



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİPOKSİK İSKEMİYE BAĞLI SEREBRAL PALSİDE
ASETİLKOLİN ESTERAZ İNHİBİTÖRÜ (-) FENSERİN'İN
MOTOR VE KOGNİTİF FONKSİYONLAR ÜZERİNDEKİ
İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİ**

MERVE BÜŞRA ÇATAKÇI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Meltem Kolgazi

İSTANBUL-2022



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİPOKSİK İSKEMİYE BAĞLI SEREBRAL PALSİDE
ASETİLKOLİN ESTERAZ İNHİBİTÖRÜ (-) FENSERİN'İN
MOTOR VE KOGNİTİF FONKSİYONLAR ÜZERİNDEKİ
İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİ**

MERVE BÜŞRA ÇATAKÇI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Meltem Kolgazi

İSTANBUL-2022

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu tezin planlamasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaktan da kaynaklar listesine aldığımı. Yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patenti ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

07/02/2022

Merve Büşra Çatakçı

İmza

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez sürecimde projemi oluşturmamda destek veren danışman hocam Doç. Dr. Meltem KOLGAZİ'ye teşekkürlerimi ve saygımı sunarım. Bölüme kabul aldığım andan yüksek lisansımın bitimine kadar ilgisi ve desteğini hissettiğim hocam Prof. Dr. Güldal SÜYEN'e minnetimi ve saygımı sunarım.

Deney günlerimde tüm özveriyle yanımda olan, doğaçlama çözümlerle hayatımı kolaylaştıran arkadaşım Ufuk KILIÇ'a teşekkür ederim. Teknik ekipte, deneyimi güvenceyle yürütmemi sağlayan ve bir telefon uzağında yardımına 7/24 koşan Emre ÖZKAN, İbrahim GÜNER ve Metin NİLÜFER'e; DEHAM'da yavrularıma gözü gibi bakan Canan BEYTUR ÖZKAN'a teşekkür ederim.

İhtiyacım olduğunda hep yanımda olan, destekleyerek özgüven aşıl原因an Dr. Vet. Hekim Samed ÖZER ve Sümeyye ÇİLİNGİR'e sevgilerim ile saygılarımı sunarım.

Deneyimde beni asiste eden minik stajyerlerim Damla SÖBE, Mehmet Can ÜNAL'a tüm sevgimle teşekkür ederim.

Tecrübeleriyle yolumu açan arkadaşım Dr. Öğr Üyesi Özgür YILMAZ'a; eğitim ve deney süreçlerimizi birlikte paylaştığım değerli arkadaşlarım Hande İpek YETKE, Dilan ACAR, Demet AÇIKGÖZ, Simge ŞENAY, Hande KASAP ve Sılasu ARIKAN'a teşekkür ederim.

Sevgi ve destekleriyle eğitimimde güvenle yol almamı sağlayan kıymetli annem Mihriban ÇATAKÇI ve kıymetli babam Niyazi ÇATAKÇI ile sevgili dostum Senay ARSLAN'a, yol arkadaşım Tarık ARIMAN'a tüm kalbimle sonsuz minnet ve sevgilerimi sunarım.

Bu tez, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 117E991 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| BEYAN..... | iii |
| ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR..... | iv |
| İÇİNDEKİLER | v |
| KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ | viii |
| ŞEKİLLER LİSTESİ..... | ix |
| RESİMLER LİSTESİ..... | x |
| ÖZET..... | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| 1 GİRİŞ VE AMAÇ | 3 |
| 2 GENEL BİLGİLER | 6 |
| 2.1 Serebral Palsi | 6 |
| 2.1.1 Etiyolojisi ve risk faktörleri | 6 |
| 2.1.2 Epidemiyolojisi..... | 7 |
| 2.1.3 Sınıflandırılması..... | 8 |
| 2.1.4 Hipoksik iskemi patofizyolojisi..... | 11 |
| 2.1.5 Tedavi yöntemleri | 13 |
| 2.2 Kolinerjik Sistem | 14 |
| 2.2.1 Tanımı ve reseptörleri | 14 |
| 2.2.2 Asetilkolin; sentezi ve metabolizması..... | 14 |
| 2.2.3 Beyinde kolinerjik nöronların yerleşimi..... | 15 |
| 2.2.4 Hipoksik iskemide kolinerjik sistem patofizyolojisi | 16 |
| 2.3 (-) Fenserin | 17 |
| 2.3.1 Tanımı ve özellikleri | 17 |
| 2.3.2 Farmakodinamik etkisi | 18 |
| 2.3.2.1 Kolinerjik mekanizma | 18 |
| 2.3.2.2 Non-kolinerjik mekanizma | 18 |
| 2.3.3 Nöronal hasar üzerindeki iyileştirici etkileri | 18 |
| 3 GEREÇ VE YÖNTEM | 20 |
| 3.1 Deney Grupları | 20 |
| 3.2 Serebral Palsi Modelinin Oluşturulması | 22 |
| 3.2.1 İskemi cerrahisi / rice-vannucci modeli..... | 22 |
| 3.2.2 Hipoksi maruziyeti..... | 23 |
| 3.3 Nörogelişimin Değerlendirilmesi..... | 24 |
| 3.3.1 Vücut ağırlığı..... | 25 |
| 3.3.2 Diş gelişimi..... | 25 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.3.3 | Tüy gelişimi | 26 |
| 3.3.4 | Gözün açılması | 26 |
| 3.3.5 | Yüzeyde doğrulma refleksi | 26 |
| 3.3.6 | Havada doğrulma refleksi..... | 26 |
| 3.3.7 | Negatif jeotaksis | 27 |
| 3.3.8 | Kavrama refleksi | 27 |
| 3.3.9 | Başın elevasyonu ve emekleme | 27 |
| 3.4 | Motor Becerinin Değerlendirilmesi | 28 |
| 3.4.1 | Ayak izi testi (Yürüme analizi)..... | 28 |
| 3.4.2 | Merdiven testi..... | 32 |
| 3.5 | Kognitif Becerinin Değerlendirilmesi | 33 |
| 3.5.1 | Yeni nesne tanıma testi..... | 33 |
| 3.6 | Histolojik İnceleme | 35 |
| 3.6.1 | Beyin doku örneklerinin toplanması ve hazırlanması..... | 35 |
| 3.6.2 | Beyin dokusundan kesit alınması ve boyama için hazırlanması | 37 |
| 3.6.3 | Hematoksilen ve eozin boyama ile hasarlı nöronların belirlenmesi | 38 |
| 3.6.4 | Cresyl violet ile nöronal kayıp üzerinden beyin hasarının belirlenmesi . | 39 |
| 3.7 | Biyokimyasal Ölçümler | 41 |
| 3.7.1 | Beyin doku örneklerinin toplanması ve ELISA kit analizi için hazırlanması | 41 |
| 3.7.2 | Beyin dokusunda TNF- α ve IL-1 β seviyelerinin ölçülmesi | 41 |
| 3.7.3 | Beyin dokusunda ELISA Kit ile BDNF ve S100 β protein seviyelerinin ölçülmesi..... | 43 |
| 3.7.4 | Kolon dokusunda MPO düzeyi ölçümü | 44 |
| 3.7.5 | Kolon dokusunda MDA düzeyi ölçümü..... | 44 |
| 3.7.6 | Kolon dokusunda GSH düzeyi ölçümü..... | 45 |
| 3.8 | İstatistiksel Analiz..... | 46 |
| 4 | BULGULAR | 47 |
| 4.1 | Yavrularda Fiziksel Gelişim Göstergelerinin Değerlendirilmesi..... | 47 |
| 4.1.1 | Tüy gelişimi ve göz açılması..... | 47 |
| 4.1.2 | Diş gelişimi..... | 48 |
| 4.1.3 | Vücut ağırlığı..... | 48 |
| 4.2 | Refleks Gelişiminin Değerlendirilmesi | 49 |
| 4.2.1 | Yüzeyde doğrulma ve negatif jeotaksi | 49 |
| 4.2.2 | Kavrama refleksi ve havada doğrulma refleksi..... | 50 |
| 4.3 | Lokomotor Davranışlar: Emekleme ve Baş Elevasyonu..... | 51 |
| 4.4 | Motor Becerinin Değerlendirilmesi | 52 |
| 4.4.1 | Ayak izi testi: adım uzunluğu, adım genişliği, pati genişliği..... | 52 |
| 4.4.2 | Yürümenin skorlanması..... | 56 |
| 4.4.3 | Merdiven testi..... | 57 |
| 4.5 | Kognitif Becerilerin Değerlendirilmesi: Yeni Nesne Tanıma Testi | 57 |
| 4.6 | Histolojik İnceleme | 59 |
| 4.6.1 | Beyin dokusunun makroskopik olarak değerlendirilmesi..... | 59 |
| 4.6.2 | Beyin dokusunda cresyl violet boyama ile nöronal kayıp üzerinden beyin hasarının yorumlanması ve beyin dokusunda hematoksilen ve eozin boyama ile hasarlı nöronların belirlenmesi..... | 60 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.7 | Biyokimyasal Analizler ile Beyin Dokusunda Pro-inflamatuvar Sitokinler TNF-α ve IL-1β Seviyelerinin Ölçülmesi | 66 |
| 4.8 | Biyokimyasal Analizler ile Beyin Dokusunda BDNF ve S100β Protein Seviyelerinin Ölçülmesi | 67 |
| 4.9 | Kolon Dokusunda Myeloperoksidaz (MPO), Malondialdehit (MDA) ve Glutasyon (GSH) Ölçümleri | 68 |
| 5 | TARTIŞMA..... | 71 |
| 6 | SONUÇ..... | 81 |
| 7 | KAYNAKLAR..... | 82 |
| 8 | EKLER..... | 94 |
| | EK 1: Etik Kurulu Onayı..... | 94 |
| 9 | ÖZGEÇMİŞ..... | 96 |

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

| | |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| ACh | Asetilkolin |
| AChEİ | Asetilkolin Esteraz İnhibitörü |
| APP | Amiloid- β öncü protein |
| BDNF | Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör |
| GSH | Glutasyon |
| Hİ | Hipoksik İskemi |
| IL-1β | İnterlökin 1 Beta |
| MDA | Malondialdehid |
| MPO | Miyeloperoksidaz |
| MSS | Merkezi Sinir Sistemi |
| P7 | Postnatal 7. gün |
| S100 βS | 100 Kalsiyum Bağlayıcı Protein Beta |
| SP | Serebral Palsi |
| TNF-α | Tümör Nekroz Faktör Alfa |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Şekil 1. Kontrol, Hİ ve tedavi gruplarında nörogelişim belirteci olarak, (A) tüy gelişimi ve (B) göz açılması..... | 48 |
| Şekil 2. Kontrol, Hİ ve tedavi gruplarında günlere göre vücut ağırlıkları değişimi. . | 49 |
| Şekil 3. Kontrol, Hİ ve tedavi gruplarında günlere göre (A) kavrama refleksi ve (B) havada doğrulma refleksi analizleri..... | 50 |
| Şekil 4. (A) günlere göre emekleme becerisi ve (B) baş elevasyon becerisi. | 51 |
| Şekil 5. Sağ ön (A), sol ön (B), sağ arka (C), sol arka (D) patilerin adım uzunluğu. | 53 |
| Şekil 6. Sağ ön (A), sol ön (B), sağ arka (C), sol arka (D) patilerin adım genişliği. . | 54 |
| Şekil 7. Sağ ön (A), sol ön (B), sağ arka (C), sol arka (D) patilerin adım genişliği. . | 55 |
| Şekil 8. Yürüme skor düzeyleri..... | 56 |
| Şekil 9. Merdiven testi skor düzeyleri..... | 57 |
| Şekil 10. (A) Ayrımcılık indeksi ve (B) Yeni nesne tercih yüzdesi..... | 58 |
| Şekil 13. TNF- α seviyeleri..... | 66 |
| Şekil 14. IL-1 β seviyesi. | 67 |
| Şekil 15. BDNF protein seviyesi..... | 68 |
| Şekil 16. S100 β protein seviyesi. | 68 |
| Şekil 17. Kolonda MPO seviyesi. | 69 |
| Şekil 18. Kolonda MDA ölçümü. | 70 |
| Şekil 19. Kolonda GSH ölçümü..... | 70 |

RESİMLER LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Resim 1. SP'nin sınıflandırılması. | 8 |
| Resim 2. Beyinde kolinerjik nöronların yerleşim yerleri. | 16 |
| Resim 3. Fenserin'in kimyasal yapı modeli. | 17 |
| Resim 4. İlaç dozlarının ip enjeksiyonu. | 21 |
| Resim 5. Yedi günlük sıçan yavrularında karotid arter izolasyonu ve oklüzyonu. | 22 |
| Resim 6. Hipoksi düzeneği ve maruziyeti. | 23 |
| Resim 7. Gelişimsel takip şeması. | 24 |
| Resim 8. İlişkilendirilecek değerlendirme parametreleri. | 25 |
| Resim 9. Negatif jeotaksisin ölçümü. | 27 |
| Resim 10. Ayak izi testi düzeneği. | 28 |
| Resim 11. Pati izi. | 29 |
| Resim 12. Yürüme analizinde hesaplama. | 31 |
| Resim 13. Merdiven testinde değerlendirme. | 32 |
| Resim 14. Kardiyak perfüzyon öncesi ve sonrasında fikse edilirken rengi açılan dokular. | 36 |
| Resim 15. Hematoksilen & Eozin (H&E) boyama protokolü. | 38 |
| Resim 16. Cresyl violet boyama adımları. | 39 |
| Resim 17. Cresyl violet boyama protokolü. | 40 |
| Resim 18. Sandviç elisa test prosedürü. | 42 |
| Resim 19. OCT tampona gömülen beyin dokuları. | 59 |
| Resim 20. Lizinli lamdaki beyin kesitleri. | 60 |
| Resim 21. Krezil viyole ile boyanmış anterior korteks dokuları. | 62 |
| Resim 22. Krezil viyole ile boyanmış anterior striatum dokuları. | 62 |

| | |
|--|----|
| Resim 23. Krezil viyole ile boyanmış Hipokampus bölgeleri: CA1, CA2, CA3, Dentat girus..... | 63 |
| Resim 24. Krezil viyole ile boyanmış posterior striatum dokuları | 64 |
| Resim 25. Krezil viyole ile boyanmış posterior korteks dokuları..... | 64 |
| Resim 26. Hematoksilen ve eozin ile boyanmış anterior korteks, anterior striatum, ve posterior striatum dokuları | 65 |



ÖZET

Hipoksik İskemiye Bağlı Serebral Palside Asetilkolin Esteraz İnhibitörü (-) Fenserin'in Motor ve Kognitif Fonksiyonlar Üzerindeki İyileştirici Etkisi

Serebral palsy, fetal/infant beyinde oluşan gelişimsel hareket ve postür bozukluklarıyla karakterize nörolojik bir hastalıktır. Araştırmada yeni doğanda hipoksik iskemiye (Hİ) bağlı Serebral palsy modelinde, (-) Asetilkolin esteraz inhibitörü olan Fenserin'in motor ve bilişsel işlevler üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Postnatal 7.günde (P7) sol karotid arterin ligasyonu ve oklüzyonundan iki saat sonra 150 dakika boyunca %8 oksijenle %92 nitrojen verilerek hipoksi oluşturulmuştur. Hİ indüksiyonundan sonra 23 gün, günde 1 mg/kg, 2,5 mg/kg ve 5 mg/kg dozlarda (-) Fenserin intraperitoneal yolla uygulanmıştır. Nörogelişim, motor gelişim ve kognitif değerlendirme yapılmıştır. P30'da sakrifikasyon sonrası toplanan beyin dokusunda tümör nekroz faktör (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve kalsiyum bağlayıcı protein B (S100 β) seviyeleri ölçülmüştür. Nöronal kayıp ve sağ kalım histolojik olarak incelenmiştir. Bağırsak dokusunda miyeloperoksidaz (MPO), malondialdehid (MDA) ve glutatyon (GSH) düzeyi ölçülmüştür. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. (-) Fenserin'in, Hİ'den köken alan Serebral palsy'deki nöronal hasar ve kaybı azalttığı, hasar kaynaklı nörogelişim ve ilişkili defisitleri iyileştirdiği gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Asetil kolinesteraz inhibitörü, Hipoksik iskemi, Serebral palsy, Yeni doğan, BDNF, S100B.

ABSTRACT

The Ameliorating Effect of (-) Phenserine on Motor and Cognitive Functions in Hypoxic Ischemia induced Cerebral Palsy

Cerebral palsy (CP) is a neurological disease that occurs in the developing fetal/ infant brain and is characterized by developmental movement and posture disorders. The aim of this study was to investigate the effect of Fenserin, which is an (-) Acetylcholine esterase inhibitor, on motor and cognitive functions in a cerebral palsy model due to hypoxic ischemia (HI) induction in newborns. Ischemia with ligation and occlusion of the left common carotid artery at postnatal day 7 (P7); two hours later, hypoxia was induced in a controlled environment given 92% nitrogen with 8% oxygen for 150 minutes. (-) Fenserine was administered intraperitoneally daily at doses of 1 mg/kg, 2.5 mg/kg and 5 mg/kg for 23 days, starting at P7 after HI induction for 23 days. In HI, the curative effect of (-) Fenserine was determined by neurodevelopmental assessments, motor tests, and cognitive evaluation. Tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and calcium-binding protein B (S100 β) levels were measured in brain tissue collected after sacrifice at P30. Neuronal loss and survival were examined histologically. Myeloperoxidase (MPO), malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels were measured in intestinal tissue. $p < 0.05$ was considered statistically significant. (-) Fenserine has been shown to reduce neuronal damage and loss in Cerebral palsy originating from HI, and improve damage-induced neurodevelopment and related deficits.

Keywords: Acetyl cholinesterase inhibitor, Hypoxia ischemia, Serebral palsy, newborn, BDNF, S100B.

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Serebral palsi (SP), gelişmekte olan fetal veya infant beyinde meydana gelen, gelişimsel hareket ve postür bozukluğuna bağlı sınırlılıkla karakterize en yaygın pediatrik nörolojik bozukluktur (1). Beyinde oluşan hasar prenatal, perinatal ve postnatal dönemde meydana gelebilmekte ve prevalansı her canlı doğumda 2,5/1000, prematür doğumda ise 22/1000 olan bu hastalık, multi-faktöriyel nedenlerle oluşabilmektedir (2). Sınıflandırılması etkilenim topografisine ve motor hasara bağlı fonksiyonel bozukluğa göre yapılmaktadır (3). Literatürdeki en yaygın motor etkilenim türü, spastik tip olarak tanımlanmaktadır ve vakaların %80'ini oluşturmaktadır. Spastik tipteki majör etiyolojik faktör, son trimester ve doğum yaşı civarında görülen hipoksik iskemidir (Hİ). Hasar çoğunlukla serebral korteks ve subkortikal beyaz madde ve derin gri maddeyle ilişkilidir (2). SP'ye bağlı motor problemlere sıklıkla duyu, algı, davranış bozuklukları ve kognitif problemler eşlik etmektedir (4). Mevcut tedavi seçeneklerinde, hastalığın kesin bir tedavisi bulunmamaktadır. Tedavi seçenekleri çocukların günlük yaşam aktivitelerini sürdürebilmeleri ile ilgili ihtiyaçlarına odaklanmakta; klinik süreç yönetimi, fonksiyon geri kazanımı ve aktivite katılımını artırarak, kötüleşme faktörlerini azaltmaya yöneliktir (5). SP'de semptomatik tedavilerin sınırlılığı ve yan etkilerinin bulunmasından dolayı yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Merkezi sinir sisteminde (MSS), nöronlar ve nöronal olmayan hücreler olan periferik makrofajlar, mikroglialar ve astrositler asetilkoline doğrudan cevap verirler. Nöronal olmayan bu hücreler kısa ve uzun dönem sinaptik fonksiyon ve plastisiteyi etkilerler (6). Hİ'de hipokampüste hasarlanan bölgeler incelendiğinde, hasarın kolinerjik nöronların yerleşim alanlarında yoğun olduğu görülmüştür (7). Hipokampüsün dentat girusunun memeli beyinde plastisite kapasitesi en yüksek bölgelerden biri olduğu ve kolinerjik nöronların yerleşim yeri olan bu bölgede uygulanabilecek bir tedavinin, gelişim süreci devam eden olgunlaşmamış bir beyinde iyileştirici etkisinin olabileceği düşünülmektedir (8).

Neonatal Hİ patofizyolojisinde, prefrontal korteks ve hipokampus arasında disfonksiyonel olgunlaşma süreci gerçekleşmektedir. Nöral ağ oluşumu sırasında oluşan bu abnormal bağlantılar, kognitif fonksiyonları etkilemektedir (9). Hipokampüsteki asetilkolin seviyesinin hafıza gibi kognitif fonksiyonlarla ilişkilendirildiği yayınlardan yapılan çıkarımla (10) Hİ'de görülen kognitif problemlerin, asetilkolin seviyelerini değiştirecek bir tedavi ile iyileştirilme potansiyeli bulunmaktadır. Asetilkolin, aynı zamanda periferik makrofajları ve santral mikrogliaların aşırı aktivasyonunu baskılayarak periferik ve santral anti-inflamatuvar yollarda rol oynamaktadır (6). Hİ'ye cevaben gelişen inflamasyonun özellikle term bebeklerde beyin hasarına neden olması (2) immün yanıtın inhibisyonu ile nöroprotektif özellik taşıyan kolinesteraz inhibitörlerinin (11,12) beyin hasarında iyileştirici bir potansiyel olduğunu göstermektedir.

Bu bilgilerden yola çıkılarak, araştırmamızda AChEİ'lerin (asetilkolinesteraz inhibitörleri) arasından üstün yönleri doğrultusunda asetil-seçici, geri dönüşümlü bir kolinesteraz inhibitörü olan (-) Fenserin'in tedavi edici etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. İlacın kan beyin bariyerini aşabilmesi, hızlı emilebilmesi, beyinde hızla yoğunlaşarak yan etkilerin görülme sıklığını azaltması ve toksisite etkisinin bulunmaması yönleriyle diğer AChEİ'lerinden ayrıcalıklı olmaktadır. Alzheimer hastalarında hafızayı ve bilişi geliştirdiği bilinen bir etki mekanizması olup, piyasada mevcut olarak kullanılan bir ilaç olduğu için insanlar üzerinde denenmiş olması (13), onun çocuklar üzerindeki potansiyelini ve uygulanabilme güvenilirliğini arttırmaktadır.

(-) Fenserin literatürde SP ve Hİ üzerine hiç çalışılmamış olup, uyguladığımız deneysel model olan Rice Vannucci modelinde de araştırılmamıştır. Rice Vannucci modeli, perinatal beyin hasarı oluşturmada kullanılan en yaygın hayvan modelidir (14). Araştırmada modelin uygulanma günü, postatal 7. gün (P7) olarak belirlenmiştir; gelişimin bu aşamasında sıçan yavrusunun beyninin mikroadatomik olarak 32 ila 34 haftalık bir gebelikteki insan fetüsüne karşılık gelmektedir. Bu dönemde, serebral kortikal nöronal katmanlama tamamlanmış, germinal matris involüsyon yapmış ve beyaz madde sınırlı miyelinizasyon göstermiştir. Modelde,

serebral korteks, hipokampus, striatum ve talamusta doku hasarı oluşmaktadır. İki aşamalı uygulanan Rica Vannucci modelinde hem iskemi hem hipoksi adınının olması ligasyon olan ipsilateral hemisferde multifokal infarktlara neden olmakta ama aynı zamanda kontralateral hemisferde hasar oluşturmayıp, klinikte en yaygın SP türü olan hemiplejik etkilenimli, spastik serebral palsinin deneysel olarak oluşturulmasına imkân vermektedir (14).

Literatürde (-) fenserin ile yapılan çalışmalar tarandığında tramvatik beyin hasarı, inme araştırmaları bulunmakta fakat yeni doğan çalışması olmayıp; araştırmalar yetişkin, insan ve hayvan çalışmalarından oluşmaktadır. Derleme bir araştırmada ilacın yetişkin travmatik beyin hasarı hastalarında anti-inflamatuvar aktiviteye sahip olduğu; oksidatif strese karşı koruma sağladığı bildirilmiştir. Aynı derlemede başka bir çalışmada amiloid- β öncü protein (APP) sentezini inhibe ettiği ve nörogenezi güçlendirdiği; sıçanlarla yapılan bir iskemi araştırmasında ise anoksiye karşı koruduğu ve hücre sağkalımını arttırdığı gösterilmiştir. Devamındaki çalışmada da travmatik beyin hasarlı fareler üzerindeki kognisyon çalışmaları da görsel hafıza ve uzaysal hafızayı iyileştirdiği gösterilmiştir (15).

Literatürde, eleyici özellikler barındıran (yan etkileri, toksisite etkileri ve düşük tolere edilme kapasiteleriyle) diğer kolinesteraz inhibitörlerinin (16), beyin hasarı üzerindeki etkileri sınırlı sayıda araştırılmış fakat kapsamlı bir gelişimsel değerlendirme ve klinikteki paralel karşılığı olan refleks, lokomotor gelişim takibi yapılmamıştır. Huperzin A ve türevi AChEİ ile yapılan birkaç çalışmada referans alınan Alzheimer çalışmalarıdaki nöroprotektif etki ve kognitif iyileşme amacı güdülmüş, araştırmalar sadece kognitif değerlendirme ile sınırlı tutulmuştur (12,17). Yayınlarda, beyindeki hasar ile kolinerjik sistem ilişkisi kısıtlı olarak ifade edilmiştir.

Araştırmamızda kolinerjik sitemin SP ve Hİ patofizyolojisiyle olan ilişkisi, (-) Fenserin'in nöroprotektif etkinliğinin gösterilerek iyileşirme potansiyeli gösterilmiştir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Serebral Palsi

"Serebral felç" terimi ilk kez 1861'de İngiliz ortopedi cerrahı William Little tarafından tanımlanarak; zor doğum ve neonatal hipoksiyle bağlantılı ekstremite spastisitesi ve bunun sonucunda ortaya çıkan kas-iskelet sistemi deformiteleri ile ilişkilendirilmiştir (18,19). Serebral palsi (SP), tanımlanmış bir hastalık sınıflandırması değil, etiyojisi çeşitli semptomları kapsayan bir şemsiye terim olarak kullanılmaktadır (20). 2006 yılında Serebral Palsi'nin Tanımlanması ve Sınıflandırılması isimli uluslararası panelde yapılan konsensüs tanımıyla SP; gelişmekte olan fetal veya infant beyinde meydana gelen, gelişimsel hareket ve postür bozukluğuna bağlı sınırlılıkla karakterize en yaygın pediatrik nörolojik bozukluk olarak tanımlanmıştır (21, 22).

2.1.1 Etiyojisi ve risk faktörleri

Prenatal, perinatal ve postnatal dönemde bebeğin beyinde meydana gelebilecek gelişimsel anormaliler ve/veya hasar SP'ye neden olabilmektedir. İlerleyici olmayan bu hastalık etiyojistik olarak her hasta için farklı faktörlerden köken alabilmektedir.

A) Prenatal dönemdeki etiyojistik faktörler

- Konjenital beyin malformasyonları
- Rahim içi enfeksiyonlar / karyoamniyonit
- Abnormal prenatal patoloji
- İntrauterin inme
- Kromozom anormalileri
- Preterm doğum
- Çoklu gebelik

- İntrauterin büyüme kısıtlılığı
- Hormon veya büyüme faktör eksikliği
- Hipoksi
- Maternal stres/madde kullanımı
- Preeklampsi

B) Perinatal dönemdeki etiyolojik faktörler

- Hipoksik-iskemik hasar
- Mekonyum aspirasyonu
- MSS enfeksiyonları
- İnme
- Kernikterus
- Glutamat eksitotoksitesi
- Genetik faktörler

C) Postnatal dönemdeki etiyolojik faktörler

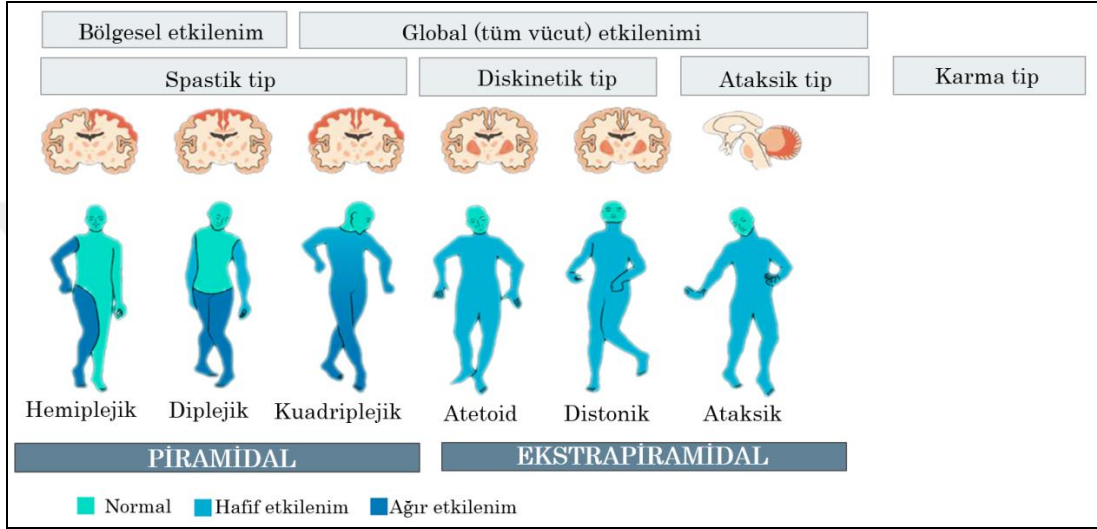
- Travma
- MSS enfeksiyonları
- İnme
- Anoksik hasar
- Sosyo-ekonomik çevre
- Genetik faktörler (23,24,25,26)

2.1.2 Epidemiyolojisi

SP'nin görülme sıklığı her 1000 canlı doğumda 2,5 iken, her 1000 prematür doğumda ise 22 olduğu bildirilmiştir (27,28,29). Literatürde hastalığın Türkiye'de görülme sıklığına dair mevcut tek çalışmada 2-16 yaş arası çocuklarda Türkiye için SP prevalansı her 1000 canlı doğumda 4.4 olarak ifade edilmektedir (30).

