



T.C.

SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

PERİNATOLOJİ BİLİM DALI

**İNTRAUTERİN İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE
SELENYUMUN FETAL SIÇAN BEYNİ VE PLASENTASINDAKİ
KORUYUCU ETKİLERİ**

Op. Dr. Kadriye Nilay ÖZCAN

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mekin SEZİK

Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından TTU-2025- 9854 no'lu proje ile
desteklenmektedir.

ISPARTA-2026

BEYAN

“İntrauterin İskemi-Reperfüzyon Modelinde Selenyumun Fetal Sıçan Beyni ve Plasentasındaki Koruyucu Etkileri” adlı Yan Dal Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Uzmanlık Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesine uygun olarak hazırlanmıştır.

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

Hazırlayan

Op. Dr. Kadriye Nilay Özcan

Danışman

Prof. Dr. Mekin SEZİK

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Çok emek verdiğim yoğun bir eğitim sürecinin ardından tamamlanan bu çalışma, yalnızca bilimsel bir araştırmanın ürünü değil, aynı zamanda mesleki ve kişisel gelişim yolculuğumun önemli bir parçasıdır. Bu yolculuk boyunca bilgi, deneyim, destek ve sevgileriyle bana eşlik eden pek çok değerli insanın katkısı vardır.

Perinatoloji yan dal uzmanlık eğitimim süresince engin bilgi birikimi, akademik vizyonu ve yol göstericiliği ile mesleki gelişimime büyük katkı sağlayan, her zaman desteğini ve güvenini hissettiğim değerli tez danışmanım Prof. Dr. Mekin Sezik'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Kendisi yalnızca bilimsel anlamda değil, hekimlik anlayışı ve yaklaşımıyla da benim için her zaman örnek olmuştur.

Eğitim hayatım boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlanma fırsatı bulduğum, desteklerini ve katkılarını esirgemeyen Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Gökhan Bayhan ve Prof. Dr. İlker Günyeli'ye; emekli öğretim üyeleri Prof. Dr. Mehmet Okan Özkaya, Prof. Dr. Hilmi Baha Oral ve Prof. Dr. Evrim Erdemoğlu'na teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezin fikir aşamasından başlayarak planlanması, yürütülmesi, değerlendirilmesi ve sonuçlandırılması sürecinde bilgi, tecrübe ve bilimsel birikimlerini benimle paylaşan; her aşamada yol gösterici yaklaşımıyla çalışmaya en önemli katkıları sunan Prof. Dr. Halil Aşçı'ya ve değerli ekibine, ayrıca özverili desteği, kıymetli önerileri ve katkılarıyla bu çalışmanın şekillenmesinde önemli pay sahibi olan Dr. Orhan Berk İmece'ye içten teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Yan dal asistanlık sürecinde her zaman yanımda olan arkadaşım Op. Dr. Tülay Şahandar'a, değerli kadın doğum asistanlarına;

Tüm eğitim hayatım boyunca her daim yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen sevgili aileme; anneme, babama ve abime; yaşam amacım, en büyük motivasyonum, canım çocuklarım Eray ve Aylin'e; eşim Doç. Dr. Mustafa Soner Özcan'a,

Sonsuz teşekkürler...

Op. Dr. Kadriye Nilay ÖZCAN
Isparta-2025

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BEYAN	i
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hipoksik İskemik Ensefalopati.....	3
2.2. Hipoksik İskemik Ensefalopati Tedavisinde Profilaktik Yaklaşım	10
2.3. Selenyum	11
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	14
3.1. Deneysel İşlemler	14
3.1.1. Pilot Çalışma.....	14
3.1.2. Ana Çalışma.....	25
3.2. Histopatolojik İnceleme Yöntemi.....	26
3.3. İmmunohistokimyasal İnceleme Yöntemi.....	28
3.4. İstatistiksel Analiz	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. Histopatolojik Bulgular	31
4.1.1. Plasenta Histopatolojik Bulguları	31
4.1.2. Fetal Beyin Histopatolojik Bulguları.....	34
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular	37
4.2.1. Plasenta Kaspaz-3 İmmunohistokimyasal Bulguları	37
4.2.2. Plasenta TNF- α İmmunohistokimyasal Bulguları	40
4.2.3. Fetal Beyin Kaspaz-3 İmmunohistokimyasal Bulguları.....	43
4.2.4. Fetal Beyin TNF- α İmmunohistokimyasal Bulguları	46
5. TARTIŞMA.....	52
5.1. Fetal Beyin Histopatolojik Bulguları ve Literatür Karşılaştırması.....	52
5.2. Plasenta Histopatolojik Bulguları ve Literatür Karşılaştırması.....	53

5.3. Plasenta TNF- α İmmunohistokimyasal Bulguları ve Literatür Karşılaştırması.....	55
5.4. Fetal Beyin TNF- α İmmunohistokimyasal Bulguları ve Literatür Karşılaştırması.....	55
5.5. Plasenta Kaspaz- 3 İmmunohistokimyasal Bulguları ve Literatür Karşılaştırması.....	56
5.6. Fetal Beyin Kaspaz-3 İmmunohistokimyasal Bulguları ve Literatür Karşılaştırması.....	58
6. SONUÇ.....	61
ÖZET.....	64
ABSTRACT.....	65
KAYNAKLAR.....	66
EKLER.....	70
Ek 1. Etik Kurul Kararı	70

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
ATP	: Adenozin trifosfat
Bax	: B-cell Lymphoma-2 Associated X protein
Bcl-2	: B-cell Lymphoma-2
Ca²⁺	: Kalsiyum İyonu
GPX	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Glutasyon
HIE	: Hipoksik-iskemik ensefalopati
IFN-γ	: İnterferon Gamma
IL-1α	: İnterlökin 1 α
IL-1β	: İnterlökin 1 β
IL-6	: İnterlökin 6
KPY	: Katlanmamış Protein Yanıtı
mPTP	: Mitokondriyal Geçirgenlik geçiş Poru
Na⁺	: Sodyum İyonu
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NMDAR	: N-metil-D-aspartat reseptörü
nNOS	: Nitrik Oksit Sentaz
NO	: Nitrik Oksit
O$\cdot$	: Süperoksit Anyonu
ONOO$\cdot$	: Peroksinitrit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1. Gebe sıçanların kafeste rastgele seçilerek gruplara alınması	17
Şekil 3.2. Subkutan anestezi uygulanması.....	17
Şekil 3.3. Batın açılması	18
Şekil 3.4. Gebe sıçanın uterin arterlerin ve uterus anotomisinin görünümü.....	19
Şekil 3.5. Uteroovaryen arter bağlanması.....	19
Şekil 3.6. Bilateral utero overyan arter klemplenmesi ile uterin asfiksi modeli.....	20
Şekil 3.7. Uterin asfiksi modeli ve selenyum uygulanan sıçanlar	20
Şekil 3.8. Fetal beyin ve plasentanın alınması.....	21
Şekil 3.9. Alınan fetal beyin ve plasenta dokularının buz akülerine alınması.....	21
Şekil 3.10. Histopatolojik ve immünohistokimyasal inceleme için doku örneklerinin formaldehit çözeltisi içeren kaplara konulması ve saklanması	22
Şekil 3.11. Vena Cava inferiordan kan alınarak cerrahi egzanguinasyon işlemi ve sakrifikasyon.....	22
Şekil 4.1. Kontrol grubunda normal plasenta yapısı, HE, bar = 200 µm.	32
Şekil 4.2. Hasar grubunda plasentada belirgin anemi (ok) ve nekrotik hücreler (ok başı), HE, bar = 200 µm.	32
Şekil 4.3. Profilaksi grubunda normal plasenta yapısı, HE, bar = 200 µm.....	33
Şekil 4.4. Terapötik grubunda normal plasenta yapısı, HE, bar = 200 µm.	33
Şekil 4.5. Gruplar arasında plasenta histopatolojik bulgularının toplu histopatolojik görüntüleri	34
Şekil 4.6. Kontrol grubundaki bir fetüste normal beyin yapısı ve ventrikülün görünümü, HE, bar=200 µm.....	35
Şekil 4.7. Hasar grubundaki bir fetüste beyinde belirgin ve şiddetli hiperemi (oklar), HE, bar = 200 µm.	35
Şekil 4.8. Profilaksi grubundaki bir fetüste normal beyin yapısı ve ventrikülün görünümü, HE, bar=200 µm.....	36
Şekil 4.9. Terapötik grubundaki bir fetüste normal beyin yapısı ve ventrikülün görünümü, HE, bar = 200 µm.....	36
Şekil 4.10. Gruplara göre fetal beyin histopatolojik bulgularının toplu histopatolojik görüntüleri.....	36
Şekil 4.11. İntrauterin iskemi-reperfüzyon hasarı ve selenyum uygulaması sonrasında fetal beyin ve plasenta dokularının histopatolojik değerlendirilmesi	37

Şekil 4.12. Kontrol grubuna ait plasenta dokusunda çok hafif kaspaz-3 ekspresyonunun görünümü.....	38
Şekil 4.13. Hasar grubuna ait plasenta dokusunda belirgin kaspaz-3 ekspresyonu... 38	
Şekil 4.14. Profilaksi grubuna ait plasenta dokusunda kaspaz-3 ekspresyonunun görünümü.....	39
Şekil 4.15. Terapötik grubuna ait plasenta dokusunda kaspaz-3 ekspresyonunun görünümü.....	39
Şekil 4.16. Gruplar arasında plasenta kaspaz-3 ekspresyonlarının görünümü.	40
Şekil 4.17. Kontrol grubuna ait plasenta dokusunda çok hafif TNF- α ekspresyonunun görünümü.....	41
Şekil 4.18. Hasar grubuna ait plasenta dokusunda belirgin TNF- α ekspresyonu.	41
Şekil 4.19. Profilaksi grubuna ait plasenta dokusunda TNF- α ekspresyonlarının görünümü.....	42
Şekil 4.20. Terapötik gruba ait plasenta dokusunda TNF- α ekspresyonlarının görünümü.....	42
Şekil 4.21. Gruplar arasında plasenta TNF- α ekspresyonlarının karşılaştırmalı görünümü.....	43
Şekil 4.22. Kontrol grubuna ait fetal beyin dokusunda çok hafif kaspaz-3 ekspresyonu.	44
Şekil 4.23. Hasar grubuna ait fetal beyin dokusunda belirgin kaspaz-3 ekspresyonu.	44
Şekil 4.24. Profilaksi grubuna ait fetal beyin dokusunda kaspaz-3 ekspresyonunun görünümü.....	45
Şekil 4.25. Terapötik gruba ait fetal beyin dokusunda kaspaz-3 ekspresyonu.	45
Şekil 4.26. Gruplar arasında fetal beyin kaspaz-3 ekspresyonlarının karşılaştırmalı görünümü.....	46
Şekil 4.27. Kontrol grubuna ait fetal beyin dokusunda negatif TNF- α ekspresyonu	47
Şekil 4.28. Hasar grubuna ait fetal beyin dokusunda belirgin TNF- α ekspresyonu. .	47
Şekil 4.29. Profilaksi grubuna ait fetal beyin dokusunda TNF- α ekspresyonu.	48
Şekil 4.30. Terapötik gruba ait fetal beyin dokusunda TNF- α ekspresyonu.....	48
Şekil 4.31. Gruplar arasında fetal beyin TNF- α ekspresyonlarının karşılaştırmalı görünümü.....	49
Şekil 4.32. İmmünohistokimyasal görüntüler ve bunlara karşılık gelen yarı kantitatif immünreaktivite skorları gösterilmiştir.	50

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 3.1. Plasenta ve fetal beyin dokularında histopatolojik skörlama sistemi	28
---	----



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Perinatal asfiksi, doğum öncesi, doğum sırasındaki veya doğum sonrası erken dönemde fetüse giden ya da fetüsten dönen kan akımının veya gaz değişiminin bozulması sonucu ortaya çıkan ciddi bir klinik tablodur. Bu durum, başta beyin olmak üzere kalp, karaciğer ve kas dokusu gibi yaşamsal organlarda oksijen sunumunun ve doku perfüzyonunun azalmasına yol açarak önemli sistemik ve nörolojik sonuçlara neden olabilir. Plasental veya pulmoner gaz değişiminin bozulması, parsiyel oksijen yetersizliğinden tam oksijen yokluğuna kadar değişebilen bir süreç oluşturmakta; bunun sonucunda ilerleyici hipoksemi, hiperkapni, anaerobik metabolizma ve laktik asidoz gelişmektedir. Bu patofizyolojik sürecin santral sinir sistemi üzerindeki en önemli yansımalarından biri neonatal hipoksik-iskemik ensefalopatidir (HIE). Söz konusu tablo perinatal asfiksi ve iskemiye bağlı gelişen nörolojik hasarı ifade eder [1]. Bu nörolojik hasarın gelişiminde birbirini izleyen enerji yetmezliği, eksitotoksikite, oksidatif stres ve inflamasyon gibi çok sayıda hücrel ve moleküler mekanizma rol oynamaktadır.

Hipoksik-iskemik süreçte gözlenen ani nöronal ölüm, diğer bir deyişle nekroz, iyon pompası yetmezliği veya eksitator nörotransmitterlerin iyonotropik reseptörler, özellikle N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri, üzerindeki etkisi sonucunda hücre içi sodyum (Na^+) ve kalsiyumun (Ca^{2+}) aşırı birikimine bağlı olarak gelişmektedir. Buna karşılık, gecikmiş nöronal ölüm biçimi olan apoptoz; hücre içi enzimlerin ve ikinci haberci sistemlerin sürekli aktivasyonu, Ca^{2+} -bağımlı lipazlar, proteazlar ve kaspazların uyarılması, mitokondriyal elektron transport zincirinin bozulması, serbest radikal ve lökotrien oluşumu, nitrik oksit sentaz aracılığıyla nitrik oksit üretiminin artması ve hücrel enerji depolarının tükenmesi gibi birden fazla patofizyolojik mekanizmanın etkisiyle ortaya çıkmaktadır. İskemik dokunun yeniden oksijenlenmesi ise aşırı reaktif oksijen türü oluşumunu tetikleyerek ek doku hasarına neden olabilmektedir. Artan oksidatif stres, endojen antioksidan savunma mekanizmalarını aşarak hücrel lipidlerde, proteinlerde, nükleik asitlerde ve kan-beyin bariyerinde hasara yol açmaktadır. Bu süreç, ayrıca nötrofil infiltrasyonunu artırmakta; aktive mikroglialarla birlikte bu hücrelerin interlökin-1 β ve tümör nekroz faktörü (TNF) gibi proinflamatuvar sitokinleri salması sonucunda inflamatuvar yanıtın daha da şiddetlenmesine katkıda bulunmaktadır [2].

Yenidoğan yoğun bakım ve obstetrik alandaki gelişmelere rağmen, hipoksik-iskemik ensefalopati halen neonatal mortalite, uzun dönem nörogelişimsel bozukluklar ve kalıcı nörolojik sekeller ile ilişkili önemli bir klinik sorun olma özelliğini sürdürmektedir. Bu nedenle, perinatal dönemde hem preterm hem de term gebeliklerde nöroprotektif tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Magnezyum, serebral palsy riskini azaltmak amacıyla antenatal dönemde kullanılmakta; ancak mevcut tedavilere ek olarak yeni ilaçların nöroprotektif etkinliğin artırabileceği düşünülmektedir. Bu bağlamda selenyum, güçlü antioksidan özellikleri ve nörogelişim üzerindeki potansiyel etkileri nedeniyle dikkat çeken bir eser elementtir.

Selenyum, antioksidan enzim olan glutatyon peroksidazın temel bileşenlerinden biri olup, hücre membran bütünlüğünün korunmasında ve lipidler, lipoproteinler ile DNA gibi biyomoleküllerin oksidatif hasara karşı savunulmasında hayati rol oynamaktadır [3]. Ayrıca selenyumun beyin gelişimi ve fonksiyonu için gerekli olduğu, glutatyon peroksidaz gibi selenyum içeren enzimlerin özellikle santral sinir sisteminin gelişimsel ve fonksiyonel süreçlerinde kritik öneme sahip olduğu gösterilmiştir [3]. Deneysel ve klinik çalışmalar, maternal selenyum desteğinin beynin farklı bölgelerindeki selenyum düzeylerini artırabileceğini, bunun da antioksidan savunma sistemini destekleyerek normal beyin gelişimine katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda fetal hipoksi-reperfüzyon sıçan modelinde beyin ve plasental dokuda gelişen hasar üzerine selenyumun etkilerinin değerlendirilmesi; selenyumun iskemik hasar öncesi ve hasar sırasındaki uygulanma zamanına göre doku koruyucu etkinliğindeki farklılıkların ortaya konulması amaçlanmıştır.

Bu doğrultuda çalışmamızın temel hipotezi, fetal hipoksi-reperfüzyon sıçan modelinde selenyum uygulamasının oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz ile ilişkili doku hasarını baskılayarak hem fetal beyin hem de plasenta üzerinde koruyucu etki göstereceğidir. Bu kapsamda, iskemik hasar öncesinde uygulanan profilaktik selenyumun hasar gelişimini sınırlayabileceği; hasar sürecinde uygulanan terapötik selenyumun ise reperfüzyon sonrası gelişen inflamatuvar ve apoptotik yanıtı azaltarak doku iyileşmesine katkı sağlayabileceği hipotez edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Perinatal asfiksi, doğumdan hemen önce, doğum sırasında veya hemen sonra fetüs veya yenidoğanda gaz değişimi ve/veya kan akımının bozulmasına bağlı olarak gelişen hipoksemi, hiperkapni ve metabolik asidoz ile karakterize klinik bir tabloyu ifade etmektedir. Yeterince şiddetli olması durumunda doku ve hayati organlarda oksijen açığı ortaya çıkacak ve buna bağlı olarak anaerobik glikoliz ve laktik asidoz gelişecektir. Klinik açıdan, bu süreç özellikle beyin başta olmak üzere vital organlarda hipoksik-iskemik hasara yol açarak yenidoğan morbidite ve mortalitesinin önemli nedenlerinden biri olarak değerlendirilmektedir. Perinatal asfiksi, zamanla gelişen patoloji ile fetal veya neonatal beyin hasarına yol açabilir [4]. Yenidoğan hipoksik-iskemik ensefalopatisi, perinatal asfiksin nörolojik sekellerini tanımlayan klinik tabloyu ifade etmektedir [5].

Perinatal asfiksi, fetüse giden kan akımını veya oksijen sunumunu engelleyen herhangi bir durum sonucunda ortaya çıkabilmektedir. Etiyolojisinde maternal dolaşım veya oksijenizasyon bozuklukları, plasentaya bağlı patolojiler ve fetüse özgü nedenler rol oynayabilir. Sık rastlanan nedenler arasında maternal hemodinamik instabiliteye neden olan durumlar, uterin patolojiler, plasenta ve umbilikal kord kaynaklı sorunlar ile enfeksiyonlar yer almaktadır. Asfiksi, doğumdan hemen önce gelişebileceği gibi, doğum sonrası dönemde resüsitasyon gerektiren ciddi klinik durumdaki yenidoğanlarda da görülebilmektedir. Olguların büyük çoğunluğu intrapartum dönemde meydana gelirken, yaklaşık %20'si antepartum dönemde gelişmekte olup, kalan kısmı ise erken postnatal dönemde ortaya çıkmaktadır [6].

2.1. Hipoksik İskemik Ensefalopati

HİE, başlangıçtaki hipoksik-iskemik hasarı takiben saatler içinde ortaya çıkan ve nöronal hücre ölümüne yol açan dinamik bir patofizyolojik süreçtir. Patogenez, genel olarak birbirini izleyen aşamalar halinde değerlendirilmektedir.

İlk aşamada hipoksi ve iskemiye bağlı olarak ciddi enerji yetmezliği gelişir. Bu dönemde, oksidatif metabolizmanın bozulması, eksitator nörotransmitterlerin ve eksitotoksik mediatörlerin birikimi, hücre içi kalsiyum seviyelerinde artış, hücresel ödem ve erken hücre ölümü meydana gelir. Bunu takiben gelen dönemde, solunum

ve serebral dolaşımın yeniden sağlanmasıyla birlikte reperfüzyon hasarı ve oksidatif stres gelişir [6, 7]. Aynı süreçte nöroenflamasyon, mitokondriyal disfonksiyon ve proapoptotik sinyal yollarının aktivasyonu geçecek nöronal ölüme katkıda bulunmaktadır. Enflamatuvar yanıtın devam etmesi ve epigenetik değişikliklerin eklenmesiyle beyin hasarı haftalar, aylar ve hatta yıllar boyunca sürebilir ve ciddi nörolojik sonuçlara yol açabilir [8]. Bu nedenle HİE patogenezi, hipoksi-iskemi, reperfüzyon hasarı, inflamasyon, oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon, eksitotoksisite, ferroptozis, endoplazmik retikulum stresi, hücresel şişme, maturasyon bozukluğu ve apoptozis gibi birçok ilişkili mekanizmayı içeren karmaşık bir süreçtir [9].

HİE'nin ilerlemesi, primer, latent, sekonder ve tersiyer fazlar olarak aşamalar arası süreklilik gösteren dört aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalar aşağıda ayrı başlıklar halinde özetlenmiştir.

Primer Faz

HİE'nin başlangıç evresi genellikle serebral doku iskemi ve hipoksi ile kendini göstermektedir. Hipoksik-iskemik beyin hasarı, hastaları beyinde oksijen ve glukoz eksikliğiyle karşı karşıya bırakır. Oksijen seviyesinin azalması, trikarboksilik asit döngüsü ile elektron taşıma zincirinin normal fonksiyonlarını engeller, oksidatif fosforilasyonu durdurur ve adenosin trifosfat (ATP)'nin hızla tükenmesine neden olarak ATP eksikliğine yol açar. Bu durumda, ATP'ye bağımlı iyon pompalarının aktivitesi azalır ve hücre membranındaki iyon pompalarının işlevsizliği, Na^+ ve Ca^{2+} 'ın su ile birlikte hücre içine girişine neden olur. Bu da hücre içi Ca^{2+} birikimi, ödem ve hücre ölümü ile sonuçlanacaktır [10].

Hipoksi, anaerobik metabolizma sonucu laktik asidoza yol açabilir. Bu aşamada sınırlı hücre ölümü yaşanırken, diğer faktörleri etkileyerek vücuda dolaylı hasar oldukça ciddidir. Bu nedenle, müdahale ve tedavi bu noktada önem taşımaktadır.

Serebral iskemi ve hipoksi sonrası ortaya çıkan enerji yetersizliği, hücresel iyon dengesinin bozulmasına yol açmaktadır. ATP üretimindeki azalma, iyon pompalarının fonksiyonlarını engellemekte olup bu durum Na^+ ve Ca^{2+} iyonlarının hücre içine aşırı girişine neden olurken, potasyum (K^+) iyonları hücre dışına

çıkılmaktadır. Ekstrasellüler K^+ seviyesindeki artış, nöronal depolarizasyonu tetikleyerek Ca^{2+} 'un hücre dışına uzaklaştırılmasını daha da zorlaştırmaktadır. Hücre içi kalsiyum birikiminin artması, sinaptik aralıkta aşırı glutamat salınımını uyarak eksitotoksik hasarı şiddetlendirmektedir [11].

Eksitotoksiste

HİE patogeneğinde merkezi rol oynayan temel mekanizmalardan biridir ve birçok nörolojik hastalıkta ortak hasar yollarından biri olarak kabul edilmektedir. Bu süreç, başlıca eksitator nörotransmitter olan glutamatın aşırı salınımı ve buna bağlı nörotoksik etkiler aracılığıyla gelişmektedir [12]. Glutamat reseptörlerinin uzun süreli ve aşırı aktivasyonu, nöronal fonksiyon kaybı ve hücre ölümü ile sonuçlanan nörotoksik olaylar zincirini başlatır. Glutamat, merkezi sinir sisteminin ana eksitator nörotransmitteridir ve özellikle N-metil-D-aspartat reseptörü (NMDAR) üzerinden etkisini göstermektedir [13]. Sinaptik boşluktaki yüksek düzeyde glutamat, NMDAR'a bağlanarak NMDAR'ın aşırı uyarılmasına ve hücrelere ek Ca^{2+} girişine neden olmaktadır. Bu durum, hücrelerin aşırı uyarılmasına ve sonuç olarak toksik maddelerin salınımına yol açarak hücre ölümünü daha da artırmakta ve bir kısır döngü oluşturmaktadır. Ayrıca, diğer glutamat reseptör ailesinin aşırı uyarılması Na^+ ve Cl^- girişini tetikleyebilir; bu da osmotik basınca karşı koymak amacıyla suyun difüzyonunu sağlayarak hücrelerin şişmesine sebep olmaktadır [12].

Aşırı Ca^{2+} alımı, moleküler nörotoksik kaskadları tetikleyerek serbest radikallerin aşırı üretimine, mitokondriyal işlev bozukluklarına, apoptoz uyarıcılarının salınımına, hücre zarı hasarına ve DNA kırılmasına yol açmaktadır. Tüm bunlar nihayetinde hücre apoptozu veya nekrozuna neden olmaktadır [11]. Bunun yanı sıra eksitotoksisteğe bağlı olarak en sık ortaya çıkan serbest radikaller, oksijen ve nitrik oksitten (NO) köken alan reaktif oksijen türleri (ROS) ile reaktif nitrik oksit türleridir (RNS). Hücre içine aşırı Ca^{2+} girişi, nöronal nitrik oksit sentazın (nNOS) aktivasyonuna neden olarak fazla miktarda NO üretimini tetiklemektedir. NO artışı, süperoksit anyonu (O_2^-) ile reaksiyona girerek toksik bir oksidan olan peroksinitritin ($ONOO^-$) oluşumuna yol açmakta, sonuçta nöronal toksisite artmakta ve hücre ölümü gerçekleşmektedir [13]. Nitrik oksit ayrıca sitokrom oksidaz aktivitesini inhibe ederek mitokondriyal solunum işlevini bozabilmektedir. Buna

karşılık, nitrik oksit sentaz aktivitesinin baskılanması, demir birikimini ve NO üretimini azaltarak nöronal hücre ölümünü hafifletebilmektedir. Özetle, eksitotoksisite birden fazla hücrel ve moleküler mekanizma aracılığıyla nöronal işlev kaybını ve hücre ölümünü derinleştirmektedir.

