implication of the pleckstrin homology domain in ROKalpha function using region-specific antibodies. *J Biol Chem* 2002;277:12680–12688.
80. Ishizaki T, Naito M, Fujisawa K, Maekawa M, Watanabe N, Saito Y, Narumiya S. p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions. *FEBS Lett* 1997;404:118–124.
81. Amano M, Chihara K, Nakamura N, Kaneko T, Matsuura Y, Kaibuchi K. The COOH terminus of Rho-kinase negatively regulates rho-kinase activity. *J Biol Chem* 1999;274:32418–32424.
82. Araki S, Ito M, Kureishi Y, Feng J, Machida H, Isaka N, Amano M, Kaibuchi K, Hartshorne DJ, Nakano T. Arachidonic acid-induced Ca²⁺ sensitization of smooth muscle contraction through activation of Rho-kinase. *Pflugers Arch* 2001;441:596–603.
83. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* 2001;3:339–345.
84. Ward Y, Yap SF, Ravichandran V, Matsumura F, Ito M, Spinelli B, Kelly K. The GTP binding proteins Gem and Rad are negative regulators of the Rho-Rho kinase pathway. *J Cell Biol* 2002;157:291–302.
85. Riento K, Guasch RM, Garg R, Jin B, Ridley AJ. RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol* 2003;23:4219–4229.
86. Pinner S, Sahai E. PDK1 regulates cancer cell motility by antagonising inhibition of ROCK1 by RhoE. *Nat Cell Biol* 2008;10:127–137.
87. Leung T, Chen XQ, Manser E, Lim L. The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol* 1996;16:5313–5327.
88. Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, Narumiya S. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett* 1996;392:189–193.

89. Sebbagh M, Hamelin J, Bertoglio J, Solary E, Breard J. Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in a caspase-independent manner. *J Exp Med* 2005;201:465–471.
90. Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J, Riche N, Bertoglio J, Breard J. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* 2001;3:346–352.
91. Komander D, Garg R, Wan PT, Ridley AJ, Barford D. Mechanism of multi-site phosphorylation from a ROCK-I:RhoE complex structure. *EMBO J* 2008;27:3175–3185.
92. Wang Y, Zheng XR, Riddick N, Bryden M, Baur W, Zhang X, Surks HK. ROCK isoform regulation of myosin phosphatase and contractility in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2009;104:531–540.
93. Thumkeo D, Keel J, Ishizaki T, Hirose M, Nonomura K, Oshima H, Oshima M, Taketo MM, Narumiya S. Targeted disruption of the mouse rho-associated kinase 2 gene results in intrauterine growth retardation and fetal death. *Mol Cell Biol* 2003;23:5043–5055.
94. Shimizu Y, Thumkeo D, Keel J, Ishizaki T, Oshima H, Oshima M, Noda Y, Matsumura F, Taketo MM, Narumiya S. ROCK-I regulates closure of the eyelids and ventral body wall by inducing assembly of actomyosin bundles. *J Cell Biol* 2005;168:941–953.
95. Asp P, Wihlborg M, Karlen M, Farrants AK. Expression of BRG1, a human SWI/SNF component, affects the organisation of actin filaments through the rhoa signalling pathway. *J Cell Sci* 2002;115: 2735–46.
96. Ishizaki T, Naito M, Fujisawa K, et al. P160ROCK, A Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions. *FEBS Lett* 1997;404:118–24.
97. Wiggan O, Shaw AE, Deluca JG, Bamburg JR. Adf/Cofilin regulates actomyosin assembly through competitive inhibition of myosin II binding to F-actin. *Dev Cell* 2012;22:530–43.
98. Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 1996;84:359–69.
99. Worthylake RA, Lemoine S, Watson JM, Burridge K. Rhoa is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *J Cell Biol* 2001;154:147–60.
100. Hauert AB, Martinelli S, Marone C, Niggli V. Differentiated HL-60 cells are a valid model system for the analysis of human neutrophil migration and chemotaxis. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34: 838–54.
101. Nakayama M, Amano M, Katsumi A, et al. Rho-kinase and myosin II activities are required for cell type and environment specific migration. *Genes Cells* 2005;10:107–17.
102. Ai S, Kuzuya M, Koike T, et al. Rho–Rho kinase is involved in smooth muscle cell migration through myosin light chain phosphorylation-dependent and independent pathways. *Atherosclerosis* 2001;155: 321–7.