2.1.3 Sınıflandırılması

SP'nin geleneksel sınıflandırılması Minear tarafından tanımlanmış başlıklar altında yapılmaktadır: Bu sınıflandırmaların tamamı birleştirilerek hastalığın vakaya özel tanımlanması yapılmakta ve tedavi için yol haritası oluşturulmaktadır (31).



Resim 1. SP'nin sınıflandırılması (32).

A) Fizyolojik Sınıflandırma: Motor veya hareket bozukluğunun tipine (hareket kalitesi ve tonus değişikliklerine) dayalıdır. İki tiptir: Spastik (piramidal) ve spastik olmayan (ekstrapiramidal) olarak ayrılmaktadır. Spastik tipte motor bulgular tutarlı ve kalıcı iken, spastik olmayan tiplerde ise değişkenlik göstermektedir (31).

1. Spastik (Piramidal) Tip: Spastisite tonik spinal gerilme refleksinde hıza bağlı artıştan kaynaklanan hipertoniyi ifade eder. Tonus değişken olmakla birlikte artışıdır. Spastik SP, vakaların %87'sini oluşturarak en yaygın tiptir. Derin tendon reflekslerinde artış, pozitif Babinski yanıtı (ekstansör plantar yanıt), sürekli ayak bileği klonusu, kalıcı hipertoni kaynaklı kontraktürler ve azalmış hareket gözlemlenir (33).

Spastisite, şiddetli perinatal asfiksi ve menenjit gibi postnatal MSS enfeksiyonlarından kaynaklanan hipoksik iskemik ensefalopati nedeniyle kortikal nöronlarda (piramidal hücreler) hasar olduğunun göstergesi olabilmektedir (31).

2. *Spastik Olmayan (Ekstrapiramidal) Tip:* Tonus, hipertoni ve hipotoni arasında değişkenlik göstermektedir. Aktivite, ajitasyon, gerginlik ve ağlamada tonus artarken; uykuda ve gevşeme durumlarında azalır. Artan tonusta rijidite görülür ve pasif fleksiyon veya ekstansiyon ile ortaya çıkar. Ekstrapiramidal hipertonus tekrarlayan hareketlerle (sallanmayla) azaltılabilir. Derin tendon refleksi normal veya hafif artmıştır. Negatif Babinski görülür ve ayak bileği klonusu sürdürülmez. Değişken tonus kontraktür oluşumunu çoğu zaman engeller. Hareket düzensizdir, anormal, istemsiz hareketler ve tonus artışları (diskinezi) görülür.

Diskinetik SP, bilirubin ensefalopatisi ve termde şiddetli perinatal asfiksi ile bazal çekirdeklerde hasara işaret eder. Görülen Diskinetik SP kendi içinde Koreatetoid SP (vücudun proksimal kısımları olan gövdede aşırı ve hızlı hareketlerle (kore) birlikte vücudun distal ekstremitelerinde (atetoz) yavaş kıvrınma hareketleriyle ve genellikle azalmış tonusla karakterize edilir. Ekstrapiramidal SP'nin en yaygın türüdür. Distonik SP, ekstrapiramidal hipertoni ve azalmış hareket (hipokinezi) ile karakterizedir (hem agonist hem de antagonist kasların aynı anda kasılması ile ortaya çıkar). Ataksik SP, serebellumdaki hasarın neden olduğu koordinasyon bozukluğu ve hipotoni belirtileri ile ortaya çıkar ve SP'nin nadir bir formudur.

B) Topografik Sınıflandırma: Spastik SP'deki nöromotor hasarın etkilediği ekstremiteye göre yapılır. Monopleji, dippleji, hemipleji, tripleji, kuadripleji olarak kendi içinde sınıflandırılmaktadır. Topografik sınıflandırma etiyolojik faktörlerle ilişkilendirilmede de yol göstericidir.

Dipleji, prematür doğum veya düşük doğum ağırlığından kaynaklanan periventriküler lökomalaziye; hemipleji, perinatal inme, periventriküler hemorajik enfarktüs veya neonatal kortikal enfarktüs; kuadripleji, termde şiddetli perinatal

asfiksi, doğum sonrası enfeksiyon (bakteriyal menenjit) ve metabolik/genetik bozuklukları gösterebilmektedir (34).

C) Tamamlayıcı Sınıflandırma: SP'deki ikincil bozuklukları ve bunların diğer sınıflandırmalarla ilişkisini içeren ek bir gruplandırma. SP'ye eşlik eden fiziksel, zihinsel veya fizyolojik bozukluklar arasında epilepsi, bilişsel, konuşma, görme ve işitme bozuklukları, davranış bozuklukları ve ikincil kas-iskelet sistemi anormallikleri (kalça çıkığı/subluksasyonu, kontraktürler) yer alır.

D) Etiyolojik Sınıflandırma: Hasarın oluşum zamanına göre prenatal (en yaygın), perinatal ve postnatal olarak sınıflandırılabilir. SP'nin bebeklerde prenatal, perinatal ve postnatal döneme göre insidansına bakıldığında, term bebeklerde (≥ 37 hafta) %50 oranında, 32-36 hafta arası doğan bebeklerde %20 ve 32 haftadan önce doğan bebeklerde ise %25 oranında görüldüğü belirtilmiştir (35).

E) Nöroanatomik (Radyolojik) Sınıflandırma: Spesifik olarak, beyindeki yapısal değişikliklerin SP tipleri ile ilişkilendirildiği ve serebral disgenezi veya malformasyonları tespit etmek için kullanılan sınıflandırma. Nöropatolojik sınıflandırma, manyetik rezonans görüntüleme ve bilgisayarlı tomografi taraması gibi nöro-görüntüleme çalışmalarına dayanır. SP'nin etiyojisi, patolojisi ve hasarın oluşum zamanının anlaşılmasına önemli ölçüde katkıda bulunur.

Anormal radyolojik bulgu ve tanıları beş kategoride sınıflandırılır: Malformasyonlar, gri madde hasarı, beyaz madde hasarı, ventrikülomegali, atrofi veya BOS boşluğu anormallileridir. Difüzyon tensör görüntüleme, manyetik rezonans spektroskopisi, fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme ve hızlı spin eko görüntüleme kapsamlı bir radyolojik sınıflandırma imkanı yaratmaktadır. Nöronal migrasyon bozukluklarının varlığının, hasarın gebeliğin ilk yarısında meydana geldiğini gösterdiği; glial bir yanıtın varlığının ise gebeliğin ikinci yarısında oluşan hasara işaret ettiği varsayılmaktadır. Bununla birlikte, gebeliğin son 2-3 ayında hücre migrasyon bozukluklarının ortaya çıkabileceğine dair kanıtlar da vardır.

Malformasyonların ise erken gebelik dönemlerinde ortaya çıkma olasılığı daha yüksektir (36).

F) Terapötik Sınıflandırma: Bir çocuğun ne kadar tedaviye veya kapsamlı müdahaleye ihtiyaç duyduğunu basitçe tanımlar.

G) Fonksiyonel Sınıflandırma: Fonksiyonel motor beceriler ile mevcut kısıtlılıkların günlük yaşam aktivitelerini ne ölçüde engellediğine dair çeşitli sınıflandırma sistemlerinin bütünüdür. Klinisyenlerin, bakım verenlerin gerçekçi rehabilitasyon hedefleri belirlemesini sağlar. SP'degüncel fonksiyonel sınıflandırmalar, beceri sınıflandırma anketleridir. Bunlardan en sık tercih edilenler; Kaba Motor Fonksiyon Sınıflandırma Sistemi (GMFCS), Manuel Yetenek Sınıflandırma Sistemi (MACS), İletişim Fonksiyonu Sınıflandırma Sistemi (CFCS), Yeme İçme Yetenek Sınıflandırma Sistemi (EDACS) anketidir (31).

2.1.4 Hipoksik iskemi patofizyolojisi

Hİ ensefalopati, yenidoğan döneminde anoksik beyin hasarı sonucunda gerçekleşen fizyolojik, hücresel ve moleküler değişiklikler olarak tanımlanmaktadır. Bu değişimler sonucunda nöronal apoptoz ve nekroz ile beyin hasarı gerçekleşmektedir (37).

Hİ'nin patofizyolojik süreci üç aşamaya ayrılmaktadır: Birincil enerji yetmezliği fazı: hipoksik iskemik hasardan 0-6 saat sonra gerçekleşir. Normal şartlar altında serebral kan akışının sürdürülmesi sistemik kan basıncına bağlıdır; Hİ'de serebral kan akışı azalır, doku ve organlarda hipoksik-iskemi ve asidoz; miyokardiyal kontraktilitede azalma, arteriyel kan basıncında düşme meydana gelir (38). Beyin dokusunda hipoksik iskemi sonucunda, sinir hücrelerinde glikozun anaerobik fermantasyonu artar, böylece hücrelerdeki adenozin trifosfat (ATP) azalır. Bu durum yüksek enerji depolanmasında tükenmeye yol açar; iyon pompasında işlev bozukluğu oluşturur ve Na^+ , Ca^{+2} taşınmasına engel olur. Aynı zamanda laktik asit, serbest

radikaller ve uyarıcı amino asitlerin birikimi oluşarak mitokondriyal disfonksiyona, sinir hücresi ödemine ve nihai apoptoza yol açar (39, 40).

İkincil enerji yetmezliği fazı: Hİ'den 6-72 saat sonra gerçekleşmektedir. Uyarıcı nörotransmitterler ve serbest radikaller salınmaya devam eder, mitokondriyal disfonksiyon daha ciddi hale gelir ve büyük fosfor rezervleri tükenir (41). Faz ilerledikçe sitokrom C mitokondriden çıkarak, kaskad reaksiyonu aktive olmakta ve sinir hücresinin apoptozu başlamaktadır. İnflamatuvar yanıtlar devam ettikçe beyindeki hasar artmaktadır (42).

Yaralanma onarımı veya kronik inflamasyon fazı olan üçüncü faz ise; Hİ ensefalopatinin başlangıcından 72 saat sonra meydana gelir ve günler hatta aylar boyunca sürebilmektedir. Hasarın derecesine, hipoksi-iskemi maruziyet süresine ve terapötik müdahalelerin etkilerine göre prognozda iki durum gerçekleşir. Birinci durumda hasarlı beyin dokusu onarım sürecine girer, iyileşme gerçekleşir; bu süreç hayatta kalan nöronları ve glial hücreleri içerir. Hücreler farklılaşmaya, çoğalmaya ve yenilenmeye başlar. İkincil sonuçta ise hasarlı doku bozulmaya devam eder. Burada inflamasyon artmaya ve kalıcı olmaya devam ettikçe hasarlı beyin dokuları nörotrofik faktörlerin desteğini kaybetmektedir. Hayatta kalan mikroglia ve astrositler, nöronal ölüm ve aksonal hasara sebep olan zararlı sitokinler salmaya devam eder ve bu dabeğin dokularında hasar artışına yol açar (43).

Yeni doğanda Hİ, seçici alt plak nöronların ölümü ile normal kortikal gelişime neden olur. Alt plaktaki nöronal hasar sonrasında plastisite bozukluklarına yol açar. Talamik gelişim de olumsuz etkilenir. Talamik nöronal hasar sonrası beyaz maddede akson hasarı ve gliozis oluşur. Üst kortikal tabakaların yapısı için çok önemli olan dorsal telensefalik subventriküler bölge ve geç GABAerjik göç eden nöronlar, birincil olarak yaralanma eğilimindedir. Son çalışmalardan elde edilen bulgulara göre, büyüme bozuklukları nöronal ölümle değil, daha çok dendritik dallanmanın olgunlaşmasında farklılaşma, diken yoğunluğunda dendritik ağın azalması ve kortikal nöronlardaki sinaps oluşumunun bozulmasıyla ilişkilendirilmiştir (2).

2.1.5 Tedavi yöntemleri

Fazlara göre izlenebilecek tedavilerde; birinci faz sırasındaki tedavi olarak kullanılan yaklaşımlar hipotermi uygulaması, serbest radikal yakalayıcılar (örneğin; melatonin, eritropoietin, hidrojen zengin salin, koenzim Q10), uyarıcı amino asit reseptör bloke edici ajanlar ile nöroprotektif diğer ajanlardır (44). İkinci fazda uygulanan tedavi stratejileri, birinci faz sırasında uygulanan tedavileri takip etmekte ve hastalara anti-inflamatuvar ajanlar, nöroprotektif olan ve sinir rejenerasyonunda kullanılan ajanlar uygulanmaktadır (45). Üçüncü fazda isekötüleşme devam ederse, tedavi anti-inflamatuvar ajanları, nöroprotektif ajanları veya sinir rejenerasyon ajanlarını (örneğin sinir büyüme faktörü) ve kök hücre transplantasyonunu içermektedir. Hastanın durumu stabil hale geldiğinde mümkün olan en erken dönemde multidisipliner takip ile rehabilitasyon yaklaşımları uygulanmaktadır (46). Bu süreçte hastaların takibi ve tedavisi nörologlar, fizyoterapistler, ortopedistler, psikiyatristler ve diğer uzman ekiplerin yer aldığı multidisipliner yaklaşımı gerektirir. Tedavi yaklaşımlarında gerçekçi hedefler üzerinden, yaşam kalitesinin yükseltici bir yol izlenmektedir. Spastik SP’de kullanılan ilaçlar; benzodiazepinler, dantrolen, tizanidin, siklobenzaprin, fenol ve botulinum toksin enjeksiyonlarıdır (47). Cerrahi tedavi seçenekleri arasında baklofen pompası, selektif dorsal rizotomi, tendon gevşetme, kalça rotasyon cerrahisi, spinal füzyon, şaşılık cerrahisi ve derin beyin stimülasyonu yer alır. Epilepsi eşlik eden hastalarda antiepileptik ilaçlar kullanılır. Konstipasyon, SP’de sık görülmektedir motilite artırıcı ilaçlar verilmektedir. Depresyon ve anksiyete için antidepresanlar kullanılabilir (47, 48).

2.2 Kolinerjik Sistem

2.2.1 Tanımı ve reseptörleri

Kolinerjik sistem, aksiyon potansiyeli iletiminde nörotransmitter olarak asetilkolini kullanan, kolinerjik nöronlardan oluşan sistemdir. Bu kolinerjik nöronlar, bir nöronal uyarının yayılması sırasında iki şekilde etkilenir; 1) asetilkolin tarafından aktive edilebilir; 2) asetilkolin içerir ve serbest bırakır (49).

Kolinerjik sistemde iki ana tip reseptör bulunmaktadır.

1) *Nikotinik reseptörler*, nöronların zarlarındaki ligand kapılı iyon kanallarına bağlı olarak bulunmakta olup, asetilkolin için alıcı görevi görür. İyonotropik bir reseptördür ve direkt olarak iyon kanalına bağlıdır. Asetilkolin nikotinik reseptöre bağlandığı zaman iyon kanallarının açılmasını sağlayıp hızlı bir katyon akışına sebep olur. Dört adet alt reseptör tipi vardır (N1, N2, N3 ve N4).

2) *Muskarinik reseptörler*, membran zarlarında G proteinine bağlı kanallara bağlı olarak bulunur. Asetilkolin bağlanması sırasında hücre içi proteinler aracılığıyla hücre içinde bilgi iletimini sağlamaktadır ve metabotropik bir reseptördür. Beş adet alt reseptör tipi bulunmaktadır (M1, M2, M3, M4 ve M5) (49).

2.2.2 Asetilkolin; sentezi ve metabolizması

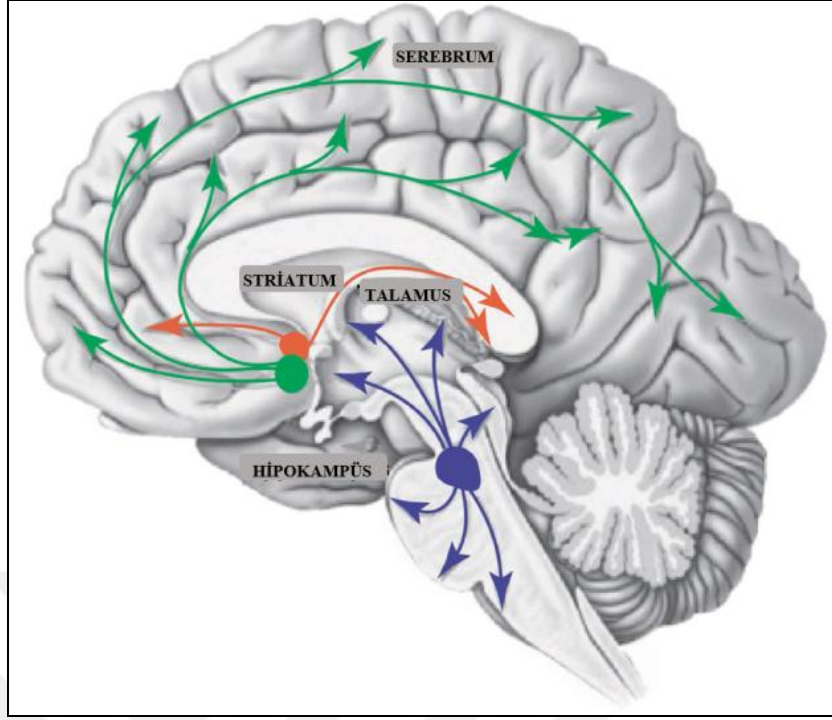
Asetilkolin, asetik asit ve kolinin bir esteri olan bir nörotransmitterdir. Vazodilatör ajan, muskarinik agonist, hormon, insan metaboliti, kemirgen metaboliti ve nörotransmitter görevi görmektedir (50). Asetilkolin hem MSS'de ve periferik sinir sisteminde (PSS) bulunur. Sempatik sinir sistemi için bir dahili vericidir, parasempatik sinir sisteminde ise salınan nihai ürün olup otonom sinir sistemi nörotransmitteridir. Beyinde hem nörotransmitter hem de bir nöromodülatör olarak

çalışmaktadır (51,52). MSS'deki kolinerjik nöronlar, serebral korteks ve hipokampüste kognitif fonksiyonlarda etkilidir. PSS'de asetilkolin kasları aktive etmektedir ve otonom sinir sisteminde kritik bir nörotransmitterdir (53,54).

Asetilkolin sentezi için, hücre zarının lipid çift tabakasında bulunan doğal amin ve metabolik reaksiyonlarda kullanılan bir tiyoester, asetil gruplarının alıcısı ve vericisi olan asetil koenzim A (asetil-CoA) ve kolin gerekmektedir. Bu moleküller asetilkolin üretmek için sadece asetilkolinerjik hücrelerde bulunan bir enzim olan kolin asetiltransferaz tarafından katalize edilebilir. Asetilkolin metabolizmasında asetilkolinesteraz, asetilkolini kolin ve asetik asit üretmek üzere parçalamaktadır. Bunun sonucunda oluşan kolin molekülleri, yüksek afiniteli kolin alım proteini ile sinir terminaline geri taşınır. Sonrasında ise tekrardan yeni asetilkolin molekülleri sentezlerler (49).

2.2.3 Beyinde kolinerjik nöronların yerleşimi

MSS'de kolinerjik nöronlar üç ana alanda bulunur; ilk alandakiler beyin sapında bulunan ve riskten kaçınma işlevi gören kolinerjik nöronlardır. Bu bölgedeki kolinerjik nöronlar talamusa projeksiyon ve inhibisyon yaparlar. İkinci alan striatumdur ve burada dopamin salınımını baskılayan kolinerjik internöronlar bulunur. Üçüncü alan ise bazal ön beyindeki kolinerjik nöronlardır. Neokorteks ve hipokampusü projekte ederler. Hipokampusün alt bölgeleri olan dentat girus, CA3, CA2 ve CA1 bölgeleri bu nöronlar tarafından projekte edilir (6) (Resim 1)



Resim 2. Beyinde kolinerjik nöronların yerleşim yerleri (55).

Korteksin kendisinde de kısıtlı sayıda kolinerjik internöronların olduğu bilinmektedir. MSS’de, nöronlar ve nöronal olmayan hücreler olan periferik makrofajlar, mikroglialar ve astrositler asetilkoline doğrudan cevap verirler. Nöronal olmayan bu hücreler kısa ve uzun dönem sinaptik fonksiyon ve plastisiteyi etkilerler (6).

2.2.4 Hipoksik iskemide kolinerjik sistem patofizyolojisi

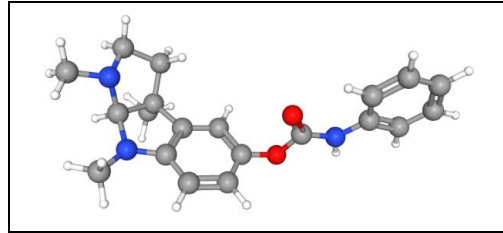
Hİ’de hipokampüste hasarlanan bölgeler incelendiğinde, hasarın kolinerjik nöronların yerleşim alanlarında yoğun olduğu görülmüştür (7). Hipokampüsün dentat girusunun memeli beyinde plastisite kapasitesi en yüksek bölgelerden biri olduğu ve kolinerjik nöronların yerleşim yeri olan bu bölgede uygulanabilecek bir tedavinin, gelişim süreci devam eden olgunlaşmamış bir beyinde iyileştirici etkisinin olabileceği düşünülmektedir (8).

Neonatal Hİ patofizyolojisinde, prefrontal korteks ve hipokampus arasında disfonksiyonel olgunlaşma süreci gerçekleşmektedir. Nöral ağ oluşumu sırasında oluşan bu abnormal bağlantılar, kognitif fonksiyonları etkilemektedir (9). Hipokampüsteki asetilkolin seviyesinin hafıza gibi kognitif fonksiyonlarda iyileşme ile ilişkilendirilmektedir (56). Asetilkolin, aynı zamanda periferik makrofajları ve santral mikrogliaların aşırı aktivasyonunu baskılayarak periferik ve santral anti-inflamatuvar yollarda rol oynamaktadır (6). Hİ'ye cevaben gelişen inflamasyonun özellikle term bebeklerde beyin hasarına neden olması (2) immün yanıtın inhibisyonu ile nöroprotektif özellik taşıyan kolinesteraz inhibitörlerinin (11, 12) beyin hasarında iyileştirici bir potansiyel olduğunu göstermektedir.

2.3 (-) Fenserin

2.3.1 Tanımı ve özellikleri

(-) - Fenserin diğer ismiyle (-)-Eserolin fenilkarbamat, moleküler formülüyle $C_{20}H_{23}N_3O_2$ tersindir, asetil-selektif kolinesteraz inhibitörüdür. Alzheimer hastalığında tedavi olarak araştırılan, nöroprotektif ve nörotrofik etkiler gösteren sentetik bir ilaçtır. Alzheimer hastalarında hafızayı ve bilişi iyileştirdiği bilinmektedir (57,58).



Resim 3. Fenserin'in kimyasal yapı modeli.

(-) Fenserin, kan-beyin bariyeri boyunca yüksek geçirgenlik göstererek beyne kolayca erişebilmektedir. Fenserinin kliniğe çevrilebilecek dozları yüksek tolere edilebilirlik göstermektedir. İlacın 20 mg/kg doz aşımı yan etkisi olarak bulantı ve

titreme gibi hafif şiddetli kolinerjik yan etkileri bildirilmiştir (59). (-) Fenserin'in kemirgenlerdeki farmakolojik etkisi 8 saatten uzun sürmektedir fakat ilacın beyin ve kandaki yarı ömrü 10-15 dakika aralığında bulunmaktadır. Beyine hızla ve kapsamlı bir şekilde alınabilmekte ve yüksek dozlarda da tolere edilmektedir (60).

2.3.2 Farmakodinamik etkisi

2.3.2.1 Kolinerjik mekanizma

(-) Fenserin, asetilkolinesteraz enzimi üzerinde seçici olarak etki eden bir asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörüdür (61). Asetilkolinin, enzim tarafından hidrolize edilmesini önleyerek nörotransmitterin sinaptik aralıkta daha fazla kalmasını sağlar (62). Bu mekanizma, kolinerjik nöronal devrelerin aktive edilmesini sağlar (15).

2.3.2.2 Non-kolinerjik mekanizma

(-) Fenserin'in nörodejenerasyonu azalttığı, programlanmış nöronal hücre ölümünü baskılayarak, kök hücrenin hayatta kalmasını ve farklılaşmasını arttırdığı kanıtlanmıştır. Bu azalan yıkım yanıtı ise pro-apoptotik faktörler ve Glial Fibriler Asidik Proteinin (GFAP) ekspresyonlarını azaltan ve kaspaz-3'ü aktive eden Beyin-türevli nörotrofik faktör (BDNF) ve anti-apoptotik protein olan B-Hücreli Lösemi/Lenfoma 2 (Bcl-2) protein seviyelerindeki artışla sağlanmaktadır (57, 63).

2.3.3 Nöronal hasar üzerindeki iyileştirici etkileri

İlacın Alzheimer Hastalığı'na neden olan β -amiloid öncü proteini (APP) ile A β peptidi olan proteinlerin seviyelerini de baskıladığı bilinmektedir (57, 64, 65). APP

geniyle ilaç etkileşiminin sonucunda, APP geninin ve onu takip eden ürünü A β proteininin ekspresyonu meydana gelir. Bunun sonucunda, glial hücre tarafından tercih edilen farklılaşmayı tersine çevirir ve nöronal hücre çıktısında artışı sağlamaktadır (15). Aktifleşmiş gliyanın beyindeki lezyon bölgesinde birikme süresi arttığında oksidatif stres uyarılmaktadır. (-) Fenserin, hüresel atıkları lezyon bölgelerinden uzaklaştırmak için mikroglial hücrelerin aşırı aktivasyonunu sonucu oluşan nöroinflamasyon yanıtını azaltmaktadır. Aktifleşmiş gliyanın beyindeki lezyon bölgesinde birikme süresi arttığında oksidatif stres uyarılmaktadır (66). İnflamatuvar yanıt, proinflamatuvar belirteçlerden olan Allogreft enflamatuvar faktörü 1 ve TNF- α 'nın artan ekspresyonunun Fenserinle zayıfladığı gösterilmiştir (67). Kan beyin bariyerinde bozulma ile nöroinflamasyona yol açan Matris Metalopeptidaz 9'un Fenserin tarafından iyileştirildiği kanıtlanmıştır (57). Proteinlerin yanlış katlanması sonucu oluşan toksik agregatlar olan alfa-sinükleinler, Parkinson hastalığında yüksek oranda gözlenmektedir. Fenserin'in, protein translasyonu yoluyla alfa-sinükleinlerin toksisitesini nötralize ettiği ve hastalığın semptomlarını azalttığı bulunmuştur (58). (-)-Fenserin'in Travmatik Beyin Hasarı ve Alzheimer Hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklara anti-inflamatuvar etkisi olduğu bilinmekte ve bunu IL-10 konsantrasyonunu koruyarak ve IL-1 β baskılayarak yapmaktadır. Meynert bazal nükleusu yaralanmalarından kaynaklanan kolinerjik kayıpları azaltmaktadır (15, 68, 69).

Bu bilgilerden yola çıkılarak bu araştırmada, bir AChEİ olan (-) Fenserin'in potansiyel tedavi ajanı olarak kullanılması ve yeni doğanda nöroprotektif etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Araştırmada kolinerjik sistemin SP ve Hİ patofizyolojisiyle olan ilişkisi tüm nörogelişim alanları üzerinden yapılacak; bu amaçla gelişim reflekslerden ve fiziksel gelişim parametrelerinden, olgun motor ve kognitif gelişim sürecine kadar takip edilecektir. Tedavi etkinliği bu makroskobik değerlendirmelerin yanısıra histolojik değerlendirme ile nöronal düzeyde; biyokimyasal analizlerle ise protein ve sitokinler düzeylerinde araştırılacaktır.