Latent Faz

Hipoksi ve iskemi sonrası yaklaşık altı saatlik bir latent dönem mevcuttur. Bu süreçte kan akışında ve oksijen temininde iyileşme sağlanır, oksidatif metabolizma geçici olarak düzelir ve reperfüzyon sonrası bazı beyin hücreleri kısmi veya tam iyileşme gösterebilir [14]. Ancak solunumun ve dolaşımın yeniden sağlanması reperfüzyon hasarına ve oksidatif strese neden olmaktadır. Bu dönemde, nekrotik hücreler yeterli oksijen ve perfüzyon sağlandıktan sonra dakikalar ile saatler içinde ölerken daha ciddi hasar oluşabilir [15]. Kısa bir toparlanma dönemi olsa da reperfüzyon sırasında temel enerji kaybı giderilememiştir ve ikincil enerji kaybı oluşmuştur.

Sekonder Faz

İkincil fazda (6–72 saat), eksitotoksisite devam etmekte olup mitokondriyal bozukluklar ve oksidatif stres artar ve membran potansiyelindeki değişiklikler ATP üretimini azaltır [15]. Eksitotoksisite ilk fazda ortaya çıkmakta ve hücrelere Ca^{2+} girişini artırmaktadır. Bu durum da lipaz aktivasyonunu, yağ asidi salınımını, nNOS aktivitesini, serbest radikal üretimini ve mitokondriyal disfonksiyonu tetiklemektedir. ROS genellikle mitokondrilerde üretilmekte olup süperoksit dismutaz (SOD) ile glutatyon peroksidaz (GPX) tarafından inaktive edilmektedir. Hipoksi sırasında ROS birikiminin ana nedeni antioksidanların yetersiz kalışıdır. Reperfüzyon, aşırı serbest radikal üretimine bağlı ek hasara ve ATP kaybına neden olmakta; bu durum da beyin hücrelerinin apoptozuna yol açmaktadır. Oksijen eksikliği, enerji tüketimi ve reoksidasyon ROS üretimini tetikleyerek membran, protein, lipid ve DNA'ya zarar verecektir [16]. ROS, astrositlerin ve mikroglianın hızla aktive olmasına neden olmaktadır; aktive olan bu hücreler ise interlekin 6 (IL-6), tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interlekin 1 α (IL-1 α), interlekin 1 β (IL-1 β) ve interferon gama (IFN- γ) gibi proinflatuar sitokinleri salgılamakta, böylece inflammatuar yanıtı tetiklemektedir. Bahsedilen reaktif türevler, inflamasyon, apoptoz, otofaji ve nekroz gibi çeşitli

hücrel yollar arasında karmaşık etkileşimlerde rol almakta olup, sonuç olarak beyin hasarının gelişimine katkıda bulunmaktadır [16, 17].

Mitokondrial Disfonksiyon ve Apoptoz

Perinatal asfiksi, iskemi ve hipoksi ancak aerobik metabolizmaya bağımlı dokularda enerji depolarının tükenmesine neden olmaktadır. Mitokondri hücrel enerji üretimi sırasında reaktif oksijen türlerinin oluşumuna zemin hazırlamaktadır [18]. Bu bağlamda, hipoksi ve iskemi durumlarında metabolik denge bozulmakta ve oluşan ROS antioksidan enzim sistemleri tarafından etkin biçimde uzaklaştırılmamaktadır. Sonuç olarak, aşırı ROS birikimi gerçekleşmekte; bu durum, lipitler, proteinler ve DNA'da oksidatif değişikliklerle birlikte, yenidoğanda hipoksik-iskemik beyin hasarından sonra metabolik yetersizlik ve mitokondriyal disfonksiyon gelişimine katkıda bulunmaktadır [19].

Mitokondriyal disfonksiyon, apoptozu tetikleyen temel mekanizmalar arasında yer almaktadır. Mitokondriyal işlev bozukluğu, ROS aşırı birikimine yol açmakta; bu durum ise mitokondriyal geçirgenlik geçiş porunun (mPTP) oluşumunu tetikleyebilmektedir [19, 20]. mPTP'nin açılması, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) ve sitokrom c gibi proapoptotik faktörlerin mitokondriden sitoplazmaya salınmasına yol açmaktadır. Sitokrom c'nin Apaf-1 ile etkileşimi sonucunda apoptotik kompleksler oluşmakta, bu da sitoplazmada kaspaz-9'un aktivasyonunu ve ardından apoptotik kaskadın başlamasını sağlamaktadır. Sonuçta bu süreç, apoptotik hücre ölümüyle sonuçlanmaktadır [21, 22].

Erişkin hayvan modellerinde mPTP inhibisyonunun nöroprotektif etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca çalışmalar, neonatal hipoksik-iskemik beyin hasarının, proapoptotik B-cell lymphoma-2 associated X protein (Bax)'ın mitokondriye translokasyonu ile ilişkili olduğunu; buna karşılık antiapoptotik B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) düzeyindeki azalmanın kaspaz-3 aktivasyonuna ve apoptozun artmasına yol açtığını göstermektedir [23]. Apoptotik sürecin hipoksik-iskemik beyin hasarından 24–72 saat sonra en yüksek düzeye ulaştığı bildirilmektedir. Bu bulgular, apoptozun HİE'nin patolojik gelişiminde önemli olduğunu göstermektedir.

Tersiyer Faz

İnflamasyon, HİE patogeneğinde sekonder nöronal ölümü tetikleyen başlıca mekanizmalar arasında yer almaktadır. Bu süreçte özellikle mikroglia, astrositler ve nötrofiller rol oynamaktadır [24]. İskemiği takiben hasar görmüş beyin dokusuna giren nötrofiller, ROS, proinflatuvar sitokinler ve matriks metalloproteinazlar aracılığı ile beyin hasarını artırmakta; ayrıca mikrovasküler akımı bozarak kan-beyin bariyerinin bütünlüğünü kaybetmesine neden olmaktadır.

Perinatal beyin hasarında mikroglia, inflamatuvar yanıtın temel aktörlerinden biri olarak kabul edilmekte ve HİE'nin önemli patolojik göstergeleri arasında yer almaktadır [24, 25]. Mikroglialar, sahip oldukları iki temel fenotip nedeniyle nöronal hasar ve iyileşme sürecinde hem proinflatuvar hem de antiinflamatuvar roller üstlenmektedir [26]. İskemiği takiben hızla aktive olan bu hücreler, IL-1 ve TNF- α gibi proinflatuvar sitokinler ile MCP-1 ve MIP-1 α gibi kemokinleri salgılayarak periferden lökosit göçünü artırmakta ve inflamatuvar hasarı derinleştirmektedir. Hasarlı bölgeye göç eden immün hücrelerin serbest oksijen radikalleri ve proteaz salınımı, kan-beyin bariyerinin geçirgenliğini artırmakta; bunun sonucunda yıkım, nöron ve glial hücrelerde şişme ve dejenerasyon gelişmekte ve iskemik doku hasarı daha da ağırlaşmaktadır. Bütünlüğünü bozarak nöronal ve glial hücre hasarını artırmaktadır [27]. Çalışmalar, hipoksi-iskeminin JAK2/STAT3 sinyal yolunu aktive ederek mikroglial aktivasyon ve nöroinflamasyona yol açabileceğini göstermektedir. Buna karşılık, bu yolun baskılanması mikroglial aktivasyonu azaltarak sinir sistemindeki inflamatuvar hasarı sınırlandırabilmektedir [28].

Astrositler de mikroglialara benzer şekilde, inflamatuvar yanıt sürecinde aktive olmakta ve aşırı aktivasyon durumunda IL-6, TNF- α , IL-1 ve IFN- γ gibi proinflatuvar mediatörlerin salınımını artırmaktadır. Böylece, nöroinflamatuvar yanıtın şiddetlenmesine, nöronal apoptozun artmasına, nöroenezin baskılanmasına ve sonuç olarak iskemik hasarın ağırlaşmasına katkıda bulunmaktadır [24].

Oksidatif stres ve inflamatuvar yanıtındaki artış, devam eden akut hücrel hasarı artırmaktadır; aynı zamanda, epigenetik değişiklikler yoluyla oligodendrositlerin olgunlaşmasında gecikmeye, nöroenezin, aksonal gelişimin ve sinaptik organizasyonun bozulmasına neden olarak HİE'ye bağlı hasarı

derinleştirmekte ve bu sürecin etkilerini daha da uzatmaktadır. Bu durum, haftalardan yıllara kadar devam edebilen tersiyer fazda beyin hasarının devam etmesine katkıda bulunmaktadır. Dolayısıyla, inflamasyon HİE’de yalnızca erken dönemdeki hasarın değil, uzun vadeli nöropatolojik sürecin de ana belirleyicilerinden biri olarak kabul edilmektedir. Bu bağlamda, özellikle mikroglia, astrositler ve nötrofiller aracılığıyla gelişen inflamatuvar mekanizmaların daha kapsamlı biçimde anlaşılması, tedavi etkinliğinin artırılması ve prognozun iyileştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır [29].

Ferropitoz

Demir, hücrelerde iki değerlikli (Fe^{2+}) ve üç değerlikli (Fe^{3+}) formlarda bulunmakta ve birçok enzim ve katalitik reaksiyonda kofaktör olarak görev yaparak redoks süreçlerinde önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle Fe^{2+} birikimi sırasında, lipid peroksitlerinin indirgenmesiyle yüksek reaktiviteye sahip alkoksi radikalleri oluşmakta; bu serbest radikaller, komşu çoklu doymamış yağ asitlerine doğrudan zarar vererek lipid kaynaklı reaktif oksijen türlerinin artmasına ve sonunda hücresel ferropitoza yol açmaktadır [30].

Ferropitoz, standart programlanmış hücre ölümü türlerinden farklı olup lipid peroksitlerinin aşırı birikimi ile şekillenmektedir. Bu süreç, glutatyon metabolizması, lipid peroksidasyonu ve demir metabolizmasındaki bozukluklarla yakından ilişkilidir [31].

Glutatyon peroksidaz 4 (GPX4) ve glutatyon (GSH), ferropitozun düzenlenmesinde temel öneme sahiptir. GSH, hücre içi Fe^{2+} için bir ligand olmasının yanı sıra GPX4 aktivitesi için de gereklidir. GSH düzeylerinin azalması, toksik hidroksil radikallerinin oluşumuna zemin hazırlarken, GPX4 inaktivasyonu peroksitlenmiş lipidlerin aşırı birikimine ve buna bağlı olarak ferroptotik hücre ölümüne neden olmaktadır [32]. HİE’li yenidoğanlarda asfiksiye bağlı olarak demir metabolizmasının bozulduğu ve ‘non-protein’ bağlı demir düzeylerinin arttığı bildirilmektedir. Ayrıca neonatal hipoksi-iskeminin beyin dokusunda GPX4 ve GSH ekspresyonunu azalttığı, antioksidan kapasiteyi düşürdüğü, ROS üretimini artırdığı ve lipid peroksidasyonunu belirgin şekilde artırdığı gösterilmiştir. İskemi ve hipoksiye bağlı olarak gelişen asidik ortamın, beyin dokusunda serbest Fe^{2+}

birikimini artırması da ferropitoz gelişimiyle uyumludur [32]. Bu nedenle ferropitoz, neonatal HİE patogeneğinde önemli bir mekanizma olarak değerlendirilmekte, özellikle GPX4 yolu yeni tedavi hedefleri açısından dikkat çekmektedir.

Endoplazmik Retikulum Disfonksiyonu

Enerji yetersizliği, protein katlanması, olgunlaşması ve yıkım süreçlerini bozarak protein homeostazında bozulmaya yol açmakta; bunun sonucunda endoplazmik retikulum (ER) fonksiyonları etkilenmekte ve endoplazmik retikulum stresi (ERS) gelişmektedir [22]. Serebral iskemi-reperfüzyon sonrasında ortaya çıkan oksidatif stres ve hücre içi kalsiyum artışı, yanlış katlanmış protein birikimini artırarak ERS'yi daha da şiddetlendirmektedir [33]. Erken dönemde nöral hücreler ER homeostazını yeniden sağlamak amacıyla çeşitli adaptif yanıtları, özellikle katlanmamış protein yanıtını (KPY) aktive etmektedir. İlmli düzeyde aktive olan bu yanıtın, iskemik hasara karşı belirli ölçüde koruyucu etkileri bulunmakla birlikte ER stresinin ağır ve süregelen hâle gelmesi durumunda KPY yetersiz kalmakta ve kaspaz-12, kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivasyonu üzerinden apoptotik hücre ölümü tetiklenmektedir [34]. Neonatal hipoksik-iskemik hasarda ERS'nin oksidatif stresi artırarak hücresel dengeyi bozduğu ve uzun dönem nörolojik fonksiyonlar üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, ERS'nin düzenlenmesi, HİE'ye bağlı patolojik süreçlerin sınırlandırılmasında potansiyel bir tedavi yaklaşımı olarak değerlendirilmektedir.

2.2. Hipoksik İskemik Ensefalopati Tedavisinde Profilaktik Yaklaşım

Hipoksik-iskemik ensefalopatisinin önlenmesine ilişkin doğum öncesi yaklaşımlar, doğrudan HİE'yi ortadan kaldıran spesifik bir tedavi olmadığı için, fetal hipoksi riskinin azaltılması ve fetal nöroproteksiyonun sağlanması esasına dayanmaktadır. Güncel bilimsel veriler ışığında, erken preterm doğumun yaklaşımlarda dikkate alınması durumunda, antenatal magnezyum sülfat uygulaması, yaşayan bebeklerde serebral palsy riskini azaltan ve fetal nöroproteksiyon sağlayan en etkin farmakolojik seçenek olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, bu uygulama, HİE'yi doğrudan ortadan kaldıran spesifik bir tedavi değil, özellikle erken preterm doğum bağlamında nörolojik sonucu iyileştirmeye yönelik bir strateji olarak değerlendirilmelidir. Öte yandan, magnezyum sülfatın term yenidoğanlardaki

nöroprotektif etkinliği konusunda mevcut kanıtlar sınırlıdır. Kliniğimizde hayvan modeli üzerinde gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda olumlu sonuçlar elde edilmiştir [35]; ancak bu etkinliğin klinik düzeyde doğrulanabilmesi için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Magnezyum sülfat, NMDAR antagonisti olarak, NMDA kanallarının aktivitesini düzenleyerek hücre içine kalsiyum girişini sınırlandırarak kalsiyuma bağlı eksitotoksik hasarı azaltabilmekte ve doğum asfiksisine maruz kalan yenidoğan beyninde nöroprotektif etki gösterebilmektedir [36]. Magnezyum iyonları hücrel işlevlerin sürdürülebilmesi için kritik bir rol oynamaktadır. Glikoliz, oksidatif fosforilasyon ve protein sentezi gibi temel metabolik süreçlerde yer almasının yanı sıra, plazma membran bütünlüğünün korunmasına da katkı sağlamaktadır [37].

Ancak HİE'nin patogenezi yalnızca eksitotoksosite ile açıklanamayacak kadar karmaşık olup, oksidatif stres, inflamasyon, mitokondriyal disfonksiyon ve apoptoz gibi birbirini etkileyen çok sayıda mekanizmayı içermektedir. Bu nedenle, mevcut tedavilere ek olarak farklı patofizyolojik yolları hedefleyen yeni nöroprotektif yaklaşımların araştırılması büyük önem taşımaktadır. Bunlar arasında selenyum güçlü antioksidan etkisi, hücrel redoks dengesinin korunmasındaki rolü ve oksidatif hasarı azaltma potansiyeli sebebiyle bu açıdan umut vaat eden tedavilerden biri olarak kabul edilmektedir.

2.3. Selenyum

Selenyum hem insanlarda hem de hayvanlarda çok çeşitli klinik durumlar ve metabolik bozukluklarla ilişkilendirilen bir eser element olup 40 yılı aşkın süredir insan sağlığı açısından esansiyel bir besin ögesi olarak kabul edilmektedir. Selenyum antioksidan savunma, inflamasyonun azaltılması, tiroid hormonunun sentezi, fertilité ve DNA sentezi gibi birçok biyolojik işlev için gerekli protein ve enzimlerin yapısında yer almaktadır [38].

Selenyumun biyolojik sistemlerdeki davranışı, biyoyararlanımı ve toksisite profili büyük ölçüde kimyasal formuna bağlıdır. Bu nedenle inorganik selenyum formları, organik selenyum formları ve biyolojik olarak aktif selenyum yapıları şeklinde sınıflandırılmaktadır. İnorganik formlar arasında başlıca selenat

(SeO_4^{2-}), selenit (SeO_3^{2-}), selenid ($\text{Se}^{2-}/\text{HSe}^-$) ve elementer selenyum (Se^0) yer almaktadır. Toprakta ve çevrede en sık karşılaşılan formlar özellikle selenat ve selenit olup, bunlar yüksek çözünürlükleri ve biyoyararlanımları nedeniyle bitkiler tarafından alınabilmektedir [39]. Organik selenyum formları ise selenyumun karbon içeren moleküllerle birleştiği yapılardır ve biyolojik sistemlerde daha işlevsel kabul edilmektedir. Bu grupta başlıca selenometiyonin, selenosistein, metilselenositstein ve diğer düşük molekül ağırlıklı organik selenyum bileşikleri yer almaktadır. Ayrıca selenyum, biyolojik işlevlerine göre selenoproteinler ve selenometabolitler kapsamında da değerlendirilmektedir [40].

Amino asit formu olan selenosistein, çeşitli enzimatik ve yapısal proteinlerin önemli bir bileşenidir. Bugüne kadar yaklaşık 35 selenoprotein tanımlanmış olmakla birlikte, bunların önemli bir kısmının işlevi henüz net değildir. Bununla birlikte, selenyuma bağlı enzimlerin aktif bölgelerinde genel olarak selenosistein bulunduğu bilinmektedir [41]. Selenyumun immün fonksiyonlar, erkek ve kadın fertilitesi, tiroit hormon metabolizması, ilaç metabolizması, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [42]. Enzimatik selenoproteinlerin en iyi bilinen örnekleri glutatyon peroksidaz ve iyodotironin deiyodinazdır [41]. Antioksidan bir enzim olan glutatyon peroksidaz, membran bütünlüğünün korunmasına katkı sağlar ve lipitler, lipoproteinler ile DNA gibi biyomolekülleri oksidatif hasardan korumaktadır [43]. İyodotironin deiyodinaz, inaktif öncül formdan aktif tiroid hormonunun oluşumunda görev almaktadır [41].

Son yıllardaki çalışmalar selenyumun beyin gelişimi ve işlevleri açısından da gerekli olduğunu göstermiştir. Selenyum eksikliğinde bazı nörotransmitterlerin dönüşüm hızlarının değiştiği bildirilmiştir. Yaşlı bireylerde düşük plazma selenyum düzeylerinin senilite ve hızlanmış bilişsel gerileme ile anlamlı şekilde ilişkili olduğu, Alzheimer hastalarında ise beyin selenyum düzeyinin kontrol grubuna göre yaklaşık %60 oranında daha düşük olduğu gösterilmiştir [44]. Beyin dokusunda katalaz düzeyinin sınırlı olması nedeniyle, glutatyon peroksidaz gibi selenoenzimler beyin gelişimi ve fonksiyonlarının sürdürülmesinde önem taşımaktadır [3]. Ayrıca selenyum desteğinin çocuklarda tedaviye dirençli epileptik nöbetler gibi çeşitli nörolojik bozukluklarda semptom şiddetini azaltabildiği bildirilmiştir [3, 45]. Bu nedenle, doğum öncesi dönemde HİE'nin önlenmesine yönelik yaklaşımların

yalnızca mevcut nöroprotektif uygulamalarla sınırlı kalmaması aynı zamanda selenyum gibi yeni potansiyel tedavi seçeneklerinin de deneysel ve translasyonel araştırmalar kapsamında değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmektedir.

Bununla birlikte, selenyumun terapötik güvenlik aralığı dar olup hem yetersizliği hem de aşırı alımı çeşitli olumsuz klinik sonuçlarla ilişkilendirilmektedir. Selenyumun toksisitesi büyük ölçüde kimyasal formuna bağlıdır. Genel olarak çoğu selenyum formu düşük toksisite göstermekle birlikte, çevresel maruziyete bağlı olarak elementer selenyum ve selenyum tuzlarına ilişkin insan toksisitesi nadiren de olsa görülmektedir. Hayvan çalışmalarında selenitin selenata göre bir miktar daha toksik olduğu, selenosisteinin selenite benzer düzeyde toksisite gösterdiği, selenometiyoninin ise daha düşük toksisiteye sahip olduğu saptanmıştır.

Öte yandan selenyum, plasental transfer yoluyla maternal dolaşımdan fetal dolaşıma geçebilmekte ve fetal maruziyet ile fetal selenyum homeostazında rol oynamaktadır. Literatürde yer alan bu bilgiler doğrultusunda, çalışmamızda HİE'ye yol açan hasar sürecinin önlenmesine yönelik olarak selenyum farmakolojik etken olarak kullanılmış; özellikle hipoksi-iskemiye bağlı gelişen oksidatif doku hasarı üzerindeki olası koruyucu etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deneyisel İşlemler

Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'nın 12.06.2025/6 ve 561 numaralı kararıyla etik kurul onayı alınmıştır. Çalışmamızda kullanmak üzere ideal selenyum dozunu belirlemek için öncelikle 6 sıçan kullanılarak pilot çalışma yapılmış, ideal selenyum dozunu belirledikten sonra ana çalışma gerçekleştirilmiştir. Ana çalışmada toplam 24 sıçan kullanılmıştır.

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilmiş 10-12 haftalık gebe Wistar albino türü dişi sıçanlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hayvanlar, sabit sıcaklık (22 ± 2 °C) ve %55-60 nem oranında, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ortam koşullarında Euro Type 4 kafeslerde barındırılmıştır. Barınma süresince deney hayvanları, standart beslenme, barınma ve bakım koşullarına tâbi tutulmuştur. Dişi ve erkek sıçanlar aynı ortamda tutulmuş, dişi sıçanların günlük vajinal plak oluşumu takip edilmiş ve smear örnekleri alınmıştır. Alternatif olarak, gebelik stripleri de kullanılmıştır. Smear sonuçlarında plaklar saptanan hamile deney hayvanlarında, hamile kaldıkları gün 0. gün olarak kabul edilmiştir.

3.1.1. Pilot Çalışma

Selenyumun olası toksik etkileri, literatürde benzer bir çalışmanın bulunmaması ve dozun belirli olmaması nedeniyle, deneyde kullanılacak ideal selenyum dozunun belirlenmesine yönelik bir ön pilot çalışma gerçekleştirilmiştir.

Deneyin uygulanması:

Dört farklı 19 günlük gebe sıçan üzerinde 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg ve 2 mg/kg subkutan dozlarda selenyum uygulanarak en etkin ve toksik olmayan dozun belirlenmesi amacıyla ön çalışma gerçekleştirilmiştir. Dört ilaç, bir hasar ve bir kontrol grubundan olmak üzere toplam 6 sıçan kullanılmıştır. Gebe sıçanlar rastgele seçilerek gruplara alınmıştır (Şekil 3.1). İlacın uygulanacağı dört sıçanda profilaksi modeli oluşturulmuştur. İskemik hasar oluşturulmadan 30 dakika önce selenyum dozu subkutan olarak uygulanmış, daha sonra anestezi altında batın açılarak utero-

ovaryen arter klemplenmiş ve fetüsler 20 dakika boyunca iskemik hasara maruz bırakılmıştır. Daha sonra klempler açılarak 30 dakika süresince reperfüzyon sağlandıktan sonra fetüsler çıkartılmıştır.

Grup 1 (n=1): 0,1 mg/kg subkutan uygulama

Bu gruba iskemik hasar oluşturulmadan 30 dakika önce 0,1 mg/kg selenyum dozu subkutan olarak uygulanmış, daha sonra anestezi altında batin açılarak (Şekil 3.2-3.3) utero-ovaryen arter klemplenmiş (Şekil 3.5-3.6) ve fetüsler 20 dakika boyunca iskemik hasara maruz bırakılmıştır. Daha sonra klempler açılarak reperfüzyon 30 dakika süreyle sağlandıktan sonra fetüsler çıkarılmıştır. Üç adet fetüsün beyni ve plasentası immünohistokimyasal ve histopatolojik inceleme amacıyla alınmıştır (Şekil 3.8). Alınan doku örnekleri formaldehit çözeltisi içeren kutulara konulmuş ve saklanmıştır (Şekil 3.10).

Grup 2 (n=1): 0,5 mg/kg subkutan uygulama

Bu gruba, iskemik hasar oluşturulmadan 30 dakika önce 0,5 mg/kg selenyum dozu subkutan olarak uygulanmış, daha sonra anestezi altında batin açılarak utero-ovaryen arter klemplenmiş ve fetüsler 20 dakika boyunca iskemik hasara maruz bırakılmıştır. Daha sonra klempler açılarak reperfüzyon 30 dakika süreyle sağlandıktan sonra fetüsler çıkarılmıştır. Üç adet fetüsün beyni ve plasentası immünohistokimyasal ve histopatolojik inceleme amacıyla alınmıştır. Alınan doku örnekleri formaldehit çözeltisi içeren kutulara konulmuş ve saklanmıştır.

Grup 3 (n=1): 1 mg/kg subkutan uygulama

Bu gruba, iskemik hasar oluşturulmadan 30 dakika önce 1 mg/kg selenyum dozu subkutan olarak uygulanmış, daha sonra anestezi altında batin açılarak utero-ovaryen arter klemplenmiş ve fetüsler 20 dakika boyunca iskemik hasara maruz bırakılmıştır. Daha sonra klempler açılarak reperfüzyon 30 dakika süreyle sağlandıktan sonra fetüsler çıkarılmıştır. Üç adet fetüsün beyni ve plasentası immünohistokimyasal ve histopatolojik inceleme amacıyla alınmıştır. Alınan doku örnekleri formaldehit çözeltisi içeren kutulara konulmuş ve saklanmıştır.

Grup 4 (n=1): 2 mg/kg subkutan uygulama

Bu gruba iskemik hasar oluşturulmadan 30 dakika önce 2 mg/kg selenyum dozu subkutan olarak uygulanmış, daha sonra anestezi altında batın açılarak utero-ovaryen arter klemplenmiş ve fetüsler 20 dakika boyunca iskemik hasara maruz bırakılmıştır. Daha sonra klempler açılarak reperfüzyon 30 dakika süreyle sağlandıktan sonra fetüsler çıkarılmıştır. Üç adet fetüsün beyni ve plasentası immünohistokimyasal ve histopatolojik inceleme amacıyla alınmıştır. Alınan doku örnekleri formaldehit çözeltisi içeren kutulara konulmuş ve saklanmıştır.