103. Saso J, Shields SK, Zuo Y, Chakraborty C. Role of Rho GTPases in human trophoblast migration induced by Igfbp1. *Biol Reprod* 2012;86: 1–9.
104. Somlyo AV, Bradshaw D, Ramos S, et al. Rho-kinase inhibitor retards migration and in vivo dissemination of human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:652–9.
105. Nakayama M, Goto TM, Sugimoto M, et al. Rho-kinase phosphorylates PAR-3 and disrupts PAR complex formation. *Dev Cell* 2008;14:205–15.
106. Worthylake RA, Burridge K. RhoA and ROCK promote migration by limiting membrane protrusions. *J Biol Chem* 2003;278: 13578–84.
107. Kümper S, Mardakheh FK, McCarthy A, Yeo M, Stamp GW, Paul A, et al. Rho-associated kinase (ROCK) function is essential for cell cycle progression, senescence and tumorigenesis. *eLife*. 2016;5.
108. Kosako H, Yoshida T, Matsumura F, et al. Rho-kinase/ROCK is involved in cytokinesis through the phosphorylation of myosin light chain and not ezrin/radixin/moesin proteins at the cleavage furrow. *Oncogene* 2000;19:6059–64.
109. Chevrier V, Piel M, Collomb N, et al. The Rho-associated protein kinase P160ROCK is required for centrosome positioning. *J Cell Biol* 2002;157:807–17.
110. Croft DR, Olson MF. The Rho GTPase effector ROCK regulates cyclin A, cyclin D1, and P27KIP1 levels by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 2006;26:4612–27.
111. Zhang S, Tang Q, Xu F, et al. Rhoa regulates G1-S progression of gastric cancer cells by modulation of multiple INK4 family tumor suppressors. *Mol Cancer Res* 2009;7:570–80.
112. Zhao Z, Rivkees SA. Rho-associated kinases play an essential role in cardiac morphogenesis and cardiomyocyte proliferation. *Dev Dyn* 2003;226:24–32.
113. Izawa I, Inagaki M. Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: a study using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Sci* 2006;97:167–74.
114. Thumkeo D, Shimizu Y, Sakamoto S, Yamada S, Narumiya S. ROCK-I and ROCK-II cooperatively regulate closure of eyelid and ventral body wall in mouse embryo. *Genes to Cells*. 2005;10(8):825–34.
115. Rikitake Y, Oyama N, Wang CY, et al. Decreased perivascular fibrosis but not cardiac hypertrophy in ROCK1+/- haploinsufficient mice. *Circulation* 2005;112:2959–2965. [PubMed: 16260635].
116. Higashi M, Shimokawa H, Hattori T, et al. Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial NAD(P)H oxidase system. *Circ Res* 2003;93:767–775. [PubMed: 14500337].

117. Masamune A, Kikuta K, Satoh M, et al. Rho kinase inhibitors block activation of pancreatic stellate cells. *Br J Pharmacol* 2003;140:1292–1302. [PubMed: 14581180].
118. Zhang YM, Bo J, Taffet GE, et al. Targeted deletion of ROCK1 protects the heart against pressure overload by inhibiting reactive fibrosis. *Faseb J* 2006;20:916–925. [PubMed: 16675849].
119. Mukai Y, Shimokawa H, Matoba T, et al. Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease: a novel therapeutic target in hypertension. *Faseb J* 2001;15:1062–1064. [PubMed: 11292668].
120. Rikitake Y, Kim HH, Huang Z, et al. Inhibition of Rho kinase (ROCK) leads to increased cerebral blood flow and stroke protection. *Stroke* 2005;36:2251–2257. [PubMed: 16141422].
121. Sato M, Tani E, Fujikawa H, et al. Involvement of Rho-kinase-mediated phosphorylation of myosin light chain in enhancement of cerebral vasospasm. *Circ Res* 2000;87:195–200. [PubMed: 10926869].
122. Mallat Z, Gojova A, Sauzeau V, et al. Rho-associated protein kinase contributes to early atherosclerotic lesion formation in mice. *Circ Res* 2003;93:884–888. .
123. Rikitake Y, Liao JK. Rho-Kinase Mediates Hyperglycemia-Induced Plasminogen Activator Inhibitor-1 Expression in Vascular Endothelial Cells. *Circulation*. 2005;111(24):3261-8.
124. James K. Liao MS, Kensuke Noma. Rho Kinase (ROCK) Inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007 July;50(1):17-24.
125. Liao JK, Seto M, Noma K. Rho kinase (ROCK) inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007;50(1):17-24.
126. Shibuya M, Hirai S, Seto M, et al. Effects of fasudil in acute ischemic stroke: results of a prospective placebo-controlled double-blind trial. *J Neurol Sci* 2005;238:31–39. [PubMed: 16005902].
127. Shin HK, Salomone S, Potts EM, et al. Rho-kinase inhibition acutely augments blood flow in focal cerebral ischemia via endothelial mechanisms. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007 ; 27 (5): 998 -1009.
128. Asano T, Suzuki T, Tsuchiya M, et al. Vasodilator actions of HA1077 in vitro and in vivo putatively mediated by the inhibition of protein kinase. *Br J Pharmacol* 1989 ; 98 (4): 1091 -100.
129. Shin HK, Dunn AK, Jones PB, et al. Vasoconstrictive neurovascular coupling during focal ischemic depolarizations. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006 ; 26 (8): 1018 -30.
130. Takemoto M, Sun J, Hiroki J, et al. Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002 ; 106 (1): 57 -62.
131. Amin-Hanjani S, Stagliano NE, Yamada M, et al. Mevastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, reduces stroke damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in mice. *Stroke* 2001 ; 32 (4): 980 -6.