3 GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırma için etik kurul onayı, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (ACU-HADYEK) tarafından HDK-2020/40 kararı ile 08.07.2020 tarihindeki toplantıda alınmıştır. Çalışma 117E991 numara ile Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Araştırma Projeleri Komisyonu (ABAPKO) tarafından desteklenmiştir.

3.1 Deney Grupları

Çalışmada yeni doğan dişi ve erkek Sprague Dawley (12-16 gr) sıçanlar kullanılmış ve 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde sabit nem ve sıcaklık koşullarında tutulmuşlardır. Doğumdan sonra anne yanında anne sütüyle, daha sonrasında standart yem ile beslenmişler ve suya serbest bir şekilde ulaşabilmişlerdir.

Araştırmada yavrular aşağıdaki şekilde gruplara ayrılmıştır:

- 1) *Kontrol grubu (n=8)*: Yalancı cerrahi ile sadece insizyon stresi oluşturularak ve 23 gün boyunca günde bir kez serum fizyolojik (SF) intraperitoneal (ip) verilmiştir.
- 2) *Hipoksik İskemi (HI) grubu (n=12)*: Rice-Vannucci Modeli ile hipoksik iskemi oluşturulan gruba 23 gün boyunca günde bir kez SF ip verilmiştir.
- 3) *HI + (-) Fenserin (n=7)*: Rice-Vannucci modeli ile hipoksik iskemi oluşturulan gruba 23 gün boyunca günde bir kez 1 mg/kg (-) fenserin ip verilmiştir (70, 71).
- 4) *HI+ (-) Fenserin (n=8)*: Rice-Vannucci modeli ile hipoksik iskemi oluşturulan gruba 23 gün boyunca günde bir kez 2,5 mg/kg (-) fenserin ip verilmiştir (68,71).
- 5) *HI+ (-) Fenserin (n=8)*: Rice-Vannucci modeli ile hipoksik iskemi oluşturulan gruba 23 gün boyunca 12 saatte bir 2.5 mg/kg olacak şekilde günde toplam 5 mg/kg (-) fenserin ip verilmiştir (68, 72, 73).

Tüm yavrular P30. günde dekapitasyon ile sakrifiye edilmişlerdir.



Resim 4. İlaç dozlarının ip enjeksiyonu.

İlaç dozlarının hazırlanması: (-) Fenserin (Sigma Aldrich> 96%), Serum fizyolojik (% 0.9 izotonik sodyum klorür çözeltisi/Polifleks) içerisinde ultrasonik sonikatörde (Bandelin/SONOREX) 30 saniye aralıklı olarak 10 dakika süresince çözdürülmüş, homojen görünüm alan çözelti ilaç tam çözünme için bir gece boyunca +4 °C soğuk odada çalkalayıcıda bırakılmıştır. 1 miligram/kilogram (mg/kg) oranını sağlamak için; 10 gramda 0.01 mg doz kullanılmış ve 10 gram yavruda 0.1 mililitrede hesabı ile, 0.1 ml’de 0.01 mg çözdürülmüştür. Aynı denklem 2.5 katı olarak 2,5 mg/kg dozun hazırlanışında uygulanmıştır. Bir gün sonrasında tam çözünen ve şeffaf renkten fuşya renge dönen ilaç; 1 mg ve 2,5 mg dozlardastok hale getirilerek, ışığa duyarlılığı sebebiyle falcon çevresine alüminyum folyo sarılarak +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

Kontrol ve Hipoksik İskemi gruplarına tedavi taklidi olarak verilecek olan serum fizyolojik çözeltisi haftalık tartım ile yine tedavi dozlarıyla aynı oranlarda verilmiştir.

3.2 Serebral Palsi Modelinin Oluşturulması

3.2.1 İşkemi cerrahisi / rice-vannucci modeli

Sprague Dawley sıçan yavruları, postnatal 7. günde (P7) annenin yanından alınarak 34.5 °C'lik inkübatöre konulmuştur. Ağırlık ve cinsiyetler kaydedilmiş ve yavrular işaretlenmiştir. İsofloran (Forane) ile anestezisiye alınan yavrularda cerrahi mikroskop (Carl ZEISS-f170) kullanılarak boynun ortasından klavikulaya kadar 1 cm'lik ventral kesi yapılarak unilateral ve sol karotid arter çevre dokulardan kıvrık uçlu pens (Isolab) ve eğimli uçlu diseksiyon makası (Isolab) ile izole edilerek 4-0 cerrahi ipek suture (Doğsan) ile, aralıklı atılan iki ayrı tek düğüm yoluyla bağlanmıştır. Kan akımının durduğuna emin olunduktan sonraarter sonrasında oklüze edilmiştir. Daha sonrasında kesi kapatılarak annenin yanına geri konulup anestezi etkisinden çıkana kadar iki saat beklenmiştir.



Resim 5. Yedi günlük sıçan yavrularında karotid arter izolasyonu ve oklüzyonu.

3.2.2 Hipoksi maruziyeti

İki saat bekleddikten sonra anestezi etkisinden çıkan yavrular, %8 oksijen ile dengelenmiş %92 nitrojen (HABAŞ-52 Lt) verilen, kontrollü özel bir küvöz (BabyNest) ortamında 37°C sıcaklıkta, 150 dakika boyunca tutulmuş ve hipoksik hasar oluşturulmuştur (74).Düzenekteki oksijen değeri küvöz içine konan oksimetre (Smart Sensor AR 8100) ile düzenli olarak takip edilmiştir. Hipoksi uygulamasından sonra yine yavrular anneleriyle aynı kafese geri konulmuşlardır. Kontrol grubunda ise yalancı cerrahi uygulaması yapılarak ligasyon olmaksızın sadece cerrahi stres oluşturulmuştur.



Resim 6. Hipoksi düzeneği ve maruziyeti.

3.3 Nörogelişimin Değerlendirilmesi

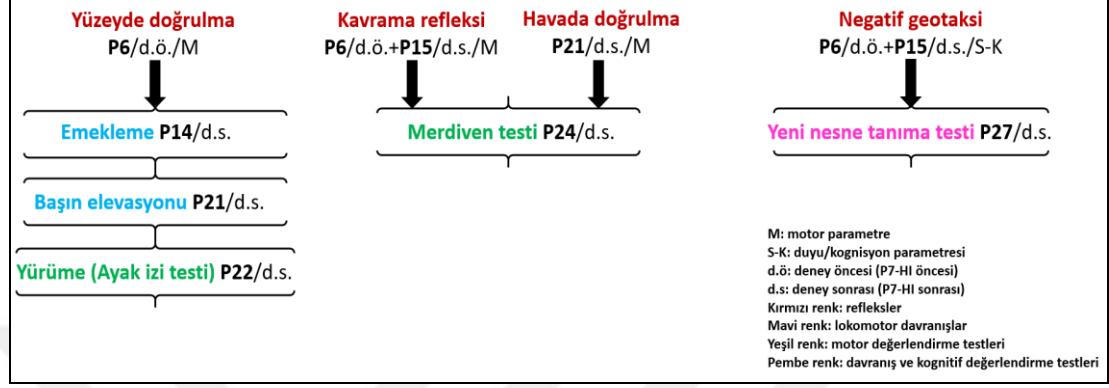
Hİ sonrasında hasarın ve hasara bağlı refleks ve nörogelişimsel bozuklukların takibinin yapılması için aşağıdaki gelişimsel belirteçler esas alınmıştır.

| Gelişimsel Kilometre Taşları | | |
|---|--|--|
| Göz açılması 7-17.gün Diş gelişimi 5-10.gün Tüy gelişimi 3-15.gün Vücut ağırlığı | Yüzeyde doğrulma 1-10.gün Havada doğrulma 16-21.gün Negatif geotaksi 3-15.gün Kavrama refleksi 3-15.gün | Başın elevasyonu 9-21.gün Emekleme 7-16.gün Yürüme 12-21.gün |
| Fiziksel gelişim göstergeleri | Refleks gelişimi | Lokomotor davranışlar |

Resim 7. Gelişimsel takip şeması.

Araştırmanın altyapısını oluşturan bu bölümde ilacın iyileştirici etkileri sadece motor ve kognitif testler ile sonuç bazında değil, nörogelişimsel bir süreç bazında klinikteki takip şemasına paralellik gösterecek şekilde planlanmıştır. Tablolarda belirtilen gelişimsel belirteçler aynı zamanda motor değerlendirme testleri ve kognisyon-davranış testlerini destekleyici unsur olarak kullanılacaktır (75).

Aşağıda refleks ve nörogelişimsel değerlendirmede kullanılan adımlar ile motor ve kognitif değerlendirilmede kullanılan adımların birbiriyle olan ilişkilerine dair şematik plan sunulmuştur.



Resim 8. İlişkilendirilecek değerlendirme parametreleri.

3.3.1 Vücut ağırlığı

Vücut ağırlıkları P7. günde deneye dahil olma uygunluğunun belirlenmesi için; indükleme sonrası ise ilaç dozları ve SF uygulanma dozlarının belirlenmesi için ölçülmüştür.

3.3.2 Diş gelişimi

Diş gelişimleri deney öncesi P7. günde ve deney sonrasında ise gelişimsel sürecin bitimi kabul edilen P10. günde dişin çıkmasının tamamlanması açısından takip edilmiştir. Mine bozuklukları ve kırılma eğilimleri ayrıca not alınmıştır.

3.3.3 Tüy gelişimi

Tüy gelişimi, tamamlanması gereken P15. günde sağlıklı ve homojen uzamaları bakımından takip edilmiştir.

3.3.4 Gözün açılması

P17. günde gözün tamamen açılma becerisinin elde edilip edilmediği takip edilmiştir.

3.3.5 Yüzeyde doğrulma refleksi

Yüzeyde doğrulma refleksi, P6. günde yavrunun deney öncesi normal motor gelişim evresinde gerekli refleks gelişimine sahip olduğunu tespit etmek için uygulanmıştır. Yavru düz bir zemin üzerinde sırtüstü konulmuş ve 60 saniye içerisinde karnı üzerine dönmesi beklenmiştir. Dönmesi 60 saniyeden uzun süren yavrular 60 olarak kabul edilip, pasif olarak karnüstü pozisyona getirilmiş ve başarısız kabul edilmişlerdir. 60 saniyeden az sürede yapabilen yavrular beceri yeterliliğine evet; yapamayanlar hayır olarak kaydedilmiştir. Motor gelişime dair bir belirteçtir.

3.3.6 Havada doğrulma refleksi

Havada doğrulma refleksi P21. günde Hİ sonucu ikinci aşama olarak doğrulma becerisini tespit etmekte kullanılmıştır. Yavru kuyruğundan baş aşağı tutularak 60 cm yükseklikten aşağıya önceden ayarlanmış yumuşak bir zemine bırakılmıştır. Yavrunun düşme sırasında ve sonrasında doğrulma becerisi gözlemlenmiştir. Motor testler için kullanılmış bir parametrelerdir.

3.3.7 Negatif jeotaksis

Negatif jeotaksi ölçümü için P6 ve P15.günde yavru pürüzlü bir yüzey üzerine konulmuştur. Yüzey gonyometrik ölçümle 30 derece eğimlendirilerek yavru baş aşağı konuma getirilmiş ve düzlem değişimine göre gövde oryantasyonu 60 saniye boyunca gözlemlenmiştir. Sensorimotor bir belirteçtir.



Resim 9. Negatif jeotaksisin ölçümü.

3.3.8 Kavrama refleksi

Kavrama refleksi, P6 ve P15. günde yavrunun alt ve üst ekstremitelerine, ayrı ayrı küt bir nesne dokundurularak değerlendirilmiş ve patileriyle kavrama yapıp yapmadıkları kaydedilmiştir (75).

3.3.9 Başın elevasyonu ve emekleme

Yavrunun P14. günde emekleme, P21. günde baş elevasyonunu sağlayabilme becerisi incelenmiştir. Yürüyebilme becerisini edinmesi beklenen üçüncü aşama olan

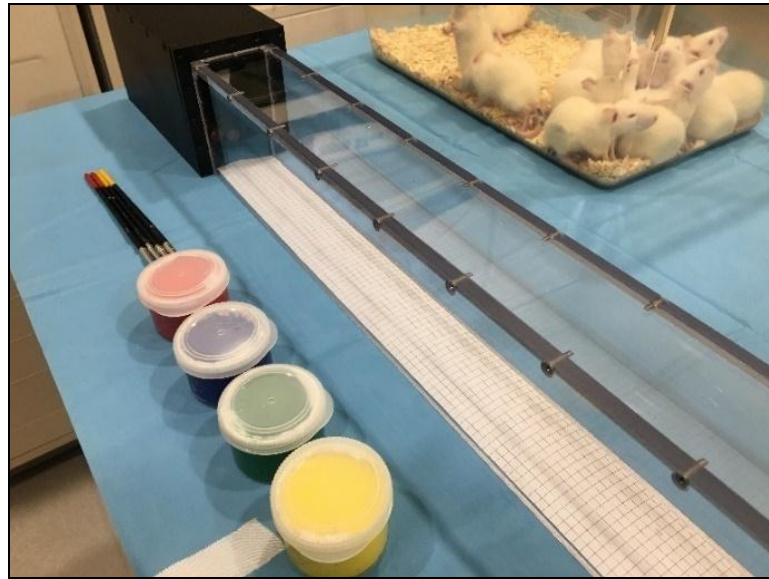
P22. günde ise vücut pozisyonlaması; baş, gövde, bacakların, patilerin ve kuyruğun duruşları açısından gözlemlenmiştir.

3.4 Motor Becerinin Değerlendirilmesi

Bir sonraki aşama olan motor değerlendirme testlerinde ayak izi testi ile (yürüme analizinde) yürüme sırasında ekstremiteler arası korelasyon bilateral ölçülmüş, merdiven testinde ise yürümedeki uzay algısının kontrolü, denge ve lokomotor davranışların gelişimiyle ilişkilendirilerek ölçüm yapılmıştır.

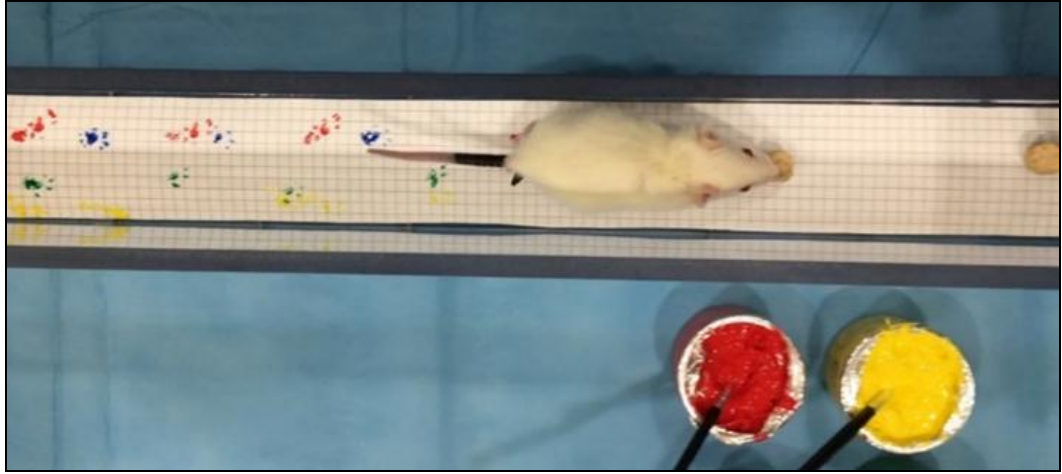
3.4.1 Ayak izi testi (Yürüme analizi)

P22. günde yürümenin kâğıttaki pati izleri üzerinden manuel hesaplamalar ile analizidir. Ölçümde değerlendirilen parametreler: 1) adım uzunluğu, 2) adım genişliği ve pati basımı sırasında parmakların pozisyonuna bağlı olan 3) pati genişliğidir. Bu üç parametrenin ölçümü her pati için ayrı ayrı uygulanmıştır.



Resim 10. Ayak izi testi düzeneği.

Yürüme analizi ayak izi testi için 20 cm yüksekliğinde x 16 cm genişliğinde x 70 cm uzunluğundaki pleksi-glass koridora sahip ve tek tarafı açık, siyah duvarlı, 23 cm x 36 cm x 28 cm ölçülü kutu ile sonlanan bir düzenek (RADON Medikal) kullanılmıştır. Kemirgenlerin doğası gereği karanlık alanı tercih etmesi nedeniyle karanlığa kaçış eğilimi teşvik edici olarak kullanılmış ve yürüme koridoru karanlık bir kutuda sonlanmıştır. Yürüme koridorunun tabanına kareli grafik kağıdı konularak ve sıçanın patileri düzeneğe yerleştirilmeden önce kuyruğu tutularak toksik olmayan, yıkanabilen dört farklı renk boya (Faber-Castell Parmak Boyası) ile boyanmıştır. Sıçanın yürüyeceği koridor girişinde konumlandırılmasından sonra koridor boyu yürümesi beklenmiştir. İlk ve son adımlarda yürüme hızı değişeceğinden, normal yürüyüş paternini temsil edemediği kabul edilerek puanlamaya dâhil edilmemiştir. Kâğıt puanlanamıyor ise hayvan on dakika dinlendirildikten sonra işlem tekrar edilmiştir.



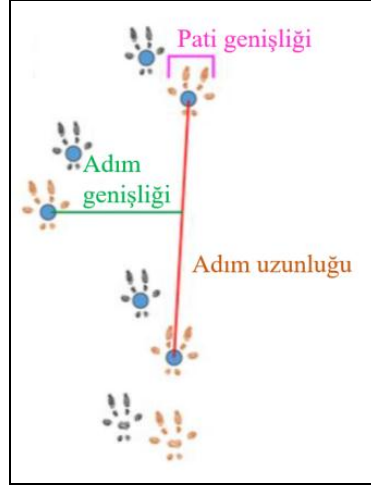
Resim 11. Pati izi.

Test sırasında her bir yavru tek seferde, kâğıtta on altı pati izi bırakacak (4-4-4-4) şekilde yürütülmüştür. Her 4 pati izi bir tam yürüme paternini, her sekiz pati izi ise ardışık iki yürüme paternini ifade etmiştir. Parametrelerin her biri hesaplanırken on altı pati izi; ilk sekiz pati izi 1.ölçüm, sonraki sekiz pati izi ise 2.ölçüm şeklinde ayrılmıştır. 1. ölçüm ilk iki ardışık (örneğin: sağ ön pati 1. basım izi ve sağ ön pati 2. basım izi), 2. ölçüm ise son iki ardışık paterni (örneğin: sağ ön pati 3. basım izi ve

sağ ön pati 4. basım izi) ifade etmiştir. İkili ölçümde amaç, aynı patinin iki ayrı ardışık adımında (4-4 ve 4-4) parametreleri hassas şekilde ölçebilmektir. Daha sonra iki 1. ve 2. ölçümün ortalamaları alınmış ve hesaplama yapılan pati için o parametreye dair esas değer elde edilmiştir. Ölçümler santimetre cinsinden kaydedilmiştir.

Hesaplama ölçüm kolaylığı için, her pati izini çevreleyecek şekilde, 2-4 mm'lik bir çember çizilerek merkez nokta oluşturulmuştur. Sonrasında bu merkez noktalar arasında çizilen yatay çizgi adım genişliğini; dikey çizgi adım uzunluğunu ve parmaklar arasına çizilen yatay çizgi ise pati genişliğini ifade etmiştir. Her parametrenin ölçümü tüm patiler için ayrı ayrı yapılmıştır.

1) *Adım uzunluğu* aynı patinin iki ardışık adım izi arasındaki mesafe olarak tanımlanır (örneğin: sağ ön pati birinci basım izi ve sağ ön pati ikinci basım izi). Hesaplanması sırasında ölçüm alınacak pati belirlenir, birinci ve ikinci paternde o pati için oluşan izler arasında dikey bir uzunluk çizilir, santimetre cinsinden ölçüm kaydedilmiştir. Sonrasında üçüncü ve dördüncü paternde aynı pati için üçüncü ve dördüncü pati basım izi arası mesafe yine aynı şekilde ölçülür. Bu iki ölçümün ortalaması alınarak o patiye dair adım uzunluğunun ana değeri elde edilir (örneğin: sağ ön pati için 1. ölçümdeki adım uzunluğu + sağ ön pati için 2. ölçümdeki adım uzunluğu /2). Bu parametreye dair ölçüm, yavrunun tüm patileri için ayrı ayrı tekrarlanır (sağ ön, sağ arka, sol ön, sol arka).



Resim 12. Yürüme analizinde hesaplama.

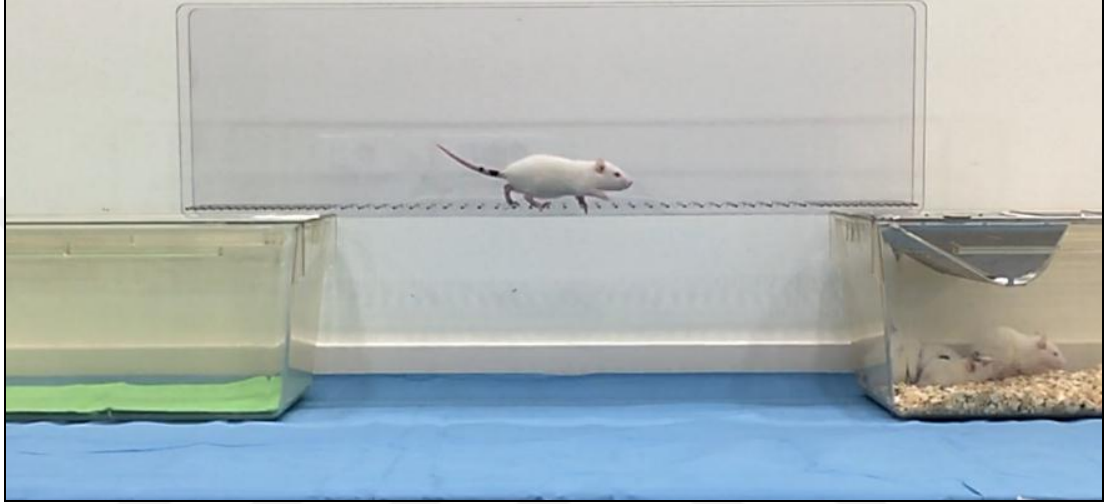
2) *Adım genişliği* ise aynı ekstremitenin için (üst pati izleri arasında veya alt pati izleri arasında), zıt taraftaki patinin izinden adım uzunluğuna doğru çizilen yatay mesafenin ölçümüdür (örneğin: sol ön patiden, sağ ön patiler arası adım uzunluğuna) (Şekil 2). Ölçüm yine her pati için ayrı ayrı tekrarlanır, her biri için 1. ve 2. ölçümün ortalamaları alınarak ana değerler elde edilir.

3) *Pati genişliği* ölçümünde de, ölçüm için seçilen patideki ilk ve son parmak ucu arasındaki mesafe yatay bir çizgi çekilerek ölçülür (Şekil 3). Aynı pati için yürüme analizinde toplamda dört iz bulunacağı için (sağ ön 1, sağ ön 2, sağ ön 3, sağ ön 4), hesaplanmasında ikinci ve üçüncü paterdeki pati basım izi seçilerek, ilk ve son parmaklar arasına çizilen yatay çizgi yoluyla iki ayrı ölçüm alınıp, ortalamaları hesaplanır. Bu parametre de yine tüm patiler için (sağ ön, sağ arka, sol ön, sol arka) tekrar edilerek, 2. ve 3. pati basım izleri ölçülüp ortalamaları kendi içinde alınarak elde edilir (76, 77).

Yürüme biçimi ise ayrıca skorlanacaktır. Skorlamada, normal 0; akıcı fakat anormal yürüyüş 1; sadece sınırlı hareketler 2; hareketle yer değiştirememesi 3 olarak skorlanmıştır (78).

3.4.2 Merdiven testi

P24. günde uygulanan bu testte; adım alma, pati yerleştirerek kavrama ve her dört ekstremitte için de koordinasyonla dengeli yürüyebilme becerisini öğrenme ile ilişkili olarak değerlendirilmektedir.



Resim 13. Merdiven testinde değerlendirme.

Sıçan, yatay yerleştirilmiş 120 cm x 9 cm x 2 cm ile 18 adım 1.5 cm-kalınlığında, 4 cm aralıklı bir merdivenin(Radon Medikal) başına konularak kuyruğuna hafifçe dokunulup yürümeye teşvik edilmiştir(79).Test öncesinde ise hayvanlar, merdiveni geçmeleri için nötr bir kafesten kendi kaldıkları kafeslerine ulaşmaları için, seans başında merdiveni beş kez tekrar ederek eğitilmişlerdir. Test ise üç tekrar şeklinde uygulanmış olup skorlamada merdiven üzerinde adım atışta ıskalama, bacağının boşa kayma sayısı, pati yerleştirmedeki becerisi, ikinci ve üçüncü tekrarda deneyim-öğrenme ilişkisiyle ilk hatayı düzeltme davranışı test edilmiştir. Skorlamada değerler; tamamen ıskalama 0, aşırı kayma 1, hafif kayma 2, yerine koyma 3, düzeltme 4, kısmi yerleştirme 5 olarak puanlanmıştır. Üç tekrar sonrasında ise skorların ortalaması alınmıştır. Aynı anda farklı hatalar oluştuğunda, puanların en düşük olanı kaydedilmiştir (80). Sıçanın yürütmesi ise zamanlayıcıyla takip edilerek test üç kez, birer dakika arayla tekrarlanmıştır. Manuel olarak, video

kaydı üzerinden hayvanın adım alıştırma sekteye uğrama ve bacağına boşa kayma sayısı hesaplanacak ve skorlamaları yapılmıştır.

3.5 Kognitif Becerinin Değerlendirilmesi

3.5.1 Yeni nesne tanıma testi

P27. günde kemirgenlerde öğrenme ve hafızanın çeşitli yönlerden değerlendirilmesi için kullanılan bir testtir. 3 aşamada uygulanır: 1) alışkanlık günü, 2) eğitim günü, 3) test gününü içerir.

Alışma gününde (T1) hayvanlar beş dakika ortamda tutularak nesnelere olmadan, boş arenayı keşfetmeleri sağlanmıştır. Eğitim günü (T2) olan ikinci günde, arenaya yerleştirilen özdeş iki nesneyi 10 dakika boyunca keşfetmelerine izin verilmiştir. İki özdeş nesne için keşife ayrılan süreler ayrı ayrı hesaplandıktan sonra ayrımcılık indeksi iki nesneye ayrılan süreler birbirinden çıkarılarak hesaplanmıştır. Test günü olan üçüncü günde (T3) ise nesnelere birisi yeni bir nesneyle değiştirilmiştir. Seçilen bu nesnelere birbirinden renk, doku, şekil olarak ayrımı belirgin nesnelere olmuştur. Kemirgenler yeni olan nesne için doğuştan bir tercihe sahip olduklarından, sıçanın tanıdığı olan nesneyi hatırlayıp diğer bilmediği yeni nesneyi keşfetmeye odaklanması beklenmiştir. İlgisel teşviği arttırmak için hayvanın kendi boyutuna yakın nesnelere seçilmiş, nesnenin üzerinde oturulan zaman dilimi ise keşif süresine dahil edilmemiştir. Biri tanıdığı diğeri ise yeni olan nesnelere keşfetmeleri için sıçanlara yine 10 dakika süre verilerek yeni nesne tercih yüzdesi ve ayrımcılık indeksleri hesaplanmıştır.

$$\text{Yeni nesne tercihi} = \frac{\text{Yeni nesne keşfetmeye ayrılan süre}}{\text{Tanıdığı nesneyi keşfetmeye ayrılan süre} + \text{Yeni nesneyi keşfetmeye ayrılan süre}} \times 100$$

Bu formül, yeni nesneyi keşfetmek için harcanan sürenin, nesnelere keşfetmek için ayrılan toplam süreye göre yüzdesini sağlamıştır. Böylece sıçanın yeni nesneye olan tercihi hesaplanmıştır. Değerler % 0 (yeni nesnenin keşfedilmemesi) ile % 100 (yalnızca yeni nesnenin keşfedilmesi) arasında değişmektedir.

$$\text{Ayrımcılık İndeksi} = \frac{\text{Yeni nesneyi tanımak için harcanan zaman} - \text{Eski nesneyi tanımak için harcanan zaman}}{\text{Toplam keşif süresi}}$$

Bu formül ise yeni nesne varlığında ayrımcılık indeksinin hesaplanmasını sağlamıştır. Değerler -1'den (yalnızca tanıdık nesnenin keşfi) +1 (yalnızca yeni nesnenin keşfi) aralığında değişir. 0 değeri elde edildiğinde ise yeni ve tanıdık nesnelere keşfetmek için eşit zaman harcadığını göstermektedir.