Grup 5 (n=1): Hasar grubu

Bu gruba anestezi altında karın açılarak 20 dakika boyunca utero-ovaryen arter klemplemesi ile fetüsler iskemik hasara maruz bırakıldı ve sonrasında 30 dakika reperfüzyon sağlandıktan sonra fetüsler çıkarılmıştır. Üç adet fetüsün beyni ve plasentası immünohistokimyasal ve histopatolojik inceleme amacıyla alınmıştır. Alınan doku örnekleri formaldehit çözeltisi içeren kutulara konulmuş ve saklanmıştır.

Grup 6 (n=1): Kontrol grubu

Bu gruba herhangi bir işlem uygulanmadan, anestezi altında fetüsler çıkarılmıştır. Üç adet fetüsün beyni ve plasentası, immünohistokimyasal ve histopatolojik inceleme amacıyla alınmıştır. Alınan doku örnekleri formaldehit çözeltisi içeren kutulara konulmuş ve saklanmıştır.

Deney tamamlandıktan sonra, tüm gruplardaki sıçanlar ketamin (80-100 mg/kg) ve ksilazin (8-10 mg/kg) anestezisi altında sakrifiye edildi. Vena Cava Inferior'dan alınan kanlar ile cerrahi egzanguinasyon işlemi yapılarak sakrifikasyon gerçekleştirildi (Şekil 3.11). Enjektör uçları ve keskin materyaller atık kaplarında, kalan dokular ise tıbbi atık poşetlerinde toplanarak imha edildi.



Şekil 3.1. Gebe sıçanların kafeste rastgele seçilerek gruplara alınması



Şekil 3.2. Subkutan anestezi uygulanması



Şekil 3.3. Batın açılması



Şekil 3.4. Gebe sıçanın uterin arterlerin ve uterus anotomisinin görünümü



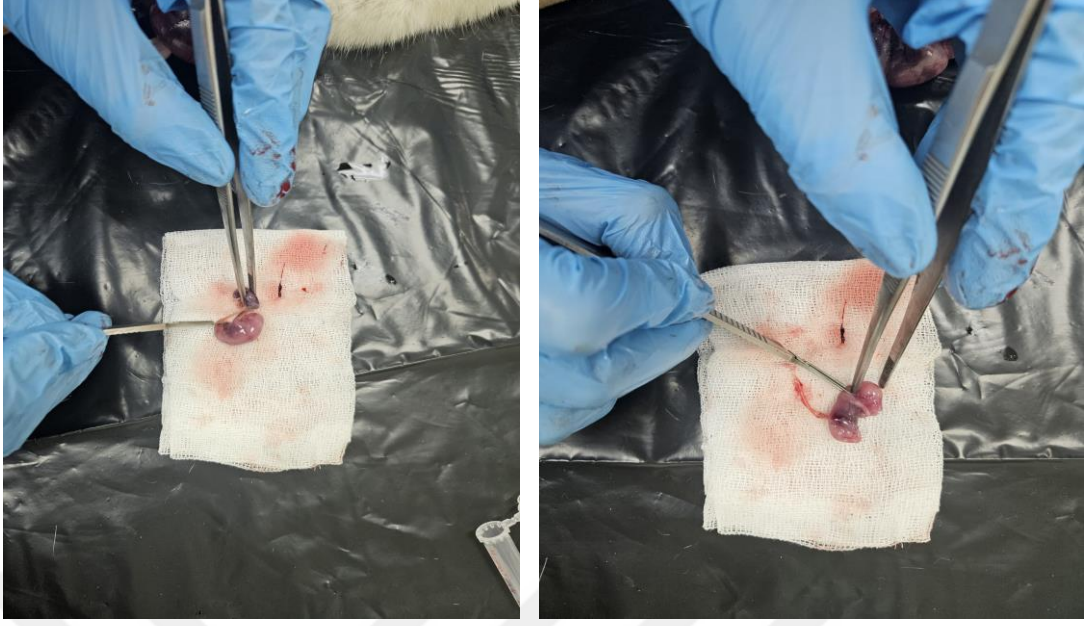
Şekil 3.5. Uteroovaryen arter bağlanması



Şekil 3.6. Bilateral utero overyan arter klemplenmesi ile uterin asfiksi modeli



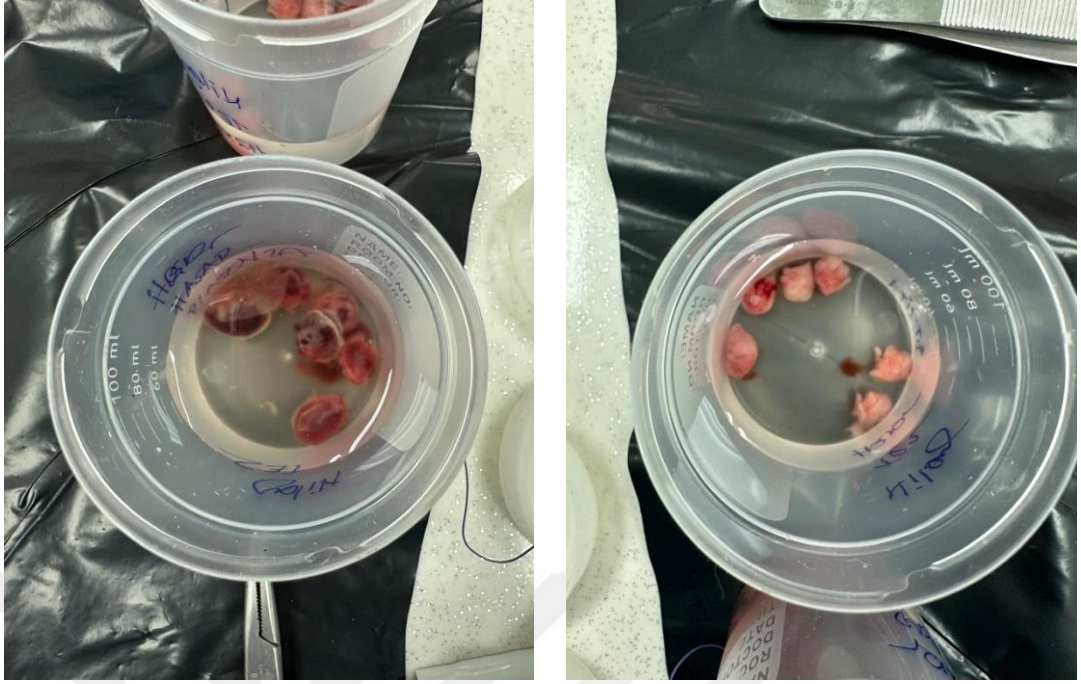
Şekil 3.7. Uterin asfiksi modeli ve selenyum uygulanan sıçanlar



Şekil 3.8. Fetal beyin ve plasentanın alınması



Şekil 3.9. Alınan fetal beyin ve plasenta dokularının buz akülerine alınması



Şekil 3.10. Histopatolojik ve immünohistokimyasal inceleme için doku örneklerinin formaldehit çözeltisi içeren kaplara konulması ve saklanması



Şekil 3.11. Vena Cava inferiordan kan alınarak cerrahi egzanguinasyon işlemi ve sakrifikasyon

Histopatolojik İncelemeler

Fetal kafatasının aşırı derecede frajil olması ve ossifikasyonunun tamamlanmamış olması nedeniyle, beyin dokuları kraniyal kaviteden ayrılmamış,

anatomik bütünlüğün korunması amacıyla kafatası ile birlikte işleme alınmıştır. Ayrıca her bir anneden temsîlî plasenta örnekleri de elde edilmiştir.

Tüm fetal ve plasental örnekler, ödem, hemoraji ve yapısal anormallikler başta olmak üzere makroskopik patolojik değişikliklerin saptanması amacıyla ayrıntılı bir makroskopik incelemeye tabi tutulmuştur. Histolojik analiz için fetal beyin örnekleri %10 nötral tamponlu formalin içinde 48 saat süreyle fikse edilmiştir. Fiksasyonun ardından, her bir fetal baş kafatası bütünlüğü korunarak orta hattan longitudinal olarak iki simetrik yarıya ayrılmış ve her iki yarı da doku takip kasetlerine yerleştirilmiştir.

Fetal beyin-kafatası kompleksleri ile maternal plasenta dokuları; dereceli alkol serilerinde dehidratasyon, ksilen ile saydamlaştırma ve parafin infiltrasyonu aşamalarını içeren standart otomatik doku takip protokolleri kullanılarak işlenmiş ve parafin blokları hâline getirilmiştir. Rotary mikrotom kullanılarak 5 µm kalınlığında seri kesitler alınmış, lamlar üzerine monte edilmiş ve rutin histopatolojik değerlendirme için hematoksilin-eozin (H&E) ile boyanmıştır. Tüm boyalı kesitler, ayrıntılı morfolojik değerlendirme amacıyla deneyimli bir histopatolog tarafından ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Hiperemi, ödem, hemoraji ve nekroz varlığı yarı kantitatif olarak değerlendirilmiş ve şiddetlerine göre 0 ile 3 arasında puanlanmıştır.

Histopatolojik Bulgular

Kontrol grubundaki fetal sıçan beyin dokularının histolojik değerlendirmesinde, normal sítarkitektürel organizasyon, sağlam nöronal morfoloji ile korunmuş meningeal ve vasküler yapılar izlenmiştir. Buna karşılık, iskemi-reperfüzyon (IR) grubunda belirgin patolojik değişiklikler saptanmıştır. Histopatolojik incelemede, hemen hemen tüm serebral damarları içeren şiddetli ve yaygın hiperemi ile birlikte belirgin vasküler konjesyon gözlenmiştir. Ayrıca, birçok yavru da çok sayıda mikrohemorajik odak tespit edilmiştir. Bu hemorajik alanların ağırlıklı olarak meninksler ve serebral korteks içinde lokalize olduğu görülmüş olup, bu durum yüzeyel kortikal bölgelerin IR'ye bağlı vasküler hasara belirgin derecede duyarlı olduğunu düşündürmektedir.

Düşük dozlarda uygulanan selenyum (Se 0,1 ve Se 0,5) IR'nin indüklediği inflamatuvar ve vasküler değişiklikleri anlamlı ölçüde azaltmıştır. Bu gruplarda serebral damarların hiperemisi belirgin şekilde azalmış, mikrohemorajik lezyonlar ise minimal düzeyde ya da tamamen yok olmuş olarak izlenmiştir. Bu bulgular, düşük doz selenyumun iskemiyle ilişkili beyin hasarına karşı koruyucu bir etki gösterdiğini düşündürmektedir.

Buna karşın, yüksek dozda selenyum uygulanan gruplarda (Se 1 ve Se 2) yavru beyin dokularında patolojik bulguların arttığı gözlenmiştir. Bu gruplarda artmış vasküler konjesyon, persistan hiperemi ve düşük doz selenyum gruplarına kıyasla daha sık mikrohemorajik alanlar saptanmıştır. Bu durum, yüksek konsantrasyonlarda selenyumun doza bağımlı pro-oksidan veya toksik etki gösterebileceğine işaret etmektedir.

Kontrol grubuna ait plasenta dokularının histopatolojik değerlendirmesinde, villöz yapıların iyi korunmuş olduğu ve vasküler bütünlüğün sağlam kaldığı normal bir histolojik mimari izlenmiştir. Buna karşılık, IR grubundan elde edilen plasentalarda belirgin patolojik değişiklikler saptanmıştır. Bu değişiklikler; belirgin vasküler hiperemi, yaygın hemorajik alanlar ve net olarak tanımlanabilen nekroz odaklarını içermekte olup, IR'ye bağlı şiddetli plasental hasara işaret etmektedir.

Düşük doz selenyum uygulaması (Se 0,1 ve Se 0,5) plasental histomorfolojide anlamlı bir iyileşme sağlamıştır. Bu gruplarda vasküler konjesyon ve hemorajik değişiklikler belirgin şekilde azalırken, nekrotik alanlara ise rastlanmamıştır. Bu bulgular, düşük dozlarda selenyumun plasenta dokusu üzerinde koruyucu bir etki gösterdiğini düşündürmektedir.

Buna karşın, yüksek dozda selenyum uygulanan gruplarda (Se 1 ve Se 2) plasental patolojinin belirgin şekilde ağırlaştığı gözlenmiştir. Bu gruplarda hem IR grubuna hem de düşük doz selenyum gruplarına kıyasla anlamlı derecede artmış hemoraji ve genişlemiş nekrotik alanlar izlenmiş olup, bu durum yüksek selenyum konsantrasyonlarında doza bağlı zararlı bir etkiye işaret etmektedir.

Genel olarak, bu çalışmanın bulguları, IR maruziyetinin hem fetal beyin hem de plasenta dokularında belirgin patolojik değişikliklere yol açtığını göstermektedir. Buna karşılık, özellikle 0,5 doz düzeyinde uygulanan düşük doz selenyum, bu

olumsuz histopatolojik değişiklikleri anlamlı ölçüde azaltmış ve IR'ye bağlı doku hasarına karşı belirgin bir koruyucu etki göstermiştir. Ancak, selenyumun daha yüksek dozlarda uygulanmasının patolojik değişiklikleri artırdığı ve selenyum dozu arttıkça doku hasarının şiddetinin belirginleştiiği saptanmıştır. Bu bulgu, yüksek konsantrasyonlarda selenyumun doza bağlı olarak zararlı bir etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Bu bulgular ve bilgiler ışığında, ana deneyde kullanılmak üzere selenyum dozu 0,5 mg/kg olarak belirlenmiştir.

3.1.2. Ana Çalışma

Ön çalışma tamamlandıktan sonra, ana çalışma 0,5 mg/kg selenyum dozu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma 24 sıçan üzerinde yapılmış olup, 19 günlük gebe sıçanlar seçilmiştir. Kontrol grubu, hasar grubu, profilaktik selenyum grubu ve terapötik selenyum grubu olmak üzere dört farklı grup oluşturulmuştur. Her bir grupta 6 sıçan olmak üzere, toplam sıçanlar rastgele gruplara dağıtılmıştır.

1- Kontrol grubu (n=6): Bu gruba herhangi bir işlem uygulanmadan, anestezi altında fetüsler çıkarılmıştır. İki adet fetüsün beyni ve plasentası immünohistokimyasal ve histopatolojik inceleme amacıyla alınmıştır. Alınan doku örnekleri formaldehit çözeltisi içeren kutulara konulmuş ve saklanmıştır.

2- Hasar grubu (n=6): Bu gruba, anestezi altında batın açılarak 20 dakika boyunca utero-ovaryen arter klemplemesi yapılarak fetüsler iskemik hasara maruz bırakılmış; sonrasında 30 dakika reperfüzyon sağlandıktan sonra fetüsler çıkarılmıştır. İki adet fetüsün beyni ve plasentası immünohistokimyasal ve histopatolojik inceleme amacıyla alınmıştır. Alınan doku örnekleri formaldehit çözeltisi içeren kutulara konulmuş ve saklanmıştır.

3- Profilaktik Selenyum grubu (n=6): Bu gruba, iskemik hasardan 30 dakika önce 0,5 mg/kg selenyum dozu subkutan olarak uygulanmıştır. Daha sonra anestezi altında batın açılarak utero-ovaryen arter klemplenmiş ve fetüsler 20 dakika iskemik hasara maruz bırakılmıştır. Ardından, klempler açılarak reperfüzyon 30 dakika süreyle sağlandıktan sonra fetüsler çıkarılmıştır. İki adet fetüsün beyni ve plasentası immünohistokimyasal ve histopatolojik inceleme amacıyla alınmıştır.

Alınan doku örnekleri formaldehit çözeltisi içeren kutulara konulmuş ve saklanmıştır.

4- Terapötik Selenyum grubu (n=6): Bu grupta anestezi altında batin açılarak utero-ovaryen arter klemplenmiş, o esnada 0,5 mg/kg selenyum dozu subkutan olarak verilmiş ve 20 dakika fetuslar iskemik hasara maruz bırakılmıştır. Ardından, klempler açılarak reperfüzyon 30 dakika süreyle sağlanmış ve fetüsler çıkarılmıştır. İki adet fetüsün beyni ve plasentası, immünohistokimyasal ve histopatolojik inceleme amacıyla alınmıştır. Alınan doku örnekleri formaldehit çözeltisi içeren kutulara konulmuş ve saklanmıştır.

Deney tamamlandıktan sonra, tüm gruplardaki sıçanlar ketamin (80-100 mg/kg) ve Xylazin (8-10 mg/kg) anestezisi altında kurban edildi. Vena Cava Inferior'dan alınan kanlar ile cerrahi egzanguinasyon işlemi yapılarak kurban edildiler. Enjektör uçları ve keskin materyaller atık kaplarında, kalan dokular ise tıbbi atık poşetlerinde toplanarak imha edildi.

3.2. Histopatolojik İnceleme Yöntemi

Toplanan doku örnekleri öncelikle makroskopik olarak değerlendirilmiştir; doku bütünlüğü, renk değişikliği, ödem, hemoraji ve olası yapısal anomaliler açısından incelenmiştir. Özellikle plasenta dokularında fiksatif penetrasyonunu artırmak amacıyla maternal ve fetal yüzeylere küçük insizyonlar yapılmıştır. Ardından tüm örnekler %10 nötral tamponlu formaldehit çözeltisi içinde alınarak fiksasyona bırakılmıştır. Dokular iki gün süreyle formaldehit içinde tutuldu ve bu süre boyunca fiksatif solüsyonu günlük olarak yenilenmiştir.

Ön fiksasyon işleminin tamamlanmasının ardından plasenta ve fetal beyin dokuları uygun boyutlarda trimlenerek doku takip kasetlerine yerleştirilmiştir. Her kaset üzerine ilgili hayvan ve grup numaraları kaydedildi ve örnekler tam fiksasyonun sağlanabilmesi amacıyla tekrar formaldehit çözeltisine alınarak yaklaşık 24 saat daha bekletilmiştir. Takip eden aşamada kasetler tam otomatik doku takip cihazına (Leica ASP300S; Leica Microsystems, Nussloch, Germany) yerleştirilerek rutin histolojik doku takip işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Rutin doku takibi sürecinde, örnekler artan konsantrasyondaki alkol serilerinden geçirilerek dehidre edilmiştir. Bu amaçla, dokular sırasıyla %70'lik etanolden başlayıp giderek artan konsantrasyondaki alkol çözeltilerinden geçirilmiş ve son olarak absolü alkol serilerinde saklanmıştır. Böylece, dokulardaki suyun uzaklaştırılması sağlanmıştır. Dehidrasyon aşamasının ardından, dokular iki ayrı ksilol banyosundan geçirilerek şeffaflaştırılmış ve lipid bileşenlerinin uzaklaştırılması gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, erimiş parafin banyolarına alınan dokulardaki oluşan boşlukların parafin ile doldurulması sağlanmıştır. Tüm bu işlemler, gece boyunca otomatik takip cihazı içerisinde tamamlanmıştır.

Ertesi gün dokular, cihazdan çıkarılarak bloklama aşamasına geçilmiştir. Bu amaçla, örnekler doku gömme cihazının (Leica Histocore Arcadia H; Leica Microsystems, Nussloch, Germany) sıcak haznesine yerleştirilmiş olup, parafinin katılaşmaması için cihazda muhafaza edilmiştir. Uygun boyuttaki metal kalıplara yerleştirilen plasenta ve fetal beyin örnekleri, anatomik yönelimlerine dikkate alınarak düzenlenmiş ve üzerine sıcak parafin dökülerek bloklar oluşturulmuştur. Daha sonra bloklar, soğuk tablo üzerine alınmış ve yaklaşık 1–2 saat süreyle bekletilerek, parafinin tamamen sertleşmesi sağlanmıştır.

Hazırlanan parafin blokları, kesit alma işleminden önce yaklaşık 4–5 saat süreyle soğutulmuştur. Ardından, tam otomatik rotary mikrotom (Leica RM2155; Leica Microsystems, Nussloch, Germany) kullanılarak, her blokta yaklaşık 5 µm kalınlığında seri kesitler elde edilmiştir. Histopatolojik inceleme amacıyla alınan kesitler standart lamlara yerleştirilmiş ve rutin hematoksil-eozin (H&E) boyama prosedürü uygulanmıştır.

Boyama işlemi öncesinde, kesitler yaklaşık 2 saat boyunca 60 °C etüvde bekletilerek lam yüzeyine tam yapışmaları sağlanmıştır. Ardından, parafinin uzaklaştırılması amacıyla kesitler çeşitli ksilol serilerinde bekletildi. Deparafinizasyonun ardından örnekler, azalan alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edilmiştir. Rehidrasyon işlemi tamamlanan kesitler, Harris hematoksil ile boyanmış ve musluk suyu ile yıkanmıştır. Daha sonra eozin ile renk verme işlemi gerçekleştirilmiş, kesitler tekrar artan alkol serilerinden geçirilerek dehidre edilmiştir. Bu aşamadan sonra, şeffaflaştırmak amacıyla ksilol kullanılmıştır. Son

olarak, preparatlar entellan ile kapatılarak lamel ile korunmuş ve oda sıcaklığında kuruması sağlanmıştır.

Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda incelenmiş olup, plasenta dokularında trofoblastik yapı düzensizliği, vaskülarizasyon, konjesyon, hemoraji, nekroz, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve yapısal dejenerasyon bulguları, Tablo 1’de belirtilen şekilde skorlanmıştır. Ayrıca, fetal beyin dokularında nöronal dejenerasyon, piknotik çekirdek oluşumu, hiperemi, ödem ve gliosis değerlendirilmiştir. Histomorfolojik değerlendirmeler ve mikrofotografik analizler, Olympus Corporation (Tokyo, Japan) tarafından geliştirilen CellSens Life Science Imaging Software System (Database) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1. Plasenta ve fetal beyin dokularında histopatolojik skrolama sistemi

Doku	Parametre	0 (Yok)	1 (Hafif)	2 (Orta)	3 (Şiddetli)
Plasenta	Trofoblastik yapı düzensizliği	Normal yapı	Hafif düzensizlik	Orta düzeyde bozulma	Yaygın ve ciddi yapı kaybı
	Anemi	Yok	Hafif	Orta	Şiddetli
	Hemoraji	Yok	Fokal	Orta yaygınlıkta	Yaygın
	Nekroz	Yok	Minimal	Orta	Yaygın
Fetal Beyin	Nöronal dejenerasyon	Yok	Hafif	Orta	Yaygın
	Piknotik çekirdek	Yok	Az sayıda	Orta	Yaygın
	Hiperemi	Yok	Hafif	Orta	Şiddetli
	Ödem	Yok	Hafif	Orta	Yaygın
	Glial değişiklikler	Yok	Hafif	Orta	Yaygın (gliosis)

3.3. İmmunohistokimyasal İnceleme Yöntemi

İmmunohistokimyasal analizler için polilizin kaplı lamlara alınan seri kesitler streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi kullanılarak boyanmıştır. Çalışmada plasenta ve fetal beyin dokularında inflamasyon, apoptotik süreçler ve hücrel yanıtın değerlendirilmesi amacıyla ilgili primer antikorlar kullanıldı. Apoptozis ve inflamasyon ile ilişkili belirteçlerden Caspase-3 (rabbit monoclonal, clone EPR18297; ab184787) ve tümör nekroz faktör- α (TNF- α ; rabbit monoclonal, clone RM1005; ab307164) ekspresyonları plasenta ve fetal beyin dokularında immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Primer antikorlar, üretici firmanın önerileri doğrultusunda ve 1/100 dilüsyonlarda hazırlanarak uygulanmıştır.

Parafin bloklarından alınan kesitler öncelikle ksilol ve azalan derecelerde alkol serilerinden geçirilerek deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerine tabi tutulmuştur. Daha sonra kesitler distile su ile yıkanıp endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek amacıyla %3 hidrojen peroksit çözeltisi içinde yaklaşık 20 dakika inkübe edilmiştir. Antijen geri kazanımı işlemi için kesitler sitrat tampon çözeltisine alınarak mikrodalga fırında iki kez 5'er dakika kaynatılmıştır. Ardından örnekler fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanmıştır.

Nonspesifik bağlanmaların önlenmesi amacıyla kesitler normal serum ile inkübe edilmiştir. Fazla serum uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar kesitler üzerine damlatılmıştır ve preparatlar nemli kamaralarda +4 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün PBS ile yıkanan kesitler üzerine sekonder antikor ve streptavidin-peroksidaz kompleksleri uygulanarak inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İmmün reaksiyonun görünür hale getirilmesi amacıyla 3,3'-diaminobenzidin (DAB) kromojen kullanılmıştır. Sekonder kit olarak hazır kullanım formatındaki HRP/DAB Detection Kit (Abcam, Cambridge, UK) tercih edilmiştir.

Karşıt boyama, Harris hematoksilin ile yapıldıktan sonra preparatlar, artan alkol serilerinden geçirilerek dehidre edilip, ksilolde şeffaflandırılarak, entellan kullanılarak lamel ile kapatılmıştır. Negatif kontrol kesitlerinde primer antikor yerine antikor dilüsyon solüsyonu kullanılmış ve diğer tüm işlem basamakları aynı şekilde uygulanmıştır.