132. Hitomi A, Satoh S, Ikegaki I, et al. Hemorheological abnormalities in experimental cerebral ischemia and effects of protein kinase inhibitor on blood fluidity. *Life Sci* 2000 ; 67 (16): 1929 -39.
133. Satoh S, Toshima Y, Hitomi A, et al. Wide therapeutic time window for Rho-kinase inhibition therapy in ischemic brain damage in a rat cerebral thrombosis model. *Brain Res* 2008 ; 1193 : 102 -8.
134. Poli KA, Tofler GH, Larson MG, et al. Association of blood pressure with fibrinolytic potential in the Framingham offspring population. *Circulation* 2000 ; 101 (3): 264 -9.
135. Marcovina SM, Koschinsky ML. Evaluation of lipoprotein(a) as a prothrombotic factor: progress from bench to bedside. *Curr Opin Lipidol* 2003 ; 14 (4): 361 -6.
136. Rikitake Y, Liao JK. Rho-kinase mediates hyperglycemia-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular endothelial cells. *Circulation* 2005 ; 111 (24): 3261 -8.
137. Yagita Y, Kitagawa K, Sasaki T, et al. Rho-kinase activation in endothelial cells contributes to expansion of infarction after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 2007 ; 85 (11): 2460 -9.
138. Moers A, Nieswandt B, Massberg S, et al. G13 is an essential mediator of platelet activation in hemostasis and thrombosis. *Nat Med* 2003 ; 9 (11): 1418 -22.
139. Moers A, Wettschureck N, Offermanns S. G13-mediated signaling as a potential target for antiplatelet drugs. *Drug News Perspect* 2004 ; 17 (8): 493 -8.
140. Satoh S, Kobayashi T, Hitomi A, et al. Inhibition of neutrophil migration by a protein kinase inhibitor for the treatment of ischemic brain infarction. *Jpn J Pharmacol* 1999 ; 80 (1): 41 -8.
141. Satoh S, Utsunomiya T, Tsurui K, et al. Pharmacological profile of hydroxy fasudil as a selective rho kinase inhibitor on ischemic brain damage. *Life Sci* 2001 ; 69 (12): 1441 -53.
142. Kahles T, Luedike P, Endres M, et al. NADPH oxidase plays a central role in blood-brain barrier damage in experimental stroke. *Stroke* 2007 ; 38 (11): 3000 -6.
143. Yamashita K, Kotani Y, Nakajima Y, et al. Fasudil, a Rho kinase (ROCK) inhibitor, protects against ischemic neuronal damage in vitro and in vivo by acting directly on neurons. *Brain Res* 2007 ; 1154 : 215 -24.
144. Satoh S, Ikegaki I, Suzuki Y, et al. Neuroprotective properties of a protein kinase inhibitor against ischaemia-induced neuronal damage in rats and gerbils. *Br J Pharmacol* 1996 ; 118 (7): 1592 -6.
145. Jeon S, Kim S, Park JB, et al. RhoA and Rho kinase-dependent phosphorylation of moesin at Thr-558 in hippocampal neuronal cells by glutamate. *J Biol Chem* 2002 ; 277 (19): 16576 -84.
146. Vedernikov YP, Graser T, Leisner H, Tiedt N. Effect of hypoxia on endothelium-dependent relaxation of porcine coronary arteries and veins. *Biomed Biochim Acta* 1991 ; 50 (3): 257 -63.

147. Semenova MM, Maki-Hokkonen AM, Cao J, et al. Rho mediates calcium-dependent activation of p38 α and subsequent excitotoxic cell death. *Nat Neurosci* 2007 ; 10 (4): 436 -43.
148. Tanaka H, Yamashita T, Yachi K, et al. Cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) enhances axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury in rats. *Neuroscience* 2004 ; 127 (1): 155 -64.
149. Lingor P, Teusch N, Schwarz K, et al. Inhibition of Rho kinase (ROCK) increases neurite outgrowth on chondroitin sulphate proteoglycan in vitro and axonal regeneration in the adult optic nerve in vivo. *J Neurochem* 2007 ; 103 (1): 181 -9.
150. Sung JK, Miao L, Calvert JW, et al. A possible role of RhoA/Rho-kinase in experimental spinal cord injury in rat. *Brain Res* 2003 ; 959 (1): 29 -38.
151. Brooks SP, Trueman RC, Dunnett SB. Assessment of Motor Coordination and Balance in Mice Using the Rotarod, Elevated Bridge, and Footprint Tests. 2012.
152. Shin HK, Salomone S, Ayata C. Targeting cerebrovascular Rho-kinase in stroke. Expert opinion on therapeutic targets. 2008;12(12):1547-64.
153. Stroobants S, Gantois I, Pooters T, D'Hooge R. Increased gait variability in mice with small cerebellar cortex lesions and normal rotarod performance. *Behavioural Brain Research*. 2013;241:32-7.
154. Carter RJ, Morton J, Dunnett SB. Motor coordination and balance in rodents. *Current protocols in neuroscience*. 2001;Chapter 8:Unit 8.12.
155. Deacon RMJ. Measuring Motor Coordination in Mice. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*. 2013(75).
156. Hart AD, Wyttenbach A, Perry VH, Teeling JL. Age related changes in microglial phenotype vary between CNS regions: grey versus white matter differences. *Brain, behavior, and immunity*. 2012;26(5):754-65.
157. Galante M, Jani H, Vanes L, Daniel H, Fisher EMC, Tybulewicz VLJ, et al. Impairments in motor coordination without major changes in cerebellar plasticity in the Tc1 mouse model of Down syndrome. *Human Molecular Genetics*. 2009;18(8):1449-63.
158. Rogers DC, Campbell CA, Stretton JL, Mackay KB. Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke*. 1997;28(10):2060-5; discussion 6.
159. Allred RP, Jones TA. Maladaptive effects of learning with the less-affected forelimb after focal cortical infarcts in rats. *Experimental neurology*. 2008;210(1):172-81.
160. Zhang L, Schallert T, Zhang ZG, Jiang Q, Arniego P, Li Q, et al. A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia. *Journal of neuroscience methods*. 2002;117(2):207-14.
161. Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols*. 2006;1(2):848-58.