Yeni nesnenin tanındığına dair ilk gösterge T3'te arenaya konan iki nesneden, yeni olan nesneye ayrılan keşif süresinin tanıdık olan nesneye ayrılan süreden daha fazla olmasıdır. Bu keşif süresinin kapsamı; sıçanın yeni nesne etrafında, yüzü nesneye dönük şekilde durma süresi ve koklama ile keşif davranışı sergileme süresidir.

Test günleri boyunca aydınlatmanın stres yaratmaması için, labirent merkezi 20 lux civarında dağınık ve düşük bir aydınlatma sağlanmıştır. Kullanılan deney arenasının da yine siyah olarak tercih edilmiştir. Deney ortamında sıçanın kafes barınma koşullarına sahip bir sıcaklık derecesi sağlanmıştır. Davranış deneyleri için sıçanın, taşıdığı yeni odada bir saat alışma süresine sahip olmasına dikkat edilmiştir. Eğitim ve test günü kullanılan nesnelere koku ve iz gibi ipuçları oluşturulmaması adına çift kopya kullanılacak ve kullanımdan önce her nesne alkol ve su ile temizlenmektedir (81, 82).

Yeni nesne tanıma testinin kamera kaydının yapılmasında üniversitemiz Deney Hayvanları Merkezinde yer alan yeni nesne tanıma test düzeneği ve kamera bağlantılı bilgisayar yazılımı Etho Vision kullanılmıştır.

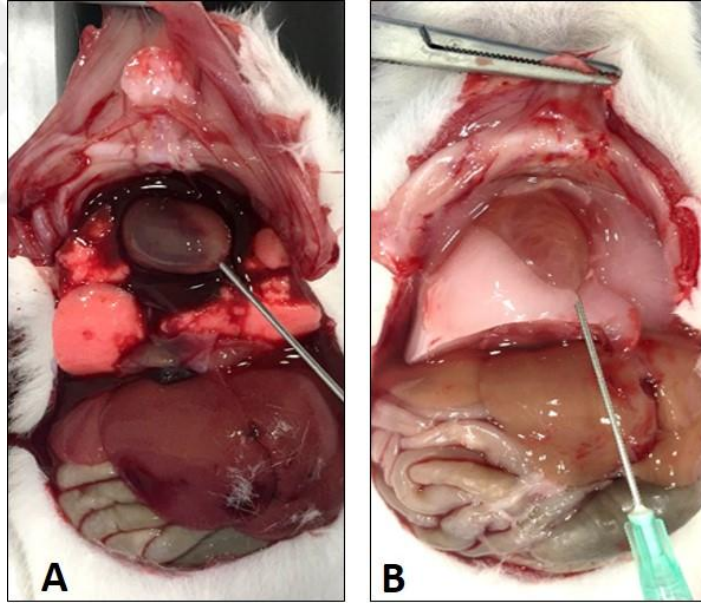
3.6 Histolojik İnceleme

3.6.1 Beyin doku örneklerinin toplanması ve hazırlanması

P30. günde sıçan yavruları isofloran anestezisine alındıktan sonra göğüs kafesleri açılarak infüzyon pompası aracılığıyla ilk olarak 1 molar (M) Fosfat Tamponlu Salin Çözeltisi (PBS-Sigma Aldrich) ve Nevparin (Heparin sodyum) Çözeltisi; sonrasında ise %4 Paraformaldehit (PFA-Merck) Çözeltisi kardiyak perfüzyon tekniğiyle verilmiştir. Bir adet PBS tablet 100 mL ddH₂O (Milli-Q Advantage A10) içerisinde manyetik karıştırıcıda çözdürülür. İçine 0.1 ml Nevparin çözeltisi eklenir. Manyetik karıştırıcıda karıştırılıp homojen formda olması sağlanır. PB hazırlamak için 1000 mL içinde 21.8 gram Sodyum Hidrojen Fosfat Heptahidrat (Merck-dibasic), 6.4 gram Sodyum Dihidrojen Fosfat Monohidrat (Merck-monobasic) tartılır (Shimadzu-AUW/220D)ve manyetik karıştırıcıda çözdürülür. Filtreden geçirilir. PFA hazırlamak için 14 gr paraformaldehit çeker ocak (Thermo Scientific-Laminar Flow Hood) içerisinde tartılarak 70 mL ddH₂O da ısıtıcılı manyetik karıştırıcı ile 55-60 derecede çözdürülür. Paraformaldehit ışığa duyarlı olduğu için dışı alüminyum folyo ile sarılır. Bu hızlı ısınması ve kolay çözülmesine de yardımcı olur. Çözdürmeyi sağlamak amacıyla aynı anda 1 M NaOH çözeltisi de kullanılır. Çözdürüldükten sonra 25-37 dereceye inmesi beklenir ve pH 7.4 e (Thermo Scientific-Orion 960 Titrator PLUS System) ayarlanır. Üzerine 110 mL daha ddH₂O eklenerek total konsantrasyon 175 mL tamamlanır. 175 mL PFA'ya 175 mL PB eklenir ve pH 7.4'e tekrar ayarlanır. Her bir perfüzyon süresi; çözeltilerin akış yoğunluğu ve hızı yavruların kilolarına göre hesaplanmıştır. Tüm solüsyonlar hazırlanması sırasında her aşamada filtreden geçirilmiş (Vakum manifold süzme/akm seti/Isolab) ve perfüzyonun dokuyu fikse etmede tıkanıklık yaşaması elimine edilmiştir. Perfüze edilen yavrular dekapite edildikten sonra, tüm gruplar için beyin dokuları, Hİ ve tedavi grupları için ise ayrıca akciğer, kalp ve karaciğerin üçüncü parçası da alınarak önceden hazırlanan %10'luk sükröz (Merck) çözeltisine konulmuştur. %10'luk sükröz çözeltisi için; 10 gr sükröz hassas terazide tartılmıştır. Üzerine 45 mL PB ile 45 mL ddH₂O eklenerek çözelti manyetik karıştırıcıda homojen hale getirilmiştir. Total konsantrasyon 100 mL'e tamamlanmıştır. %20'lik

sükroz için 20 gr sükroz 40 PB+40 mL ddH₂O içinde; %30'luk sükroz için ise 30 gr sükroz 35 mL PB+35 mL ddH₂O da çözdürülmüştür.

Hastalık ve doz grubunda her bir yavruda perfüzyonda bireysel faktörler kısıtlılık yaratabilmiş, kardiyak olan bu modelde kardiyak perfüzyonda damar esneklik bozuklukları ve dolaşım bozuklukları olduğu perfüzyon sırasında gözlemlenebilmiş ve bu gibi tıkanıklık durumlarında doğrudan aortadan perfüzyon tamamlanmıştır. Hİ ve tedavi gruplarında perfüzyon sonrası akciğer ve karaciğer dokularında fokal nekrozlar görülmüş ve özellikle tedavi dozları arasında hacim olarak makroskobik farklılığa sahip olan kalp dokusu histolojik olarak değerlendirilmek üzere ayrıca alınarak beyin dokusuyla aynı protokol uygulanılarak fikse edilmiş ve muhafaza edilmiştir.



Resim 14. Kardiyak perfüzyon öncesi ve sonrasında fikse edilirken rengi açılan dokular.

Perfüzyon sonrası beyinler %10'luk sükroz çözeltisinde 1 gün boyunca çökmesi beklendikten sonra %20'lik sükroz çözeltisine konmuştur. Aynı işlem dokunun dibine çökmesi için yine 1 gün beklenerek %30'luk sükroz çözeltisine konması ve çökmesiyle tamamlanmıştır. Çöken dokular OCT Tampon'a (Tissue-Tek®)

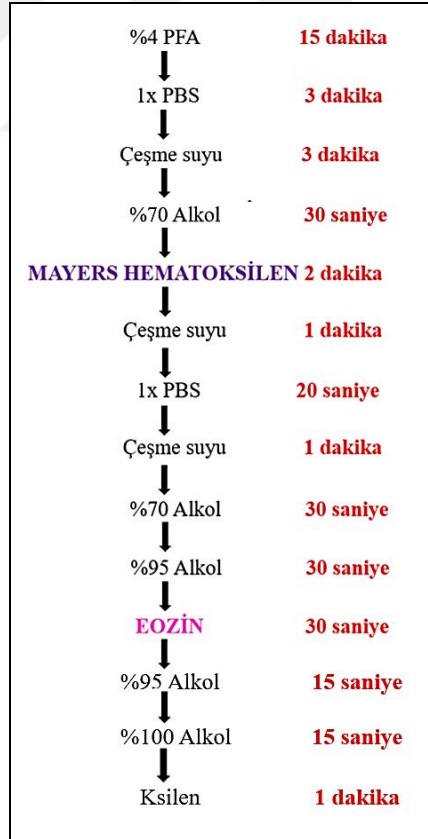
gömülmek üzere buz kalıbı kutularına anteriordan posteriora koronal kesit alınabilmesine uygun olacak şekilde gömülmüştür. Gömülme sırasında yarıya kadar OCT konulmuş, doku ortasına yerleştirilmiş ve sonrasında dışını tamamen kaplayacak şekilde OCT Tamponla üstü örtülmüştür. Oluşan baloncuklar kesit alımda bozukluk yaratacağından pipet ucu ile patlatılmış veya yana ayrılmıştır. Kutunun kapağı tamamen kapatıldıktan sonra sıvı azot (Thermo Scientific) olan bir havuza 2 dk süre boyunca batırılmış ve kutu içindeki tüm dokuların etrafındaki OCT'nin beyaz bir forma gelene kadar donması sağlanmıştır. Donmuş tüm kutular -80 derece olan dolapta (GFL - 6483) kesit öncesi muhafaza edilmiştir.

3.6.2 Beyin dokusundan kesit alınması ve boyama için hazırlanması

-80 °C'de muhafaza edilen beyin dokuları kesit alımı sırasında parçalanmaması ve kademeli soğuması için yarım saat öncesinde -20 °C buzdolabına getirilmiştir. Cryostat (Cryo3® Flex Cryostat/Tissue-Tek®) kesit alım öncesinde ideal sıcaklıklara ayarlanmış: cryobar -60 °C'ye, cihazın kesim haznesi ve doku sabitleme aparatı ise -25 °C'ye ayarlanmıştır. OCT Tampon ile beyin dokusunun posteriorudoku sabitleme aparatına yapıştırılmış ve 30 mikronluk koronal kesitler alınmıştır. Alınan kesitler 30 günlük sıçan yavrusunun beyin gelişimine uygun mikron aralıklarının yetişkin sıçan beyin atlası üzerinden revize edilmiştir. 8 bölgede (anterior ve posterior serebral korteks; hipokampüste CA1, CA2, CA3 ve dentat girus; anterior ve posterior striatum) yapılacak iki ayrı boyama için çift kesit alınmıştır. Kesitler lizinli lam (g-MANZEL) ile toplanmış ve boyamadan önce 1 hafta -80 derece buzdolabında muhafaza edilmiştir. Boyamanın yapılacağı günlerde kırık buz üzerinde oda sıcaklığına getirilen kesitler cresyl violet boyama ve Hematoksilen & Eosin boyama için aşağıdaki boyama protokollerinden geçirilerek boyanmıştır. Sonrasında birkaç damla entellan pastor pipeti ile doku üzerine damlatılmış, 45 derecelik açı ile lizinli lamın üzeri lamel ile örtülmüştür. Ardından lizinli lamlar kurumak üzere 2 gün boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında bırakılmıştır.

3.6.3 Hematoksilen ve eozin boyama ile hasarlı nöronların belirlenmesi

Alınan kesitler ışık mikroskopunda (ZEISS AXIO SCOPE A1 AX10) hücre sayımı için Hematoksilen (Sigma Aldrich) ve eozin (Eozin Y Solüsyonu %1, alkolik Merck) ile boyanmıştır. %4 PFA, 96 mL ddH₂O + PBS tablet içerisinde NaOH ile 60 derecede çözdürülerek hazırlanmıştır. Sonrasında ise 30 dereceye soğutulurak pH: 7.4'e HCl ile çekilmiştir. Boyama protokolünde aşağıdaki süreler boyamanın yeterliliğine göre optimize edilmiştir. Protokoldeki PBS yıkama %4 PFA hazırlanışında çözücü olarak kullanıldığı için, %4 PFA ile OCT Tampondaki dokunun lizinli lama (Thermo Scientific-Menzel-Glaser-Polysine Slides) fiksasyonu sağlandıktan sonra yıkamada bu süreci bozmaması adına ara yıkama olarak kullanılmıştır. Boyamada tüm alkol derişimleri Absolute Etanol (EtOH) ile hazırlanmıştır.

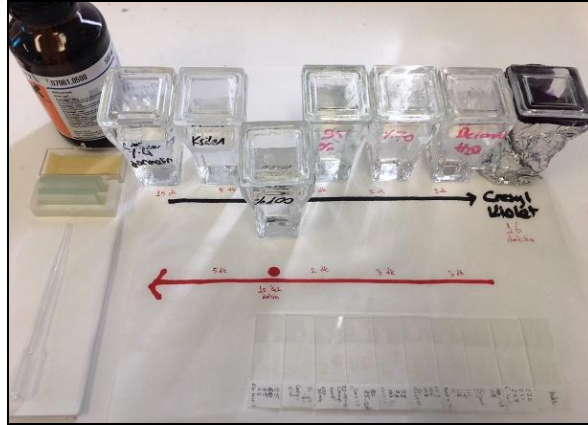


Resim 15. Hematoksilen & Eozin (H&E) boyama protokolü.

Morfolojik olarak normal yapıda olan nöronlar ile iskemiye bağlı değişim gösteren nöronlar (küçülmüş hücre gövdeleri, üçgenleşmiş pinotik çekirdek ve eozinofilik sitoplazma) mikroskopik sayım şablonu (Reticle Grid-0.4 mm/Microscope World) ile değerlendirilmiştir. Nöron değerlendirmesi her 8 bölge (anterior ve posterior serebral korteks; hipokampüste CA1, CA2, CA3 ve dentat girus; anterior ve posterior striatum) için on farklı alandan yapılmıştır. İskemik nöronların yapısı yorumlanmıştır. Böylece sadece etkilenen hemisferdeki hasarın yoğunluğuna (iskemik nöronların yoğunluğuna) bakılmıştır (83).

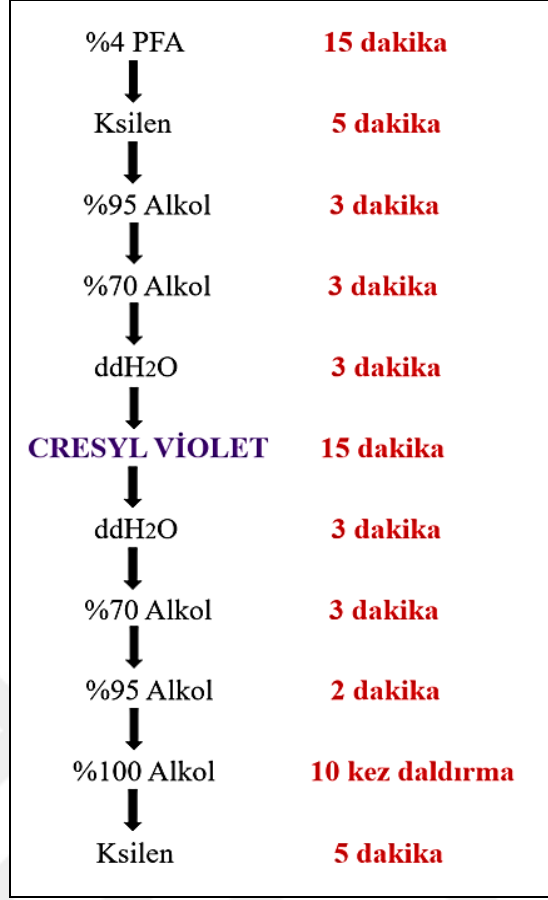
3.6.4 Cresyl violet ile nöronal kayıp üzerinden beyin hasarının belirlenmesi

Beyin hasarının ışık mikroskopunda (ZEISS AXIO SCOPE A1 AX10) skorlanması için kesitler cresyl violet (Cresyl violet asetat/Sigma Aldrich) ile boyanmıştır. %4 PFA H&E boyamadakiyle aynı protokolle hazırlanmıştır.



Resim 16. Cresyl violet boyama adımları.

Cresyl violet dha uzun fiksasyon protokolü gerektirdiği için %4 PFA sonrası fiksasyonda Ksilen (TEKKİM-Ksilen Extra Pure) kullanılmıştır.



Resim 17. Cresyl violet boyama protokolü.

Hipoksik iskemide ipsilateraldeki beyin bölgeleri (serebral korteks, striatum ve hipokampus) hasar görmekte ve bu bölgelerde nöron ölümü gerçekleşmektedir. Hasar belirlenmesi için hem ipsilateral alanda hem de kontralateral alanda hayatta kalan nöronların tespiti yapılmıştır. Her beyin bölgesi için (8 bölge - anterior ve posterior serebral korteks; hipokampüste CA1, CA2, CA3 ve dentat girus; anterior ve posterior striatum) 40X magnifikasyon ile resim çekilmiş ve değerlendirilmiştir (84).

3.7 Biyokimyasal Ölçümler

3.7.1 Beyin doku örneklerinin toplanması ve ELISA kit analizi için hazırlanması

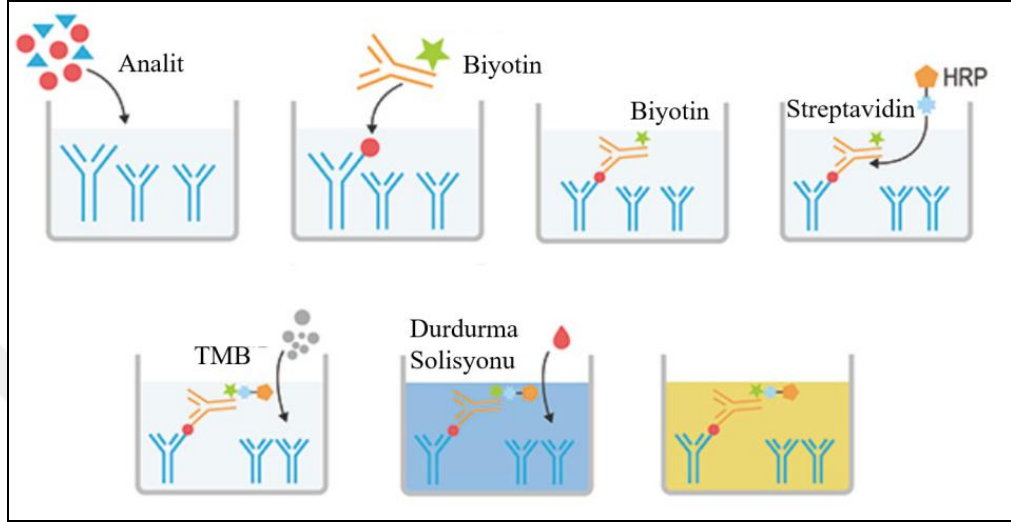
P30. günde dekapitasyon sonrası toplanan beyin dokuları -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Ölçüm gününde beyin dokusundan 1 gram doku kesilerek hassas terazide tartılıp (Shimadzu - AUW/220D) üzerine 9 ml çalışma solüsyonu (140 mmol KCl+Deiyonize su içinde) eklenmiştir. Sonrasında doku 20 saniye süreyle homojenize edilmiştir (Isolab - Homogenizer-light duty). Homojenize edilen dokular +4 °C'de, 7000 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir (Hettich ZENTRIFUGEN-Micro200R). Süpernatant elde edilmiş ve ELISA Kit'te kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.7.2 Beyin dokusunda TNF- α ve IL-1 β seviyelerinin ölçülmesi

Hasarın değerlendirilmesi için beyin dokusunda pro-inflamatuvar sitokinler TNF- α ve IL-1 β seviyeleri ELISA kit (Elabscience) yardımı ile üreticinin talimatları doğrultusunda ölçülmüştür (85).

TNF- α ELISA Kit'te sağlanan mikro ELISA plakası, sıçan TNF- α 'ya özgü bir antikora önceden kaplanmıştır. Standartlar veya numuneler, mikro ELISA plaka kuyularına eklenmiş ve spesifik antikor ile birleştirilmiştir. Daha sonra Sıçan TNF- α ve Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) konjugatına özgü biyotinlenmiş bir saptama antikoruna, her bir mikro plaka kuyusuna art arda eklenmiş ve inkübe edilmiştir. Serbest bileşenler yıkanmıştır. Substrat çözeltisi her kuyuya eklenmiştir. Yalnızca sıçan TNF- α , biyotinlenmiş saptama antikoruna ve Avidin-HRP konjugatı içeren oyuklar mavi renkte görünmüştür. Enzim-substrat reaksiyonu, stop solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırılmış ve renk sarı hale gelmiştir. Optik yoğunluk, 450 nm \pm 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik (BIO-TEK– Elx800)

olarak ölçülür. Optik yoğunluk değeri, Sıçan TNF- α 'nın konsantrasyonu ile orantılıdır. Numunelerin Optik yoğunluk değeri, standart eğriyle karşılaştırılarak numunelerdeki sıçan TNF- α konsantrasyonunu hesaplanmıştır.



Resim 18. Sandviç elisa test prosedürü.

IL-1 β ELISA kiti, Sandwich-ELISA prensibini kullanmaktadır. Bu kitle sağlanan mikro ELISA plakası, sıçan IL-1 β 'ye özgü bir antikorla önceden kaplanmıştır. Standartlar veya numuneler, mikro ELISA plaka kuyularına eklenmiştir ve spesifik antikor ile birleştirilmiştir. Daha sonra sıçan IL-1 β ve Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) konjugatına özgü biyotinlenmiş bir saptama antikorunu, her mikro plaka kuyusuna art arda eklenmiş ve inkübe edilmiştir. Serbest bileşenler yıkanmıştır. Substrat çözeltisi her kuyuya eklenmiştir. Yalnızca sıçan IL-1 β , biyotinlenmiş saptama antikorunu ve Avidin-HRP konjugatı içeren oyuklar mavi renkte görünmüştür. Enzim-substrat reaksiyonu, stop solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırılmış ve renk sarı hale gelmiştir. Optik yoğunluk, 450 nm \pm 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik (BIO-TEK– Elx800) olarak ölçülmüştür. Optik yoğunluk değeri, sıçan IL-1 β konsantrasyonu ile orantılıdır. Numunelerin Optik yoğunluk değeri, standart eğriyle karşılaştırılarak numunelerdeki sıçan IL-1 β konsantrasyonu hesaplanmıştır.

3.7.3 Beyin dokusunda ELISA Kit ile BDNF ve S100 β protein seviyelerinin ölçülmesi

Beyinden türetilen nörotrofik faktör (BDNF), gelişim sırasında nöronların hayatta kalması ve farklılaşmasının değerlendirilmesi için ölçülmüştür (86). Bu ELISA kiti (Elabscience), Sandwich-ELISA prensibini kullanır. Bu kitede sağlanan mikro ELISA plakası, sıçan BDNF'ye özgü bir antikorla önceden kaplanmıştır. Standartlar veya numuneler, mikro ELISA plaka kuyularına eklenmiş ve spesifik antikor ile birleştirilmiştir. Daha sonra sıçan BDNF ve Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) konjugatına özgü biyotinlenmiş bir saptama antikorunu, her bir mikro plaka kuyusuna art arda eklenmiş ve inkübe edilmiştir. Serbest bileşenler yıkanmıştır. Substrat çözeltisi her kuyuya eklenmiştir. Yalnızca sıçan BDNF, biyotinlenmiş saptama antikorunu ve Avidin-HRP konjugatı içeren kuyucuklar mavi renkte görünmüştür. Enzim-substrat reaksiyonu, stop solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırılmış ve renk sarı hale gelmiştir. Optik yoğunluk, 450 nm \pm 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik (BIO-TEK– Elx800) olarak ölçülmüştür. Optik yoğunluk değeri, sıçan BDNF konsantrasyonuyla orantılıdır. Numunelerin Optik yoğunluk değeri, standart eğriyle karşılaştırılarak numunelerdeki sıçan BDNF konsantrasyonu hesaplanmıştır.

S100 β seviyeleri astrogliaziste artmakta ve çeşitli çalışmaların astrositlerdeki artan S100 β seviyelerini dejeneratif ve enfeksiyöz beyin bozukluklarının patofizyolojisi ile ilişkilendirmesi açısından ölçülmüştür (87). Bu ELISA kiti (Elabscience), Sandwich-ELISA prensibini kullanır. Bu kitede sağlanan mikro ELISA plakası, sıçan S100 β 'ye özgü bir antikorla önceden kaplanmıştır. Standartlar veya numuneler, mikro ELISA plaka kuyularına eklenmiş ve spesifik antikor ile birleştirilmiştir. Daha sonra sıçan S100 β ve Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) konjugatına özgü biyotinlenmiş bir saptama antikorunu, her bir mikro plaka kuyusuna art arda eklenmiş ve inkübe edilmiştir. Serbest bileşenler yıkanmıştır. Substrat çözeltisi her kuyuya eklenmiştir. Yalnızca sıçan S100 β , biyotinlenmiş saptama antikorunu ve Avidin-HRP konjugatı içeren kuyucuklar mavi renkte görünmüştür. Enzim-substrat reaksiyonu, stop solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırılmış ve renk

sarı hale gelmiştir. Optik yoğunluk, 450 nm \pm 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik (BIO-TEK– Elx800) olarak ölçülmüştür. Optik yoğunluk değeri, sıçan S100 β 'nin konsantrasyonu ile orantılıdır. Numunelerin Optik yoğunluk değerini standart eğriyle karşılaştırılarak numunelerdeki sıçan S100 β konsantrasyonu hesaplanmıştır.

3.7.4 Kolon dokusunda MPO düzeyi ölçümü

Doku MPO aktivitesi, nötrofil infiltrasyonunu gösteren biyokimyasal bir parametredir. Bu amaçla beyin ve kolon doku örnekleri %0,5'lik HETAB (Heksadesiltrimetilammonyum bromide) (50mM potasyum fosfat tamponu içinde; pH:6) ile 10 kez sulandırılarak homojenize edilip, 12.000 rpm'de, 4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen peletten süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 50 mM potasyum-fosfat tamponu içinde tekrar homojenize edilmiştir. Daha sonra her bir tüpe 50 mM potasyum fosfat tamponu + o-dianisidin. 2HCl (20 mg/ml) + H₂O₂ (20 mM) + örnek konulmuş ve su banyosunda 37°C'de 3 dakika süren reaksiyon %2'lik sodyum azid ile durdurulmuştur. Örnekler 5.000 rpm'de 4 °C'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantların abzorban değerleri 460 nm'de spektrofotometrede (UV-2600/UV-VIS Spectrophotometer-SHIMADZU) okutulmuştur (88).

3.7.5 Kolon dokusunda MDA düzeyi ölçümü

Oksidan hasarın bir göstergesi olan MDA düzeyinin ölçüldüğü bu yöntemde, beyin ve kolon doku örnekleri ağırlıklarınının 10 katına denk gelen miktarda %10'luk triklorik asit solüsyonu ile homojenize edildikten sonra 3.000 rpm'de ve 4 °C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar ayrılarak bir kez daha 10.000 rpm'de 8 dk. santrifüj edilmiştir. 750 μ l miktardaki örnekler cam tüplerde 20 dakika boyunca kaynatılarak elde edilen renk değişimi spektrofotometrede (UV-2600/UV-VIS/Spectrophotometer-SHIMADZU) 535 nm'de ölçülmüş ve $1.56 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ katsayısı ile lipid peroksidasyon düzeyi MDA cinsinden belirlenmiştir (88).

3.7.6 Kolon dokusunda GSH düzeyi ölçümü

Dokudaki endojen antioksidan GSH miktarının ölçüldüğü bu yöntemde, beyin ve kolon doku örnekleri ağırlıklarının 10 katına denk gelen miktarda %10'luk triklorik asit solüsyonu ile homojenize edildikten sonra 3.000 rpm'de ve 4 °C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar ayrılarak 10.000 rpm'de 8 dakika daha santrifüj edilmiştir. Modifiye Ellman yöntemi (40 mg DTNB + %1 Na sitrat) kullanılarak GSH miktarı spektrofotometrik (UV-2600/UV-VIS/Spectrophotometer-SHIMADZU) olarak 412 nm'de ölçülmüştür (88).



3.8 İstatistiksel Analiz

Kontrol grubu ve Hipoksik iskemi grubu karşılaştırıldığında, bağımsız değişken iskemi oluşturma amaçlı oklüzyon ve düşük oksijenli hava solunmasıdır. Hipoksik iskemi ile Tedavi grupları karşılaştırıldığında, bağımsız değişken üç ayrı doz olarak uygulayacağımız (-) fenserin tedavisidir.

Bağımlı değişkenlerimiz ise refleks ölçümleri, fiziksel gelişim göstergeleri ve lokomotor davranış ölçümleri, motor ve kognitif değerlendirme testleri (ayak izi testi, merdiven testi ve yeni nesne tanıma testi), biyokimyasal parametreler ve mikroskopik hasarlardır.