İmmünohistokimyasal değerlendirmelerde pozitif boyanma gösteren hücrelerin oranı belirlenerek gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Analizler sırasında her preparattan rastgele seçilen 5 farklı alanda inceleme yapılmıştır. Her alanda yaklaşık 20 hücre değerlendirilerek her hayvan için toplam 100 hücre analiz edilmiştir. Pozitif reaksiyon gösteren kahverengi boyanmış hücreler ImageJ 1.48 yazılımı (Ulusal Sağlık Enstitüleri, Bethesda, MD, ABD) kullanılarak sayılmıştır. Mikrofotografik görüntüleme ise Olympus CX41 ışık mikroskobu ve CellSens görüntü analiz sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.4. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler, SPSS sürüm 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) ve GraphPad Prism sürüm 10.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veriler, ortalama $\pm$ standart sapma (SS) şeklinde ifade edilmiştir. Histopatolojik ve immünohistokimyasal skorlar, Kruskal–Wallis testi ve ardından Dunn çoklu karşılaştırma post hoc testi kullanılarak analiz edilmiştir. Moleküler, immünohistokimyasal ve histopatolojik parametreler arasındaki korelasyon analizleri, Spearman sıra korelasyon katsayısı yöntemiyle değerlendirilmiş ve korelasyon ısı haritası ile görselleştirilmiştir. Korelasyon katsayıları (r), değişkenler arasındaki ilişkinin yönü ve gücüne göre yorumlanmıştır. $P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

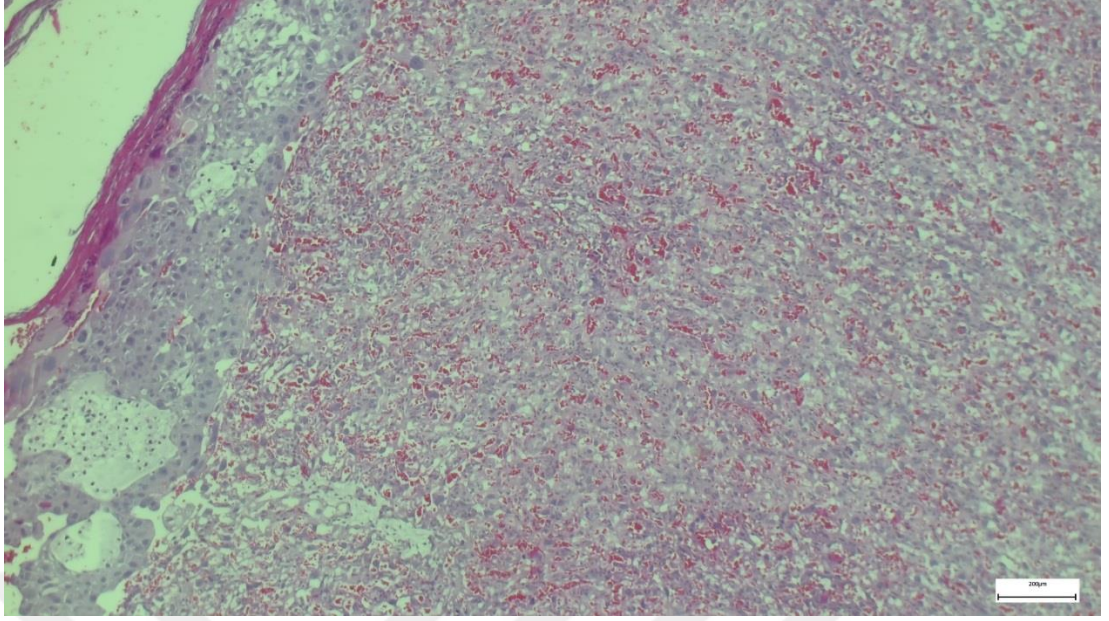
4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik Bulgular

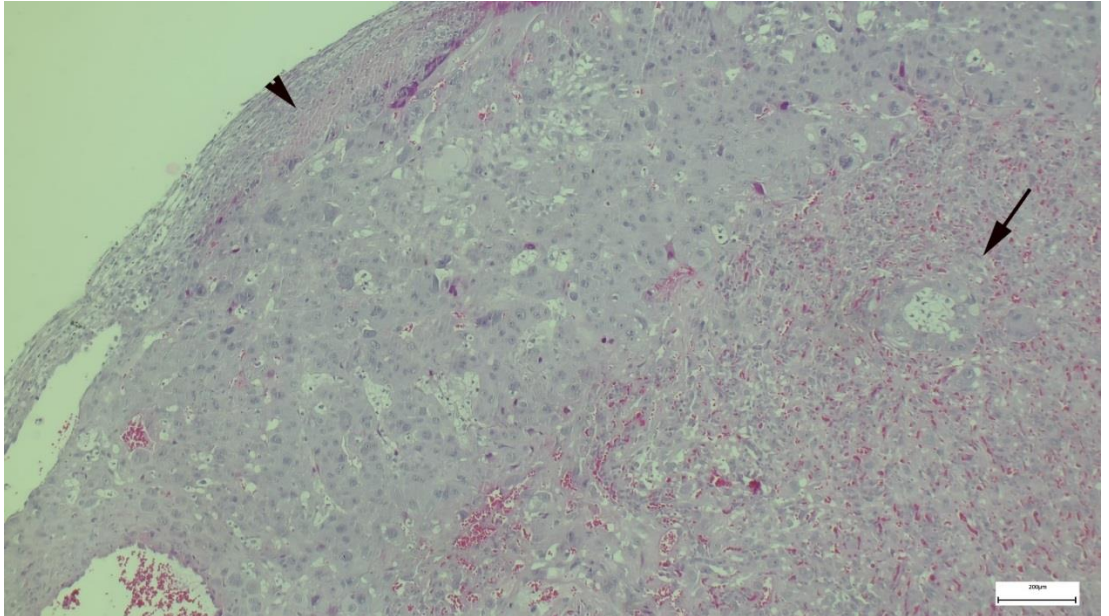
Nekropsi sırasında alınan fetüslerin beyin ve iç organ dokuları histopatolojik olarak incelenmiştir. Organların histopatolojik incelemesinde, kontrol grubundaki fetüslerin normal görüldüğü dikkati çekmiştir. Hasar grubundaki hayvanların plasentalarında belirgin anemi, fetal beyin dokularında ise hiperemi ve küçük kanama odakları saptanmıştır. Profilaktik ve terapötik selenyum uygulamalarının patolojik bulgularda önemli derecede iyileşme sağladığı tespit edilmiştir.

4.1.1. Placenta Histopatolojik Bulguları

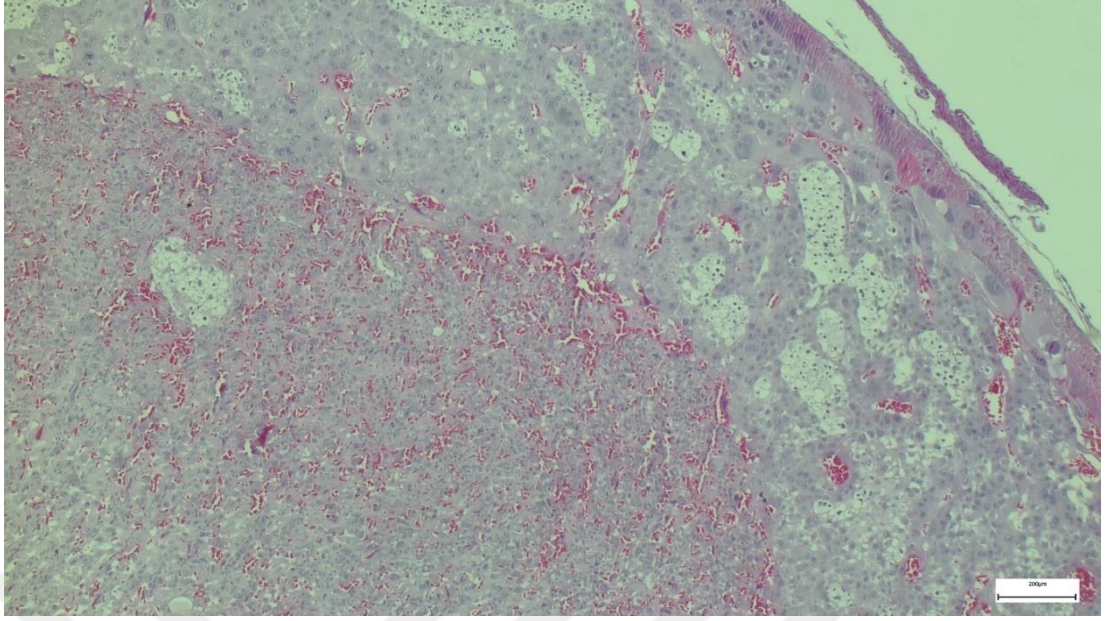
Kontrol grubu annelerinin plasentaları normal görünümdeyken, hasar grubundaki plasentalarda belirgin bir anemik görünüm dikkati çekmiştir. Profilaktik ve terapötik uygulamalar ise patolojik görünümde belirgin bir düzelmeye yol açmıştır. (Şekil 4.1-Şekil 4.5). Her iki selenyum uygulama protokolü de plasental histomorfolojide iyileşme sağlamıştır. Yarı kantitatif analizler, tedavisiz İR grubuna kıyasla selenyum uygulanan gruplarda trofoblastik düzensizlik, plasental damarlardaki eritrosit içeriğinde azalma ve plasental nekroz skorlarında anlamlı düşüş olduğunu göstermiştir ($p<0,05-0,01$). Tedavi edici selenyum uygulamasının, genel olarak plasental yapı ve nekrotik değişiklikler üzerinde daha belirgin iyileşme sağladığı gözlenmiştir. Plasental hemoraji, İR grubunda Kontrol grubuna kıyasla belirgin olarak artmış olmasına rağmen ($p<0,001$), selenyum uygulanan gruplar ile İR grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır. Genel olarak bu bulgular, selenyum uygulamasının plasental iskemi-reperfüzyon hasarının başlıca morfolojik bulgularını hafiflettiğini ve fetal serebral hasara karşı kısmi koruma sağladığını göstermektedir.



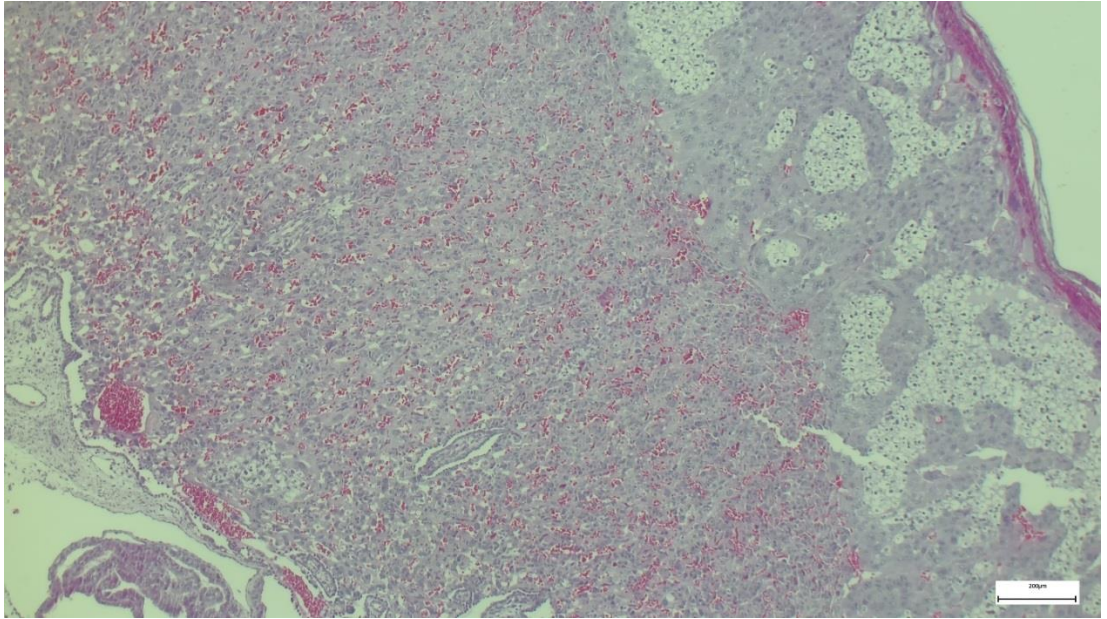
Şekil 4.1. Kontrol grubunda normal plasenta yapısı, HE, bar = 200 µm.



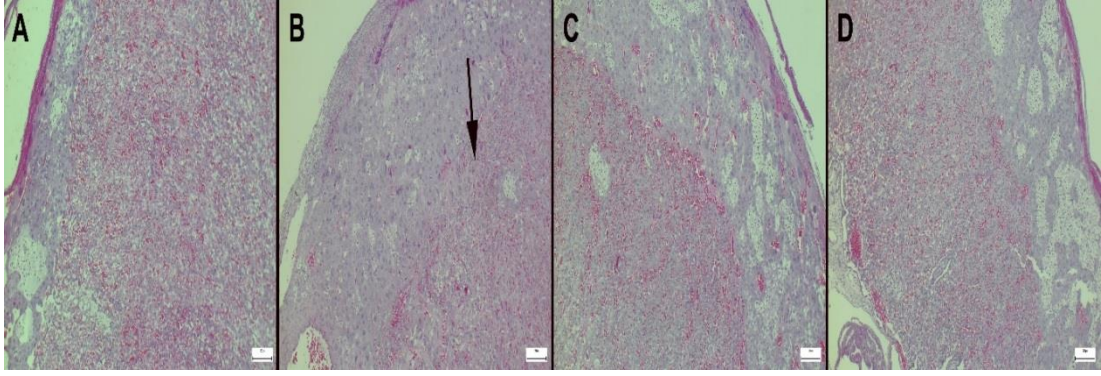
Şekil 4.2. Hasar grubunda plasentada belirgin anemi (ok) ve nekrotik hücreler (ok başı), HE, bar = 200 µm.



Şekil 4.3. Profilaksi grubunda normal plasenta yapısı, HE, bar = 200 μm.



Şekil 4.4. Terapötik grubunda normal plasenta yapısı, HE, bar = 200 μm.



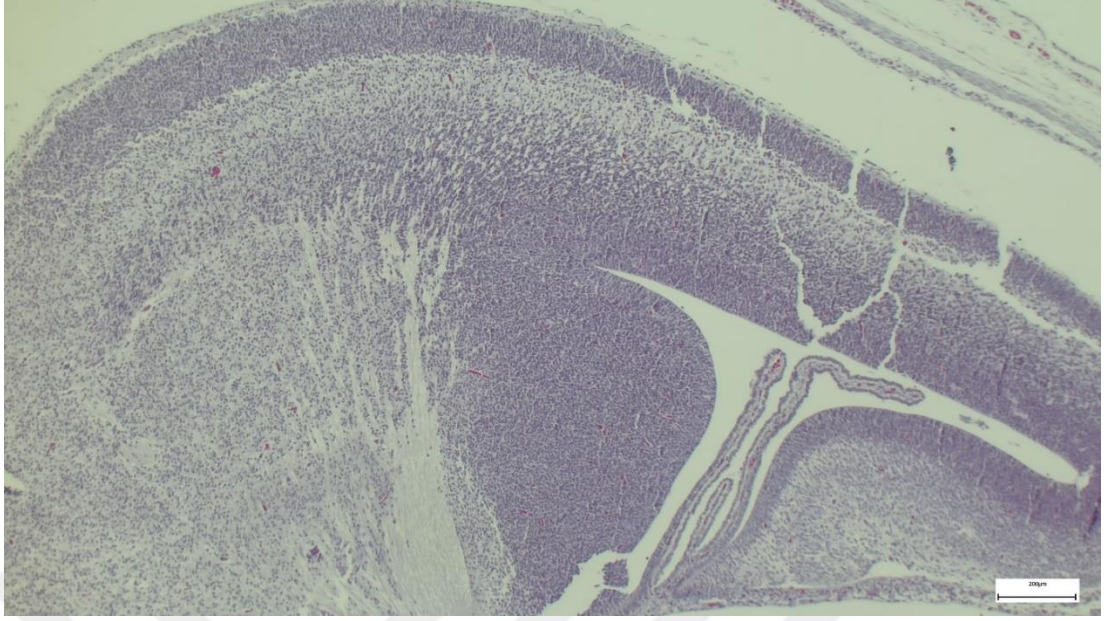
Şekil 4.5. Gruplar arasında plasenta histopatolojik bulgularının toplu histopatolojik görünüşleri

(A) Kontrol grubunda normal plasental histoloji, (B) Hasar grubunda belirgin anemi (ok), (C) Profilaksi grubunda patolojik bulguların azalması, (D) Terapötik grupta patolojik görünüşlerde azalma, HE, bar=200 μ m.

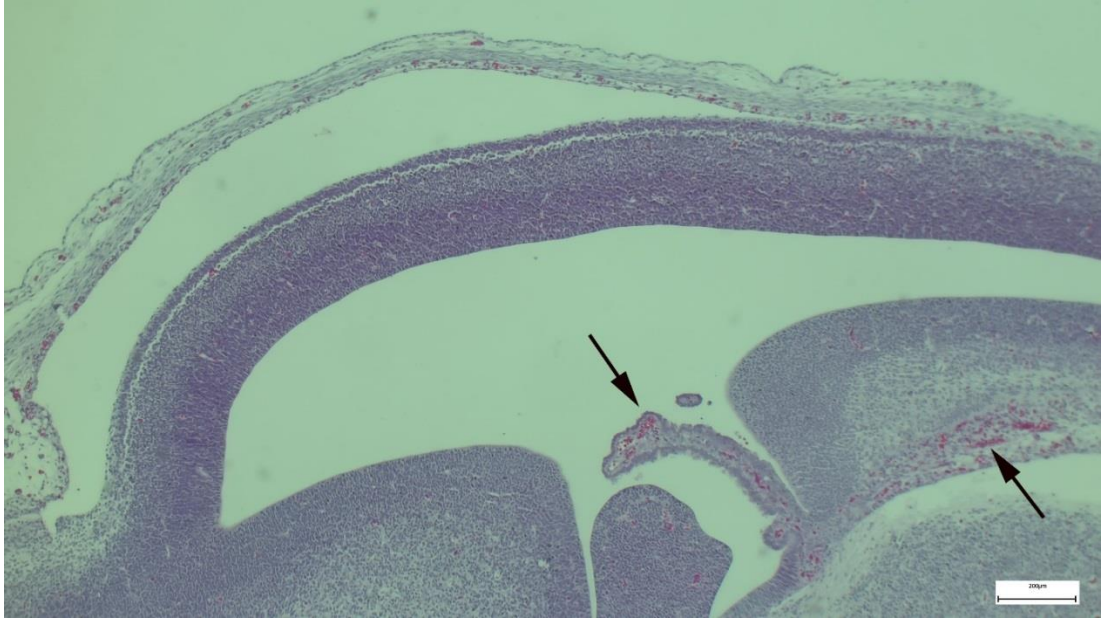
4.1.2. Fetal Beyin Histopatolojik Bulguları

Hiçbir uygulama yapılmayan kontrol grubunda annelerin fetüslerinin beyinlerinin normal görüldüğü gözlemlenmiştir. Hasar grubunda ise belirgin hiperemi, ödem ve mikrohemorajiler dikkati çekmiştir. Yarı kantitatif analizlerde, İR grubunda nöronal dejenerasyon ($p<0,001$), nöronal piknoz ($p<0,05$), hiperemi ($p<0,001$), ödem ($p<0,001$) ve gliozis ($p<0,001$) skorlarının Kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Profilaksi ve terapötik gruplarda patolojik bulgularda belirgin azalma saptanmıştır (Şekil 4.6-Şekil 4.10).

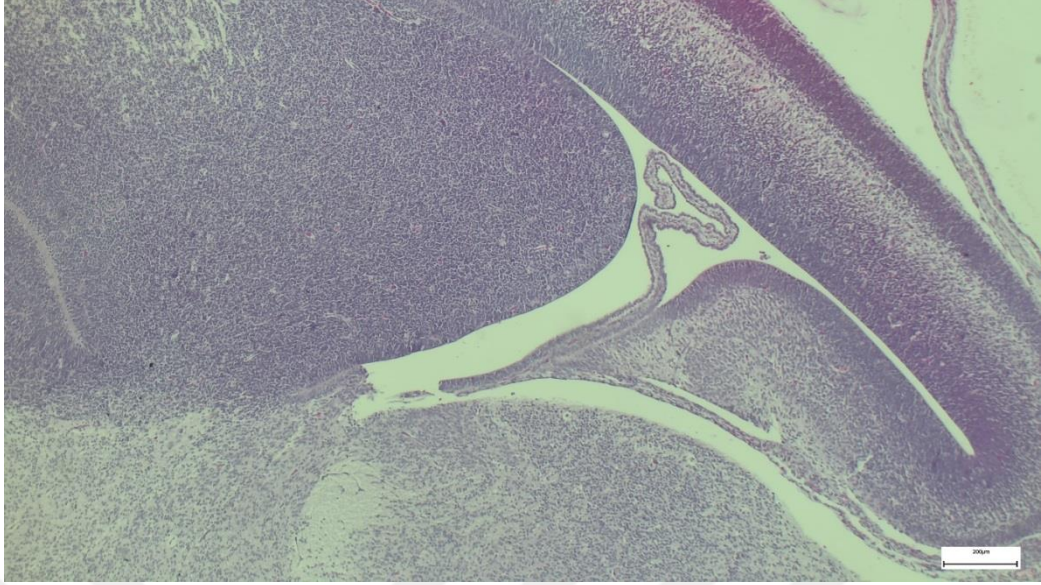
Selenyum uygulaması fetal serebral histopatoloji üzerinde farklı etkiler göstermiştir. Terapötik selenyum uygulaması (İR+Th-SEL), hasar (İR) grubuna kıyasla nöronal dejenerasyon ve hiperemi skorlarında anlamlı azalma sağlamıştır (her ikisi için de $p<0,05$). Buna karşılık, profilaktik selenyum uygulaması (İR+Pr-SEL) ödem skorlarını anlamlı düzeyde azaltmıştır ($p<0,05$). Her iki selenyum uygulama protokolü de gliozisi anlamlı olarak hafifletmiş olup, bu azalmanın profilaktik selenyum grubunda ($p<0,01$), tedavi edici selenyum grubuna kıyasla ($p<0,05$) daha belirgin olduğu gözlenmiştir. Histolojik inceleme, selenyum uygulanan hayvanlarda nöronal morfolojinin kısmen korunduğunu düşündürmekle birlikte, nöronal piknoz skorları açısından tedavi grupları ile tedavisiz İR grubu arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.



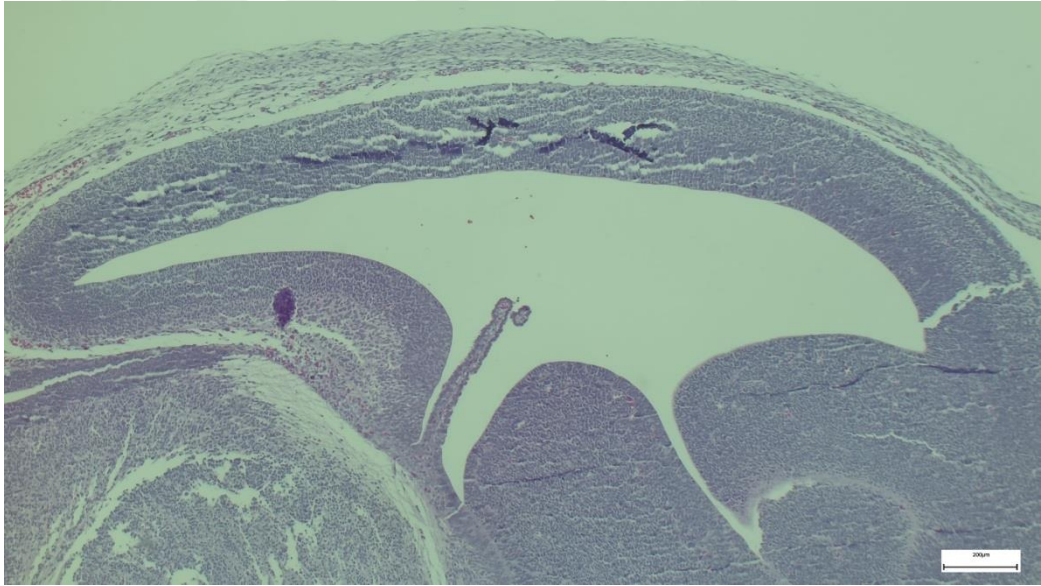
Şekil 4.6. Kontrol grubundaki bir fetüste normal beyin yapısı ve ventrikülün görünümü, HE, bar=200 μm.



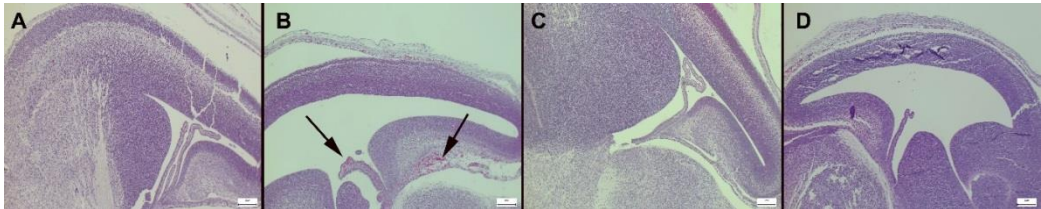
Şekil 4.7. Hasar grubundaki bir fetüste beyinde belirgin ve şiddetli hiperemi (oklar), HE, bar = 200 μm.



Şekil 4.8. Profilaksi grubundaki bir fetüste normal beyin yapısı ve ventrikülün görünümü, HE, bar=200 µm.

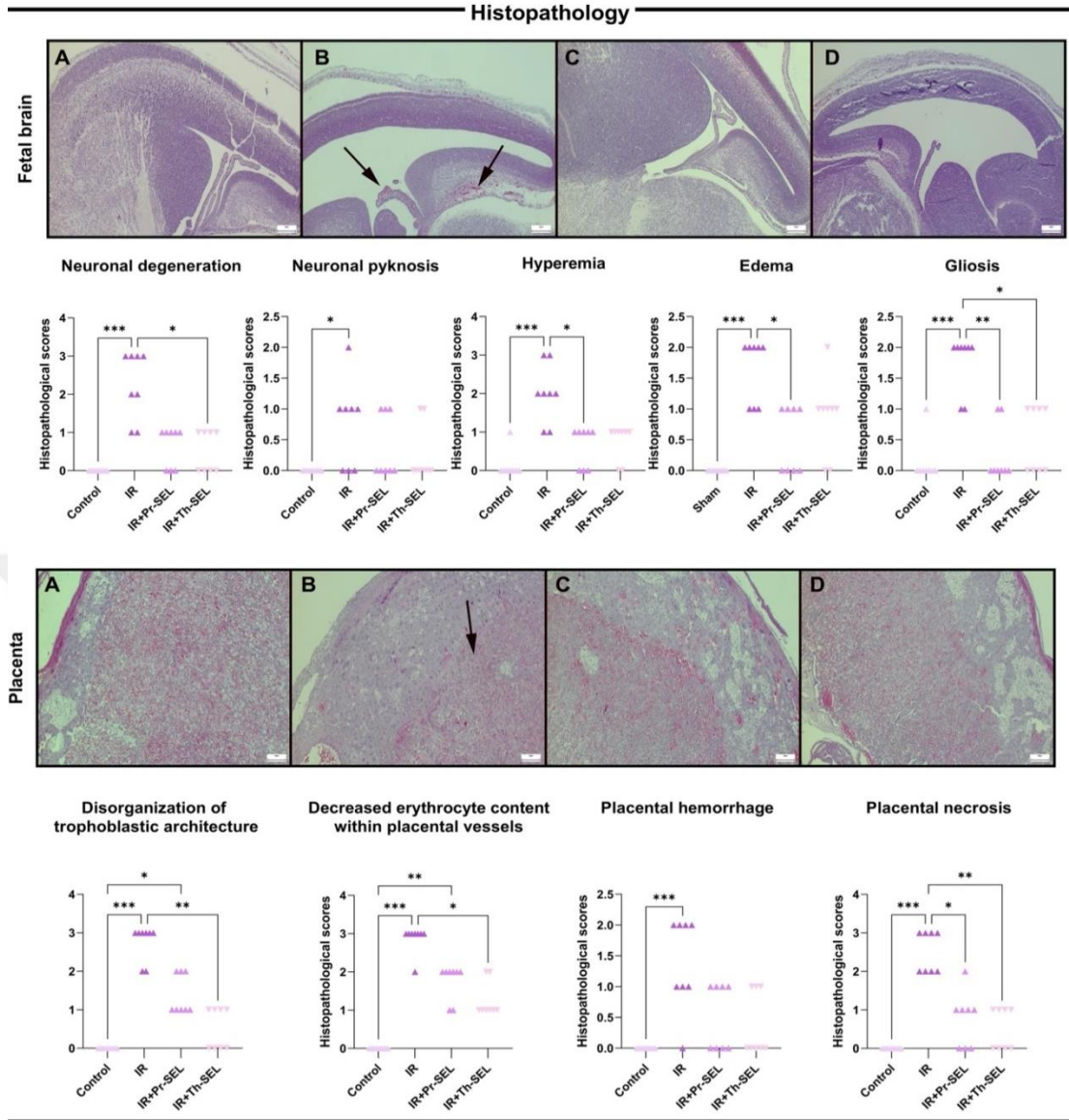


Şekil 4.9. Terapötik grubundaki bir fetüste normal beyin yapısı ve ventrikülün görünümü, HE, bar = 200 µm.