162. Caston J, Lalonde R, Delhay-Bouchaud N, Mariani J. The cerebellum and postural sensorimotor learning in mice and rats. *Behavioural brain research*. 1998;95(1):17-22.
163. Gandhi CC, Kelly RM, Wiley RG, Walsh TJ. Impaired acquisition of a Morris water maze task following selective destruction of cerebellar purkinje cells with OX7-saporin. *Behavioural brain research*. 2000;109(1):37-47.
164. Bobee S, Mariette E, Tremblay-Leveau H, Caston J. Effects of early midline cerebellar lesion on cognitive and emotional functions in the rat. *Behavioural brain research*. 2000;112(1):107-17.
165. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods*. 1984;11(1):47-60.
166. Sunyer B, Patil S, Höger H, Lubec G. Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice. *Nat Protoc*. 2007;390:10-38.
167. Hölscher C. Stress impairs performance in spatial water maze learning tasks. *Behavioural Brain Research*. 1999;100(1):225-35.
168. Berlyne DE. Novelty and curiosity as determinants of exploratory behaviour. *British Journal of Psychology*. 1950;41(1-2):68-80.
169. Balsters JH, Whelan CD, Robertson IH, Ramnani N. Cerebellum and Cognition: Evidence for the Encoding of Higher Order Rules. *Cerebral Cortex*. 2013;23(6):1433-43.
170. Koziol LF, Budding D, Andreasen N, D'Arrigo S, Bulgheroni S, Imamizu H, et al. Consensus Paper: The Cerebellum's Role in Movement and Cognition. *The Cerebellum*. 2013;13(1):151-77.
171. Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*. 2012;13(2):93-110.
172. Bevins RA, Besheer J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nature Protocols*. 2006;1(3):1306-11.
173. Cossu M, Pau A, Siccardi D, Viale GL. Infratentorial ischaemia following experimental cerebellar haemorrhage in the rat. *Acta neurochirurgica*. 1994;131(1-2):146-50.
174. Viscomi MT, Latini L, Florenzano F, Bernardi G, Molinari M. Minocycline attenuates microglial activation but fails to mitigate degeneration in inferior olive and pontine nuclei after focal cerebellar lesion. *Cerebellum (London, England)*. 2008;7(3):401-5.
175. Chan HH, Cooperrider JL, Park HJ, Wathen CA, Gale JT, Baker KB, et al. Crossed Cerebellar Atrophy of the Lateral Cerebellar Nucleus in an Endothelin-1-Induced, Rodent Model of Ischemic Stroke. *Frontiers in aging neuroscience*. 2017;9:10.
176. Hinman JD, Rasband MN, Carmichael ST. Remodeling of the axon initial segment after focal cortical and white matter stroke. *Stroke*. 2013;44(1):182-9.

177. Rosenzweig S, Carmichael ST. Age-dependent exacerbation of white matter stroke outcomes: a role for oxidative damage and inflammatory mediators. *Stroke*. 2013;44(9):2579-86.
178. Ahmad AS, Satriotomo I, Fazal J, Nadeau SE, Dore S. Considerations for the Optimization of Induced White Matter Injury Preclinical Models. *Frontiers in neurology*. 2015;6:172.
179. Sozmen EG, Kolekar A, Havton LA, Carmichael ST. A white matter stroke model in the mouse: axonal damage, progenitor responses and MRI correlates. *Journal of neuroscience methods*. 2009;180(2):261-72.
180. Nikolov R, Rami A, Kriegelstein J. Endothelin-1 exacerbates focal cerebral ischemia without exerting neurotoxic action in vitro. *European journal of pharmacology*. 1993;248(2):205-8.
181. Hughes PM, Anthony DC, Ruddin M, Botham MS, Rankine EL, Sablone M, et al. Focal lesions in the rat central nervous system induced by endothelin-1. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2003;62(12):1276-86.
182. Frost SB, Barbay S, Mumert ML, Stowe AM, Nudo RJ. An animal model of capsular infarct: endothelin-1 injections in the rat. *Behav Brain Res*. 2006;169(2):206-11.
183. Horie N, Maag AL, Hamilton SA, Shichinohe H, Bliss TM, Steinberg GK. Mouse model of focal cerebral ischemia using endothelin-1. *Journal of neuroscience methods*. 2008;173(2):286-90.
184. Ahmad AS, Satriotomo I, Fazal J, Nadeau SE, Doré S. Considerations for the Optimization of Induced White Matter Injury Preclinical Models. *Frontiers in neurology*. 2015;6.
185. Ashwal S, Cole DJ, Osborne S, Osborne TN, Pearce WJ. L-NAME reduces infarct volume in a filament model of transient middle cerebral artery occlusion in the rat pup. *Pediatric research*. 1995;38(5):652-6.
186. Quast MJ, Wei J, Huang NC. Nitric oxide synthase inhibitor NG-nitro-L-arginine methyl ester decreases ischemic damage in reversible focal cerebral ischemia in hyperglycemic rats. *Brain research*. 1995;677(2):204-12.
187. Goddyn H, Leo S, Meert T, Dhooge R. Differences in behavioural test battery performance between mice with hippocampal and cerebellar lesions. *Behavioural Brain Research*. 2006;173(1):138-47.
188. Caston J, Jones N, Stelz T. Role of Preoperative and Postoperative Sensorimotor Training on Restoration of the Equilibrium Behavior in Adult Mice Following Cerebellectomy. *Neurobiology of Learning and Memory*. 1995;64(3):195-202.
189. Igloi K, Doeller CF, Paradis AL, Benchenane K, Berthoz A, Burgess N, et al. Interaction Between Hippocampus and Cerebellum Crus I in Sequence-Based but not Place-Based Navigation. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)*. 2015;25(11):4146-54.
190. Chao OY, Pum ME, Li JS, Huston JP. The grid-walking test: assessment of sensorimotor deficits after moderate or severe dopamine depletion by 6-