Hasta ve kontrol grupları, hasta ve tedavi grupları arasındaki farkı göstermede verilerin analizleri için tek yönlü Varyans analizi (Oneway ANOVA) ve Tukey-Kramer testleri kullanılmıştır. Çalışmada elde edilen tüm verilerin istatistiksel analizi GraphPad Prism 6.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) programı kullanılarak yapıldı ve p değerinin 0,05'den küçük olması ($p < 0,05$) durumunda veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4 BULGULAR

4.1 Yavrularda Fiziksel Gelişim Göstergelerinin Değerlendirilmesi

(-) Fenserin'in etkin tedavi dozunu belirlemek için; Hİ, tedavi dozları (1 mg/kg, 2,5mg/kg, 5 mg/kg) ve kontrol grubunda normal gelişimin oluşması ve sürdürülmesi gelişimin olgun forma ulaştığı kabul edilen referans günde gelişimin tamamlanması veya kazanılamaması olarak takip edilmiştir.

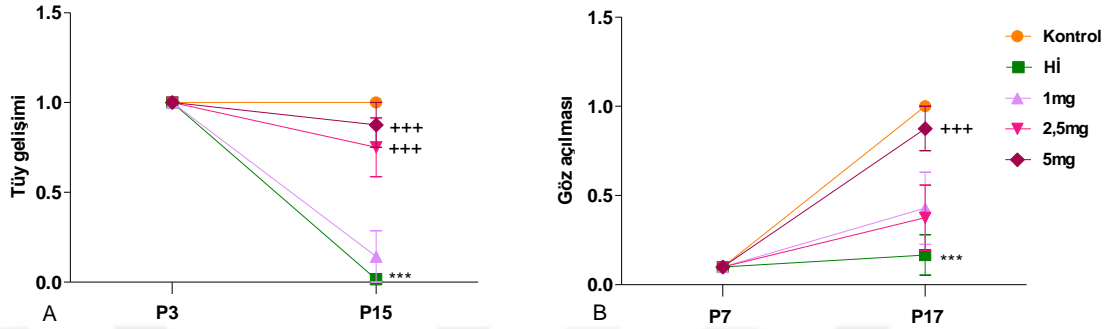
4.1.1 Tüy gelişimi ve göz açılması

Hipoksik iskemi ile hastalık indüklenmesinden ve kontrol grubunda yalancı insizyon oluşturulmasından sonra P15. günde yavrularda pembe deri görünmeyecek şekilde gövdenin tamamen tüy ile kaplanması ve P17. günde iki gözün bilateral olarak aynı seviyede açılması beklenmiştir.

Kontrol grubunda sağlıklı tüy gelişimi P15. günde görülmüş, Hİ grubunda kontrole göre belirgin şekilde tüy gelişim bozukluğu görülmüştür ($p<0,001$) (Şekil 1A). Hİ grubunda hasarın yoğun olarak olduğu bölge olan sol hemisferde sol baş çevresi, sol göz çevresi tüyelerinin gelişiminin kontrol grubuna kıyasla deri yüzeyini örtemeyecek şekilde seyrek olduğu; göğüs kafesi ve özellikle arka bacaklarda çizgilenme şeklinde gelişmiştir. 1 mg/kg doz grubunda baş çevresinde tüylenme bozukluğu Hİ grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermezken; 2,5 mg/kg doz ve 5 mg/kg doz gruplarında tüylenme bozukluğu Hİ'ye kıyasla düzelmiş ve kontrol grubuyla benzerlik göstermiştir ($p<0,001$) (Şekil 1A).

Kontrol grubunda yavrular P17. günde her iki göz için de gözü tam açabilme becerisine sahip hale gelmişlerdir. Hİ grubunda ise, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında göz açılması P17. günde olgunlaşmamış sol göz açma becerisi elde edilememiştir ($p<0,001$) (Şekil 1B). Göz açma becerisi 1 mg/kg ve 2,5 mg/kg

tedavi gruplarında istatistiksel bir anlamlı fark göstermezken 5 mg/kg doz gruplarında P17. günde gözü açabilme becerisi Hİ grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermiştir ($p<0,001$) (Şekil 1B).



Şekil 1. Kontrol, Hİ ve tedavi gruplarında nörogelişim belirteci olarak, (A) tüy gelişimi ve (B) göz açılması.

(*** $p<0,001$, Kontrol grubuna kıyasla. +++ $p<0,001$, Hİ grubuna kıyasla. Hİ: hipoksik iskemi.)

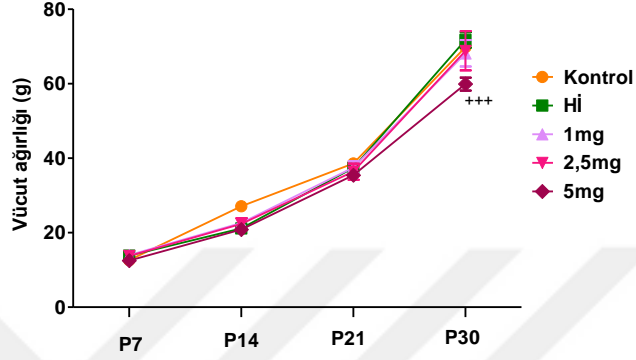
4.1.2 Diş gelişimi

P10.günde diş minelerinin damakta tamamen görünür olması ve beyaz olması beklenmektedir. Kontrol grubunda diş gelişimi beklendiği üzere P10. günde tamamlanmış, Hİ grubu ve tedavi gruplarında P10. günde diş gelişimini tamamlayamamıştır.

4.1.3 Vücut ağırlığı

Vücut ağırlıkları P7, P14, P21. ve P30. günde ölçülmüştür. P14.gün hastalık indükleme modelinin ilk etkisinin görüldüğü gündür. Vücut ağırlığının gruplara göre değişimi incelendiğinde Hİ grubunun kilo ortalamasının kontrol grubundan düşük; 1 mg/kg doz ile 2,5 mg/kg doz gruplarının kontrol grubuna benzer ve Hİ grubundan yüksek ölçülse de görülse de, farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

P21.günde tüm gruplarda kilo artışı yaşanmış fakat gruplararası istatistiksel bir fark bulunamamıştır. P30.gündeki vücut ağırlıkları incelendiğinde is sadece 5 mg/kg tedavi grubunda Hİ grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p<0,001$) (Şekil 2).



Şekil 2. Kontrol, Hİ ve tedavi gruplarında günlere göre vücut ağırlıkları değişimi.

(Sadece P30.gün için 5 mg/kg tedavi grubu +++ $p<0,001$, Hİ grubuna kıyasla. Hİ: hipoksik iskemi.)

4.2 Refleks Gelişiminin Değerlendirilmesi

(-) Fenserin'in etkin tedavi dozunu belirlemek için; Hİ, tedavi dozları (1 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg) ve kontrol grubunda normal gelişimin oluşması ve sürdürülmesi gelişimin olgun forma ulaştığı kabul edilen referans günde başarılı olunması beklenmiştir.

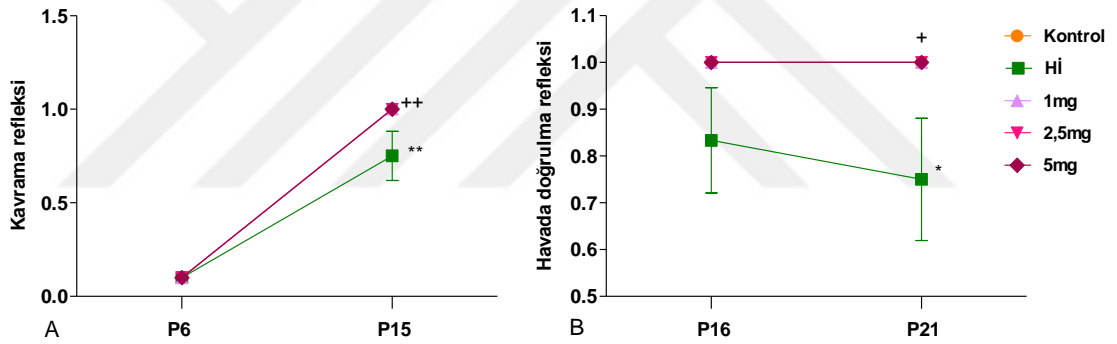
4.2.1 Yüzye doğrulma ve negatif jeotaksi

P6. ve P10. Yüzye doğrulma günde tüm gruplarda, gruplararası fark olmamaksızın başarılı olarak tanımlanmıştır. Bu refleks parametresinde gruplar arası istatistiksel fark oluşmamıştır.

P6. ve P15. Günde negatif jeotaksi tüm gruplarda gruplararası fark olmaksızın başarılı olarak tanımlanmıştır. Bu refleks parametresinde gruplar arası istatistiksel fark oluşmamıştır.

4.2.2 Kavrama refleksi ve havada doğrulma refleksi

P6. günde kavrama refleksi hiçbir grup için başarılı olarak tamamlanamamıştır. P15.günde ise sadece Hİ grubunda kontrole kıyasla istatistiksel olarak fark bulunmuştur ($p<0,001$) (Şekil 3A). Tedavi dozları arasında bir farklılık olmaksızın, tüm yavrular Hİ grubuna kıyasla kavrama becerisini edinmişlerdir ($p<001$) (Şekil 3A).



Şekil 3. Kontrol, Hİ ve tedavi gruplarında günlere göre (A) kavrama refleksi ve (B) havada doğrulma refleksi analizleri.

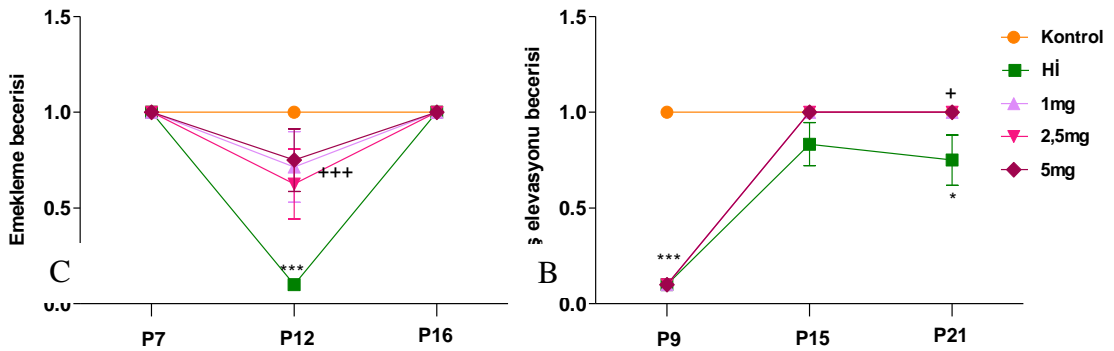
(* $p<0,05$, ** $p<0,01$, Kontrol grubuna kıyasla; + $p<0,05$, ++ $p<0,01$ Hİ grubuna kıyasla. Hİ: hipoksik iskemi.)

P16. günde kontrol ve tedavi grubundaki tüm yavrular bu refleks değerlendirmesinde başarılı olmuştur. Hİ grubu ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir ($p<0,01$) Aynı günde tüm tedavi grupları; istatistiksel olarak Hİ'ye göre yüksek değerlere ($p<0,01$), sahipken kontrol grubu ile benzerdi.

P21.günde Hİ grubu kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir ($p<0,05$). Tedavi grupları ise Hİ grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek değerlere sahipti. ($p<0,05$) (Şekil 3B).

4.3 Lokomotor Davranışlar: Emekleme ve Baş Elevasyonu

Yavrularda P14. günde emekleme, P21. günde baş elevasyonunu sağlayabilmesi değerlendirilmiştir. Gelişimle birlikte ağırlık merkezinin baştan gövdeye indirilmesi; buna bağlı olarak baş elevasyonunun kazanılması ve ağırlık merkezinin gövde merkezine konumlanarak dört ekstremitede kordineli hareketin kazanılması; kuyruk pozisyonlama ile dengenin oryante edilmesi beklenmiştir. Kuyruk vücudun orta hattından yere parallel hayali bir çizgi çekildiğinde o çizginin üzerinde ve ortalama 30-45 derecelik açıda yukarı bakmalıdır. Baş elevasyonunda ileriye bakacak şekilde başın orta hattaki hayali çizgiyi takip etmesi gerekmektedir. P7.günde tüm yavru grupları emekleme becerisini edinmiştir. Gruplararası istatistiksel olarak bir fark bulunmamaktadır. P12. günde kontrol grubu bu becerisini sürdürebilirken, Hİ grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir beceri kaybı görülmüştür ($p<0,001$) (Şekil 4A). Aynı gün için istatistiksel olarak tüm tedavi grupları Hİ grubuna göre artış göstermektedir ($p<0,001$).



Şekil 4. (A) günlere göre emekleme becerisi ve (B) baş elevasyon becerisi.

(* $p<0,05$, *** $p<0,001$, Kontrol grubuna kıyasla; + $p<0,05$, +++ $p<0,001$, Hİ grubuna kıyasla. Hİ: hipoksik iskemi.)

P9. günde Hİ, 1 mg/kg, 2,5 mg/kg ve 5 mg/kg tedavi gruplarının hepsinde istatistiksel olarak anlamlı bir baş elevasyon becerisi kaybı gözlemlenmiştir ($p<0,001$), kontrol grubuna kıyasla. P15. günde doz grupları ve Hİ grubunda bu beceride artış görülmüş fakat istatistiksel bir anlamlılık çıkarılamamıştır. P21. gün ölçümünde baş elevasyon becerisi Hİ grubunda anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0,05$), kontrol grubuna kıyasla. Doz gruplarında ise ($p<0,05$), Hİ grubuna kıyasla. P21. günde baş elevasyonu tüm gruplarda sağlanmıştır ve istatistiksel olarak gruplararası bir fark oluşmamaktadır. (Şekil 4B).

4.4 Motor Becerinin Değerlendirilmesi

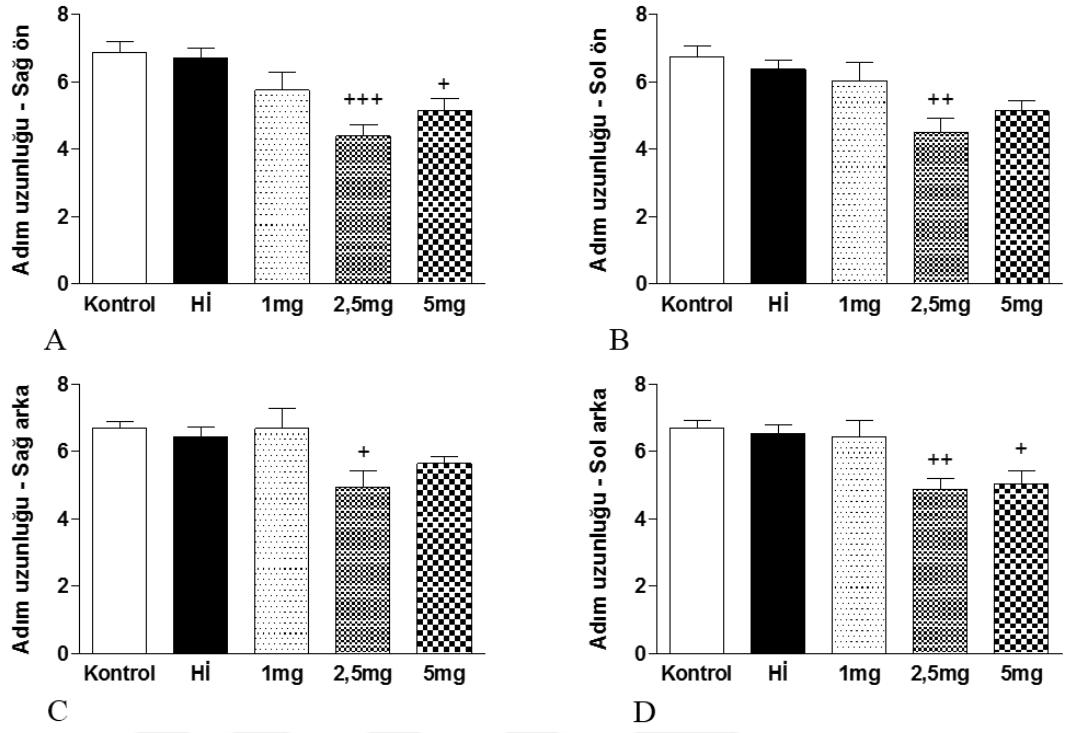
Yürümenin olgunlaştığı P22. günde yürüme becerisi ayak izi testi ile ölçülmüş ve yürüme ayrıca skorlanmıştır. P24. günde ise Merdiven testi ile skorlama yapılmıştır.

4.4.1 Ayak izi testi: adım uzunluğu, adım genişliği, pati genişliği

Ayak izi testinde adım uzunluğu, adım genişliği ve pati genişliği her bir dört pati için tüm yavrularda değerlendirilmiştir. Ölçümlerde her dört pati için, kontrol grubu ve Hİ grubu arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır.

2,5 mg/kg ile tedavi adım uzunluğu sağ ön pati ($p<0,001$) adım uzunluğu sol ön pati ($p<0,01$), Adım uzunluğu sağ arka pati ($p<0,05$) Adım uzunluğu sol arka pati ($p<0,01$), Hİ grubuna kıyasla anlamlı bir azalma göstermiştir.

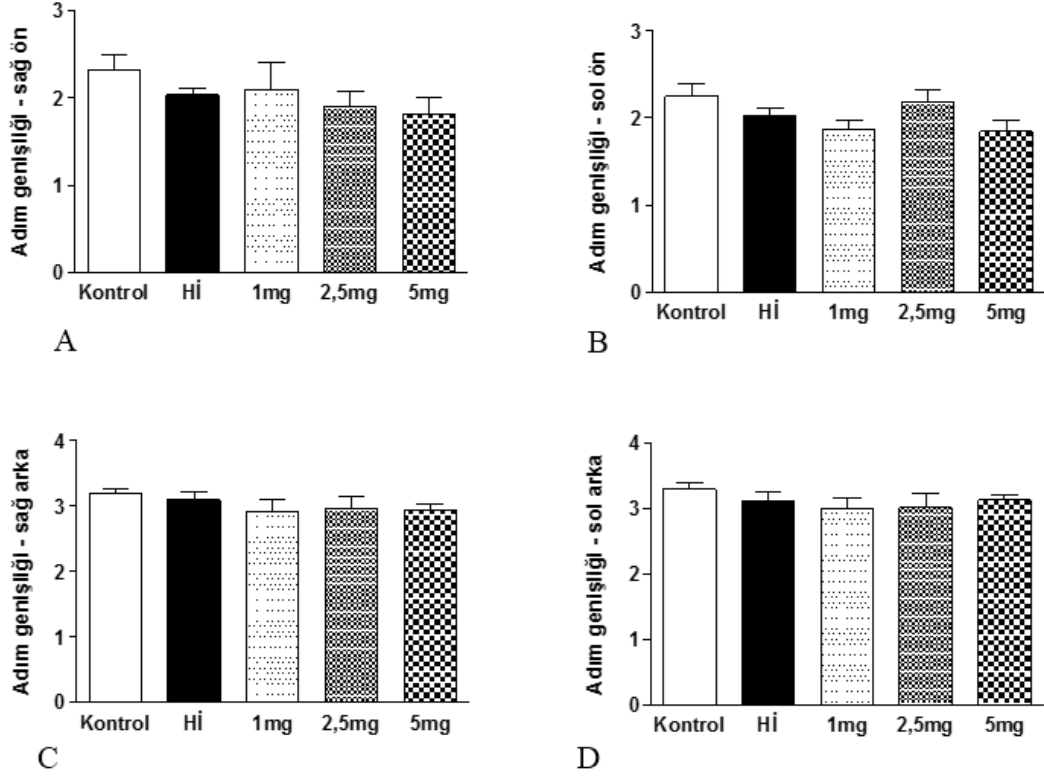
5 mg/kg doz grubunda ise sadece sağ ön ($p<0,05$) ve sol arka pati adım genişliği ($p<0,05$) Hİ grubuna kıyasla anlamlı bir fark bulunmuştur (Şekil 5).



Şekil 5. Sağ ön (A), sol ön (B), sağ arka (C), sol arka (D) patilerin adım uzunluğu.

(+p<0,05, +++p<0,001, +++p<0,001, Hİ grubuna kıyasla. Hİ: hipoksik iskemi.)

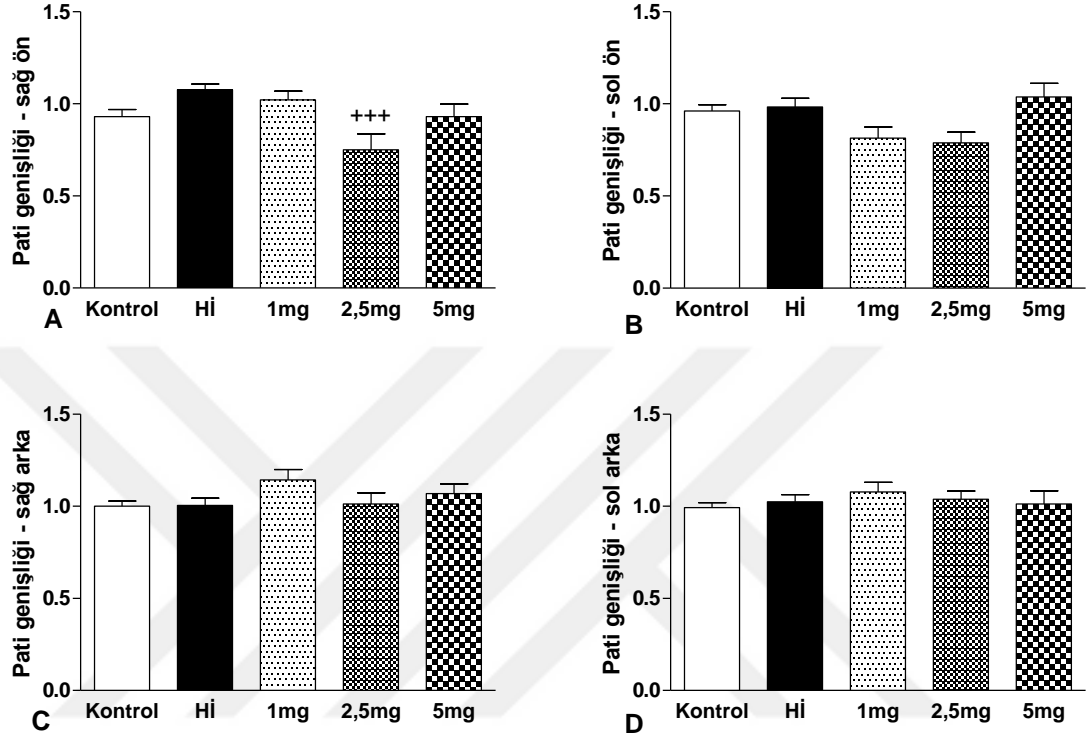
Adım genişliği ölçümleri hiçbir grupta adım genişliği istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir (Şekil 6).



Şekil 6. Sağ ön (A), sol ön (B), sağ arka (C), sol arka (D) patilerin adım genişliği.

(Hİ: hipoksik iskemi.)

Ölçümlerde pati genişliği için sadece sağ ön patide 2,5 mg/kg Hİ grubuna kıyasla istatistiksel olarak azalma göstermiştir ($p<0,001$) (Şekil 7A).

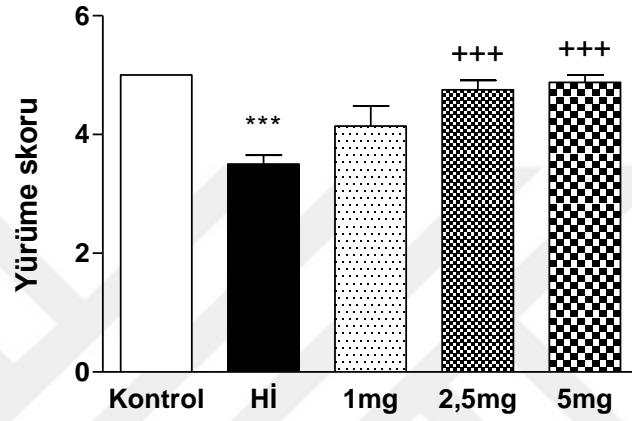


Şekil 7. Sağ ön (A), sol ön (B), sağ arka (C), sol arka (D) patilerin adım genişliği.

(+++ $p<0,001$, Hİ grubuna kıyasla. Hİ: hipoksik iskemi.)

4.4.2 Yürümenin skorlanması

Yürüme skorlanmasında Hİ grubunun skor sonucunda kontrole göre anlamlı bir azalma gösterirken ($p<0,001$), 2,5 mg/kg ($p<0,001$) ve 5 mg/kg ($p<0,001$) doz gruplarında Hİ grubuna kıyasla anlamlı artış görülmüştür (Şekil 8).

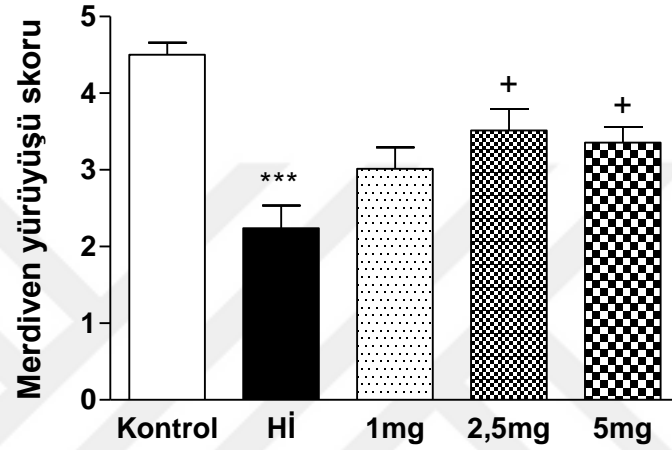


Şekil 8. Yürüme skor düzeyleri.

(*** $p<0,001$, kontrol grubuna kıyasla. 2,5 mg/kg ve 5 mg/kg doz grupları için +++ $p<0,001$, Hİ grubuna kıyasla. Hİ: hipoksik iskemi.)

4.4.3 Merdiven testi

Hİ grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalış gözlenirken ($p<0,001$), tedavi gruplarında ise 2,5 mg/kg doz grubunda ($p<0,05$) ve 5 mg/kg doz grubunda ($p<0,05$) Hİ grubuna kıyasla anlamlı bir artış gözlenmiştir (Şekil 9).

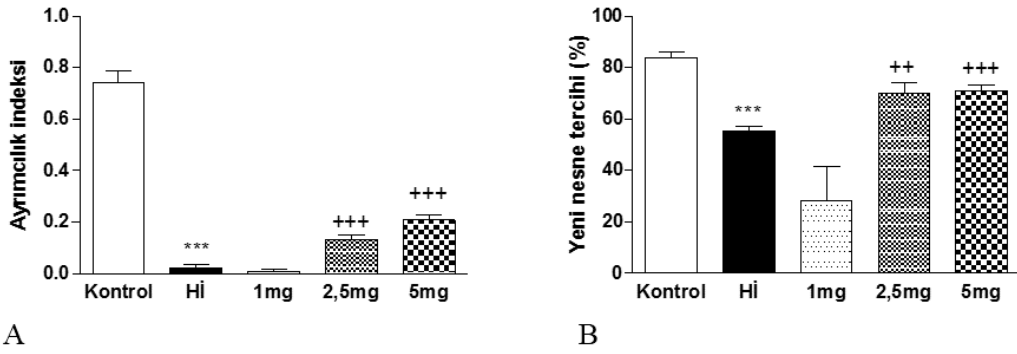


Şekil 9. Merdiven testi skor düzeyleri.

(*** $p<0,001$, kontrol grubuna kıyasla. + $p<0,05$, Hİ grubuna kıyasla. Hİ: hipoksik iskemi.)

4.5 Kognitif Becerilerin Değerlendirilmesi: Yeni Nesne Tanıma Testi

P29. günde nesneye karşı olan ayrımcılık indeksinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde Hİ grubunda, kontrole kıyaslandığında anlamlı bir azalma görülmüştür ($p<0,001$). 1 mg/kg doz grubunda anlamlı bir ayırım artışı görülmezken, Hİ grubu ile karşılaştırıldığında 2,5 mg/kg ($p<0,001$) ve 5 mg/kg ($p<0,001$) tedavi gruplarında anlamlı bir artış görülmüştür (Şekil 10A).



Şekil 10. (A) Ayrımcılık indeksi ve (B) Yeni nesne tercih yüzdesi.