Şekil 4.10. Gruplara göre fetal beyin histopatolojik bulgularının toplu histopatolojik görünimleri

(A) Kontrol grubunda normal beyin histolojisi, (B) Hasar grubunda belirgin hiperemi (ok), (C) Profilaksi grubunda patolojik bulguların azalması, (D) Terapötik grupta patolojik görünümlerin azalması, HE, bar=200 µm.



Şekil 4.11. İntrauterin iskemi-reperfüzyon hasarı ve selenyum uygulaması sonrasında fetal beyin ve plasenta dokularının histopatolojik değerlendirilmesi

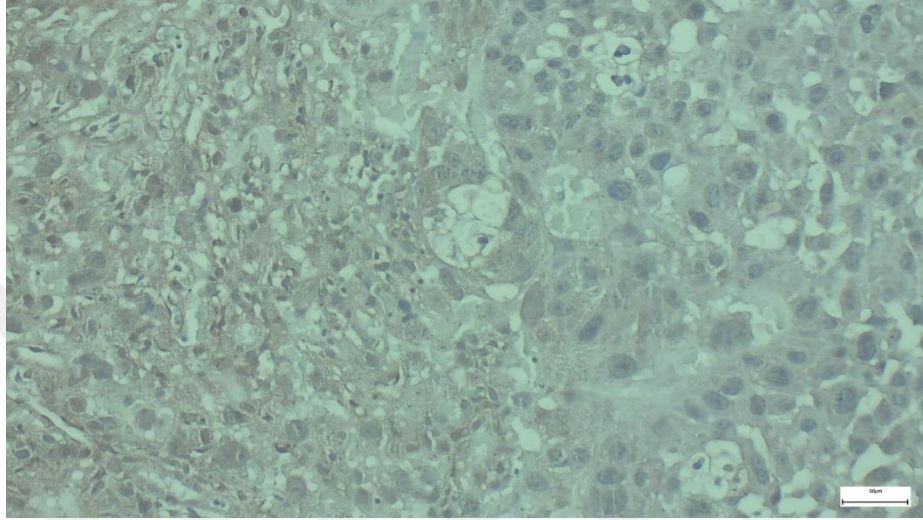
Veriler bireysel histopatolojik skorlar olarak sunulmuştur. İstatistiksel analizler Kruskal-Wallis testi ve Dunn çoklu karşılaştırma post hoc testi ile yapılmıştır. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Ölçek çubukları = 200 μm .

4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.2.1. Plasenta Kaspaz-3 İmmünohistokimyasal Bulguları

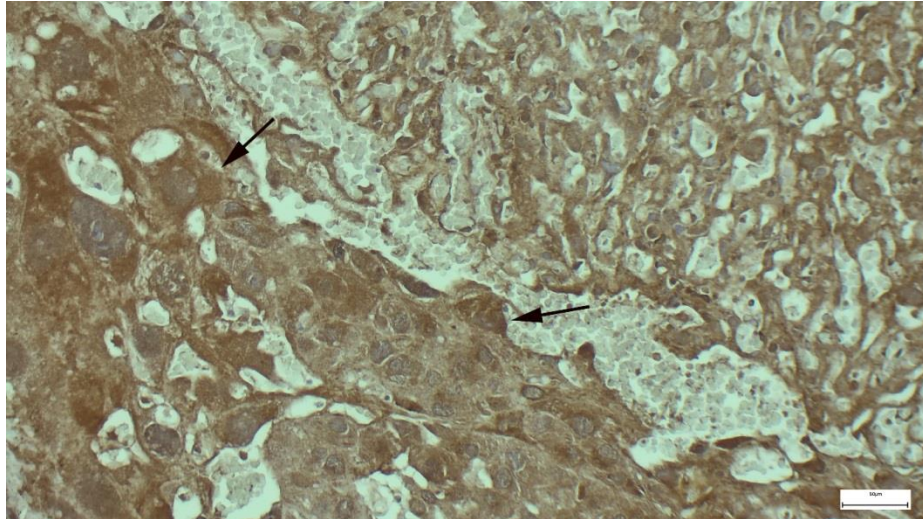
Plasenta dokularında gerçekleştirilen immünohistokimyasal incelemelerde kaspaz-3 immünreaktivitesinin özellikle trofoblast hücrelerinde ve bazı vasküler yapılarda lokalize olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubunda kaspaz-3 ekspresyonunun

oldukça zayıf olduğu ve sınırlı sayıda hücrede pozitif reaksiyon görüldüğü belirlenmiştir. Buna karşılık, hasar grubunda plasental dokularda kaspaz-3 pozitifliğinin belirgin şekilde arttığı ($p<0,001$), özellikle trofoblastik hücrelerde yoğun sitoplazmik boyanma şekillendiği dikkat çekmiştir. Profilaktik ve terapötik gruplarda ise kaspaz-3 ekspresyonunun deney grubuna kıyasla azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,01$) (Şekil 4.12-Şekil 4.16).



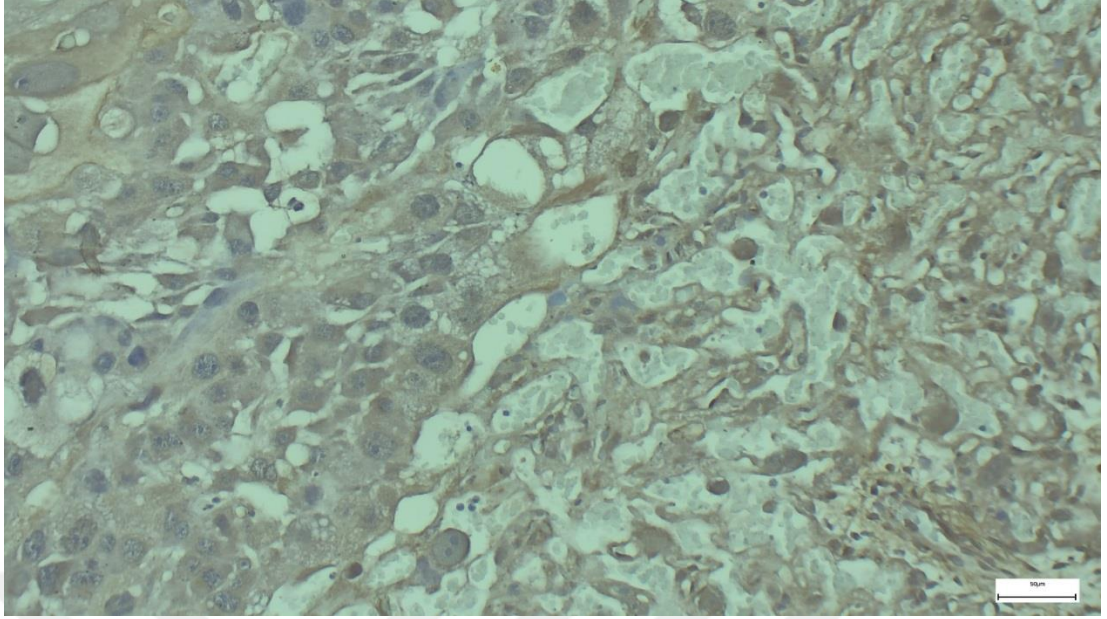
Şekil 4.12. Kontrol grubuna ait plasenta dokusunda çok hafif kaspaz-3 ekspresyonunun görünümü

streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi, DAB kromojen, Harris hematoxilen karşıt boyama, bar = 50 µm.



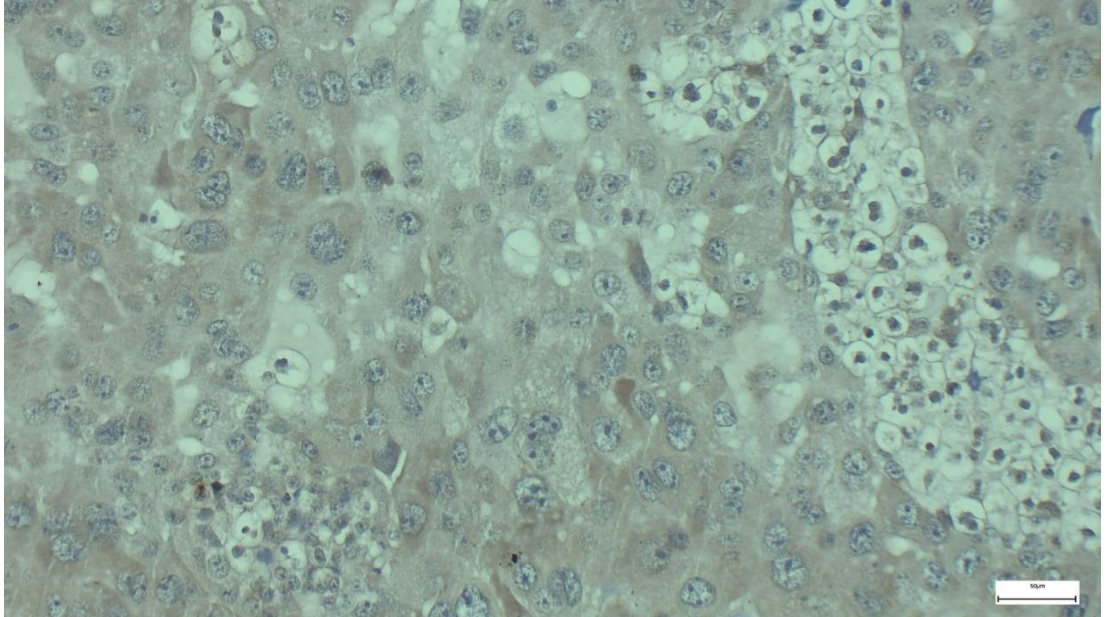
Şekil 4.13. Hasar grubuna ait plasenta dokusunda belirgin kaspaz-3 ekspresyonu.

Trofoblast hücrelerinde yoğun kahverengi immünpozitif boyanmalar dikkati çekmektedir. Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi, DAB kromojen, Harris hematoxilen karşıt boyama, bar = 50 µm.



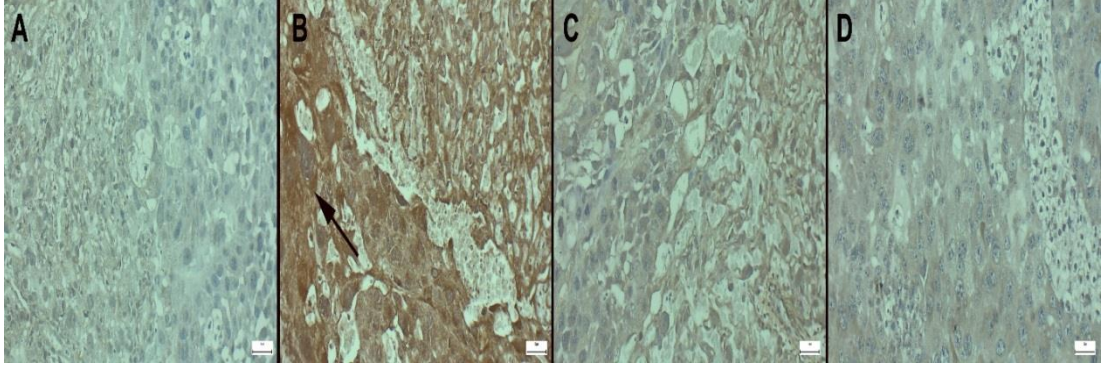
Şekil 4.14. Profilaksi grubuna ait plasenta dokusunda kaspaz-3 ekspresyonunun görünümü.

Trofoblast hücrelerinde hasar grubuna kıyasla daha hafif düzeyde immunekspresyonlar. Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi, DAB kromojen, Harris hematoksilen karşıt boyama, bar = 50 µm.



Şekil 4.15. Terapötik grubuna ait plasenta dokusunda kaspaz-3 ekspresyonunun görünümü.

Trofoblast hücrelerinde hasar grubuna kıyasla önemli ölçüde azalmış immün ekspresyonlar, streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi, DAB kromojen, Harris hematoksilen karşıt boyama, bar = 50 µm.

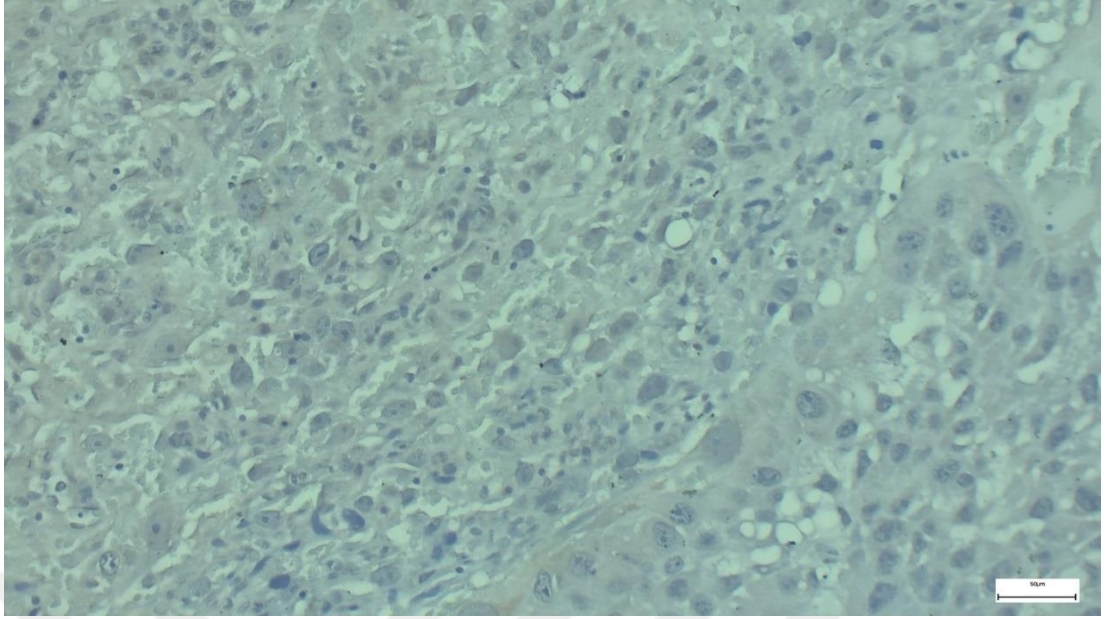


Şekil 4.16. Gruplar arasında plasenta kaspaz-3 ekspresyonlarının görünümü.

(A) Kontrol grubunda çok hafif ekspresyon, (B) Hasar grubunda belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (ok), (C) Profilaksi grubunda azalmış ekspresyon, (D) Terapötik grupta belirgin şekilde azalmış ekspresyon. Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi, DAB kromojen, Harris hematoksilin karşıt boyama. bar = 50 μ m.

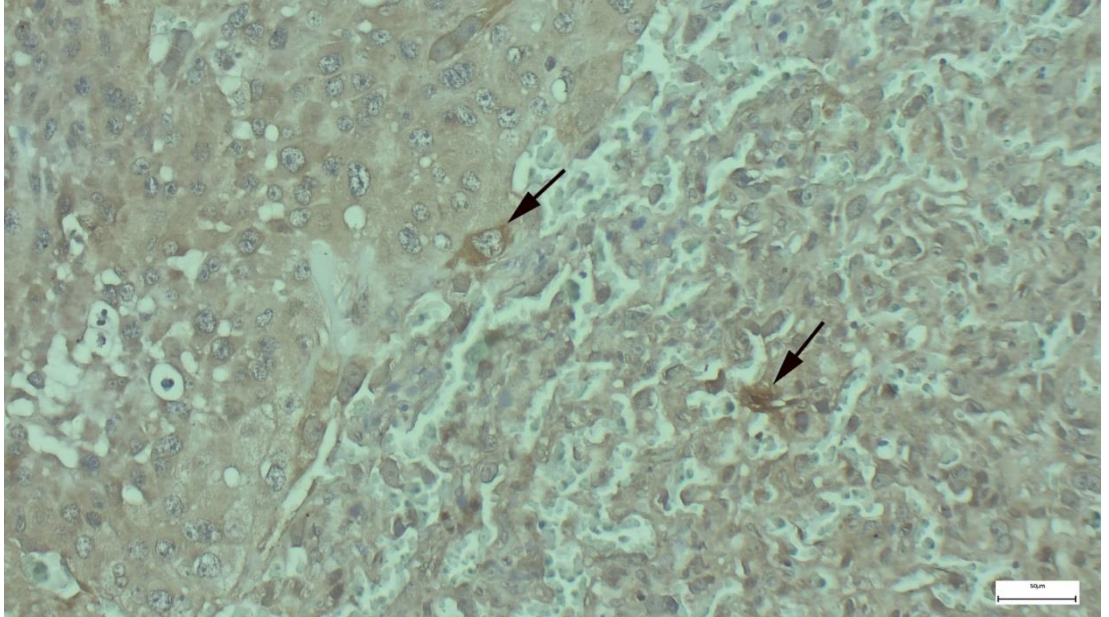
4.2.2. Plasenta TNF- α İmmünohistokimyasal Bulguları

Plasenta dokularının TNF- α immünohistokimyasal incelemelerinde, immün reaktivitenin özellikle trofoblast hücrelerinde ve bazı vasküler yapılarda lokalize olduğu gözlemlenmiştir. Kontrol grubunda TNF- α ekspresyonunun oldukça düşük seviyelerde olduğu ve sınırlı sayıda hücrede pozitif reaksiyonların saptandığı belirlenmiştir. Buna karşılık, hasar grubunda plasental dokularda TNF- α pozitifliğinin belirgin biçimde arttığı ve özellikle trofoblastik hücrelerde yoğun sitoplazmik boyanmanın gözlemlendiği dikkat çekmiştir ($p < 0,001$). Profilaktik ve terapötik gruplarda ise TNF- α ekspresyonu hasar grubuna kıyasla anlamlı biçimde azalmıştır ($p < 0,01$); en düşük immünreaktivite ise tedavi edici selenyum grubunda tespit edilmiştir (Şekil 4.17–Şekil 4.21).



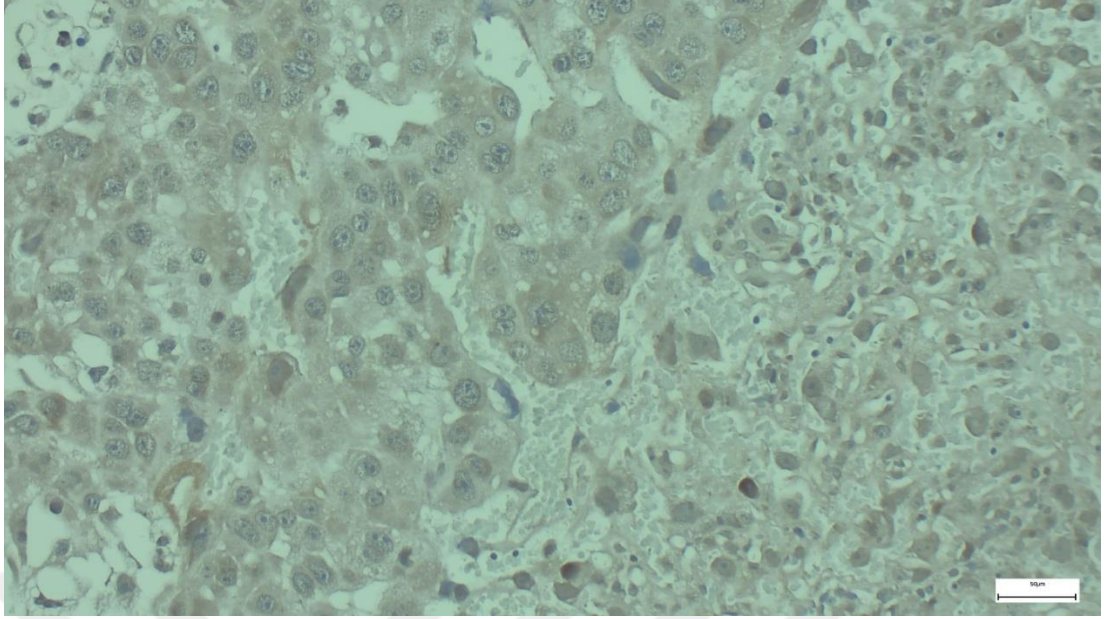
Şekil 4.17. Kontrol grubuna ait plasenta dokusunda çok hafif TNF- α ekspresyonunun görünümü

streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi, DAB kromojen, Harris hematoksilin karşıt boyama, bar = 50 μ m.



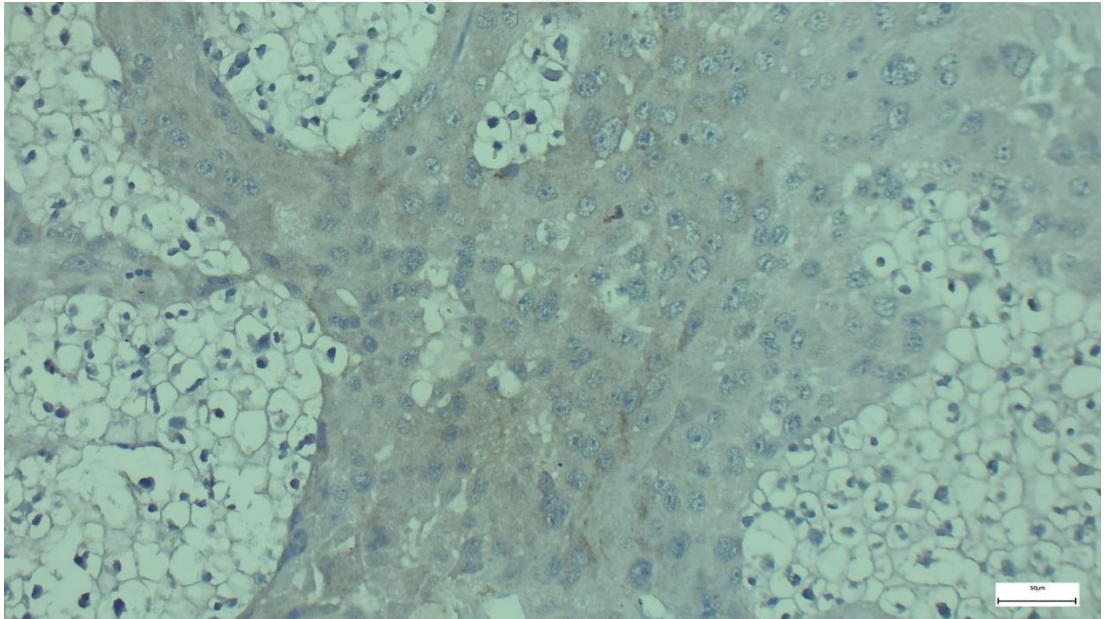
Şekil 4.18. Hasar grubuna ait plasenta dokusunda belirgin TNF- α ekspresyonu.

Trofoblast hücrelerinde yoğun kahverengi immünopozitif boyanmalar dikkati çekmektedir. Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi, DAB kromojenleri, Harris hematoksil karşıt boyama, bar = 50 μ m.



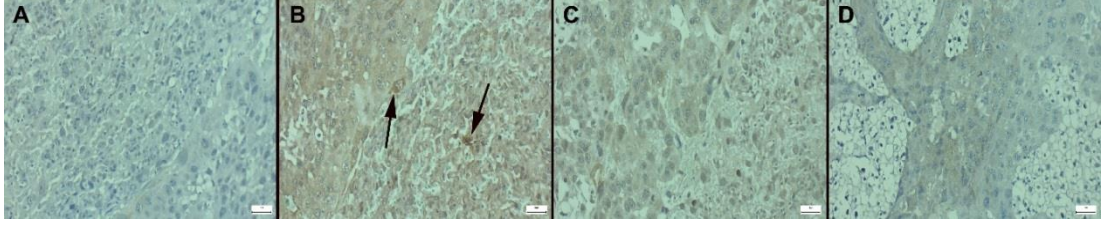
Şekil 4.19. Profilaksi grubuna ait plasenta dokusunda TNF- α ekspresyonlarının görünümü.

Trofoblast hücrelerinde hasar grubuna kıyasla daha hafif düzeyde immünreaktivite gözlenmektedir. Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi, DAB kromojen, Harris hematoxilen karşıt boyama, bar = 50 μ m.



Şekil 4.20. Terapötik gruba ait plasenta dokusunda TNF- α ekspresyonlarının görünümü.

Trofoblast hücrelerinde hasar grubuna kıyasla belirgin şekilde azalmış immünreaktivite gözlenmektedir. Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi, DAB kromojen, Harris hematoxilen karşıt boyama, bar = 50 μ m.