- hydroxydopamine lesions in the dorsal striatum and medial forebrain bundle. *Neuroscience*. 2012;202:318-25.
191. Lukong KE, Richard S. Motor coordination defects in mice deficient for the Sam68 RNA-binding protein. *Behav Brain Res*. 2008;189(2):357-63.
 192. Northup LR. Additive effects of ethanol and Purkinje cell loss in the production of ataxia in mice. *Psychopharmacology*. 1976;48(2):189-92.
 193. Liu YH, Zhao Y, Huang FZ, Chen YH, Wang HX, Bonney E, et al. Combination of early constraint-induced movement therapy and fasudil enhances motor recovery after ischemic stroke in rats. *The International journal of neuroscience*. 2016;126(2):168-73.
 194. Buckner Randy L. The Cerebellum and Cognitive Function: 25 Years of Insight from Anatomy and Neuroimaging. *Neuron*. 2013;80(3):807-15.
 195. Schmahmann JD, Caplan D. Cognition, emotion and the cerebellum. *Brain*. 2006;129(2):290-2.
 196. Petrosini L, Molinari M, Dell'Anna ME. Cerebellar Contribution to Spatial Event Processing: Morris Water Maze and T-maze. *European Journal of Neuroscience*. 1996;8(9):1882-96.
 197. Joyal C, Meyer C, Jacquart G, Mahler P, Caston J, Lalonde R. Effects of midline and lateral cerebellar lesions on motor coordination and spatial orientation. *Brain research*. 1996;739(1-2):1-11.
 198. Hilber P, Jouen F, Delhay-Bouchaud N, Mariani J, Caston J. Differential roles of cerebellar cortex and deep cerebellar nuclei in learning and retention of a spatial task: studies in intact and cerebellectomized lurcher mutant mice. *Behavior genetics*. 1998;28(4):299-308.
 199. Mandolesi L, Leggio M, Graziano A, Neri P, Petrosini L. Cerebellar contribution to spatial event processing: involvement in procedural and working memory components. *European Journal of Neuroscience*. 2001;14(12):2011-22.
 200. Shirao S, Yoneda H, Ishihara H, Kajiwara K, Suzuki M. A proposed definition of symptomatic vasospasm based on treatment of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in Japan: Consensus 2009, a project of the 25(th) Spasm Symposium. *Surgical Neurology International*. 2011;2.
 201. Shibuya M, Hirai S, Seto M, Satoh S-i, Ohtomo E. Effects of fasudil in acute ischemic stroke: Results of a prospective placebo-controlled double-blind trial. *Journal of the Neurological Sciences*. 238(1):31-9.
 202. Rikitake Y, Kim HH, Huang Z, Seto M, Yano K, Asano T, et al. Inhibition of Rho kinase (ROCK) leads to increased cerebral blood flow and stroke protection. *Stroke*. 2005;36(10):2251-7.
 203. Shin HK, Salomone S, Potts EM, Lee SW, Millican E, Noma K, et al. Rho-kinase inhibition acutely augments blood flow in focal cerebral ischemia via endothelial mechanisms. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2007;27(5):998-1009.

204. Chan SL, Cipolla MJ. Treatment with low dose fasudil for acute ischemic stroke in chronic hypertension. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2017;37(9):3262-70.



EKLER

EK-1: Tez Çalışması İle İlgili Etik Kurul İzinleri



Institutional Animal Care and Use Committee
Massachusetts General Hospital
149 13th Street
Charlestown, MA 02129
Tel: (617) 726-3495
Fax: (617) 724-2475

Notification of IACUC Review Protocol #: 2010N000131

Date: 12/23/2013

To: Cenk Ayata, MD
 MGH, Neurology

From: Dianne McCabe IACUC Manager
 Research Management

Title of Protocol: Rho Kinase Inhibition in Experimental Stroke Recovery
Sponsor(s): Departmental Funds
Species / Number: Mice/464
Expiration Date: 7/21/2016
Annual Report Date: 7/21/2014

This Protocol has been reviewed and approved by the MGH IACUC – OLAW Assurance # A3596-01. The protocol as submitted and reviewed conforms to the USDA Animal Welfare Act, PHS Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals, the "ILAR Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" and other applicable laws and regulations. The protocol is approved for a three-year period, subject to submission of annual reports.