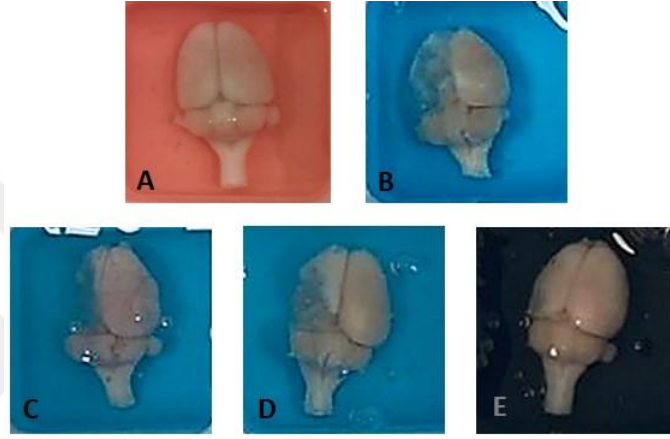
(*** $p<0,001$, kontrol grubuna kıyasla. +++ $p<0,001$ ve ++ $p<0,01$ Hİ grubuna kıyasla. Hİ: hipoksik iskemi.)

Yeni nesne tercih yüzdeleri kıyaslandığında ise Hİ grubunda kontrole kıyasla anlamlı bir azalma görülürken ($p<0,001$), 2,5 mg/kg ($p<0,01$) ve 5 mg/kg doz ($p<0,001$) grubunda anlamlı bir artış görülmüştür (Şekil 10B).

4.6 Histolojik İnceleme

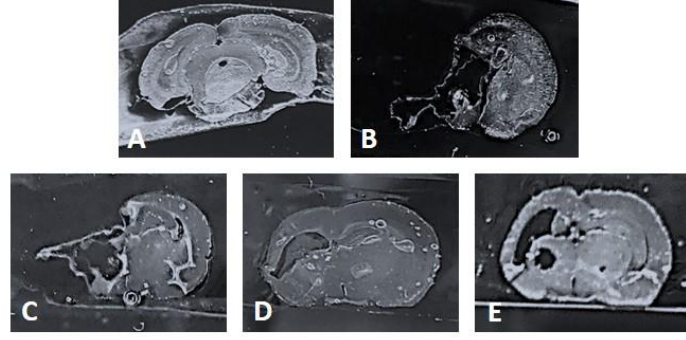
4.6.1 Beyin dokusunun makroskopik olarak değerlendirilmesi

Mikroskopik değerlendirme öncesindeki hasar ve iyileşme düzeyleri, kontrolle kıyaslandığında makroskopik olarak anlamlı farklılıklar göstermiştir (Resim 19).



Resim 19. OCT tampon gömülen beyin dokuları: Kontrol (A), Hİ (B), 1 mg tedavi (C), 2,5 mg tedavi (D) ve 5 mg tedavi grubu (E).

Kesit alımı sırasında lizinli lamdaki görüntüler incelendiğinde ise Hİ grubunda hasar etkisi makroskopik olarak görülmektedir. Tedavi gruplarında hemisfer bütünlüğünün makroskopik olarak korunduğu ve yapı bütünlüğünün Hİ grubuna göre iyileştirdiği görülmektedir (Resim 20).



Resim 20. Lizinli lamdaki beyin kesitleri. Kontrol (A), Hİ (B), 1 mg tedavi (C), 2,5 mg tedavi (D) ve 5 mg tedavi grubu (E).

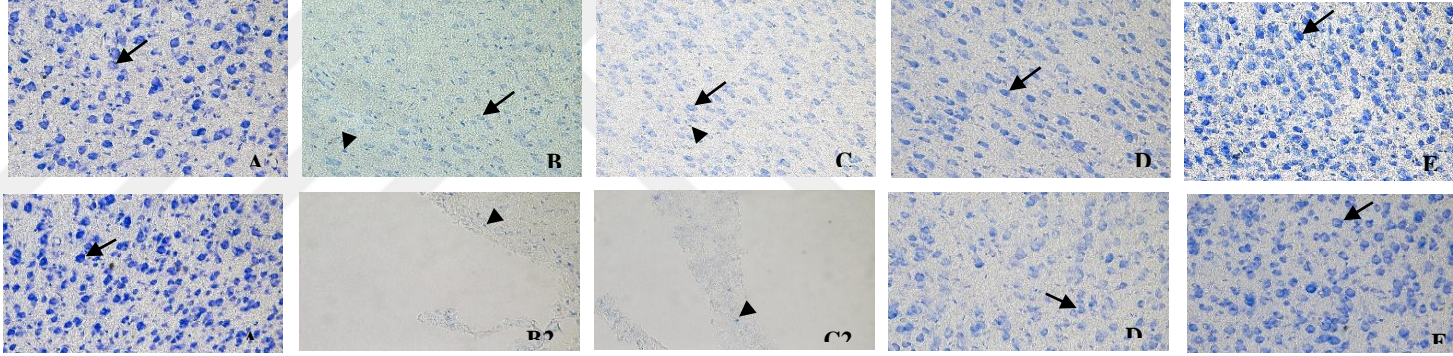
4.6.2 Beyin dokusunda cresyl violet boyama ile nöronal kayıp üzerinden beyin hasarının yorumlanması ve beyin dokusunda hematoksilen ve eozin boyama ile hasarlı nöronların belirlenmesi

Fotoğraflarda, hipoksik iskemik uygulamasından sonra anterior korteks, anterior striatumda (sağ ve sol hemisfer), hipokampus'un CA1, CA2, CA3 ve dentat girus bölgelerinde (yalnızca sağ hemisfer), posterior striatumda (sağ ve sol hemisfer) ve posterior kortekste (yalnızca sağ hemisfer) cresyl violet (A-E) boyamasının görüntüsü sunulmuştur (Resim 21-25). Görüntülerde de yer aldığı üzere hipoksiye maruz kalan beyin dokusunda ipsilateral hemisferde sadece anterior korteks, anterior striatum ve posterior striatum bölgeleri gelişim gösterirken, diğer beyin bölgelerinde oluşamamış ve görüntülenememiştir. Anterior korteks bölgesine ait doku örneklerinde ise hipoksiye maruz kalmış (B) ve 1 mg/kg (-) fenserin tedavisi uygulanmış (C) beyin dokusunda ipsilateral hemisferin ensefalopatik görünümde olduğu ve BOS sıvısının yoğun seyrettiği görülmüştür. Anterior striatum'a ait olan ipsilateral doku örneklerinde ise kontralaterale kıyasla (B-E) striatom yapılarının bozulduğu, (-) fenserin tedavisi ile striatomların düzelmeye göstermediği gözlemlenmiştir.

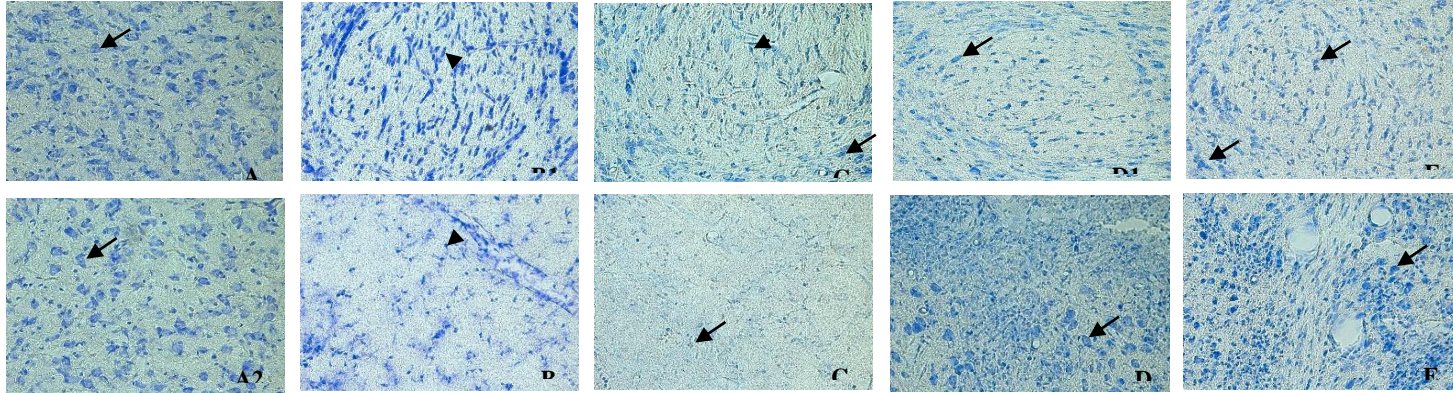
Bununla birlikte, doza bağılı olarak (-) fenserin tedavisi ile piknotik hücrelerin yerini normal görünümlü ve normal çekirdekli hücrelere bırakmaya başladığı gözlenmiş 5 mg/kg tedavi almış grupta normal hücre sayısının belirgin şekilde arttığı görülmüş, bu grubun kontrole en yakın grup olduğu tespit edilmiştir.

Hipokampus kesitlerinde ise 5 mg/kg tedavi iyileştirici ve normal hücre sayısını artırıcı bir etki göstermesine rağmen, 2,5 mg/kg tedavi dozunun daha etkili olduğu ve kontrole en yakın görüntüyü verdiği görüldü. Bununla birlikte hipokampus dokusunun CA1, CA2, CA3 ve dentat girus bölgelerinde hipoksi ile granüler hücre tabakasında değişiklik ve bozulmalar görüntülenmiştir. 1 mg/kg ve 5 mg/kg (-) fenserin tedavisinin granüler hücre tabakasındaki bozulmayı iyileştirmeye olumlu etkisi gözlemlenmezken, 2,5 mg/kg (-) fenserin tedavisinin granüler hücre tabakasının korunmasına önemli ölçüde katkı sağladığı görülmüştür.

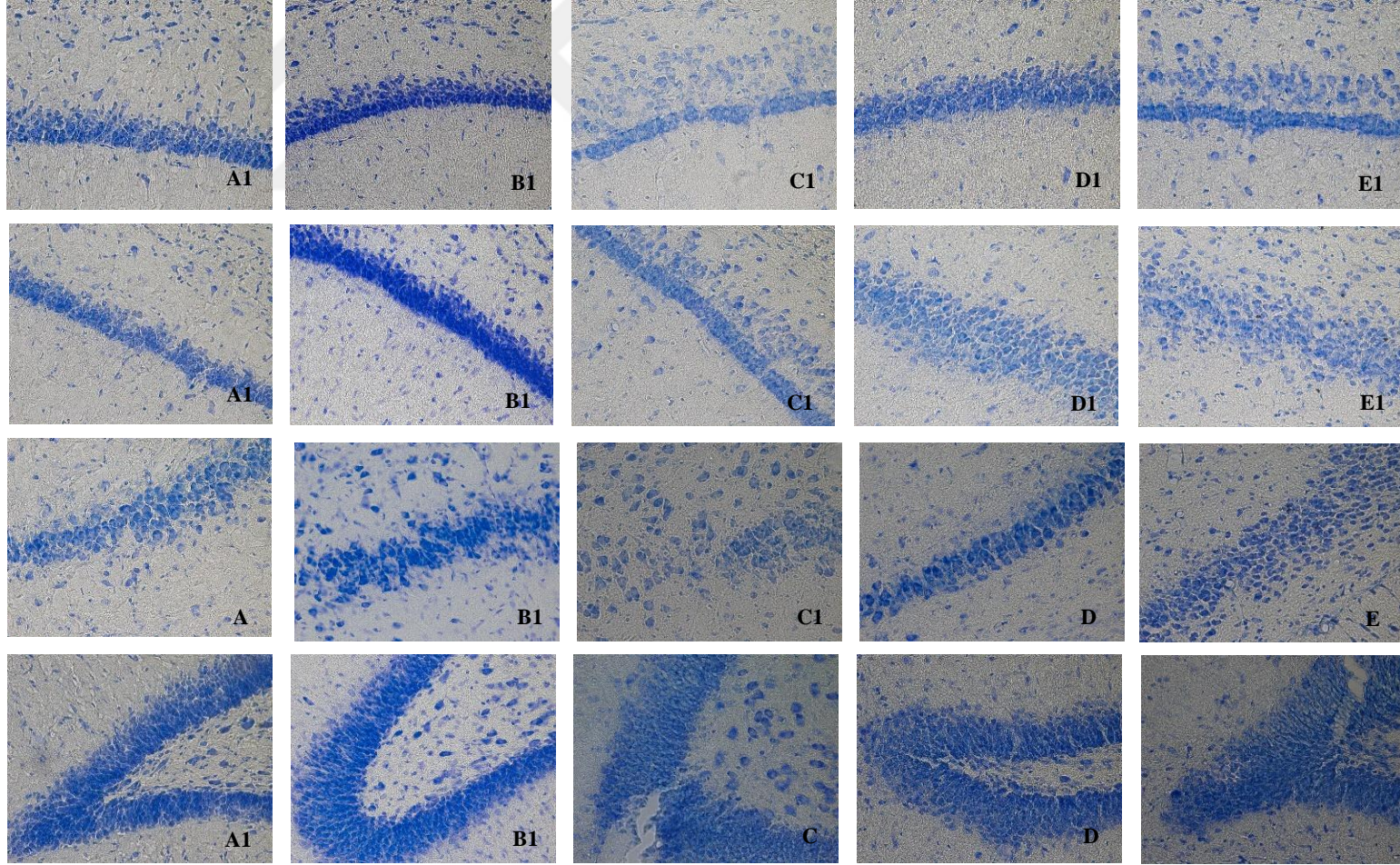
Fotoğraflarda, hipoksik iskemi indüklenmesinden sonra anterior korteks, anterior striatum, ve posterior striatum bölgelerinde hemotoksilen eozin boyamasının görüntüleri sunulmuştur (Resim 26). Hipoksiye maruz kalmış hem Hİ grubu beyin dokusunda hem de üç tedavi grubunda da beyin dokusunda piknotik hücreler görüntülenmiştir. Diğer taraftan hipoksiye maruz kalan beyin dokusunda ipsilateral hemisferde sadece anterior korteks, anterior striatum ve posterior striatum bölgeleri gelişim gösterirken, diğer beyin bölgeleri oluşmamıştır. Bununla birlikte, (-) fenserin tedavisi ile doza bağılı şekilde dokularda piknotik hücrelerin yerini normal görünümlü ve normal çekirdekli hücrelere bırakmaya başladığı görülmüştür. 5 mg/kg (-) fenserin tedavi grubunda normal hücre sayısının en fazla olduğu saptanmıştır.



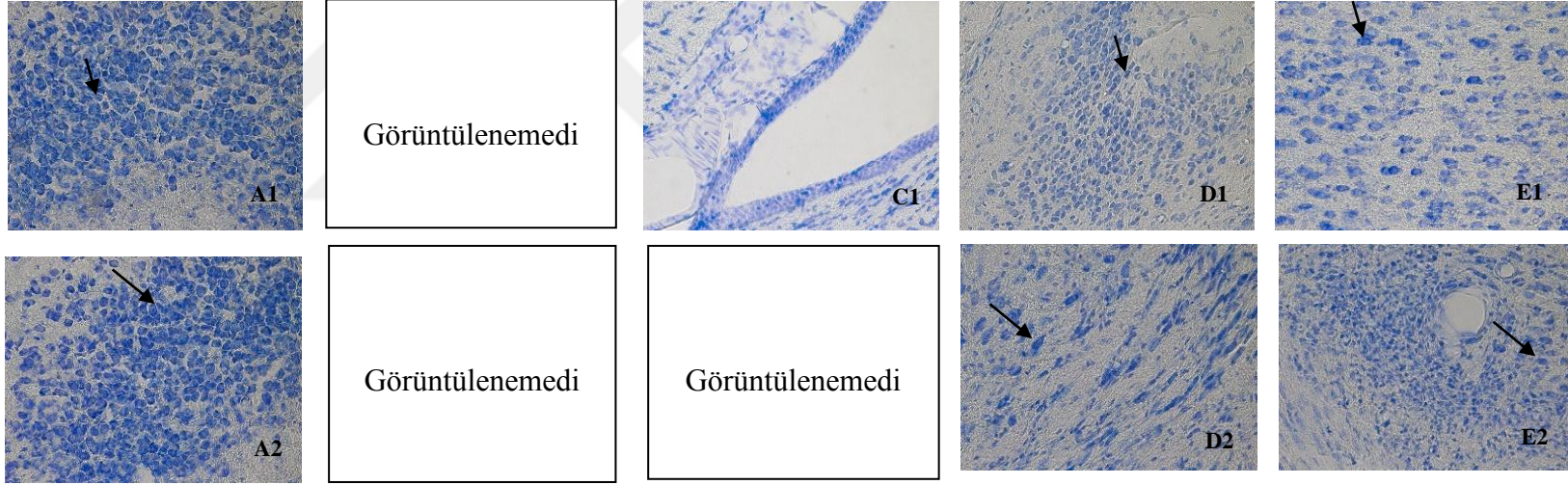
Resim 21. Krezil viyole ile boyanmış anterior korteks dokuları: Kontrol (A), Hİ (B), 1mg/kg tedavi (C), 2,5 mg/kg tedavi (C), 5 mg/kg tedavi grubu (D). 1: Sağ hemisfer, 2: Sol hemisfer. Oklar, cresyl violet boyaması (A-E) altındaki canlı hücreleri göstermektedir.



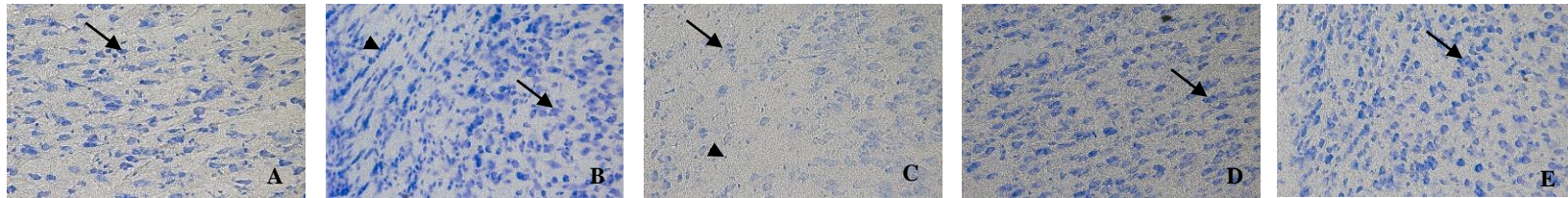
Resim 22. Krezil viyole ile boyanmış anterior striatum dokuları: Kontrol (A), Hİ (B), 1mg/kg tedavi (C), 2,5 mg/kg tedavi (C), 5 mg/kg tedavi grubu (D). 1: Sağ hemisfer, 2: Sol hemisfer. Oklar, cresyl violet boyaması (A-E) altındaki canlı hücreleri göstermektedir.



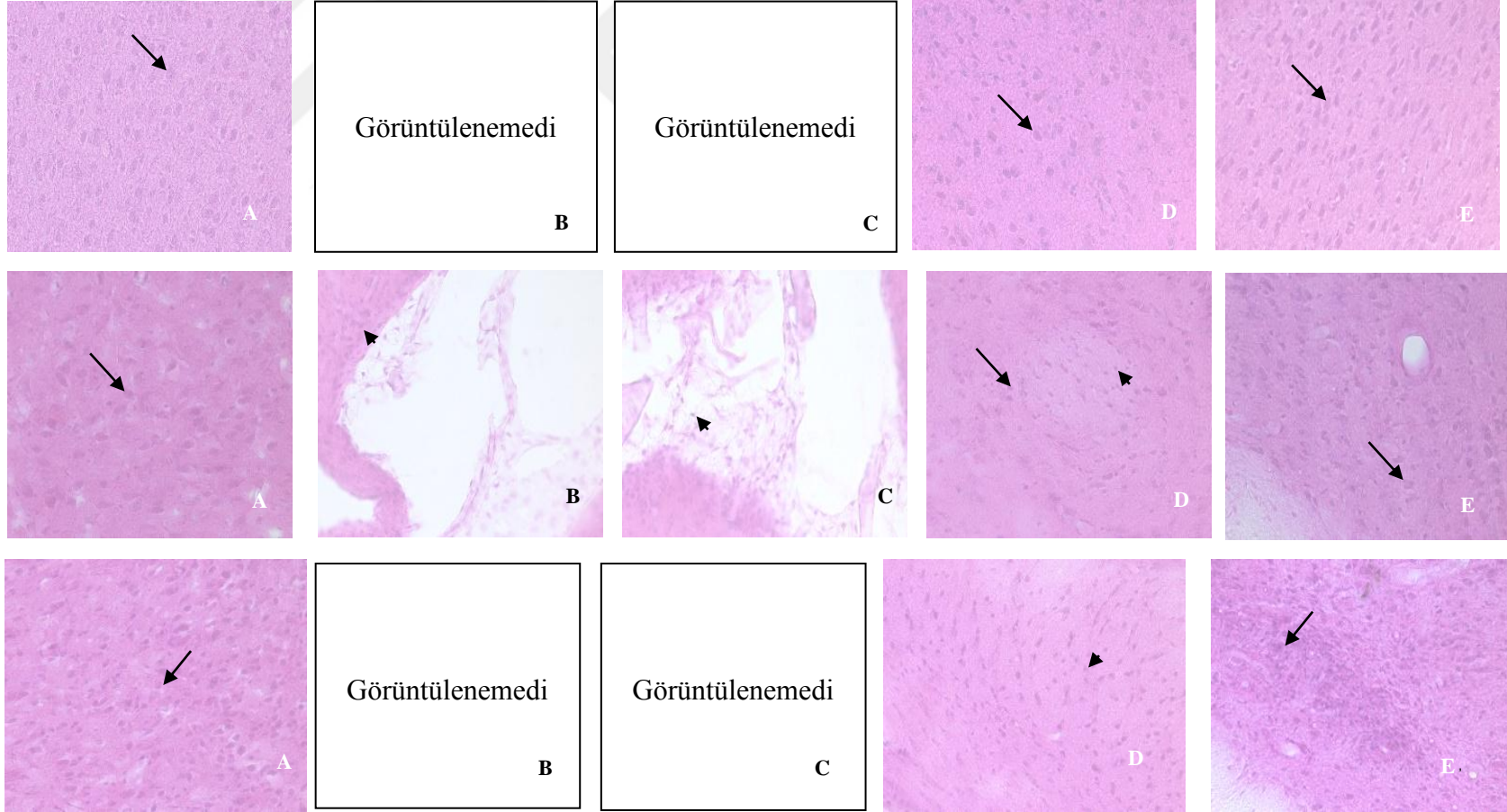
Resim 23. Krezil viyole ile boyanmış Hipokampus bölgeleri: Kontrol (A), Hİ (B), 1mg/kg tedavi (C), 2,5 mg/kg tedavi (C), 5 mg/kg tedavi grubu (D). 1: Sağ hemisfer. Dört satır sırasıyla; CA1, CA2, CA3, Dentat girus.



Resim 24. Krezil viyole ile boyanmış posterior striatum dokuları: Kontrol (A), Hİ (B), 1mg/kg tedavi (C), 2,5 mg/kg tedavi (C), 5 mg/kg tedavi grubu (D). 1: Sağ hemisfer, 2: Sol hemisfer. Oklar, cresyl violet boyaması (A-E) altındaki canlı hücreleri göstermektedir.



Resim 25. Krezil viyole ile boyanmış posterior korteks dokuları: Kontrol (A), Hİ (B), 1mg/kg tedavi (C), 2,5 mg/kg tedavi (C), 5 mg/kg tedavi grubu (D). 1: Sağ hemisfer. Oklar, cresyl violet boyaması (A-E) altındaki canlı hücreleri göstermektedir.

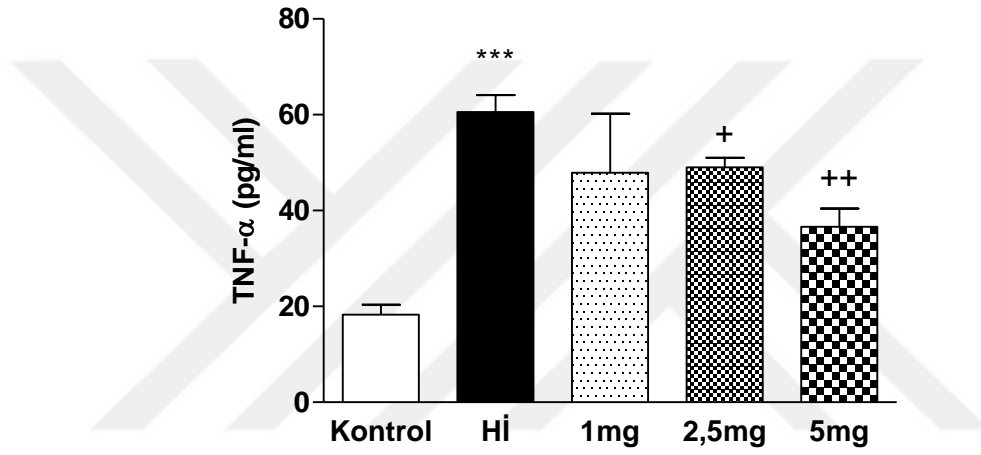


Resim 26. Hematoksilen ve eozin ile boyanmış anterior korteks, anterior striatum, ve posterior striatum dokuları: Kontrol (A), Hİ (B), 1mg/kg tedavi (C), 2,5 mg/kg tedavi (C), 5 mg/kg tedavi grubu (D). 1: Sağ hemisfer. Oklar, hematoksilen ve eozin boyaması (A-E) altındaki canlı hücreleri göstermektedir.

4.7 Biyokimyasal Analizler ile Beyin Dokusunda Pro-inflamatuvar Sitokinler

TNF- α ve IL-1 β Seviyelerinin Ölçülmesi

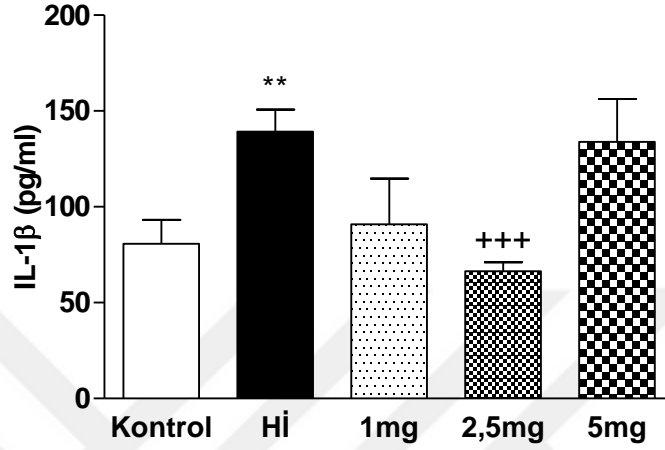
P30. gündeki ölçüm sonucunda; Hİ grubunda TNF- α seviyesi kontrole kıyasla anlamlı şekilde artış göstermiştir ($p<0,001$). 5 mg/kg tedavi ($p<0,01$) ve 2,5 mg/kg tedavi grubunda ise ($p<0,05$), Hİ'ye kıyasla azalış görülmüştür (Şekil 13).



Şekil 11. TNF- α seviyeleri.

(*** $p<0,001$, kontrol grubuna kıyasla. + $p<0,05$ ve ++ $p<0,001$, Hİ grubuna kıyasla. Hİ: hipoksik iskemi.)

P30. gündeki ölçüm sonucunda; Hİ grubunda IL-1 β seviyesi kontrole kıyasla anlamlı şekilde artış göstermiştir ($p<0,01$). 2,5 mg/kg dozda ise ($p<0,001$) Hİ grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir azalma oluşmuştur (Şekil 14).

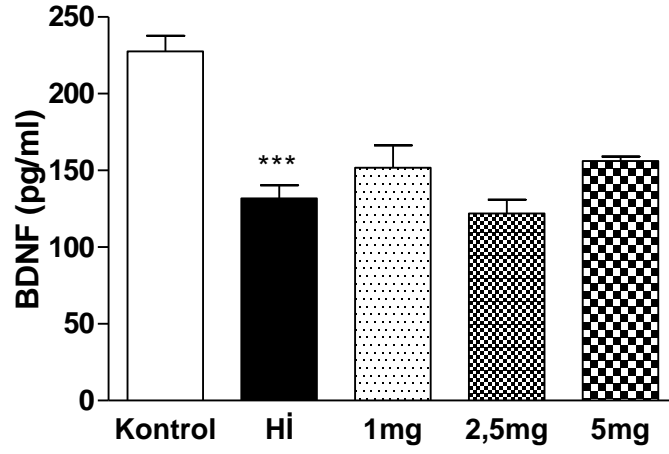


Şekil 12. IL-1 β seviyesi.

(** $p<0,01$, kontrol grubuna kıyasla. +++ $p<0,001$, Hİ grubuna kıyasla. Hİ: hipoksik iskemi.)