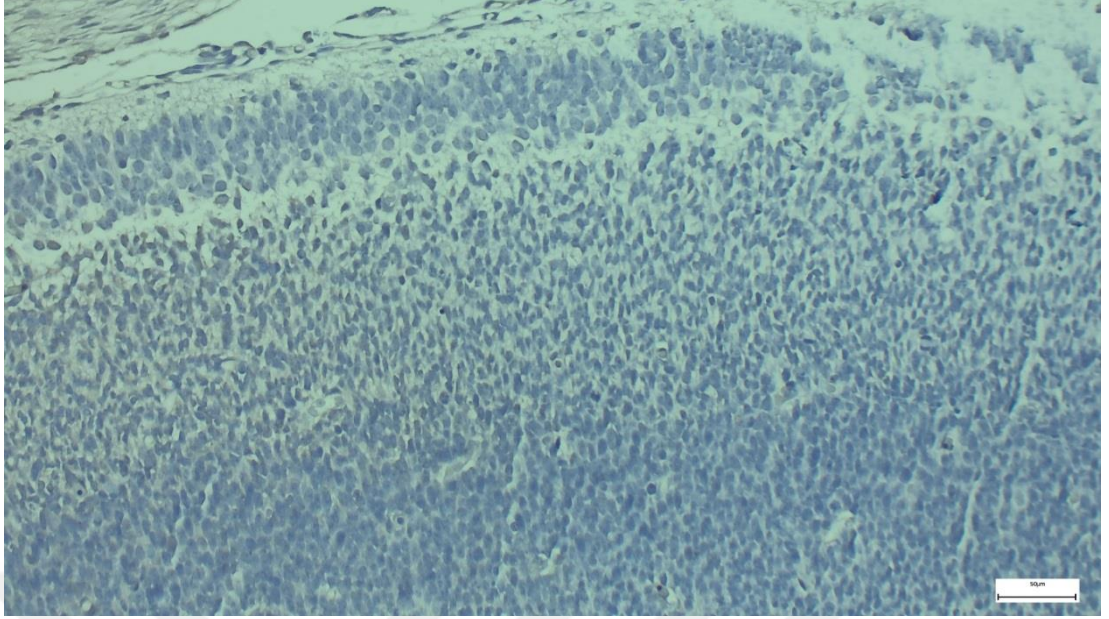


Şekil 4.21. Gruplar arasında plasenta TNF- α ekspresyonlarının karşılaştırmalı görünümü

(A) Kontrol grubunda çok düşük ekspresyon, (B) Hasar grubunda belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (ok), (C) Profilaksi grubunda azalmış ekspresyon, (D) Terapötik grupta belirgin şekilde azalmış ekspresyonlar. Streptavidin-biotin-peroksidadaz yöntemi, DAB kromojen, Harris hematoksislen karşıt boyama, bar = 50 μ m.

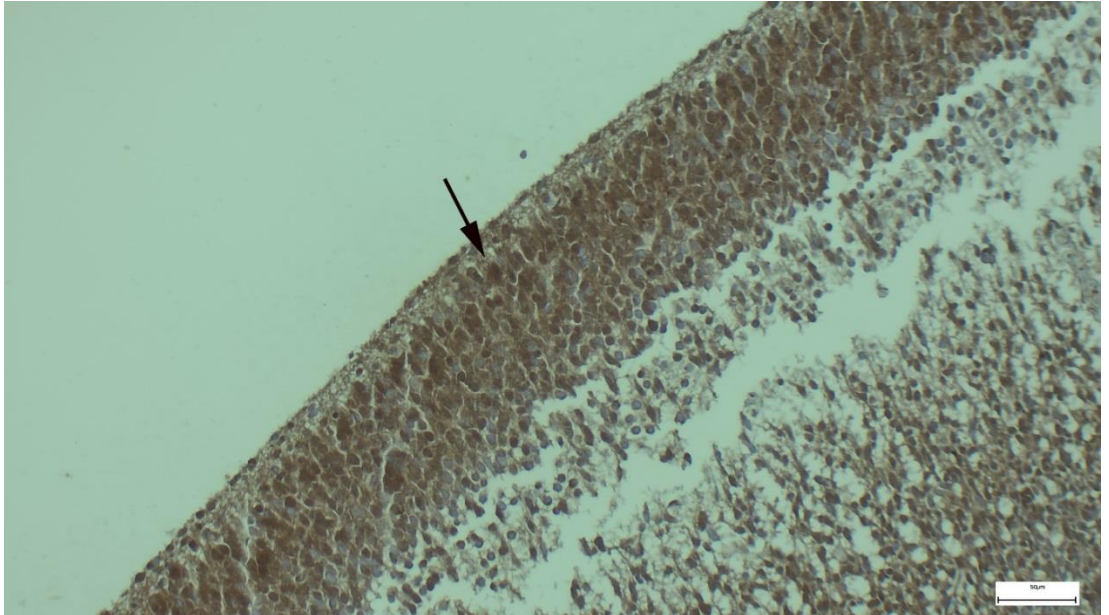
4.2.3. Fetal Beyin Kaspaz-3 İmmünohistokimyasal Bulguları

Fetal beyin dokularında gerçekleştirilen immünohistokimyasal incelemeler sırasında, kaspaz-3 ekspresyonunun özellikle nöronal hücrelerde ve perivasküler bölgelerde lokalize olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubunda, kaspaz-3 immünreaktivitesinin oldukça düşük seviyede olduğu ve nöronlarda seyrek, zayıf sitoplazmik boyanma ile sınırlı kaldığı belirlenmiştir. Buna karşılık, hasar grubunda fetal beyin dokusunda kaspaz-3 pozitifliğinin belirgin şekilde arttığı gözlemlenmiştir ($p < 0,001$). Profilaksi ve tedavi gruplarında ise kaspaz-3 ekspresyonu hasar grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0,01$) (Şekil 4.22-Şekil 4.26). Apoptotik belirteç ekspresyonundaki en belirgin azalma, terapötik selenyum uygulanan grupta saptanmıştır.



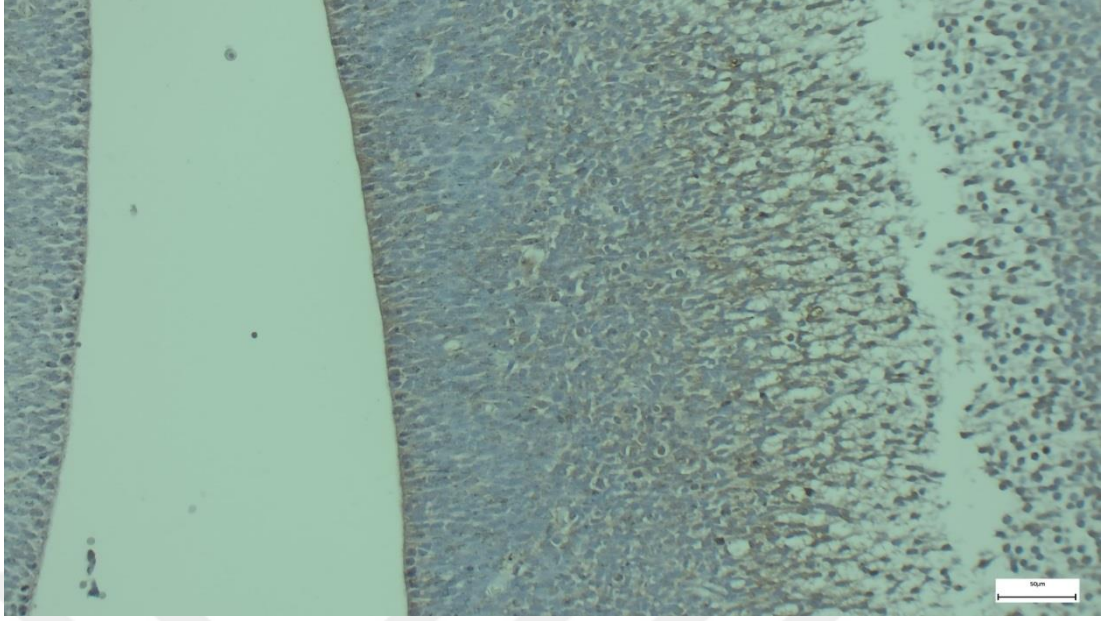
Şekil 4.22. Kontrol grubuna ait fetal beyin dokusunda çok hafif kaspaz-3 ekspresyonu.

Nöronal hücrelerde negatif immünreaktivite, streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi, DAB kromojen, Harris hematoksilin karşıt boyama, bar = 50 µm.



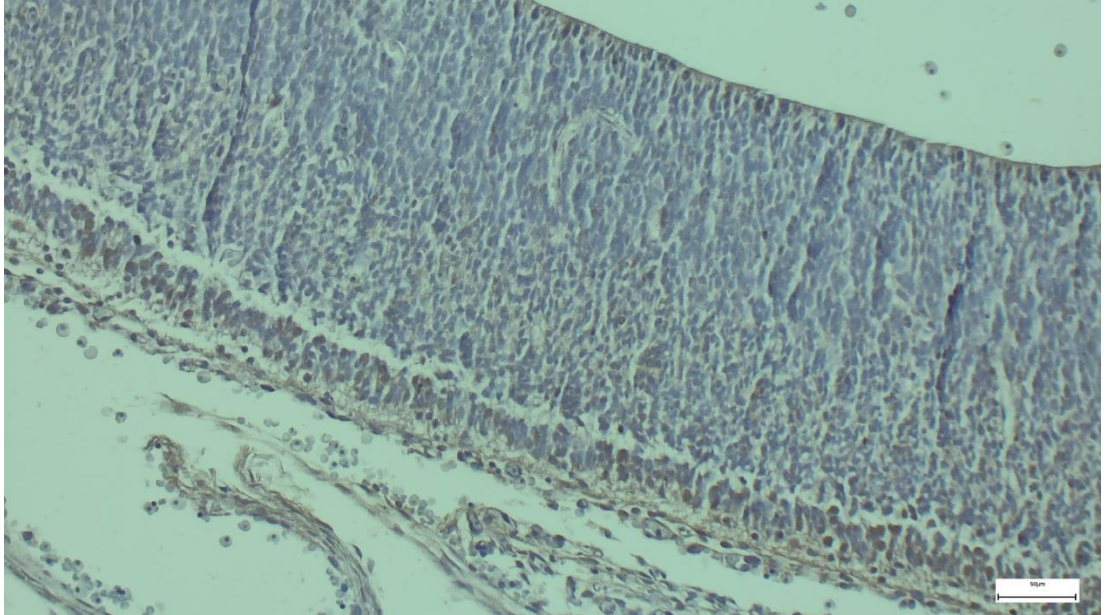
Şekil 4.23. Hasar grubuna ait fetal beyin dokusunda belirgin kaspaz-3 ekspresyonu.

Nöronal hücrelerde yoğun kahverengi immünpozitif boyanmalar (ok), streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi, DAB kromojen, Harris hematoksilin karşıt boyama, bar = 50 µm.



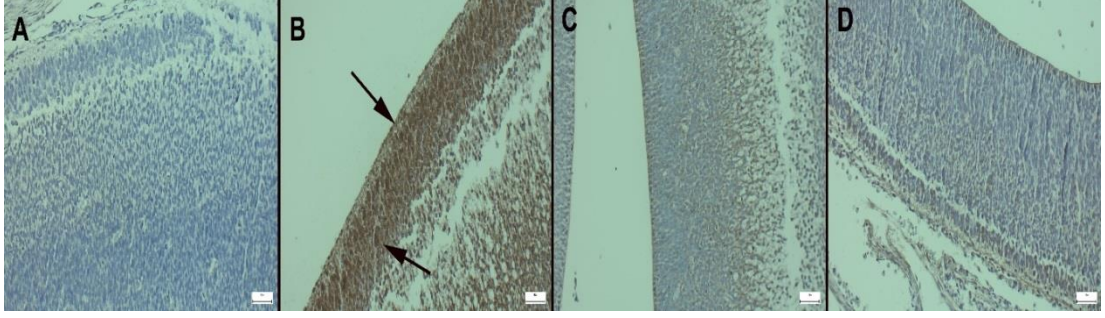
Şekil 4.24. Profilaksi grubuna ait fetal beyin dokusunda kaspaz-3 ekspresyonunun görünümü.

Nöronal hücrelerde hasar grubuna kıyasla daha hafif düzeyde immünreaktivite; streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi, DAB kromojen, Harris hematoksilen karşıt boyama; bar = 50 µm.



Şekil 4.25. Terapötik gruba ait fetal beyin dokusunda kaspaz-3 ekspresyonu.

Nöronal hücrelerde, hasar grubuna kıyasla önemli ölçüde azalmış immünreaktivite gözlenmektedir. Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi, DAB kromojen, Harris hematoksilen karşıt boyama, bar = 50 µm.

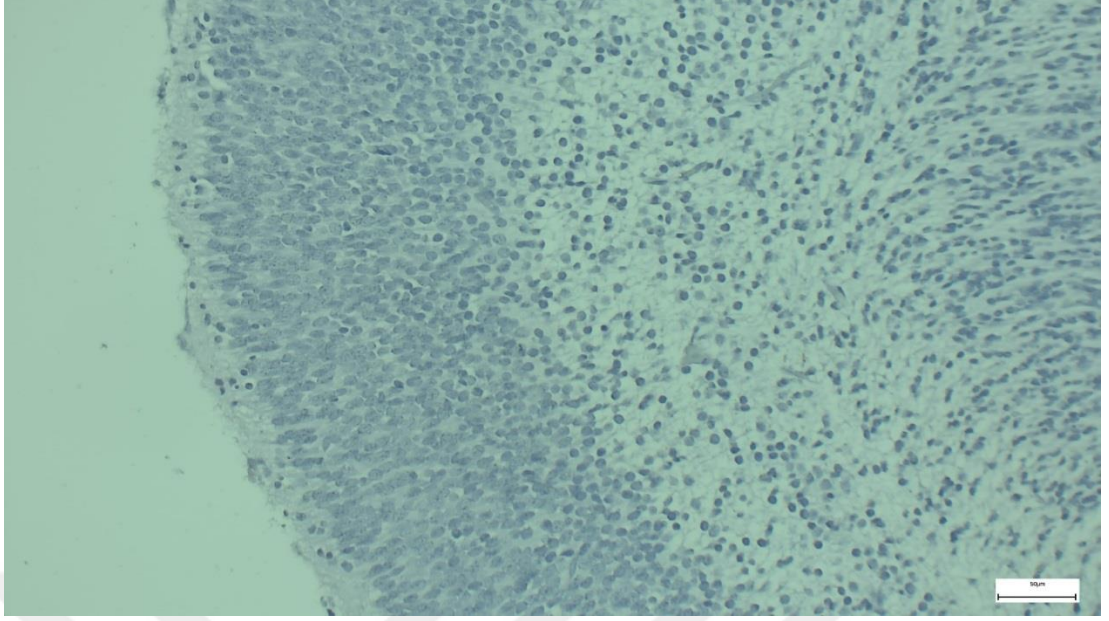


Şekil 4.26. Gruplar arasında fetal beyin kaspaz-3 ekspresyonlarının karşılaştırmalı görünümü

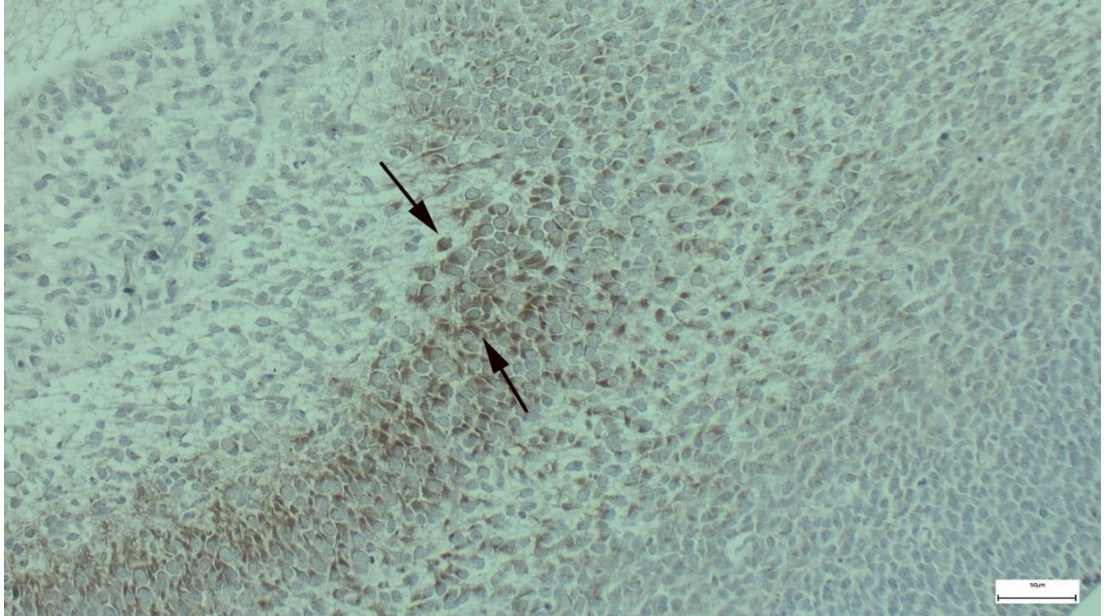
(A) Kontrol grubunda çok hafif ekspresyon, (B) Hasar grubunda belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (ok), (C) Profilaksi grubunda azalmış ekspresyon, (D) Terapötik grupta belirgin şekilde azalmış ekspresyonlar. Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi, DAB kromojen, Harris hematoksilin karşıt boyama, bar = 50 μ m.

4.2.4. Fetal Beyin TNF- α İmmunohistokimyasal Bulguları

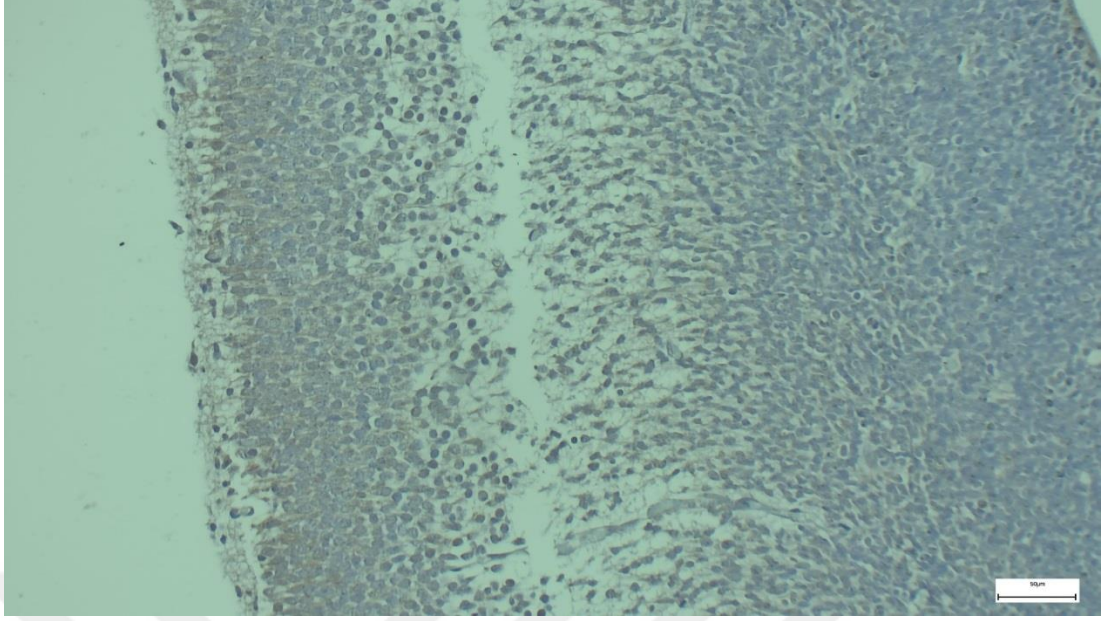
Fetal beyin dokularında gerçekleştirilen immünohistokimyasal incelemelerde, TNF- α immünreaktivitesinin nöronal hücrelerde ve perivasküler alanlarda lokalize olduğu gözlemlenmiştir. Kontrol grubunda, TNF- α ekspresyonunun oldukça düşük seviyelerde olduğu ve sınırlı sayıda nöronda zayıf sitoplazmik boyanma ile karakterize edildiği tespit edilmiştir. Hasar grubunda ise fetal beyin dokusunda TNF- α ekspresyonunun belirgin şekilde arttığı ve özellikle kortikal bölgelerde yoğun nöronal ve glial immünpozitif boyanmanın dikkat çektiği gözlenmiştir ($p < 0,001$). Bu artışın inflamatuvar yanıtın aktivasyonunu destekleyecek nitelikte olduğu değerlendirilmiştir. Profilaksi grubunda, TNF- α immünoreaktivitesinin hasar grubuna kıyasla anlamlı derecede azaldığı ve nöronal hücrelerde daha hafif, daha sınırlı boyanma paterni sergilediği gözlemlenmiştir. Terapötik grupta ise, TNF- α ekspresyonunun belirgin şekilde baskılandığı, immünpozitif hücre sayısının azaldığı ve dokusal inflamatuvar aktivitenin kontrol grubuna yakın düzeylere gerilediği tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Bu bulgular, uygulanan profilaktik ve terapötik yaklaşımların fetal beyin dokusunda inflamatuvar yanıtı azaltıcı etkiler gösterebileceğini düşündürmektedir (Şekil 4.27-Şekil 4.31).



Şekil 4.27. Kontrol grubuna ait fetal beyin dokusunda negatif TNF- α ekspresyonu streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi, DAB kromojen, Harris hematoksilen karşıt boyama, bar = 50 μ m.

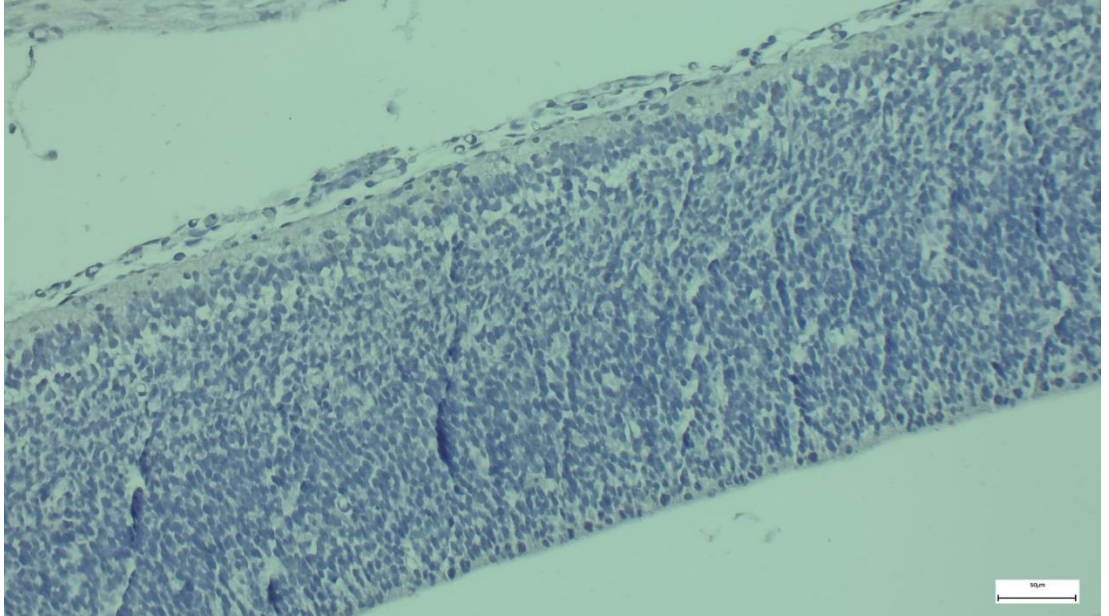


Şekil 4.28. Hasar grubuna ait fetal beyin dokusunda belirgin TNF- α ekspresyonu. Nöronal hücrelerde yoğun kahverengi immünpozitif boyanmalar (oklar), streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi, DAB kromojen, Harris hematoksilen karşıt boyama, bar = 50 μ m.



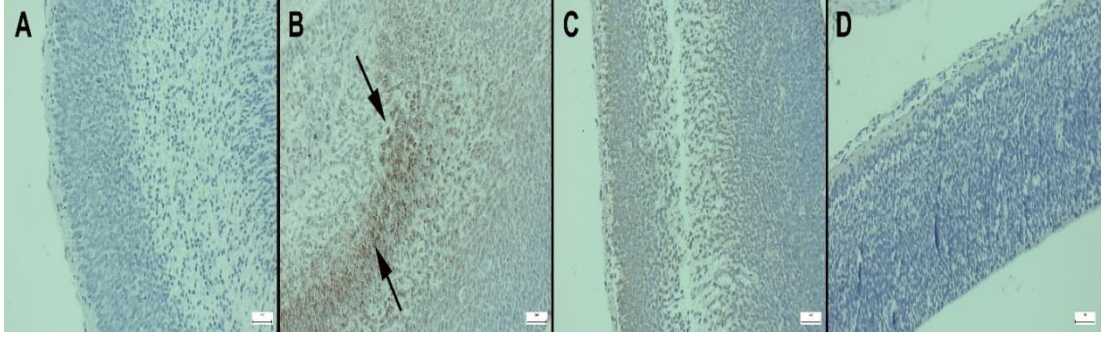
Şekil 4.29. Profilaksi grubuna ait fetal beyin dokusunda TNF- α ekspresyonu.

Nöronal hücrelerde hasar grubuna kıyasla daha hafif düzeyde immünreaktivite, streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi, DAB kromojen, Harris hematoksilin karşıt boyama, bar = 50 μ m.