Please note that if a IACUC member had a conflict of interest with regard to the review of this protocol, that member left the room during the discussion and the vote on this project.

As Principal Investigator you are responsible for the following:

1. Compliance with MGH IACUC/CCM Policies governing the care and use of animals.
2. Submission using Insight of changes to this project for IACUC review and approval prior to initiation of the change.
3. Submission of annual progress reports to the IACUC for review and approval.

MASSACHUSETTS GENERAL HOSPITAL / HARVARD MEDICAL SCHOOL

June 28, 2018

To Whom It May Concern,

The purpose of this letter is to certify that the study "The Effect of Rho-Kinase Inhibitors in Cerebellar Infarct Mouse Model" was conducted by Dr. Sanem Aslihan Aykan Dilmen in accordance with research protocols approved by the IACUC ethics committee of Massachusetts General Hospital.

Please do not hesitate to contact me if you have any questions.

Sincerely,

[Handwritten signature]

ÖZGEÇMİŞ

AD: Sanem Aslıhan
SOYAD: AYKAN DİLMEN
DOĞUM YERİ / TARİHİ: İSTANBUL - 1988
UYRUĞU: TC
E-mail: aykan1@msn.com

EĞİTİM

(MEZUNİYET DERECESİ)

09/2012 – 06/2018 Hacettepe Üniversitesi, Fizyoloji AD – Fizyoloji Doktorası

02/2017 – 05/2017 SBÜ Sultan Abdülhamid Han EAH - FTR Uzmanlığı

08/2015 – 08/2016 Harvard Üniversitesi, Massachusetts General Hastanesi, Radyoloji AD – Araştırma Görevlisi

02/2012 – 02/2017 Ankara FTR EAH –Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Uzmanlık Öğrencisi

09/2005 - 06/2011 Marmara Üniversitesi, İngilizce Tıp Fakültesi
(FAKÜLTE İKİNCİSİ)

09/2002 - 06/2005 İstanbul Fen Lisesi ***(OKUL BİRİNCİSİ)***

VERDİĞİ DERSLER

2018 BAHAR DÖNEMİ SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ – FİZYOLOJİ DERSİ

ZORUNLU HİZMET

11/2011-01/2012 Elazığ Palu Devlet Hastanesi – Acil Doktoru

AKADEMİK BAŞARI

- **2015** Türkiye Fulbright Eğitim Komisyonu
2015-2016 AKADEMİK YILI DOKTORA TEZİ ARAŞTIRMA BURSUSU
- **2009** Marmara Tıp Fakültesi
AKADEMİK BAŞARI BURSUSU
- **2008** 8. Ulusal Marmara Tıp Öğrenci Kongresi
EN İYİ SÖZEL SUNUM
- **2008** 21. Uluslararası Tıp Bilimleri Öğrenci Kongresi
EN İYİ POSTER SUNUMU
- **2007** Marmara Tıp Öğrenci Kongresi
EN İYİ POSTER SUNUMU
- **2005** Fen Lisesi
BİRİNCİLİK - %100 AKADEMİK BURS
- **2005** İstanbul Fen Liseler Arası Matematik Yarışması
İKİNCİLİK
- **2004** Üniversite Sınavına Hazırlık Deneme Sınavı (22000 öğrenci katılmıştır)
BİRİNCİLİK
- **1998-2005** 14 adet Takdirname

TEZLER

Fiziksel Tıp Ve Rehabilitasyon Uzmanlık Tezi: Sanem Aslıhan Aykan Dilmen. McGill Ağrı Ölçeğinin Kısa Formunun Genişletilmiş ve Revize Edilmiş

Versiyonunun Kronik Bel Ağrılı Hastalarda Türkçe Güvenirliliği ve Geçerliliği.
Danışman: Doç Dr. Halil Uçan. Ankara 2016

Fizyoloji Doktora Tezi: Sanem Aslıhan Aykan Dilmen. Serebral Enfarktlı Fare Hayvan Modelinde Rho-kinaz inhibitörlerinin etkinliği. Danışman: Doç. Dr. İsmail Karabulut. Boston. MGH, Harvard Üniversitesi

YAYINLAR

Kaymaz S, İkiz Kaymaz T, **Aykan S A**, The association between serum vitamin D level and knee function, muscle strength, quality of life in patients with knee osteoarthritis. Journal of Physical Medicine & Rehabilitation Sciences/Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Bilimleri Dergisi Yayının Kabul Tarihi: 07.02.2018

Tilkici, M., Alemdaroğlu, E., Mandiroğlu, S., Ordu Gökkaya, N. K., Uçan, H., **& Aykan, S. A.** (2017). The Effect of Upper Extremity Electrical Stimulation in Addition to Conventional Rehabilitation in Individuals with Chronic Stroke: Randomized Controlled Study. Journal of Physical Medicine & Rehabilitation Sciences/Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Bilimleri Dergisi, 20(3).