4.8 Biyokimyasal Analizler ile Beyin Dokusunda BDNF ve S100 β Protein Seviyelerinin Ölçülmesi

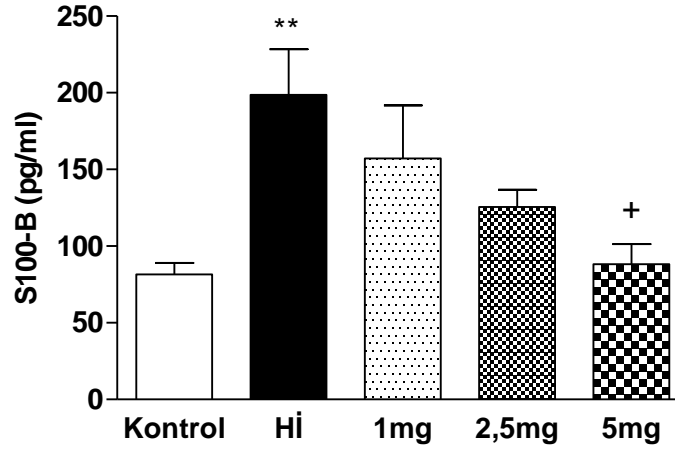
P30. gündeki ölçüm sonucunda; Hİ grubunda BDNF protein seviyesi kontrole kıyasla anlamlı şekilde azalma göstermiştir ($p<0,001$) (Şekil 15).



Şekil 13. BDNF protein seviyesi.

(***p<0,001, kontrol grubuna kıyasla. Hİ: hipoksik iskemi.)

P30. gündeki ölçüm sonucunda; Hİ grubunda S100 β protein seviyesi kontrole kıyasla anlamlı şekilde artış göstermiştir (p<0,01). 5 mg/kg dozda ise Hİ'ye kıyasla anlamlı bir azalma gerçekleşmiştir (p<0,05) (Şekil 16).

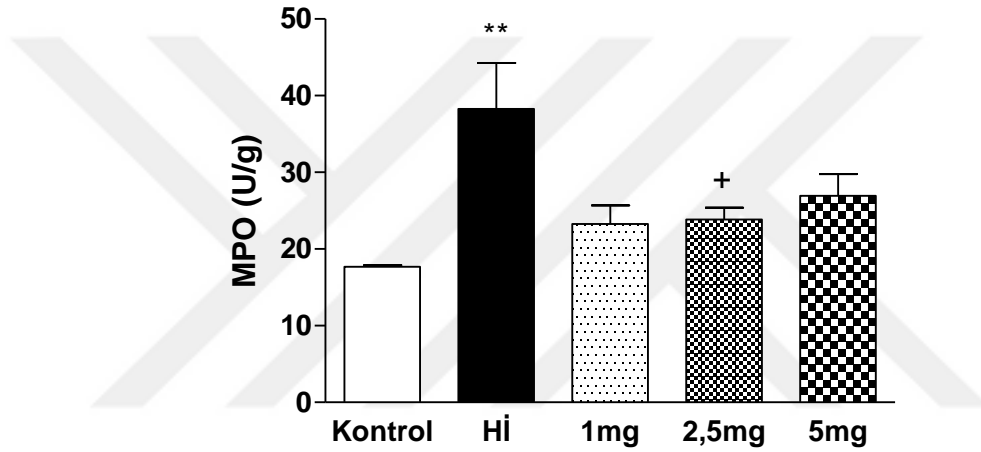


Şekil 14. S100 β protein seviyesi.

(**p<0,01, kontrol grubuna kıyasla. +p<0,05, Hİ grubuna kıyasla. Hİ: hipoksik iskemi.)

4.9 Kolon Dokusunda Myeloperoksidaz (MPO), Malondialdehit (MDA) ve Glutasyon (GSH) Ölçümleri

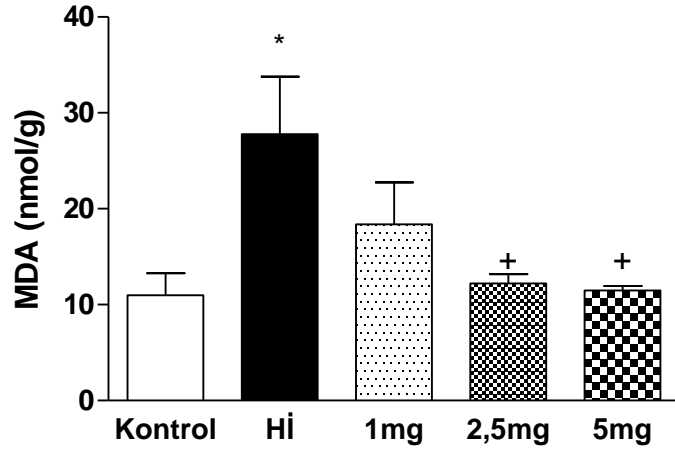
P30. günde kolon dokusunda yapılan MPO ölçümünde Hİ grubunda kontrole kıyasla anlamlı bir yükseliş meydana gelmiştir ($p<0,001$). Tedavi gruplarında sadece 2,5 mg/kg doz grubunda Hİ grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gerçekleşmiştir ($p<0,01$) (Şekil 17).



Şekil 15. Kolonda MPO seviyesi.

(** $p<0,001$, kontrole kıyasla. + $p<0,001$, Hİ grubuna kıyasla. Hİ: hipoksik iskemi.)

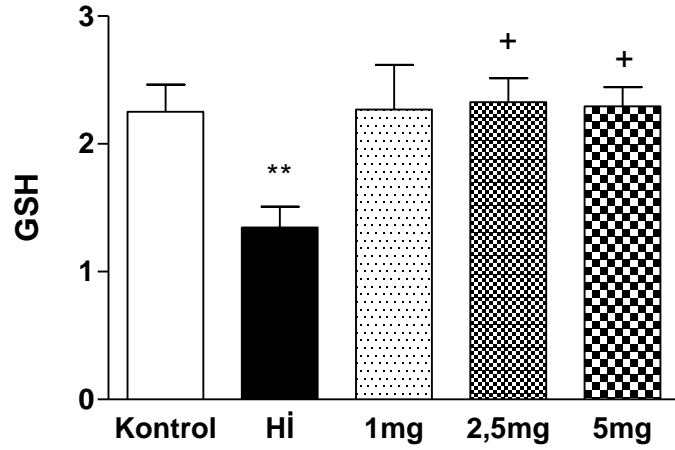
P30. günde kolon dokusunda yapılan MDA ölçümünde Hİ grubunda kontrole kıyasla anlamlı bir yükseliş meydana gelmiştir ($p<0,05$). Tedavi gruplarında 2,5mg/kg dozda ($p<0,05$) ve 5mg/kg doz grubunda ($p<0,05$), Hİ grubuna göre anlamlı bir azalma gerçekleşmiştir (Şekil 18).



Şekil 16. Kolonda MDA ölçümü.

(*p<0,05, kontrole kıyasla. +p<0,05, Hİ grubuna kıyasla. Hİ: hipoksik iskemi.)

Kolon dokusunda yapılan GSH ölçümünde Hİ grubunda kontrole kıyasla anlamlı bir azalma meydana gelmiştir (p<0,01). Tedavi gruplarında 2,5mg/kg dozda (p<0,05) ve 5mg/kg doz grubunda (p<0,05), Hİ grubuna kıyasla (Şekil 19).



Şekil 17. Kolonda GSH ölçümü.

**p<0,01, kontrole kıyasla. +p<0,05, Hİ'ye kıyasla. Hİ: hipoksik iskemi.)

5 TARTIŞMA

Araştırmada, postnatal yedi günlük Sprague-Dawley sıçan yavrularında sol ortak karotid arter ligasyon ve ardından oklüzyonu ile iskemik hasar, 150 dakikalık %8 Oksijen ile dengelenmiş %92 Azot ile hipoksik hasar meydana getirilerek, gelişimini sürdüren neonatal beyinde hipoksik iskemik hasar meydana getirilmiştir. Tedavi olarak (-) fenserin 1 mg/kg, 2,5 mg/kg ve 5 mg/kg olmak üzere üç ayrı doz olarak uygulanmış; nöro gelişim, motor ve kognitif gelişimin 23 günlük takibi sonrasında 30. günlerinde tüm yavrulardan alınan beyin dokuları histopatolojik ve biyokimyasal olarak analiz edilmiştir. Araştırma sonucu olarak etkin tedavi dozu 5 mg/kg olarak sunulmuştur. (-) Fenserin'in olgunlaşmasını sürdüren beyinde nöroprotektif olarak etkili olduğu ve hipoksik iskemiden kaynaklanan serebral palsi modelinde nöro gelişim, motor ve kognitif gelişime dair defisitleri iyileştirdiği belirlenmiştir.

Neonatal hipoksik iskemi (HI), doğum asfiksisi ve azalmış serebral kan perfüzyonu sonucu beyine giden oksijen miktarının azalması ile beyinde gerçekleşen hasar olarak tanımlanmakta ve serebral palsiye neden olmaktadır (89). Yaşam boyu zihinsel ve fiziksel engellerle sebep olan sınırlayıcı bir patolojidir (90). Görüntüleme sonuçlarındaki nöroanatomik bulgular klinik fenotiple koreledir ve vücuttaki tutulum derecesi hafif ile şiddetli arasında değişkenlik göstermektedir. Bunun sonucunda klinik progresyon bireysel farklılıklarla sürmektedir. Neonatal mortalite ve morbiditenin önde gelen nedenlerinden biri (91) olmasına rağmen henüz sınırlı tedavilerle semptomatik yaklaşımlar uygulanmaktadır çünkü kesin bir tedavisi bulunmamaktadır (92).

Serebral palsinin patofizyolojisi tam olarak bilinmemektedir fakat nöro inflamasyonun bu beyin hasarında temel rol oynadığı bilinmektedir (93). Hasara cevaben periventriküler lökomalazi, ventrikül çevrelerinde fokal nekroz ile, olgunlaşmamış beyaz maddedeki mikroglia ve astrosit hücrelerinde yaygın aktivasyon görülmektedir (94). Serebral palsi'nin ilerlemeyen bir hasar olduğu algısı olsa da gelişimi süren beyinde bu hasara uyumlu şekilde adaptif gelişimsel değişiklikler oluşmaktadır (95).

Merkezi sinir sisteminde, nöronlar, mikroglialar ve astrositler asetilkoline doğrudan cevap verirler. Nöronal olmayan bu hücreler kısa ve uzun dönem sinaptik fonksiyon ve plastisiteyi etkilerlediklerler. Hipoksik iskemiye bağlı gelişen serebral palsy modelinde kolinerjik yolak ile ilişkili çok az sayıda yayın bulunmaktadır. Hipoksik iskemiye bağlı gelişen beyin hasarında kolinerjik innervasyon gelişiminin bozulduğu gösterilmiştir. Oluşan fonksiyonel anormallerin kolinerjik nöronal devrelerdeki yeniden yapılanma değişimleriyle alkali olduğu düşünülmektedir (96). Buradan yola çıkılarak kolinerjik nöronların ve asetilkolinin (ACh) serebral palside iyileştirici etkileri araştırılmıştır. Araştırmada bu hedef ACh esterase inhibitörü ile asetilkolin düzeyi yüksek tutularak sağlanmıştır.

Hastalığın tedavisini zorlaştıran temel sebepler bulunmaktadır. Bunlar; inflamasyon ve beyindeki hasarın beyaz maddede yaygın olması, beyinde doğum öncesi veya sırasında meydana gelen hasarda doğum sonrasında uygulanan tedaviler ile motor fonksiyonda iyileşme sağlanamamasıdır. Dolayısıyla minimum yan etkileri olan etkili bir terapötik ajana ihtiyaç vardır (93). Araştırma hipotezimiz beyin hasarında kolinerjik sistem üzerinden gerçekleştirilecek bir tedavinin nöroprotektif olacağı üzerine kurulmuş, bu amaçla araştırmamızda, kan beyin bariyerini aşabilen, hızlı emilerek beyinde hızla yoğunlaşan ve yan etkilerin görülme sıklığını bu yolla azaltan, toksisite etkisi bulunmayan bir asetil kolin esterase inhibitörü (AChEI) tercih edilmiştir. Bu yüzden AChEI'lerin arasından asetil-seçici, geri dönüşümlü olmasıyla üstün olan (-) Fenserin'in tedavi edici etkileri araştırılmıştır. (-) Fenserin'in etkinliği literatürde Serebral palsy ve hipoksik iskemi üzerine hiç araştırılmamış olduğundan araştırma özgün bulgular ortaya koymaktadır.

Seçilen tedavi dozları literatürdeki diğer araştırmalar üzerinden belirlenmiştir. 21 aylık sıçanlarda yapılan bir araştırmada, (-) - fenserin 1mg/kg, 2 mg/kg ve 3 mg/kg dozlarında intraperitoneal olarak beş gün boyunca uygulanmış, minimum doz olarak 1 mg/kg tercih edilmiş ve 1 mg/kg ile 2 mg/kg dozda yan etkinin bulunmadığı belirtilmiştir (70). Diğer bir çalışmada ise sıçanlarda (-) fenzerin 1,5 mg/kg, 3,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 5,0 mg/kg, 7,5 ve 10,0 mg/kg dozlarda intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Verilen tüm dozların öğrenmede artışa sebep olduğu belirtilmiş ve

yan etki gözlenmemiştir (71). Farelerle yapılan başka bir çalışmada vücut ağırlığı 28-32 gr arasında değişen, 5 aylık yetişkin farelerde (-) fenzerin 2,5 mg/kg ve 7,5 mg/kg dozda intraperitonel olarak 21 gün boyunca uygulanmış ve yan etki görülmemiştir (72). Diğer bir makalede ise, 6-8 haftalık olan 30 gram ağırlığındaki farelere beş gün boyunca (-) - fenzerin 2,5 ve 5,0 mg/kg dozlarında intraperitonel olarak uygulanmıştır. Çalışmada travmatik beyin hasarında kognitif beceri kazanımında 2,5 mg/kg doz daha başarılı bulunmuştur (68). Bu makalelerde belirtilen doz uygulamaları değerlendirildiğinde, araştırmada hipoksik iskemi oluşturulduktan sonra tedavi olarak 1 mg/kg, 2,5 mg/kg ve 5 mg/kg dozlarında (-) Fenzerin'in 23 gün boyunca günde bir kez ip olarak verilmesi planlanmıştır. Daha önce ilacın 7,5 mg/kg dozda 21 gün boyunca uygulanmış olması ve yan etki gözlenmemesi (-) fenzerinin uzun dönemde uygulanmasına dair çekinceyi de gidermektedir. Bu bilgilerden yola çıkılarak araştırmamızda 23 gün boyunca 1 mg/kg, 2,5 mg/kg ve 5 mg/kg olmak üzere üç ayrı dozun etkinliği araştırılmıştır. Araştırmada doz seçimlerinde neonatal beyindeki etkilere dair referans bulgular sunularak bu anlamda hipoksik iskemi ve Serebral palside (-) fenzerin ile alakalı yapılan ilk doz çalışması olarak literatüre katkı sunmaktadır.

Araştırmada serebral palsy oluşumunu indüklemeye kullanılan Rice vannucci modeli, perinatal beyin hasarı oluşturmada kullanılan en yaygın hayvan modelidir (14). Bu model, yeni doğanda hipoksik iskemiye bağlı beyin hasarını göstermede 1981'den beri güvenle kullanılmakta olup; kendi içinde varyasyonları oluşturularak bir çok sıçan ve fare türünde uygulanmıştır. Kemirgenler üzerinde yaygın şekilde çalışılmış olması dolayısıyla literatür kıyaslamasına en uygun model olmakta ve güvenilirliği ispatlanmış bir yöntem olarak öne çıkmaktadır (74). Araştırmada modelin uygulanma günü, postatal 7.gün (P7) olarak belirlenmiştir (15). Bunun sebebi, gelişimin bu aşamasında sıçan yavrusunun beyninin mikroanatomik olarak 32 ila 34 haftalık bir gebelikteki insan fetüsüne karşılık gelmesidir. Literatürde (-) Fenzerin tedavisinin Rice-Vannucci modeli ile daha önce denenmemiş olması araştırmanın bir diğer literatür katkısıdır.

Klinikte Serebral palsili çocuklarda, nöro anatomik görüntüleme ile hasar tanımlama sonrasında, patolojik refleksler, motor becerideki anormaliler ve yürüme bozuklukları ile entelektüel bozukluklar tedavi planı oluşturabilme amacıyla düzenli olarak takip edilir (97). Araştırmamız kliniği taklit edecek şekilde nöro gelişim, refleks gelişimi, lokomotor gelişim, motor gelişim ve kognitif gelişim parametreleri klinik ile benzer şekilde postnatal 30 gün boyunca takip edilmiştir. Rice vannucci modelinde nöro gelişimsel olarak çocuklardaki klinik takip ile gelişimsel sürecin takibini taklit eden bir hayvan çalışması örneği de bulunmamaktadır araştırma bu anlamda da kıymetli olmaktadır.

Araştırmada bu amaçla fiziksel gelişim için; tüy gelişimi, diş gelişimi, göz açılması ve vücut ağırlığı; refleks gelişimi ve patolojik refleks varlığını sorgulamak için; yüzeyde ve havada doğrulma refleksi, kavrama refleksi ve negatif jeotaksi; lokomotor beceri gelişimini gözlemlemek için ise; emekleme ve baş elevasyonu takip edilmiştir.

Nöro gelişimsel refleks yani ilkel refleks testleri, klinikte sinir sistemi olgunlaşmasını değerlendirmek için takip edilir. Ön belirteç olarak güvenilirler; olgunlaşan motor ve kognitif gelişimle tutarlıdır. Anormal reflekslerin varlığı, nöro gelişimsel bozukluklar için risklerin göstergeleridir ve reflekslerin oluşmaması, kaybolması gereken yaşta halen görülmesi, yeniden ortaya çıkması veya gecikmesi olarak görülebilmektedir. Patolojik refleksler sergilenen nöro gelişim ve diğer nöro gelişimsel yetersizlikleri taklit eden hayvan modellerinde de insan bebeklerde gözlemleneceği gibi anormal gelişimsel refleksler görülmektedir (118).

Araştırmamızda tüy gelişimi P3 ve P15. günlerde değerlendirilmiştir. P3. Günde tüm yavrularda gruplar arası fark olmaksızın tüy gelişimi başlamıştır. P7.günde kontrole yalancı insizyon ile cerrahi stres, hastalık ve üç ayrı tedavi grubuna ise hipoksik iskemi indüklenmiştir. P15. günde ölçümü yapılan bu gelişimsel parametrede hipoksik iskemi grubunda tüy gelişimi kaybedilmiştir. Tedavi gruplarında ise 2,5 mg/kg ve 5 mg/kg dozda istatistiksel anlamlılık gösteren, tüy

gelişimi kazanımı görülmüştür. Hastalıkta bozulan tüy gelişiminde en yüksek doz olan 5 mg/kg ile iyileşme sağlanmıştır.

Görsel algının bozulması SP'de temel bozukluklar arasında kabul edilir (107). Benzer şekilde literatür de hipoksik iskemik hasarın göz açılmasını geciktirdiğini göstermektedir (98). Hİ indüklenen hayvanlarda göz açılması araştırmamızda da gecikmiştir. Hİ grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında göz açılması P17. günde olgunlaşmamış sol göz açma becerisi hiç elde edilememiştir. Uyguladığımız tedavi ile en yüksek dozda anlamlı bir iyileşme görülmüştür. 5 mg/kg doz gruplarında P17. günde gözü açabilme becerisi Hİ grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir.

Serebral palside yetersiz beslenme kaynaklı vücut ağırlığı azalması sıklıkla görülmektedir. Yetersiz beslenmek büyüme geriliğe sebep olmakta; bağışıklık ve serebellar fonksiyonda azalma yaratmaktadır (119). Bu amaçla araştırmamızda vücut ağırlığı ölçümleri fiziksel gelişimi takip etmede ve günlük dozların belirlenmesinde kullanılmıştır. P7, P14, P21 ve P30. günde yapılan vücut ağırlığı ölçümleri sonucunda yavruların hepsi istikrarlı olarak kilo kazanmışlardır. Literatür bulgularımızı desteklemiş ve Wistar sıçanlarda Hİ sonucu aralıklı ölçümlerde kilo tüm gruplar için artmıştır (120). P30. günde sadece 5 mg/kg doz grubunda istatistiksel anlamlılık yaratan bir azalma görülmüştür. Bu ise kolinesteraz inhibitörlerinin kilo kaybına olan azaltıcı etkisi olarak literatür tarafından da desteklenmektedir (121).

Serebral palside el deformiteleri ve ilişkili işlevsel bozukluklar; kavrama becerisinde zayıflık sıklıkla görülmekte ve günlük yaşamdaki birçok aktivitede kısıtlılık yaratmaktadır (99). Hemiplejik çocuklarda etkilenen taraftaki el, kontralateral taraftaki ele göre azalmış beceri göstermektedir (100). Kliniği taklit eden araştırmamızda neonatal sıçanlarda kavrama becerisi P6. ve P15. günde değerlendirilmiş, P6. günde gruplararası fark bulunamaz ve beceri elde edilemezken, P15. günde Hİ grubunda kavrama becerisinde kontrole göre azalma; tedavi gruplarının tümünde ise Hİ'ye göre iyileşme görülmektedir. Literatürde de 7

günlük Wistar sıçanlarda üst ve alt patilerde kavrama becerisi değerlendirildiğinde kavramada Hİ grubunda başarıda azalma görülmüştür (122). (-) Fenserin tedavisi her üç tedavi dozunda da istatistiksel olarak kavrama becerisini iyileştirmiştir.

P6. ve P10. yüzeyde doğrulma P6. ve P15. günde negatif jeotaksi tüm gruplarda, gruplar arası fark olmaksızın başarılı olmuştur ve gruplar arası istatistiksel fark oluşmamıştır. Benzer şekilde literatürde Hİ için negatif jeotaksiste anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (101).

Serebral palsinin temel klinik özellikleri arasında abnormal yürüyüş paterni ve yürüme anormalileri bulunur (102,103). Bu amaçla hemisfer hasarına bağlı yürüyüş paterni değerlendirmede ayak izi testi, uzay algısı değişimine göre yürümenin değerlendirilmesinde ise merdiven testi kullanılmıştır. Literatürde birçok çalışma uzun dönemde lezyon ve motor performans değerlendirme verilerini paylaşmamıştır bunun sebebi kemirgenlerde hasarla ilişkili fiziksel defisit oluşumunun insanlara daha az benzerlik göstermesidir (104). İstemli hareketlerdeki bozulmalar insanlara göre çok daha az belirgin olmaktadır. Bu anlamda makroskobik olarak incelendiğinde hasar oluşumu nedeniyle sadece tek sağ hemisferi bulunan Hİ grubu hayvanlarında yürümeyi engelleyen fiziksel hiçbir motor defisit paterni ayak izi testi ile gözlemlenmemiştir. Literatür de bu bulguyu desteklemektedir (105).

Hipoksik iskemi indüklenmiş Wistar sıçanlarda yapılmış çalışmada merdiven testinde Hİ grubunda kontrole göre adımlama kalitesinde düşme, ipsilateral ön pati performansında azalma ve adım başına yapılan hataların arttığı gösterilmiştir (106). Benzer şekilde araştırmamızda merdiven testi uygulanan sıçan yavrularında da Hİ grubunda kontrole kıyasla anlamlı bir beceri azalması olmuş, doz gruplarında 2,5 mg/kg ve 5 mg/kg tedavi ile merdiven testindeki skor değerleri Hİ grubuna göre artış göstermiştir. Bu sonuçla birlikte Hİ'de adım yerleştirme kalitesinin (-) Fenserin ile iyileştirildiği ilk kez gösterilmiştir.

SP'li çocuklar sıklıkla bilişsel ve davranışsal bozukluklara sahip olmaktadır (108,109). SP'nin hayvan modellerinde, seçici ve uzun süreli öğrenme ile hafıza

bozuklukları gibi bir dizi bilişsel bozukluk gösterilmiştir (110). Araştırmamızda P27-P29. günler arasında yapılan yeni nesne tanıma testinde, bir aylık sıçan yavrularında öğrenme ve belleğin Hİ grubunda yüksek anlamlılıkta bir bozukluk gösterdiği ve başarının çok düştüğü gözlemlenmiştir. Literatürde Hİ hasara sahip kemirgenlerde, kademeli ve tekrarlı durumlara maruz kaldıklarında karmaşık bir bellek görevini öğrenebildikleri fakat aynı anda yüksek bir bellek talebi istendiğinde performanslarının düştüğü bulunmuştur (111). Elde ettiğimiz bulgular literatürle uyumludur (123): literatürde 7 günlük Hİ indüklenen Sprague-Dawley sıçanlarda ayrımcılık indeksi sonuçlarıyla benzer şekilde bizim araştırmamızda da Hİ grubunda ayrımcılık indeksinde azalma görülmüştür. Hİ yavrular test gününde yeni nesne ayrımı ve yeni nesneye ayrılması beklenen keşif süresi bakımından kontrol grubuna göre bellek ve öğrenme becerisinde geride kalmışlardır. (-) Fenserin ile ise öğrenme ve bellekte 2,5 mg/kg ile 5 mg/kg doz gruplarında iyileşme sağlanmıştır. İlacın 5 mg/kg dozu araştırmamızda öğrenme ve bellekte en etkin doz olarak sunulmaktadır.

Model ile serebral korteks, hipokampus, striatumda serebral palsiyi taklit eden hasar meydana getirilerek; doku hasarı üzerine ilacın nöroprotektif özelliğinin gösterilmesi için histolojik olarak beynin bu bölgelerinde ayrı ayrı nöronal yapı ve canlılık değerlendirilmesi yapılmıştır. Krezil viyole boyama ile hem ipsilateral hem kontraateral hemisferdeki nöronal canlılık belirlenmiştir. Bunun sonucunda Hİ ile meydana gelen nöronal kaybın, tedavi dozları ile iyileştiği görülmüş ve araştırmada anterior korteks, anterior ve posterior striatum için 5 mg/kg dozun iyileştirmede en etkin doz olduğu görülürken; hipokampüste CA1, CA2, CA3 ve dentat girus bölgelerinde ve ayrıca posterior kortekste hücresel yapıyı korumada 2,5 mg/kg dozun daha etkin olduğu görülmüştür. Hematoksilen ve eozin ile boyanmış anterior korteks, anterior striatum, ve posterior striatum dokularında ise etkin tedavi dozu 5 mg/kg kabul edilmiştir.

Bir immün aktivasyona yanıt olarak, fetal ve yenidoğan beyindeki mikroglyal hücreler ve astrositler, IL-1 β ve TNF-a gibi sitokinler salgılayarak, gelişen oligodendrositlerde ve nöronal progenitörlerde hasara neden olabilir (112,113). Bu amaçla araştırmamızda beyin dokusunda IL-1 β ve TNF-a seviyeleri incelenmiş; Hİ

grubunda IL-1 β ve TNF- α seviyelerinin literatürle uyumlu şekilde arttığı görülmüştür. Fenserin ile tedavi bu iki sitokinin seviyelerinde düşüşe sebep olmuştur. (-) Fenserin'in IL-1 β için etkin tedavi dozu 2,5 mg/kg; TNF- α için ise etkin tedavi dozu 5 mg/kg olarak belirlenmiştir.

Beyinden türetilen nörotrofik faktör (BDNF), gelişim sırasında nöronların hayatta kalması ve farklılaşmasında önemli bir role sahip olan bir nörotrofin ailesine aittir. Hücre hayatta kalımı ve çoğalmasındaki değişiklikler yoluyla nörogenesi de artırabilmektedir. Sinaps gelişimi, stabilizasyonu ve plastisitesinde BDNF'nin çoklu rolleri vardır. BDNF'nin sinaptik iletim ve plastisitede çoğunlukla öğrenme, hafıza ve davranışlar için kritik bir beyin bölgesi olan hipokampüste bir etkiye sahip olduğunu gösterilmiştir (114,115). Araştırmamızda BDNF düzeyi Hİ grubunda kontrole göre azalma göstermiştir. Fakat (-) Fenserin tedavisi ile bir iyileşme görülmemiştir.

Astroisitler, en yüksek S100 β ekspresyonuna sahip beyin hücresidir. S100 β seviyeleri astroglioziste artmakta ve çeşitli çalışmalar astrositlerdeki artan S100 β seviyelerini dejeneratif ve inflamatuvar beyin bozukluklarının patofizyolojisi ile ilişkilendirmektedir. Bununla birlikte, beyin hasarı durumunda astrositler, sitoplazmik süreçlerini hızla geri çekerek, çoğaldığı ve hasar alanına göç ederek reaktif gliozise yol açtığı bilinmektedir. Bu değişiklikler büyük ölçüde kan-beyin bariyerindeki değişime bağlıdır ve serum faktörleri ile lokal olarak salınan sitokinler aracılığı ile gerçekleşmektedir. Artan kanıtlar, S100 β 'nin nörogeniz sırasında, astrosit olgunlaşmasında ve granül öncü hücrelerinin göçünde rol oynayabileceğini göstermektedir (116). Ayrıca bir çalışmada TG farelerinde, perinatal hipoksi-iskemiye karşı S100 β 'de artan duyarlılık gösterilmiş, S100 β 'nin aşırı ekspresyonunun gelişmiş astrogliozis ve mikrogliozis ile Alzheimer hastalığına benzer patolojiyi hızlandırdığı gösterilmiştir (117). Araştırmamızda S100 β düzeyi Hİ grubunda kontrole göre artış göstermiştir ve literatürle uyumludur. (-) Fenserin tedavisi ile 5 mg/kg dozda iyileşme sağlanmıştır.