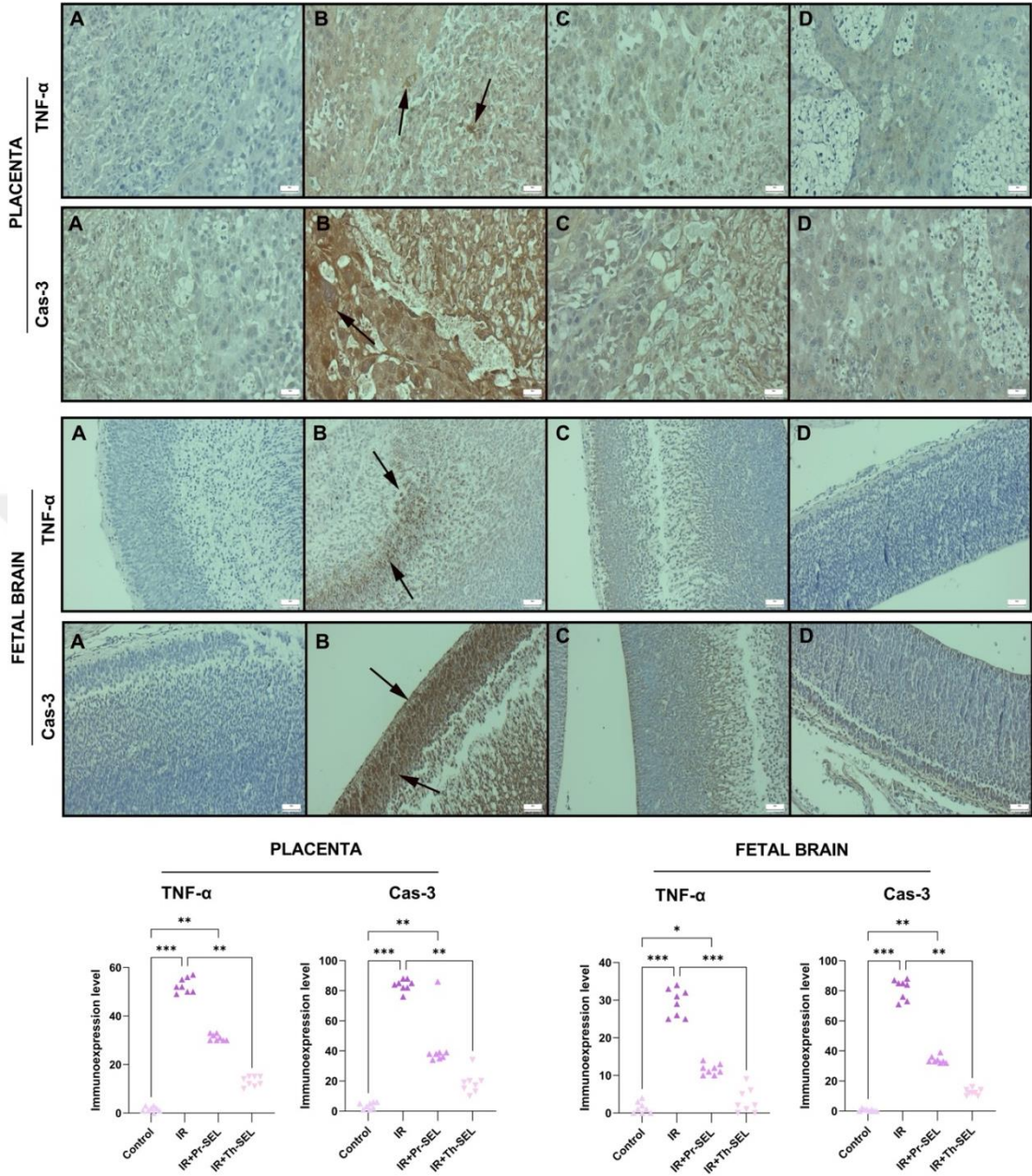
Şekil 4.30. Terapötik gruba ait fetal beyin dokusunda TNF- α ekspresyonu.

Nöronal hücrelerde hasar grubuna kıyasla belirgin şekilde azalmış immünreaktivite streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi, DAB kromojen, Harris hematoksilin karşıt boyama, bar = 50 μ m.



Şekil 4.31. Gruplar arasında fetal beyin TNF- α ekspresyonlarının karşılaştırmalı görünümü

(A) Kontrol grubunda çok hafif ekspresyon, (B) Hasar grubunda belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (ok), (C) Profilaksi grubunda azalmış ekspresyon, (D) Terapötik grupta belirgin şekilde azalmış ekspresyonlar. Streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi, DAB kromojen, Harris hematoksilen karşıt boyama, bar = 50 μ m.



Şekil 4.32. İmmünohistokimyasal görüntüler ve bunlara karşılık gelen yarı kantitatif immünreaktivite skorları gösterilmiştir.

İstatistiksel analizler Kruskal-Wallis testi ve ardından Dunn çoklu karşılaştırma post hoc testi ile yapılmıştır. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Ölçek çubukları = 50 μ m.

Kantitatif immünohistokimyasal analizler, İR grubunda plasenta ve fetal beyin dokularında TNF- α ve Cas-3 ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığını göstermiştir. Profilaktik ve terapötik selenyum uygulamaları hem plasental hem de fetal serebral dokularda inflamatuvar ve apoptotik belirteçlerin

ekspresyonunu anlamlı biçimde azaltmıştır. Bu sonuçlar, selenyumun intrauterin iskemi-reperfüzyon hasarına karşı potansiyel antiinflamatuvar ve antiapoptotik nöroprotektif etkiler sağlayabileceğine işaret etmektedir.



5. TARTIŞMA

Bu çalışma, selenyumun intrauterin iskemi-reperfüzyon (İR) hasarına karşı fetal sıçan beyni ve plasentası üzerindeki doku koruyucu etkilerini araştıran deneysel bir çalışmadır. Elde edilen bulgular, literatürde yer alan benzer deneysel çalışmalarla birlikte değerlendirildiğinde, selenyumun hem nöroprotektif hem de plasental koruyucu özellikler gösterebileceğini ortaya koymaktadır [42, 46]. Bildiğimiz kadarıyla, intrauterin iskemi-reperfüzyon modelinde selenyumun hem fetal beyin hem de plasenta üzerindeki koruyucu etkilerini birlikte değerlendiren çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Mevcut literatür, bir yandan intrauterin İR'nin fetal beyin hasarı oluşturduğunu, diğer yandan selenyumun serebral İR modellerinde nöroprotektif etkiler gösterebildiğini ortaya koymaktadır [47]. Bununla birlikte, bu iki yaklaşımın plasenta-beyin eksenini esas alan aynı deneysel modelde birleştirildiği bir çalışma görünmemektedir.

Selenyumun, özellikle antioksidan savunma sistemleri üzerindeki düzenleyici etkileri aracılığıyla, farklı doku ve organlarda İR hasarını azaltabildiği bildirilmiştir [48, 49]. Ancak selenyumun intrauterin İR modelinde fetal beyin ve plasenta üzerindeki koruyucu etkilerini değerlendiren çalışmaların sınırlı olması, bu alanda açıklığa kavuşturulması gereken önemli bir araştırma boşluğu olduğunu göstermektedir. Bu yönüyle mevcut çalışma, plasenta ile fetal beyin hasarını inceleyen deneysel yaklaşımı ve selenyumun nöroprotektif ve plasenta koruyucu etkilerini aynı modelde birlikte değerlendirmesi bakımından özgünlük taşımaktadır.

5.1. Fetal Beyin Histopatolojik Bulguları ve Literatür Karşılaştırması

Çalışmamız, İR hasarının hipoksi ile ilişkili vasküler düzensizlik, inflamatuvar aktivasyon, oksidatif stres, gliosis, apoptoz ve ferroptosis ile ilişkili moleküler değişikliklerle karakterize edildiğini ve belirgin plasental-fetal serebral hasara yol açtığını göstermiştir. Histopatolojik incelemelerde, fetal beyin dokusunda nöronal dejenerasyon, piknoz, hiperemi, ödem ve gliotik değişiklikler izlenmiş olup, plasentada ise trofoblastik mimaride bozulma, plasental hipoperfüzyon/anemik görünüm, hemoraji ve nekroz ile birlikte ciddi plasental hasar saptanmıştır.

Çalışmamızdaki bulgularla benzer şekilde, literatürde perinatal hipoksik-iskemik hasarın histopatolojik düzeyde nöronal dejenerasyon, glial aktivasyon/gliososis ve ilerleyici hücre ölümü ile ilişkili olduğu; reperfüzyon fazında ise serbest radikal oluşumu, inflamatuvar yanıt ve apoptotik mekanizmaların hasarı derinleştirdiği gösterilmiştir [50, 51].

5.2. Placenta Histopatolojik Bulguları ve Literatür Karşılaştırması

Yakın zamanda yayımlanan bir derlemede, oksidatif stresin plasental patogeneze merkezi bir rol oynadığı; özellikle trofoblast fonksiyon bozukluğu, anormal anjiyogenez, inflamatuvar yanıtın artışı ve redoks homeostazının bozulması yoluyla plasental hasarın gelişimine katkıda bulunduğu vurgulanmaktadır [52, 53]. Ayrıca, oksidatif stresin plasental disfonksiyonun yalnızca bir sonucu değil, aynı zamanda bu hasarın ilerlemesini destekleyen temel bir patofizyolojik mekanizma olduğu da belirtilmektedir. Bu yönüyle söz konusu çalışma, deneysel modelimizde iskemi-reperfüzyon sonrasında gözlenen trofoblastik yapı bozuklukları, hipoperfüzyon, inflamatuvar aktivasyon ve doku hasarı bulgularını destekler niteliktedir [52]. Bunun yanında, plasental disfonksiyonun gaz ve besin değişiminin bozulmasına, anjiyogeneze yetersizliğe ve immün-inflamatuvar dengenin değişmesine sebep olarak fetal beyin gelişimini olumsuz yönde etkileyebileceği gösterilmiştir [54, 55]. Bu kavramla uyumlu olarak, İR grubundaki fetal beyin dokularında belirgin nöronal dejenerasyon, piknoz, ödem, hiperemi ve gliosis saptanmıştır. Nöronal piknoz ve dejenerasyon, geri dönüşümsüz nöronal hasarın ve apoptotik sürecin yaygın olarak kabul gören göstergeleridir. Benzer şekilde, ödem ve vasküler hiperemi iskemik hasar sonrası serebral vasküler bütünlüğün bozulduğunu ve kan-beyin bariyeri disfonksiyonunu yansıtmaktadır. Gliotik değişikliklerin varlığı, serebral hasara ikincil olarak gelişen nöroinflamatuvar yanıtların ortaya çıktığını desteklemektedir. Bu bulgular, plasental hasarın yalnızca lokal bir doku yanıtı olmadığını, aynı zamanda fetal serebral hasarın gelişiminde belirleyici patofizyolojik basamaklardan biri olabileceğini ortaya koymaktadır.

Selenyum, selenoproteinlerin yapısında bulunan ve hem yapısal hem de enzimatik işlevler üstlenen temel eser elementtir. İnsan vücudunda yaklaşık 25 selenoprotein bulunduğuna tahmin edilmekte olup, bu proteinler çeşitli biyolojik

süreçlerde rol almaktadır [56]. Selenyum bağımlı enzimler arasında özellikle glutatyon peroksidaz (GPX) ailesi öne çıkmaktadır. Güçlü antioksidan özelliklere sahip GPX, hidrojen ve lipid peroksitler gibi toksik metabolitleri hücre membranı ve sitoplazmadan uzaklaştırarak oksidatif hasara karşı hücre savunmasında kritik bir rol oynamaktadır [57, 58]. Önceki araştırmalar, bu antioksidan selenoproteinlerin nöronlar ile astrositler gibi sinir sistemi hücrelerini oksidatif hasardan korumada önemli bir rol oynadığını göstermiştir [59, 60]. Selenoprotein eksikliği veya aktivitesindeki azalma, selenyumun nörolojik hastalıklardaki biyolojik etkileri ile yakından ilişkilendirilmiştir [61].

Selenyumun fetal ve neonatal etkilerini inceleyen çalışmalarda, annede selenyum desteğinin gelişmekte olan beynin çeşitli bölgelerinde selenyum düzeyini artırabildiği ve böylece antioksidan savunma sistemine katkı sağlayarak normal beyin gelişimini olumlu yönde etkileyebileceği gösterilmiştir [45]. Bunun yanında, selenyumun santral sinir sisteminin büyümesi, gelişimi ve uygun işlevlerinin sürdürülmesinde önemli rol oynadığı; tedaviye dirençli epileptik nöbetler ve bazı nörodejeneratif hastalıklarda ise terapötik potansiyel taşıdığı ifade edilmektedir [3, 45].

Selenoproteinler ve diğer selenyum bileşikler, sahip oldukları antioksidan özellikler nedeniyle iskemi-reperfüzyon hasarının önlenmesi veya hafifletilmesinde de araştırılmıştır. Sodyum selenitin, mitokondriyal membran potansiyelindeki kaybı ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu baskılayarak fare hipokampal hücrelerinde glutamat toksisitesini ve hipoksiye bağlı hücre ölümünü belirgin şekilde azalttığı gösterilmiştir [62]. Bu verilerle uyumlu olarak, çalışmamızda selenyum uygulamasının histopatolojik değişiklikleri anlamlı ölçüde azalttığı ve hipoksik-iskemik doku hasarlarıyla ilişkili çok sayıda moleküler yolu modüle ettiği gösterilmiştir. Elde edilen bulgular, selenyumun inflamatuvar, antioksidan, endotelial, anjiyojenik ve antiapoptotik sinyal yollarını bütüncül biçimde düzenleyerek hem plasentayı koruyucu hem de nöroprotektif etkiler gösterebileceğini düşündürmektedir.

5.3. Plasenta TNF- α İmmunohistokimyasal Bulguları ve Literatür Karşılaştırması

İnflamasyon, hipoksik-iskemik doku hasarında rol oynayan temel mekanizmalardan biridir. TNF- α , endotelyal disfonksiyon, oksidatif stresin artışı, mitokondriyal bozulma ve apoptotik sinyal yollarının aktivasyonunda görev alan başlıca proinflamatuvar sitokinlerden biridir. TNF- α , uygun uyarılar altında plasental hücreler de dahil olmak üzere çeşitli hücre tipi tarafından üretilmektedir [63]. Çalışmamızda, iskemi-reperfüzyon hasarı sonrasında hem plasental hem de fetal beyin dokularında TNF- α immünreaktivitesinin belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir. Bu bulgu, literatür verileriyle uyumludur. Deneysel çalışmalarda, iskemi-reperfüzyon koşullarında plasental TNF- α salınımının arttığı, oksidatif stresin trofoblastlarda ADAM17 aracılığıyla TNF- α üretimini yükseltebildiği ve bu artışın plasental işlev bozukluğu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, bu artışın trofoblast migrasyonunu ve plasental hücresel fonksiyonları olumsuz etkileyebileceği bildirilmiştir [64]. Bu çerçevede, çalışmamızda saptanan artmış plasental TNF- α ekspresyonu, iskemi-reperfüzyon hasarına eşlik eden inflamatuvar aktivasyonun önemli bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Buna karşılık, selenyum uygulaması sonrası TNF- α ekspresyonunda gözlenen azalma, selenyumun plasental dokuda inflamatuvar yanıtı baskılayabileceğini desteklemektedir. İnsan plasenta dokusunda gerçekleştirilen in vitro çalışmalarda da selenyum ön tedavisinin inflamasyonu ve oksidatif stresi azalttığı, ayrıca TNF- α ile ilişkili hücresel sinyal yollarını baskıladığı bildirilmiştir [65].

5.4. Fetal Beyin TNF- α İmmunohistokimyasal Bulguları ve Literatür Karşılaştırması

Çalışmamızda fetal beyin dokusunda, özellikle nöronal ve perivasküler bölgelerde artan TNF- α immünopozitifliği, iskemi-reperfüzyon hasarına eşlik eden nöroenflamatuvar yanıtın belirginleştiğini düşündürmektedir. TNF- α , hipoksik-iskemik beyin hasarında erken dönemde artış gösteren başlıca proinflamatuvar sitokinlerden biri olup mikrogial aktivasyon, endotelyal uyarılma ve nörovasküler ünite bozulması ile ilişkilidir [66, 67]. Nitekim literatürde, hipoksik-iskemik hasar sonrasında nörovasküler ünite ve kan-beyin bariyerinde gelişen bozulmanın

vasküler geçirgenlik artışına, serebral ödeme ve ilerleyici nöronal hasara katkıda bulunduğu bildirilmiştir [66]. Bu çerçevede, çalışmamızda nöronal ve perivasküler alanlarda saptanan TNF- α ekspresyon artışı inflamatuvar aktivasyonun yalnızca hücresel düzeyde değil, aynı zamanda serebral vasküler bütünlük üzerinde de bozucu etkiler yaratabileceğini düşündürmektedir. Özellikle perivasküler bölgelerdeki belirgin immünopozitiflik, TNF- α aracılı inflamatuvar yanıtın kan-beyin bariyeri geçirgenliğinde artışıyla, serebral ödem gelişimi ve buna eşlik eden ilerleyici nöronal hasarla ilişkilidir. Buna karşılık, selenyum uygulaması sonrasında TNF- α immünreaktivitesinde saptanan belirgin azalma, selenyumun fetal beyin dokusunda nöroenflamatuvar yanıtı baskılayabileceğini düşündürmektedir.

Bu bulguyu destekler nitelikte, 2025 yılında yayımlanan bir derlemede selenyumun koruyucu etkilerinin mekanizmaları ayrıntılı olarak ele alınmıştır. Artmış selenoprotein ekspresyonunun kaspaz-8, NF- κ B, IL-1 β ve TNF- α gibi proinflamatuvar mediatörleri baskılayarak nöroenflamasyonu azalttığı; ayrıca LPS ile indüklenen reaktif oksijen türlerinin üretimini düşürerek toplam antioksidan kapasiteyi artırdığı bildirilmiştir. Selenyum desteğinin aynı zamanda kan-beyin bariyeri bütünlüğünü koruduğu, albümin infiltrasyonunu azalttığı ve PSD-95 ile BDNF ekspresyonunu artırarak nörolojik fonksiyonlara olumlu katkı sağladığı gösterilmiştir [56].

Bu bilgiler ışığında, çalışmamızdaki bulgular selenyumun antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri aracılığıyla hipoksik-iskemik hasar sonrası gelişen sekonder serebral hasarı sınırlandırabileceğini ve nörovasküler bütünlüğün korunmasına katkıda bulunabileceğini desteklemektedir.

5.5. Plasenta Kaspaz- 3 İmmunohistokimyasal Bulguları ve Literatür Karşılaştırması

Çalışmamızda, apoptotik aktivasyonun doku hasarının temel bileşenlerinden biri olduğu belirlenmiştir. Hasar grubunda, plasental trofoblast hücrelerinde kaspaz-3 immünreaktivitesinin anlamlı düzeyde arttığı gözlemlenmiş olup; buna ek olarak, profilaktik ve terapötik selenyum uygulanan gruplarda bu artışın belirgin şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Kaspaz-3, geri dönüşümsüz apoptotik hücre ölümünden sorumlu olan en son yürütücü kaspazdır. Bu bağlamda, hasar grubunda gözlemlenen

yoğun kaspaz-3 pozitifliği, iskemi-reperfüzyon hasarına bağlı olarak plasental dokuda apoptotik mekanizmaların aktive olduğunu düşündürmektedir.

Plasental iskemi ve bunu takip eden reperfüzyon sürecinin ROS aşırı üretimine yol açarak hücrel redoks dengesini bozduğu bilinmektedir. Oksidatif stres sonucunda meydana gelen mitokondriyal membran hasarı, sitokrom c salınımını tetiklemekte ve intrinsik apoptotik yolak üzerinden kaspaz-3 aktivasyonuna neden olmaktadır. Plasental iskemik hastalıklarda mitokondriyal disfonksiyonun, trofoblast apoptozunun temel belirleyicilerinden biri olduğunu ve artmış kaspaz-3 aktivitesinin doku hasarının şiddetiyle yakından ilişkili olduğunu bildirmiştir [68]. Bu bulgular, çalışmamızda hasar grubunda saptanan belirgin kaspaz-3 artışıyla paralellik göstermektedir.

Chen ve arkadaşları (2024) maternofetal ara yüzde hücre ölüm mekanizmalarını incelemiştir. Çalışmalarında, fizyolojik düzeyde trofoblast apoptozunun normal gelişim için gerekli olduğu, ancak aşırı apoptotik aktivitenin plasental disfonksiyon, fetal büyüme kısıtlılığı ve gebelik komplikasyonlarına neden olduğu ortaya konulmuş ve kaspaz-3 aracılı yolların patolojik gebeliklerde aktif olduğu vurgulanmıştır [69]. Çalışmamızda ise hasar grubunda trofoblastlardaki yoğun kaspaz-3 boyaması bu bulguları destekler niteliktedir.

Selenyum uygulanan gruplarda kaspaz-3 ekspresyonunda saptadığımız azalma, bu elementin antioksidan ve antiapoptotik özellikleri ile ilişkilendirilebilir. İnsan plasentasında bulunan selenoproteinlerin oksidatif stresin kontrolündeki rolünün değerlendirildiği bir çalışmada, selenyum yetersizliğinin trofoblast fonksiyonlarında bozulmaya ve hücrel hasarın artmasına katkıda bulunabileceği ifade edilmiştir [70]. Benzer şekilde, hem insan plasantasının hem de deneysel IR hasarının incelendiği diğer çalışmalar da bu bulguları desteklemektedir [65].

Tüm bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, çalışmamızda profilaktik ve terapötik selenyum uygulanan gruplarda kaspaz-3 immünreaktivitesinin azalması, selenyumun plasental IR hasarına karşı koruyucu etkisinin en azından kısmen antioksidan ve antiapoptotik mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştiğini düşündürmektedir. Bu bulgu, selenyumun trofoblast hücrelerinde apoptotik yanıtı baskılayarak plasental doku bütünlüğünün korunmasına katkı sağlayarak hücrel

hasarın sınırlandırılmasında potansiyel bir koruyucu ajan olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

5.6. Fetal Beyin Kaspaz-3 İmmunohistokimyasal Bulguları ve Literatür Karşılaştırması

Hipoksik-iskemik beyin hasarında nöronal kaybın temel mekanizmalarından biri apoptotik hücre ölümüdür. Hipoksi ve reperfüzyon sonrası ortaya çıkan enerji yetersizliği, aşırı reaktif oksijen türü üretimi, kalsiyum homeostazında bozulma ve mitokondriyal fonksiyon kaybı sonucu intrinsik apoptotik yolak aktive olmakta; sitokrom c salınımını takiben kaspaz-9 ve kaspaz-3 aracılığıyla hücre ölümü gerçekleşmektedir. Bu süreçlerin uzun dönem nörogelişimsel bozuklukların gelişiminde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir [71]. Çalışmamızdaki nöronal dejenerasyon ve piknotik hücre artışına eşlik eden yoğun kaspaz-3 immünreaktivitesi, morfolojik hasar ile apoptotik aktivasyon arasındaki bu ilişkiyi desteklemektedir.

Bulgularımızın dikkat çekici yönlerinden biri, kaspaz-3 pozitifliğinin perivasküler alanlarda da belirgin olarak gözlenmesidir. Bu durum, iskemi-reperfüzyon hasarının yalnızca nöronal hücreleri değil, aynı zamanda nörovasküler üniteyi ve kan-beyin bariyerini oluşturan yapıları da etkilediğini düşündürmektedir.

Kan-beyin bariyeri, merkezi sinir sisteminin homeostazının sürdürülmesinde kritik rol oynayan seçici geçirgen bir yapı olup endotelial hücreler, perisitler ve astrositik ayak çıkıntılarından oluşur. İR sürecinde ortaya çıkan oksidatif stres ve inflamatuvar yanıt, sıkı bağlantı proteinlerinin yıkımına neden olarak kan-beyin bariyeri bütünlüğünün bozulmasına yol açmaktadır. Güncel çalışmalar, neonatal hipoksik-iskemik hasarda kan-beyin bariyerinin erken dönemde bozulduğunu ve vasküler geçirgenliğin arttığını göstermektedir. Kan-beyin bariyeri bütünlüğünün bozulması, inflamatuvar hücre infiltrasyonunu kolaylaştırmakta, serebral ödem gelişimini hızlandırmakta ve nöronal hasarı daha da ağırlaştırmaktadır [72].

Selenyumun nöroprotektif etkileri büyük ölçüde yapısına katıldığı selenoproteinler aracılığıyla gerçekleşmektedir. Özellikle glutatyon peroksidaz ve selenoprotein P'nin merkezi sinir sisteminde oksidatif stresin kontrol altına

alınmasında kritik rol oynadığı bilinmektedir. Selenyum desteğinin hücre içi antioksidan savunmayı güçlendirerek reaktif oksijen türlerinin birikimini azalttığı ve böylece mitokondriyal hasar ile buna bağlı apoptotik kaskadın aktivasyonunu sınırladığı bildirilmektedir. Nöronal sağkalımı artırdığı ve oksidatif strese bağlı hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir [56], [73]. Benzer şekilde Savvina ve ark. (2023), akut serebral hasar modellerinde selenyumun nöronal fonksiyonların korunmasına katkı sağladığını ve JNK/p38 gibi proapoptotik sinyal yollarını baskılayarak kaspaz aracılı hücre ölümünü azalttığını bildirmiştir. Aynı çalışmada selenyumun astrogliyozu inhibe ettiği ve nöronal bütünlüğün korunmasına katkıda bulunduğu da saptanmıştır [74].

Deneyssel serebral iskemi-reperfüzyon modellerinde selenyumun yalnızca nöronal hücreleri korumakla kalmadığı, aynı zamanda kan-beyin bariyeri bütünlüğünün sürdürülmesine de katkı sağladığı bildirilmiştir. Selenyumun PI3K/Akt/mTOR ile ilişkili hücresel sağkalım mekanizmalarını aktive ederek endotelial hasarı azaltması, bariyer geçirgenliğini sınırlandırması ve reperfüzyon sonrası gelişen ikincil hasar süreçlerini engellediği gösterilmiştir [73].

Bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, çalışmamızda selenyum uygulanan gruplarda kaspaz-3 immünreaktivitesindeki azalma, selenyumun fetal beyinde İR hasarına bağlı gelişen apoptotik nörodejenerasyonu baskıladığını düşündürmektedir. Ayrıca nöronal dejenerasyon ve piknotik hücre sayısındaki azalmanın, kaspaz-3 ekspresyonundaki düşüş ile birlikte değerlendirilmesi, selenyumun fetal serebral dokuda yapısal ve fonksiyonel bütünlüğün korunmasına katkıda bulunan önemli bir nöroprotektif molekül olabileceğini göstermektedir.

Korelasyon analizi koordineli bir plasental–fetal hasar ekseninin varlığını daha da desteklemiştir. Plasental hasar skorlarının, plasental TNF- α , plasental Cas-3, fetal beyin TNF- α , fetal beyin Cas-3, nöronal dejenerasyon ve gliosis ile güçlü pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Bu bulgular, plasental inflamasyon ve apoptozun fetal serebral hasarla yakından ilişkili olduğunu düşündürmekte ve selenyum aracılığıyla antioksidan savunma mekanizmalarının yeniden sağlanmasının, bu patolojik plasenta-beyin sinyal kaskadını kesintiye uğratabileceği görüşünü desteklemektedir.

Selenyumun düşük maliyetli, klinik kullanıma uygun ve gebelik sırasında besinsel destek amacıyla rutin olarak kullanılan bir tedavi seçeneği olması da dikkate değerdir. Bu nedenle, selenyumun plasental hipoksi, inflamasyon, apopitoz ve ferropitoz ile ilişkili hasar yollarını eş zamanlı olarak hedefleyebilme kapasitesi, fetal hipoksik-iskemik beyin hasarını azaltmaya yönelik umut vaat eden bir strateji sunabilir. Her ne kadar bu bulguların klinik uygulamaya geçirilmesi için ileri klinik çalışmalara ihtiyaç duyulsa da, mevcut bulgular selenyumun plasental yetersizlik ve fetal hipoksik hasar riski taşıyan gebeliklerde yardımcı bir tedavi seçeneği olabileceğini desteklemektedir.