Dilmen S, Eryılmaz M, Balkan SM, Serdar M, Durusu M, Yıldırım AO, **Dilmen S A** (2017). Comparison of Warm Fluid and Cold Fluid Resuscitations During Uncontrolled Hemorrhagic Shock Model in Rats. Turkish Journal of Trauma and Emergency Surgery. Ahead of Print: UTD-50487 | DOI: 10.5505/tjtes.2016.50487.

Çetiz A, Demirkaya Ş, Muşabak U, Akgün H, **Dilmen S A**. Investigation of Serum Interleukin 10 Levels in Patients with Multiple Sclerosis. Multiple sclerosis Journal 2016; 22(3) 396–445 (Poster olarak sunuldu)

Çetiz A, Demirkaya Ş, Muşabak U, Akgün H, **Dilmen S A**. Investigation of Serum Chemerin Levels in Patients with Multiple Sclerosis. Multiple sclerosis Journal 2016; 22(3) 396–445 (Poster olarak sunuldu)

Akgün H, Çetiz H, Demirkaya Ş, Taşdemir S, Muşabak U, **Dilmen S A**. Investigation of serum interleukin (IL)-1 beta levels in patients with multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Journal 2016: NP1–NP24 (Poster olarak sunuldu)

Dilmen S A, Alemdaroğlu E, Dilmen S, Ucan H, Kum RO (2013). A rare Cause of Poststroke Dizziness -Vestibular Schwannoma: A Case Report, Turk J Phys Med Rehab: (59 Suppl 2), p101. (Poster olarak sunuldu)

ULUSLARARASI BİLDİRİLER

Dilmen S A, Öztürk Y, Odabaşı Z, Uçan H. In spite of sensation loss, normal sensory nerve action potentials: Differentiation of brachial plexopathy from root avulsion with electrodiagnostic studies. INEREM 2015 Istanbul, p.42

Dilmen S A, Öztürk Y, Odabaşı Z, Uçan H. Median Nerve Injury Due To Transbrachial Coronary Angiography: An Electrodiagnostic Approach. INEREM 2015 Istanbul, p.43

Dilmen S A, Çelik Tam D, Uçan H, Aras M. The Physical Functional Effect of Kinesio-taping in Stroke Patients with Shoulder Subluxation. INEREM 2015 Istanbul, p.107

Kaymaz S, Mandıroğlu S, **Dilmen S A**, Aras M. Shoulder Ultrasound Abnormalities, Physical Examination Findings In Patients With Spinal Cord Injury. INEREM 2015 Istanbul, p.91

Dilmen S A, Gursoy Y., Gokkaya K., Uçan H. Complex regional pain syndrome of the upper and lower limbs in a stroke patient – Case Report. 8th WSRC 8-12 April 2014 Istanbul p. 640

Dilmen S A, Alemdaroğlu E, Dilmen S, Uçan H, Kum R O. A rare cause of poststroke dizziness- Vestibular schwannoma: A case report. 12th Congress of European Forum for Research in Rehabilitation. Semp 11-14 2013, p. 101

Aykan S A, Ordu Gökkaya N K, Uçan H, Alemdaroğlu E. Relationship between psychological symptoms of parents and factors that affect the life of cerebral palsy patients. 12th Congress of European Forum for Research in Rehabilitation. Semp 11-14 2013, p. 75

Dilmen S, Uysal E, Duran E, **Dilmen S A**, Salman N., Arslan D. et al. Acute Popliteal artery thrombosis after blunt trauma. Eur Surg Res 50 (suppl 1) 1-162 (2013):114

Kurtulus O, Uysal E, Dilmen S, Akbulut H, Aydoğan U, **Dilmen S A**. Factors Effecting Mortality in Patients with Penetrating Thoracic Trauma. Eur Surg Res 50 (suppl 1) 1-162 (2013):113

Aykan S A, Kılınç E, Demiröz Ö, Kır B, Relation between Speech discrimination and Pure Tone Averages, 21st International Medical Sciences Student Congress Abstract Book, May 9-11 2008, p.71

Aykan S A, Opinion amongst preclinical and clinical students of Marmara University, Medical Faculty, Eur J Med Res 12(Supplement IV), p.20-21 Indexed in: Index Medicus and MEDLINE

ULUSAL BİLDİRİLER

Dilmen S A, Uçan H, Kutluk Ö, Çarlı A B. Validity and reliability of the Turkish version of the

Short-form mcgill pain questionnaire 2 in patients with chronic low back pain.
26. Ulusal Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Kongresi. 25-29 Nisan 2017 (sözlü sunum olarak kabul edilmiştir)

Dilmen S A, Uçan H, Kutluk Ö. Validity and reliability of the turkish version of the Short-form mcgill pain questionnaire 2 in patients with chronic low back pain. Türk Romatoloji Kongresi 2017. 22-26 Mart 2017 p.045

Çetiz A, Demirkaya Ş, Muşabak U, Akgün H, Ardiç N, Albay A, **Dilmen S A**. Multipl Skleroz Hastalarında Serum Chemerin Düzeyinin İncelenmesi. IX. Klinik Nöroimmünoloji Sempozyumu, 2-5 Haziran 2016 Aydın - Türkiye

Dilmen S A, Çelik Tam D, Uçan H, Aras M. The Physical Functional Effect of Kinesio-taping in Stroke Patients with Shoulder Subluxation. 25. Ulusal Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Kongresi. 22-26 Nisan 2015, s.528

Dilmen S A, Alemdaroğlu E, Dilmen S, Uçan H, Kum R O. A rare cause of poststroke dizziness- Vestibular schwannoma: A case report. Turk J Phys Med Rehab 2011;59 Suppl;1-499

Aykan S A. Crutzfeldt-Jacop Disease: A Diagnostic Approach, 22nd International Medical

Sciences Student Congress Abstract Book, May 14-16 2010, p.64

Şimşek L, Eskiörük İ, Dönmez D, **Aykan S**. Cilt Sağlığı (Skin Health), Marmara Medical Student Congress 2006 Program and Abstract Book, p.90

GÖREV ALDIĞI KONRE ORGANİZASYONLARI

- **Dünya İnme Kongresi 2014 İstanbul**
 - ❖ Organizasyon Komitesi Üyesi
- **8. Ulusal Marmara Tıp Öğrenci Kongresi**

- ❖ Organizasyon Komitesi Başkanı, Bilimsel ve Sosyal Programı Genel Koordinatörü, Halkla İlişkiler

KATILDIĞI KONGRE VE KURSLAR

- 2018 Uluslararası Katılımlı Türk Romtoloji Sempozyumu – Cyprus
- 2017 Uluslararası Katılımlı Türk Romtoloji Sempozyumu – Antalya
- 2017 Türkiye Klinik Nörofizyoloji Eeg-Emg Derneği İstanbul Şubesi Emg Kursu - İstanbul
- 2016 Animal Models and Imaging Tools for CNS Injury and Diseases (Martinos Center, Harvard University) – Boston
- 2016 Musculoskeletal Ultrasound Course (MGH, Harvard University) – Boston
- 2016 Fulbright Enrichment Seminar – Seattle
- 2016 Fulbright Visiting Researcher Community Day - Boston
- 2015 Academic English Course (University of California San Diego) – San Diego
- 2015 International Neurology and Rehabilitation Meeting - Istanbul
- 2015 Türk Romtoloji Sempozyumu - Antalya
- 2014 World Stroke Congress – Istanbul
- 2014 8th World Congress for Neurorehabilitation - Istanbul
- 2014 11. Nöropatik Ağrı Kongresi - Antalya
- 2013 Kinezyolojik Bantlama Kursu – Ankara
- 2013 12th Congress of European Forum for Research in Rehabilitation - Istanbul
- 2013 KPR kursu - Ankara
- 2013 Foot and Ankle Problems in Cerebral Palsy Symposium - Ankara
- 2013 Therapeutic Injection Course - Ankara
- 2013 Upper Extremity Musculoskeletal System Ultrasonography Course - Ankara
- 2012 11. CME – EMG learning - Ankara
- 2012 Pain Control- I. Summer School - Istanbul
- 2012 11th Spinal Cord Injury Symposium - Istanbul
- 2011 4. Uludağ Üniversitesi Genel Cerrahi Toplantısı - Bursa
- 2011 12. Geleneksel Uludağ FTR Sempozyumu - Bursa
- 2010 10. Ulusal Marmara Öğrenci Kongresi - Istanbul
- 2010 22nd International Medical Student Congress - Istanbul
- 2010 1st National Mesenchymal Stem Cell Symposium - Eskisehir
- 2009 Acıbadem Ataşehir Tıp Merkezinde 4 hafta yaz stajı - Istanbul
- 2009 2th Marmara Internal Medicine Days - Istanbul
- 2008 14th WONCA Europe Regional Conference - Istanbul
- 2008 8. Ulusal Marmara Öğrenci Kongresi - Istanbul
- 2008 21st International Medical Sciences Student Congress - Istanbul
- 2008 9. GATA Ulusal Öğrenci Kongresi - Istanbul
- 2008 Programlı Hücre Ölümü Sempozyumu - Istanbul
- 2008 Istanbul Üniversitesi Kardiyoloji Enstitüsü Günleri - Istanbul
- 2008 1st Marmara Internal Medicine Days - Istanbul

- 2008 Emerging Trends in Hematologic Malignancies, Highlights from the 49th Annual Meeting of the American Society of Hematology - Istanbul
- 2007 18th European Students' Conference – Berlin /GERMANY
- 2007 Marmara University Student Congress - Istanbul
- 2007 Istanbul Medical Student Research Congress - Istanbul
- 2006 Marmara University Student Congress - Istanbul
- 2005 International Sea Medicine Symposium - Istanbul

SERTİFİKALAR

- Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası Kursu– 80saat- Mayıs 2015
- İş Yeri Hekimliği Sertifikası 2015

BİLGİSAYAR

Word, Excel, PowerPoint, Outlook: İleri düzey

SPSS: İleri düzey

Photoshop: İleri düzey

Graphpad Prism: İleri düzey

Matlab: Orta düzey