6. SONUÇ

Bu çalışmada, intrauterin iskemi-reperfüzyon hasarının fetal sıçan beyni ve plasentasında oluşturduğu histopatolojik ve moleküler değişiklikler ile selenyum uygulamasının bu değişiklikler üzerindeki olası koruyucu etkileri araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, intrauterin İR hasarının placentaya ve fetal beyinde belirgin yapısal ve hücre hasara yol açtığını; selenyum uygulamasının ise bu hasarı çeşitli düzeylerde azaltabildiğini ortaya koymuştur.

Histopatolojik değerlendirmelerde, İR hasarı sonrasında fetal beyin dokusunda nöronal dejenerasyon, piknoz, ödem, hiperemi ve gliosis gibi belirgin nörodejeneratif değişiklikler saptanırken; plasental dokuda trofoblastik mimaride bozulma, hipoperfüzyon, hemoraji ve nekroz ile karakterize ciddi yapısal hasar saptanmıştır. Bu bulgular, intrauterin İR hasarının yalnızca plasentayı etkileyen lokal bir süreç olmadığını, aynı zamanda fetal serebral dokuda da önemli düzeyde hasara neden olduğunu göstermektedir.

İmmünohistokimyasal incelemelerde hem plasenta hem de fetal beyin dokularında TNF- α ekspresyonunun intrauterin yenidoğan riski hasarı sonrasında belirgin şekilde arttığı belirlenmiştir. Bu durum, inflamasyonun intrauterin yenidoğan risk hasarının temel patofizyolojik mekanizmalarından biri olduğunu desteklemektedir. Özellikle fetal beyin dokusunda nöronal ve perivasküler bölgelerde gözlenen artmış TNF- α immünreaktivitesi, nöroenflamatuvar süreçlerin yanı sıra nörovasküler ünite ve kan-beyin bariyerinin bütünlüğünün de hasardan etkilendiğini düşündürmektedir. Selenyum uygulaması sonrasında TNF- α ekspresyonunda gözlenen anlamlı azalma, selenyumun güçlü antiinflamatuvar etkilerini ortaya koymaktadır.

Apopitozun değerlendirilmesi amacıyla, kaspaz-3 ekspresyonu hem plasental trofoblast hücrelerinde hem de fetal beyin dokusundaki nöronal ve perivasküler alanlarda İR hasarı sonrası artış göstermiştir. Bu durum, oksidatif stres ve inflamasyonun apoptotik mekanizmaların aktive olmasına neden olduğunu göstermektedir. Selenyum uygulanan gruplarda kaspaz-3 ekspresyonunun azalması, selenyumun antiapoptotik özelliklerini desteklemektedir. Özellikle terapötik

selenyum grubu, selenyumun yalnızca koruyucu değil, aynı zamanda hasar sonrası doku koruyucu olabileceğine işaret etmektedir.

Çalışmada elde edilen korelasyon bulguları, plasental inflamasyon ve apoptozun fetal serebral hasar ile yakından ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Plasental hasar skorlarının hem plasental hem de fetal beyin TNF- α ve kaspaz-3 düzeyleri ile güçlü pozitif korelasyon göstermesi, plasenta ve fetal beyin arasında koordineli bir hasar ekseninin varlığını desteklemektedir. Bu sonuçlar, plasental fonksiyon bozukluğunun fetal nörogelişim üzerinde belirleyici etkiler yaratabileceğini ve plasentanın fetal serebral hasarın patogenezinde merkezi bir rol oynadığını göstermektedir.

Çalışmamızın en önemli bulgularından biri selenyumun inflamasyon, oksidatif stres ve apoptoz ile ilişkili patolojik süreçleri eşzamanlı olarak modüle edebilmesidir. Selenyumun antioksidan savunma sistemlerini güçlendirmesi, proinflamatuvar sitokin üretimini azaltması, apoptotik sinyal yollarını baskılaması ve muhtemelen nörovasküler bütünlüğün korunmasına katkı sağlaması, saptadığımız histopatolojik iyileşmelerin temel mekanizmalarını oluşturmaktadır. Bu yönüyle selenyum, yalnızca nöroprotektif değil, aynı zamanda plasenta koruyucu özellikler de gösteren çok yönlü bir biyolojik yaklaşım olarak değerlendirilebilir.

Sonuç olarak, intrauterin iskemi-reperfüzyon hasarının fetal beyin ve plasentada ciddi inflamatuvar, apoptotik ve dejeneratif değişikliklere yol açtığı; selenyum uygulamasının ise bu patolojik süreçleri anlamlı ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Elde edilen veriler, selenyumun plasenta-beyin eksenini boyunca gelişen hasar mekanizmalarını baskılayarak fetal dokuları koruyabileceğini göstermektedir. Bu bulgular, selenyumun plasental yetmezlik, fetal hipoksi ve hipoksik-iskemik beyin hasarı riski taşıyan gebeliklerde potansiyel bir yardımcı tedavi yaklaşımı olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, bu deneysel sonuçların klinik uygulamaya aktarılabilmesi için farklı dozları, uygulama zamanlarını ve etki mekanizmalarını inceleyen ileri deneysel çalışmalar ile geniş ölçekli klinik araştırmalara ihtiyaç vardır.

Bu çalışmanın bazı kısıtlılıkları göz önünde bulundurulmalıdır. İncelenen tüm moleküler yollar protein düzeyinde doğrulanmamıştır; ayrıca oksidatif stres

göstergeleri, mitokondriyal fonksiyon değerlendirmeleri ve ferropitoza özgü lipit peroksidasyon ölçümleri gibi ek araştırmalar, bulguların yorumu açısından büyük önem taşıyabilir. Bunun yanı sıra, uzun vadeli nörodavranışsal değerlendirmeler yapılmamıştır. Gelecekteki çalışmalarda, davranışsal, elektrofizyolojik ve ileri moleküler analizleri içeren yaklaşımlar, fetal hipoksik-iskemik hasarda selenyumun nöroprotektif potansiyeline ilişkin daha güçlü veriler sunabilir.



ÖZET

İntrauterin İskemi-Reperfüzyon Modelinde Selenyumun Fetal Sıçan Beyni ve Plasentasındaki Koruyucu Etkileri

Bu çalışmada, intrauterin iskemi-reperfüzyon (İR) hasarının fetal sıçan beyni ve plasentasında oluşturduğu histopatolojik ve moleküler değişiklikler ile selenyum uygulamasının bu değişiklikler üzerindeki koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada gebe sıçanlar kontrol, iskemi-reperfüzyon (İR), profilaktik selenyum ve terapötik selenyum gruplarına ayrılmıştır. İntrauterin İR modeli oluşturulduktan sonra fetal beyin ve plasenta dokuları, histopatolojik ve immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir. Doku hasarının tespiti amacıyla, histopatolojik incelemelerin yanı sıra, inflamasyon belirteci olarak tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) ve apoptotik aktivitenin göstergesi olarak kaspaz-3 ekspresyonları da araştırılmıştır.

İskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulan grupta fetal beyin dokusunda nöronal dejenerasyon, piknoz, ödem, hiperemi ve gliosis ($p<0,001$); plasental dokuda ise trofoblastik mimaride bozulma, hipoperfüzyon, hemoraji ve nekroz saptanmıştır ($p<0,01$). Ayrıca hem plasenta hem de fetal beyin dokularında TNF- α ve kaspaz-3 immünreaktivitesinin anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir ($p<0,001$). Selenyum uygulanan gruplarda ise histopatolojik hasarın azaldığı, TNF- α ve kaspaz-3 ekspresyonlarının ise anlamlı derecede düştüğü saptanmıştır ($p<0,01$). Koruyucu etkinin özellikle terapötik selenyum uygulanan gebeliklerde daha belirgin olduğu ortaya konmuştur. Korelasyon analizleri, plasental inflamasyon ve apoptozun fetal serebral hasar ile yakından ilişkili olduğunugöstermektedir.

Sonuç olarak, intrauterin iskemi-reperfüzyon hasarının fetal beyin ve plasentada belirgin inflamatuvar, apoptotik ve dejeneratif değişikliklere neden olduğu tespit edilmiştir. Selenyum uygulamasının ise bu patolojik süreçleri bastırarak hem nöroprotektif hem de plasenta koruyucu etkiler gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, selenyumun plasenta-beyin ekseninde boyunca gelişen hasarın azaltılmasında potansiyel bir yardımcı tedavi seçeneği olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Selenyum, İskemi-reperfüzyon, Plasenta, Fetal beyin, TNF- α , kaspaz-3, Nörokorunma

ABSTRACT

Protective Effects of Selenium on Fetal Rat Brain and Placenta in an Intrauterine Ischemia-Reperfusion Model

The present study aimed to investigate the histopathological and molecular alterations induced by intrauterine ischemia-reperfusion (I/R) injury in the fetal rat brain and placenta, and to evaluate the potential protective effects of selenium against these changes.

Pregnant rats were assigned to control, ischemia-reperfusion (I/R), prophylactic selenium, and therapeutic selenium groups. After establishing the intrauterine I/R model, fetal brain and placental tissues were examined histopathologically and immunohistochemically. Tissue injury was assessed histologically, and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and caspase-3 expressions were evaluated as markers of inflammation and apoptosis, respectively. The I/R group demonstrated marked neuronal degeneration, pyknosis, edema, hyperemia, and gliosis in the fetal brain ($p < 0,001$), as well as disruption of trophoblastic architecture, hypoperfusion, hemorrhage, and necrosis in placental tissues ($p < 0,05$). Moreover, TNF- α and caspase-3 immunoreactivity were significantly increased in both placental and fetal brain tissues ($p < 0,001$). Selenium administration significantly reduced histopathological damage and decreased TNF- α and caspase-3 expressions ($p < 0,01$ for both). The protective effect was more pronounced in the therapeutic selenium group. Correlation analyses further revealed a strong association between placental inflammation, apoptosis, and fetal cerebral injury.

In conclusion, intrauterine ischemia-reperfusion injury induces notable inflammatory, apoptotic, and degenerative changes in both the fetal brain and placenta. The administration of selenium mitigates these pathological modifications and demonstrates neuroprotective as well as placentoprotective effects. These findings imply that selenium could serve as a promising adjunctive therapeutic strategy to diminish placental and fetal cerebral damage associated with intrauterine ischemia-reperfusion.

Keywords: Selenium, Ischemia-reperfusion, Placenta, Fetal brain, TNF- α , caspase-3, Neuroprotection

KAYNAKLAR

1. Enweronu-Laryea, C.C., et al., *Parental costs for in-patient neonatal services for perinatal asphyxia and low birth weight in Ghana*. PloS one, 2018. 13(10): p. e0204410.
2. Stevenson, D.K., et al., *Fetal and neonatal brain injury*. 2017: Cambridge University Press.
3. Ramaekers, V.T., et al., *Selenium deficiency triggering intractable seizures*. Neuropediatrics, 1994. 25(04): p. 217-223.
4. Paz, A.A. and A. González-Candia, *Potential pharmacological target of tight junctions to improve the BBB permeability in neonatal Hypoxic-Ischemic encephalopathy Diseases*. Biochemical Pharmacology, 2023. 207: p. 115356.
5. Gillam-Krakauer, M., M. Shah, and C.W. Gowen Jr, *Birth asphyxia*, in *StatPearls [Internet]*. 2024, StatPearls Publishing.
6. Andelius, T.C.K., et al., *Asphyxia and hypoxic-ischaemic encephalopathy*. Ugeskrift for laeger, 2020. 182(14A): p. V12190704.
7. Ranjan, A.K. and A. Gulati, *Advances in therapies to treat neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy*. Journal of clinical medicine, 2023. 12(20): p. 6653.
8. Cánovas-Ahedo, M. and D. Alonso-Alconada, *Combined therapy in neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy*. Anales de Pediatría (English Edition), 2019. 91(1): p. 59-59. e6.
9. Molloy, E.J., et al., *Neuroprotective therapies in the NICU in term infants: present and future*. Pediatric research, 2023. 93(7): p. 1819-1827.
10. Zdolińska-Malinowska, I., et al., *Rationale for the Use of Cord Blood in Hypoxic-Ischaemic Encephalopathy*. Stem Cells International, 2022. 2022(1): p. 9125460.
11. Belov Kirdajova, D., et al., *Ischemia-triggered glutamate excitotoxicity from the perspective of glial cells*. Frontiers in cellular neuroscience, 2020. 14: p. 51.
12. Neves, D., et al., *Molecular mechanisms of ischemia and glutamate excitotoxicity*. Life sciences, 2023. 328: p. 121814.
13. Shen, Z., et al., *Glutamate excitotoxicity: Potential therapeutic target for ischemic stroke*. Biomedicine & pharmacotherapy, 2022. 151: p. 113125.
14. Zhou, K.Q., et al., *Targeting persistent neuroinflammation after hypoxic-ischemic encephalopathy—is exendin-4 the answer?* International journal of molecular sciences, 2022. 23(17): p. 10191.
15. Nuñez, A., et al., *Oxidative stress in perinatal asphyxia and hypoxic-ischaemic encephalopathy*. Anales de Pediatría (English Edition), 2018. 88(4): p. 228. e1-228. e9.
16. Zhao, M., et al., *Oxidative stress in hypoxic-ischemic encephalopathy: molecular mechanisms and therapeutic strategies*. International journal of molecular sciences, 2016. 17(12): p. 2078.
17. Yang, M., et al., *Hypoxic-ischemic encephalopathy: pathogenesis and promising therapies*. Molecular Neurobiology, 2025. 62(2): p. 2105-2122.
18. Li, P., et al., *Chloroquine inhibits autophagy and deteriorates the mitochondrial dysfunction and apoptosis in hypoxic rat neurons*. Life sciences, 2018. 202: p. 70-77.
19. Greco, P., et al., *Pathophysiology of hypoxic-ischemic encephalopathy: a review of the past and a view on the future*. Acta Neurologica Belgica, 2020. 120(2): p. 277-288.
20. Lee, J.K., J.L. Rosales, and K.-Y. Lee, *Requirement for ER-mitochondria Ca²⁺ transfer, ROS production and mPTP formation in L-asparaginase-induced apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells*. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2023. 11: p. 1124164.

21. He, M., et al., *Deletion of mitochondrial uncoupling protein 2 exacerbates mitophagy and cell apoptosis after cerebral ischemia and reperfusion injury in mice*. International journal of medical sciences, 2020. 17(17): p. 2869.
22. Hua, C., et al., *Molecular chaperones and hypoxic-ischemic encephalopathy*. Neural regeneration research, 2017. 12(1): p. 153-160.
23. Yata, K., et al., *Granulocyte-colony stimulating factor inhibits apoptotic neuron loss after neonatal hypoxia-ischemia in rats*. Brain research, 2007. 1145: p. 227-238.
24. Liu, F. and L.D. McCullough, *Inflammatory responses in hypoxic ischemic encephalopathy*. Acta Pharmacologica Sinica, 2013. 34(9): p. 1121-1130.
25. Serdar, M., et al., *Involvement of CXCL1/CXCR2 during microglia activation following inflammation-sensitized hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats*. Frontiers in neurology, 2020. 11: p. 540878.
26. Hamzei Taj, S., et al., *Dynamic modulation of microglia/macrophage polarization by miR-124 after focal cerebral ischemia*. Journal of Neuroimmune Pharmacology, 2016. 11(4): p. 733-748.
27. Teo, E.J., et al., *Early evolution of glial morphology and inflammatory cytokines following hypoxic-ischemic injury in the newborn piglet brain*. Scientific Reports, 2023. 13(1): p. 282.
28. Zeng, J., et al., *Role of JAK2/STAT3 signaling pathway in microglia activation after hypoxic-ischemic brain damage*. Zhongguo gu Shang= China Journal of Orthopaedics and Traumatology, 2020. 33(2): p. 190-194.
29. Juul, S.E. and D.M. Ferriero, *Pharmacological neuroprotective strategies in neonatal brain injury*. Clinics in perinatology, 2013. 41(1): p. 119.
30. Zhu, K.-Y. and M.-Y. Hei, *Research advances in the role of ferroptosis in neonatal hypoxic-ischemic brain damage*. Zhongguo Dang dai er ke za zhi= Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2021. 23(5): p. 536-541.
31. Cai, Y., et al., *Vitamin D suppresses ferroptosis and protects against neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy by activating the Nrf2/HO-1 pathway*. Translational Pediatrics, 2022. 11(10): p. 1633.
32. Lin, W., et al., *Ferroptosis is involved in hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats*. Neuroscience, 2022. 487: p. 131-142.
33. Li, X. and W. Yang, *An update on the unfolded protein response in brain ischemia: Experimental evidence and therapeutic opportunities*. Neurochemistry international, 2021. 151: p. 105218.
34. Yin, J.-W., et al., *Dexmedetomidine and Netrin-1 combination therapy inhibits endoplasmic reticulum stress by regulating the ERK5/MEF2A pathway to attenuate cerebral ischemia injury*. Frontiers in neuroscience, 2021. 15: p. 641345.
35. Şahandar, T., *Magnezyum sülfatın intrauterin iskemi-reperfüzyon hasarında fetal sıçan beyinde ve plasentasında oluşan hasar üzerine doku koruyucu etkisi*, in Kadın Hastalıkları ve Doğum. 2025, Süleyman Demirel Üniversitesi: Isparta.
36. Dixon, B.J., et al., *Neuroprotective strategies after neonatal hypoxic ischemic encephalopathy*. International journal of molecular sciences, 2015. 16(9): p. 22368-22401.
37. Hoffman, D.J., et al., *Protective effect of MgSO₄ infusion on NMDA receptor binding characteristics during cerebral cortical hypoxia in the newborn piglet*. Brain research, 1994. 644(1): p. 144-149.
38. Brown, K.M. and J. Arthur, *Selenium, selenoproteins and human health: a review*. Public health nutrition, 2001. 4(2b): p. 593-599.
39. Mehdi, Y., et al., *Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions*. Molecules, 2013. 18(3): p. 3292-3311.
40. Minich, W.B., *Selenium metabolism and biosynthesis of selenoproteins in the human body*. Biochemistry (Moscow), 2022. 87(Suppl 1): p. S168-S177.

41. O'Dell, B.L. and R.A. Sunde, *Handbook of nutritionally essential mineral elements*. 1997: CRC Press.
42. Bou-Resli, M., et al., *Brain selenium accumulation in rat pups of selenium supplemented mothers*. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 2002. 31(4): p. 228-231.
43. Diplock, A.T., *Antioxidants and disease prevention*. *Molecular aspects of medicine*, 1994. 15(4): p. 293-376.
44. Hawkes, W.C. and L. Hornbostel, *Effects of dietary selenium on mood in healthy men living in a metabolic research unit*. *Biological Psychiatry*, 1996. 39(2): p. 121-128.
45. Weber, G., et al., *Glutathione peroxidase deficiency and childhood seizures*. *The Lancet*, 1991. 337(8755): p. 1443-1444.
46. Khera, A., J. Vanderlelie, and A. Perkins, *Selenium supplementation protects trophoblast cells from mitochondrial oxidative stress*. *Placenta*, 2013. 34(7): p. 594-598.
47. Shi, Y., et al., *Selenium alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury by regulating oxidative stress, mitochondrial fusion and ferroptosis*. *Neurochemical research*, 2022. 47(10): p. 2992-3002.
48. Venardos, K., et al., *Selenium supplementation and ischemia–reperfusion injury in rats*. *Redox report*, 2004. 9(6): p. 317-320.
49. Hanafy, D.A., et al., *Effect of Selenium on Lung Injury Induced by Limb Ischemic Reperfusion Injury in Sprague-Dawley Rats*. *Vascular Specialist International*, 2023. 39: p. 36.
50. Berger, R. and Y. Garnier, *Pathophysiology of perinatal brain damage*. *Brain Research Reviews*, 1999. 30(2): p. 107-134.
51. Wu, L., et al., *Regulated cell death in hypoxic-ischaemic encephalopathy: recent development and mechanistic overview*. *Cell Death Discovery*, 2024. 10(1): p. 277.
52. Vornic, I., et al., *Oxidative stress and placental pathogenesis: a contemporary overview of potential biomarkers and emerging therapeutics*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024. 25(22): p. 12195.
53. Wu, F., F.-J. Tian, and Y. Lin, *Oxidative stress in placenta: health and diseases*. *BioMed research international*, 2015. 2015(1): p. 293271.
54. Liu, D., et al., *Placental dysfunction: the core mechanism for poor neurodevelopmental outcomes in the offspring of preeclampsia pregnancies*. *Placenta*, 2022. 126: p. 224-232.
55. Reynolds, L., et al., *Role of the placenta in developmental programming: observations from models using large animals*. *Animal reproduction science*, 2023. 257: p. 107322.
56. Huang, G., et al. *Exploring the neuroprotective role of selenium: implications and perspectives for central nervous system disorders*. in *Exploration*. 2025. Wiley Online Library.
57. Joorabloo, A. and T. Liu. *Recent advances in reactive oxygen species scavenging nanomaterials for wound healing*. in *Exploration*. 2024. Wiley Online Library.
58. Bellinger, F.P., et al., *Glutathione peroxidase 4 is associated with neuromelanin in substantia nigra and dystrophic axons in putamen of Parkinson's brain*. *Molecular neurodegeneration*, 2011. 6(1): p. 8.
59. Wang, H., et al., *Cathodal bilateral transcranial direct-current stimulation regulates selenium to confer neuroprotection after rat cerebral ischaemia–reperfusion injury*. *The Journal of Physiology*, 2024. 602(6): p. 1175-1197.
60. Schweizer, U. and M. Fabiano, *Selenoproteins in brain development and function*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2022. 190: p. 105-115.
61. Liang, X., et al., *Selenium supplementation enhanced the expression of selenoproteins in hippocampus and played a neuroprotective role in LPS-induced neuroinflammation*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023. 234: p. 123740.

62. Zhuo, Z., et al., *Selenium supplementation provides potent neuroprotection following cerebral ischemia in mice*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2023. 43(7): p. 1060-1076.
63. Hung, T.-H., et al., *Secretion of tumor necrosis factor- α from human placental tissues induced by hypoxia-reoxygenation causes endothelial cell activation in vitro: a potential mediator of the inflammatory response in preeclampsia*. The American journal of pathology, 2004. 164(3): p. 1049-1061.
64. Ma, R., et al., *ADAM17 regulates TNF α production by placental trophoblasts*. Placenta, 2011. 32(12): p. 975-980.
65. Nguyen-Ngo, C., A.V. Perkins, and M. Lappas, *Selenium prevents inflammation in human placenta and adipose tissue in vitro: implications for metabolic diseases of pregnancy associated with inflammation*. Nutrients, 2022. 14(16): p. 3286.
66. Disdier, C. and B.S. Stonestreet, *Hypoxic-ischemic-related cerebrovascular changes and potential therapeutic strategies in the neonatal brain*. Journal of Neuroscience Research, 2020. 98(7): p. 1468-1484.
67. Bhalala, U.S., R.C. Koehler, and S. Kannan, *Neuroinflammation and neuroimmune dysregulation after acute hypoxic-ischemic injury of developing brain*. Frontiers in pediatrics, 2015. 2: p. 144.
68. Waseem, S., et al., *Mitochondrial dysfunction in placental ischemic diseases: Mechanisms and therapeutic implications: Mechanisms and Therapeutic Implications*. Placenta and Reproductive Medicine, 2026. 5(1): p. 1-15.
69. Chen, H., Y. Chen, and Q. Zheng, *The regulated cell death at the maternal-fetal interface: beneficial or detrimental?* Cell Death Discovery, 2024. 10(1): p. 100.
70. Hogan, C. and A.V. Perkins, *Selenoproteins in the human placenta: how essential is selenium to a healthy start to life?* Nutrients, 2022. 14(3): p. 628.
71. Jiang, X.-l., et al., *PHLDA1 contributes to hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats via inhibiting FUNDC1-mediated mitophagy*. Acta Pharmacologica Sinica, 2024. 45(9): p. 1809-1820.
72. Jiang, X., et al., *Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke*. Progress in neurobiology, 2018. 163: p. 144-171.
73. Turovsky, E.A., A.S. Baryshev, and E.Y. Plotnikov, *Selenium nanoparticles in protecting the brain from stroke: possible signaling and metabolic mechanisms*. Nanomaterials, 2024. 14(2): p. 160.
74. Savvina, I.A., et al., *Replacement Selenium Therapy in Acute Cerebral Damage*, in *Selenium and Human Health*. 2023, IntechOpen.

EKLER

Ek 1. Etik Kurul Kararı

	T.C. SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI KARAR	
Toplantı Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
12.06.2025	06	561
SDÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 12.06.2025 tarihinde saat-10:00'da toplanarak aşağıdaki kararlar alınmıştır;		
Karar:561 Proje Yürütücüsü: Prof.Dr. Mekin SEZİK (Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilimdalı Perinatoloji bilim Dalı) Yürütücülüğünde, Araştırmacılar: Arş.Gör.Dr. Kadriye Nilay Özcan ve Prof.Dr.Halil AŞCI'nın yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı <u>İntrauterin İskemi-Reperfüzyon Modelinde Selenyumun Fetal Sıçan Bevni ve Plasentasındaki Koruyucu Etkileri</u>" başlıklı SDÜ bilimsel araştırma projesi etik kurulumuzca oybirliği ile <u>UYGUNLUĞUNA</u> karar verilmiştir.		
Prof. Dr. Kanat GÜLLE Başkan	Prof. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR Başkan Yardımcısı	Prof. Dr. Duygu KUMBUL ÜYE
Doç. Dr. Müge ÇINA ÜYE	Prof. Dr. Ömer ÇELİK ÜYE	Dr.Öğr. Üyesi Mustafa Soner ÖZCAN ÜYE
Doç.Dr. Gülşah USTA SOFU ÜYE	Doç. Dr. Muhammet Yusuf TEPEBAŞI ÜYE	Dr. Öğr. Üyesi Mesut ERGAN ÜYE
Öğr. Gör. Dr. İbrahim ONARAN (HÜDAL Sorumlu Veteriner Hekimi) ÜYE	Vet. Hek. Dr. Ayşegül AVŞAR SIVİL ÜYE	Nursan BECEREN SIVİL ÜYE