Oksidatif stres ve inflamasyon, serebral iskemi-reperfüzyon hasarının iki önemli patolojik sürecini oluşturmaktadır. Miyeloperoksidaz (MPO), serebral iskemi-reperfüzyon hasarın patolojik sürecinde hem oksidatif stres hem de nöroinflamasyonu tetikleyen kritik bir inflamatuvar enzim olarak terapötik bir hedef olmaktadır. MPO, iskemik hasar sonucunda infiltrate nötrofillerde, aktive edilmiş mikrogliyal hücrelerde, nöronlarda ve astrositlerde bulunur. Ayrıca reaktif oksijen (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) salınımını teşvik ederek, mikrogliya ve nötrofillerde polarizasyon ve iltihaplanma ile ilgili sinyal yollarını modüle ederek oksidatif strese aracılık eder. MPO, iskemik inmede oksidatif hasarı ve nöroinflamasyonu azaltmak için terapötik bir hedef olabilir bu anlamda araştırılmaya açıktır (124). Bu amaçla araştırmamızda kolon dokusunda MPO analiz edilmiş ve Hİ grubunda MPO düzeyinde artış görülürken, tedavi ile düşmüştür. Literatür de sonucumuzu bu anlamda desteklemektedir (125). Araştırmada 2,5 mg/kg doz tedavisinin MPO seviyesini etkili bir şekilde azalttığı bulunmuştur.

Malondialdehit (MDA), serbest oksijen radikallerinin dokular üzerindeki etkisinden ve lipid peroksidasyonu sırasında bir dizi reaksiyondan kaynaklanan bir lipiddir (126). Literatürde MDA konsantrasyonlarının, değişen hipoksik iskemik ensefalopati şiddetine göre değiştiği ve bu nedenle hasarın evresinin, tedavi sürecinin ve prognozun belirlenmesi için bir öngörücü olarak kullanılabilceği bildirilmiştir (127). Bu amaçla araştırmamızda kolon dokusunda MDA analiz edilmiş ve Hİ grubunda MDA düzeyinde artış görülürken, tedavi ile düşmüştür. Literatür de sonucumuzu bu anlamda desteklemektedir (128). Araştırmamızda 5 mg/kg ve 2,5 mg/kg dozlarının iyileşme sağladığı görülmüştür.

Hipoksik-iskemik beyin hasarı, artan reaktif oksijen türlerinin oluşumuna sebep olduğu bilinmektedir. Bu tür ajanlara karşı hücre korumadaki anahtar faktörler, GSH ile ilişkili reaksiyonları olmaktadır ve glutatyondaki azalma, bozulmuş serbest radikal inaktivasyonu ve/veya redoksla ilgili değişiklikler yoluyla hücre ölümünün gelişmesinde önemli olabilmektedir (129). GSH, kurucu amino asitlerden sentezlendiği sitozolde ve oksidan kaynaklı hücre ölümüne karşı önemli bir koruyucu rol oynadığı mitokondride bulunan büyük ve çok yönlü bir hücre koruyucu antioksidandır.

Antioksidan işlevi nedeniyle hipoksida hücre içi GSH depolarını azaltması beklenir (130). Bu amaçla araştırmamızda kolon dokusunda GSH analiz edilmiş ve Hİ grubunda GSH düzeyinde azalma görülürken, tedavi ile artış görülmüştür. Literatür de sonucumuzu bu anlamda desteklemektedir (128). Araştırmamızda 5 mg/kg ve 2,5 mg/kg dozlarının iyileşme sağladığı görülmüştür.



6 SONUÇ

Bu araştırma neonatal hipoksik iskemiye bağlı serebral palside (-) Fenserin'in nöroprotektif etkisinin olduğunu gösteren ilk çalışmadır. (-) Fenserin'in hipoksik iskemik defisitleri iyileştirme ve nöroprotektif etkisi kolinerjik yolak ve asetilkolin esterazın inhibisyonu ile meydana gelmiştir. (-) Fenserin etkisini asetilkolin ekspresyonu arttırarak ve inflamasyon yanıtta azaltıcı etki sağlayarak göstermiştir. (-) Fenserin serebral palsy'deki nöronal hasar ve kaybı azaltarak, hasar kaynaklı nöro gelişim ve ilişkili patolojik reflekslerin gelişimsel süreçte iyileştirilmesini sağlamış bununla birlikte hipoksik iskemi ile bozulan motor ve kognitif becerileri iyileştirmiştir. (-) Fenserin tüm bu nöroprotektif etkileri, hastalığın indüklendiği günden itibaren 30. güne kadar tedavi olarak uygulanması bu yüzden akut, sekonder ve kronik fazdaki inflamasyon sürecine olan etkinliği ile ilişkilidir. Araştırmamızda (-) Fenserin'in pro-inflamatuvar sitokinler olan TNF- α ve IL-1 β seviyelerini iyileştirdiği gösterilmiştir. Pro-inflamatuvar sitokinler ve reaktif oksijen ile nitrojen türlerinin hedef aldığı astrosit ölümünde kolinerjik yolak üzerinden etki ederek, astrosit canlılığı üzerinde koruyucu etki sağlamış olabilir. Dolayısıyla aksonal büyümenin oluşmaması ve gliosis ile sonuçlanan beyaz madde lezyonunda hasarın azalmasını, inflamasyon ve nekroz ile apoptozu inhibe edici etkiyle sağlamış olabilir. Araştırmamızda beyinde hasarla ilişkili protein S100 β seviyelerinde de (-) Fenserin tedavisi ile iyileşmenin bu yolla sağlanmış olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca çalışmada (-) Fenserin ile yapılan tedavide 2,5 mg/kg ve 5 mg/kg dozların hipoksik iskemiye bağlı serebral palside meydana gelen nörolojik defisitlere iyileştirici etki gösterdiği belirlenmiştir. Tüm bu bulgular değerlendirildiğinde (-) Fenserin'in hipoksik iskemik serebral palsy tedavisinde potansiyel bir ajan olabileceği ve bu konuyla alakalı daha detaylı çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

7 KAYNAKLAR

1. Hallman-Cooper JL, Gossman W. Cerebral Palsy. [Updated 2020 Jun 7]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538147/>
2. Rumajogee, P., Bregman, T., Miller, S. P., Yager, J. Y., & Fehlings, M. G. (2016). Rodent Hypoxia-Ischemia Models for Cerebral Palsy Research: A Systematic Review. *Frontiers in neurology*, 7, 57. <https://doi.org/10.3389/fneur.2016.00057>
3. Michael-Asalu, A., Taylor, G., Campbell, H., Lelea, L. L., & Kirby, R. S. (2019). Cerebral Palsy: Diagnosis, Epidemiology, Genetics, and Clinical Update. *Advances in pediatrics*, 66, 189–208. <https://doi.org/10.1016/j.yapd.2019.04.002>
4. Stadskleiv K. (2020). Cognitive functioning in children with cerebral palsy. *Developmental medicine and child neurology*, 62(3), 283–289. <https://doi.org/10.1111/dmcn.14463>
5. Graham, H. K., Rosenbaum, P., Paneth, N., Dan, B., Lin, J. P., Damiano, D. L., Becher, J. G., Gaebler-Spira, D., Colver, A., Reddihough, D. S., Crompton, K. E., & Lieber, R. L. (2016). Cerebral palsy. *Nature reviews. Disease primers*, 2, 15082. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.82>
6. Haam, J., & Yakel, J. L. (2017). Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. *Journal of neurochemistry*, 142 Suppl 2(Suppl 2), 111–121. <https://doi.org/10.1111/jnc.14052>
7. Liu, C. L., Siesjö, B. K., & Hu, B. R. (2004). Pathogenesis of hippocampal neuronal death after hypoxia-ischemia changes during brain development. *Neuroscience*, 127(1), 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.03.062>
8. Maurer, S. V., & Williams, C. L. (2017). The Cholinergic System Modulates Memory and Hippocampal Plasticity via Its Interactions with Non-Neuronal Cells. *Frontiers in immunology*, 8, 1489. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01489>
9. Brockmann, M. D., Kukovic, M., Schönfeld, M., Sedlacik, J., & Hanganu-Opatz, I. L. (2013). Hypoxia-ischemia disrupts directed interactions within neonatal prefrontal-hippocampal networks. *PloS one*, 8(12), e83074. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083074>
10. Flood P. (2007). A new treatment for hypoxic brain injury?. *Anesthesia and analgesia*, 105(3), 559–560. <https://doi.org/10.1213/01.ane.0000278523.91877.21>
11. Galinsky, R., Lear, C. A., Dean, J. M., Wassink, G., Dhillon, S. K., Fraser, M., Davidson, J. O., Bennet, L., & Gunn, A. J. (2018). Complex interactions between hypoxia-ischemia and inflammation in preterm brain injury. *Developmental medicine and child neurology*, 60(2), 126–133. <https://doi.org/10.1111/dmcn.13629>
12. Odorcyk, F. K., Sanches, E. F., Nicola, F. C., Moraes, J., Pettenuzzo, L. F., Kolling, J., Siebert, C., Longoni, A., Konrath, E. L., Wyse, A., & Netto, C. A. (2017). Administration of Huperzia quadrifariata Extract, a Cholinesterase Inhibitory Alkaloid Mixture, has Neuroprotective

- Effects in a Rat Model of Cerebral Hypoxia-Ischemia. *Neurochemical research*, 42(2), 552–562. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2107-6>
13. National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 192706, Phenserine. Retrieved August 18, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenserine>.
 14. Zhu C., Wang X., Blomgren K. (2009) Cerebral Hypoxia—Ischemia in Neonatal Rats or Mice: A Model of Perinatal Brain Injury. In: Chen J., Xu Z.C., Xu X.M., Zhang J.H. (eds) *Animal Models of Acute Neurological Injuries*. Springer Protocols Handbooks. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-185-1_18
 15. Hoffer, B. J., Pick, C. G., Hoffer, M. E., Becker, R. E., Chiang, Y. H., & Greig, N. H. (2017). Repositioning drugs for traumatic brain injury - N-acetyl cysteine and Phenserine. *Journal of biomedical science*, 24(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0377-1>
 16. Colović, M. B., Krstić, D. Z., Lazarević-Pašti, T. D., Bondžić, A. M., & Vasić, V. M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current neuropharmacology*, 11(3), 315–335. <https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006>
 17. Wang, L. S., Zhou, J., Shao, X. M., & Tang, X. C. (2002). Huperzine A attenuates cognitive deficits and brain injury in neonatal rats after hypoxia-ischemia. *Brain research*, 949(1-2), 162–170. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)02977-3](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)02977-3)
 18. Little W. J. (2012). The classic: Hospital for the cure of deformities: course of lectures on the deformities of the human frame. 1843. *Clinical orthopaedics and related research*, 470(5), 1252–1256. <https://doi.org/10.1007/s11999-012-2302-y>
 19. Little W. J. (1966). On the influence of abnormal parturition, difficult labours, premature birth, and asphyxia neonatorum, on the mental and physical condition of the child, especially in relation to deformities. *Clinical orthopaedics and related research*, 46, 7–22.
 20. Badawi, N., Watson, L., Petterson, B., Blair, E., Slee, J., Haan, E., & Stanley, F. (1998). What constitutes cerebral palsy?. *Developmental medicine and child neurology*, 40(8), 520–527. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.1998.tb15410.x>
 21. Rosenbaum, P., Paneth, N., Leviton, A., Goldstein, M., Bax, M., Damiano, D., Dan, B., & Jacobsson, B. (2007). A report: the definition and classification of cerebral palsy April 2006. *Developmental medicine and child neurology*. Supplement, 109, 8–14.
 22. Michael-Asalu, A., Taylor, G., Campbell, H., Lelea, L. L., & Kirby, R. S. (2019). Cerebral Palsy: Diagnosis, Epidemiology, Genetics, and Clinical Update. *Advances in pediatrics*, 66, 189–208. <https://doi.org/10.1016/j.yapd.2019.04.002>
 23. Nelson K. B. (2008). Causative factors in cerebral palsy. *Clinical obstetrics and gynecology*, 51(4), 749–762. <https://doi.org/10.1097/GRF.0b013e318187087c>
 24. MacLennan, A. H., Thompson, S. C., & Gecz, J. (2015). Cerebral palsy: causes, pathways, and the role of genetic variants. *American journal of obstetrics and gynecology*, 213(6), 779–788. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.05.034>

25. Marret, S., Vanhulle, C., & Laquerriere, A. (2013). Pathophysiology of cerebral palsy. *Handbook of clinical neurology*, 111, 169–176. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52891-9.00016-6>
26. Van Steenwinckel, J., Schang, A. L., Sigaut, S., Chhor, V., Degos, V., Hagberg, H., Baud, O., Fleiss, B., & Gressens, P. (2014). Brain damage of the preterm infant: new insights into the role of inflammation. *Biochemical Society transactions*, 42(2), 557–563. <https://doi.org/10.1042/BST20130284>
27. Hankins, G. D., & Speer, M. (2003). Defining the pathogenesis and pathophysiology of neonatal encephalopathy and cerebral palsy. *Obstetrics and gynecology*, 102(3), 628–636. [https://doi.org/10.1016/s0029-7844\(03\)00574-x](https://doi.org/10.1016/s0029-7844(03)00574-x)
28. Goldenberg, R. L., & Culhane, J. F. (2007). Low birth weight in the United States. *The American journal of clinical nutrition*, 85(2), 584S–590S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.2.584S>
29. Robertson, C. M., Watt, M. J., & Yasui, Y. (2007). Changes in the prevalence of cerebral palsy for children born very prematurely within a population-based program over 30 years. *JAMA*, 297(24), 2733–2740. <https://doi.org/10.1001/jama.297.24.2733>
30. Serdaroglu, A., Cansu, A., Ozkan, S., & Tezcan, S. (2006). Prevalence of cerebral palsy in Turkish children between the ages of 2 and 16 years. *Developmental medicine and child neurology*, 48(6), 413–416. <https://doi.org/10.1017/S0012162206000910>
31. Ogoke, Christian. (2018). *Clinical Classification of Cerebral Palsy*. 10.5772/intechopen.79246.
32. (<https://www.neurogen.in/cerebral-palsy>)
33. Nguyen, A., Armstrong, E. A., & Yager, J. Y. (2013). Evidence for therapeutic intervention in the prevention of cerebral palsy: hope from animal model research. *Seminars in pediatric neurology*, 20(2), 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2013.06.010>
34. Nelson Textbook of Pediatrics Elsevier eBook on VitalSource, 20th Edition by Robert M. Kliegman, MD, Bonita F. Stanton, MD, Joseph St. Geme, MD and Nina F Schor, MD, PhD VEYA Michael VJ. Encephalopathies. In: Behrman RE, Kliegman RM, Stanton BF, St Geme JW III, Schor NF, editors. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 20th ed. Philadelphia: Saunders; 2015. pp. 2896-2909
35. Surveillance of Cerebral Palsy in Europe (2000). Surveillance of cerebral palsy in Europe: a collaboration of cerebral palsy surveys and registers. *Surveillance of Cerebral Palsy in Europe (SCPE)*. *Developmental medicine and child neurology*, 42(12), 816–824. <https://doi.org/10.1017/s0012162200001511>
36. Korzeniewski, S. J., Birbeck, G., DeLano, M. C., Potchen, M. J., & Paneth, N. (2008). A systematic review of neuroimaging for cerebral palsy. *Journal of child neurology*, 23(2), 216–227. <https://doi.org/10.1177/0883073807307983>
37. Greco, P., Nencini, G., Piva, I., Scioscia, M., Volta, C. A., Spadaro, S., Neri, M., Bonaccorsi, G., Greco, F., Cocco, I., Sorrentino, F., D'Antonio, F., & Nappi, L. (2020). Pathophysiology of

- hypoxic-ischemic encephalopathy: a review of the past and a view on the future. *Acta neurologica Belgica*, 120(2), 277–288. <https://doi.org/10.1007/s13760-020-01308-3>
38. Douglas-Escobar, M., & Weiss, M. D. (2015). Hypoxic-ischemic encephalopathy: a review for the clinician. *JAMA pediatrics*, 169(4), 397–403. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2014.3269>
 39. Distefano, G., & Praticò, A. D. (2010). Actualities on molecular pathogenesis and repairing processes of cerebral damage in perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Italian journal of pediatrics*, 36, 63. <https://doi.org/10.1186/1824-7288-36-63>
 40. Lai, M. C., & Yang, S. N. (2011). Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, 609813. <https://doi.org/10.1155/2011/609813>
 41. Dixon, B. J., Reis, C., Ho, W. M., Tang, J., & Zhang, J. H. (2015). Neuroprotective Strategies after Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *International journal of molecular sciences*, 16(9), 22368–22401. <https://doi.org/10.3390/ijms160922368>
 42. Leonardo, C. C., & Pennypacker, K. R. (2009). Neuroinflammation and MMPs: potential therapeutic targets in neonatal hypoxic-ischemic injury. *Journal of neuroinflammation*, 6, 13. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-6-13>
 43. Juul, S. E., & Ferriero, D. M. (2014). Pharmacologic neuroprotective strategies in neonatal brain injury. *Clinics in perinatology*, 41(1), 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2013.09.004>
 44. Gulczyńska, E., & Gadzinowski, J. (2012). Hipotermia lecznicza w encefalopatii niedokrwiennie-niedotlenieniowej u noworodka [Therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy]. *Ginekologia polska*, 83(3), 214–218.
 45. Tagin, M. A., Woolcott, C. G., Vincer, M. J., Whyte, R. K., & Stinson, D. A. (2012). Hypothermia for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: an updated systematic review and meta-analysis. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*, 166(6), 558–566. <https://doi.org/10.1001/archpediatrics.2011.1772>
 46. Wang, Q., Lv, H., Lu, L., Ren, P., & Li, L. (2019). Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: emerging therapeutic strategies based on pathophysiologic phases of the injury. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine: the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 32(21), 3685–3692. <https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1468881>
 47. Nahm, N. J., Graham, H. K., Gormley, M. E., Jr, & Georgiadis, A. G. (2018). Management of hypertonia in cerebral palsy. *Current opinion in pediatrics*, 30(1), 57–64. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000567>
 48. Park, T. S., Dobbs, M. B., & Cho, J. (2018). Evidence Supporting Selective Dorsal Rhizotomy for Treatment of Spastic Cerebral Palsy. *Cureus*, 10(10), e3466. <https://doi.org/10.7759/cureus.3466>

49. Jackson C.E. (2011) Cholinergic System. In: Kreutzer J.S., DeLuca J., Caplan B. (eds) Encyclopedia of Clinical Neuropsychology. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-79948-3_1113
50. National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 187, Acetylcholine. Retrieved November 13, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetylcholine>.
51. Tiwari, P., Dwivedi, S., Singh, M. P., Mishra, R., & Chandy, A. (2013). Basic and modern concepts on cholinergic receptor: A review. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 3(5), 413–420. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(13\)60094-8](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(13)60094-8)
52. George M. Kapalka, Chapter 4 - Substances Involved in Neurotransmission, Editor(s): George M. Kapalka, In Practical Resources for the Mental Health Professional, Nutritional and Herbal Therapies for Children and Adolescents, Academic Press, 2010, Pages 71-99, ISSN 18730450, ISBN 9780123749277, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374927-7.00004-2>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123749277000042>)
53. Prashant Tiwari, Shubhangi Dwivedi, Mukesh Pratap Singh, Rahul Mishra, Anish Chandy, Basic and modern concepts on cholinergic receptor: A review, Asian Pacific Journal of Tropical Disease, Volume 3, Issue 5, 2013, Pages 413-420, ISSN 2222-1808, [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(13\)60094-8](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(13)60094-8).
54. Miller RD, Eriksson LI, Fleisher LA, Wiener-Kronish JP, Young WL, eds. (2009-01-01). Miller's Anesthesia (7th ed.). Elsevier Health Sciences. pp. 343–47. ISBN 978-0-443-06959-8.
55. Bertrand D., Wallace T.L. (2020) A Review of the Cholinergic System and Therapeutic Approaches to Treat Brain Disorders. In: Shoaib M., Wallace T. (eds) Behavioral Pharmacology of the Cholinergic System. Current Topics in Behavioral Neurosciences, vol 45. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/7854_2020_141
56. Flood P. (2007). A new treatment for hypoxic brain injury?. Anesthesia and analgesia, 105(3), 559–560. <https://doi.org/10.1213/01.ane.0000278523.91877.21>
57. Luo, C., & Pan, S. Y. (2015). The pathways by which mild hypothermia inhibits neuronal apoptosis following ischemia/reperfusion injury. Neural regeneration research, 10(1), 153–158. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.150725>
58. Hsueh, S. C., Lecca, D., Greig, N. H., Wang, J. Y., Selman, W., Hoffer, B. J., Miller, J. P., & Chiang, Y. H. (2019). (-)-Phenserine Ameliorates Contusion Volume, Neuroinflammation, and Behavioral Impairments Induced by Traumatic Brain Injury in Mice. Cell transplantation, 28(9-10), 1183–1196. <https://doi.org/10.1177/0963689719854693>
59. National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 192706, Phenserine. Retrieved September 24, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenserine>. (kaynak tüm yazıda temelde kullanıldı ona göre belirt)

60. Kilbourn, M. R., Sherman, P. S., & Snyder, S. E. (1999). Simplified methods for in vivo measurement of acetylcholinesterase activity in rodent brain. *Nuclear medicine and biology*, 26(5), 543–550. [https://doi.org/10.1016/s0969-8051\(98\)00122-x](https://doi.org/10.1016/s0969-8051(98)00122-x)
61. Klein J. (2007). Phenserine. *Expert opinion on investigational drugs*, 16(7), 1087–1097. <https://doi.org/10.1517/13543784.16.7.1087> (tübitak aynı kaynak)
62. Stanciu, G. D., Luca, A., Rusu, R. N., Bild, V., Beschea Chiriac, S. I., Solcan, C., Bild, W., & Ababei, D. C. (2019). Alzheimer's Disease Pharmacotherapy in Relation to Cholinergic System Involvement. *Biomolecules*, 10(1), 40. <https://doi.org/10.3390/biom10010040>
63. Becker, R. E., Greig, N. H., Lahiri, D. K., Bledsoe, J., Majercik, S., Ballard, C., Aarsland, D., Schneider, L. S., Flanagan, D., Govindarajan, R., Sano, M., Ferrucci, L., & Kapogiannis, D. (2018). (-)-Phenserine and Inhibiting Pre-Programmed Cell Death: In Pursuit of a Novel Intervention for Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer research*, 15(9), 883–891. [https://doi.org/10.2174/1567205015666180110120026\(tekrarladı\)](https://doi.org/10.2174/1567205015666180110120026(tekrarladı))
64. Rizvi, Syed Ibrahim & Cakatay, Ufuk. (2018). Molecular Basis and Emerging Strategies for Anti-aging Interventions. 10.1007/978-981-13-1699-9.
65. Jain, Kewal. (2019). *The Handbook of Neuroprotection*. 10.1007/978-1-4939-9465-6.
66. Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., & Collin, F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox biology*, 14, 450–464. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014>
67. Greig, N. H., Lecca, D., Hsueh, S. C., Nogueras-Ortiz, C., Kapogiannis, D., Tweedie, D., Glotfelty, E. J., Becker, R. E., Chiang, Y. H., & Hoffer, B. J. (2020). (-)-Phenserine tartrate (PhenT) as a treatment for traumatic brain injury. *CNS neuroscience & therapeutics*, 26(6), 636–649. <https://doi.org/10.1111/cns.13274>
68. Tweedie, D., Fukui, K., Li, Y., Yu, Q. S., Barak, S., Tamargo, I. A., Rubovitch, V., Holloway, H. W., Lehrmann, E., Wood, W. H., 3rd, Zhang, Y., Becker, K. G., Perez, E., Van Praag, H., Luo, Y., Hoffer, B. J., Becker, R. E., Pick, C. G., & Greig, N. H. (2016). Cognitive Impairments Induced by Concussive Mild Traumatic Brain Injury in Mouse Are Ameliorated by Treatment with Phenserine via Multiple Non-Cholinergic and Cholinergic Mechanisms. *PloS one*, 11(6), e0156493. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156493>
69. Lilja, A. M., Luo, Y., Yu, Q. S., Röjdner, J., Li, Y., Marini, A. M., Marutle, A., Nordberg, A., & Greig, N. H. (2013). Neurotrophic and neuroprotective actions of (-)- and (+)-phenserine, candidate drugs for Alzheimer's disease. *PloS one*, 8(1), e54887. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054887>
70. Ikari, H., Spangler, E. L., Greig, N. H., Pei, X. F., Brossi, A., Speer, D., Patel, N., & Ingram, D. K. (1995). Maze learning in aged rats is enhanced by phenserine, a novel anticholinesterase. *Neuroreport*, 6(3), 481–484. <https://doi.org/10.1097/00001756-199502000-00019>
71. Iijima, S., Greig, N. H., Garofalo, P., Spangler, E. L., Heller, B., Brossi, A., & Ingram, D. K. (1993). Phenserine: a physostigmine derivative that is a long-acting inhibitor of cholinesterase

- and demonstrates a wide dose range for attenuating a scopolamine-induced learning impairment of rats in a 14-unit T-maze. *Psychopharmacology*, 112(4), 415–420. <https://doi.org/10.1007/BF02244888>
72. Lahiri, D. K., Chen, D., Maloney, B., Holloway, H. W., Yu, Q. S., Utsuki, T., Giordano, T., Sambamurti, K., & Greig, N. H. (2007). The experimental Alzheimer's disease drug posiphen [(+)-phenserine] lowers amyloid-beta peptide levels in cell culture and mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 320(1), 386–396. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.112102>
 73. Heller, B., Brossi, A., & Ingram, D. K. (1993). Phenserine: a physostigmine derivative that is a long-acting inhibitor of cholinesterase and demonstrates a wide dose range for attenuating a scopolamine-induced learning impairment of rats in a 14-unit T-maze. *Psychopharmacology*, 112(4), 415–420. <https://doi.org/10.1007/BF02244888>
 74. Nguyen A., Armstrong E.A., Yager J.Y. (2015) Unilateral Common Carotid Artery Ligation as a Model of Perinatal Asphyxia: The Original Rice–Vannucci Model. In: Yager J. (eds) *Animal Models of Neurodevelopmental Disorders*. *Neuromethods*, vol 104. Humana Press, New York, NY.
 75. Heyser C. J. (2004). Assessment of developmental milestones in rodents. *Current protocols in neuroscience*, Chapter 8. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0818s25>
 76. Wertman, V., Gromova, A., La Spada, A. R., & Cortes, C. J. (2019). Low-Cost Gait Analysis for Behavioral Phenotyping of Mouse Models of Neuromuscular Disease. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (149), 10.3791/59878. <https://doi.org/10.3791/59878>
 77. Carter, R. J., Lione, L. A., Humby, T., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G. P., Morton, A. J. (1999). Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human huntington's disease mutation. *The Journal of Neuroscience*, 19(8), 3248–3257. doi:10.1523/jneurosci.19-08-03248.1999
 78. Castelhana-Carlos, M. J., Sousa, N., Ohl, F., & Baumans, V. (2010). Identification methods in newborn C57BL/6 mice: a developmental and behavioural evaluation. *Laboratory animals*, 44(2), 88–103. <https://doi.org/10.1258/la.2009.009044>
 79. Casal, D., Mota-Silva, E., Iria, I., Pais, D., Farinho, A., Alves, S., Pen, C., Mascarenhas-Lemos, L., Ferreira-Silva, J., Ferraz-Oliveira, M., Vassilenko, V., Videira, P. A., & Goyri-O'Neill, J. (2020). Functional and Physiological Methods of Evaluating Median Nerve Regeneration in the Rat. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (158), 10.3791/59767. <https://doi.org/10.3791/59767>
 80. Metz, G. A., & Whishaw, I. Q. (2009). The ladder rung walking task: a scoring system and its practical application. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (28), 1204. <https://doi.org/10.3791/1204>
 81. Lueptow L. M. (2017). Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (126), 55718. <https://doi.org/10.3791/55718>

82. Miedel, C. J., Patton, J. M., Miedel, A. N., Miedel, E. S., & Levenson, J. M. (2017). Assessment of Spontaneous Alternation, Novel Object Recognition and Limb Clasping in Transgenic Mouse Models of Amyloid- β and Tau Neuropathology. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (123), 55523. <https://doi.org/10.3791/55523>
83. Li, R. C., Guo, S. Z., Lee, S. K., & Gozal, D. (2010). Neuroglobin protects neurons against oxidative stress in global ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 30(11), 1874–1882. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.90>
84. Tao, F., Lu, S. D., Zhang, L. M., Huang, Y. L., & Sun, F. Y. (2001). Role of excitatory amino acid transporter 1 in neonatal rat neuronal damage induced by hypoxia-ischemia. *Neuroscience*, 102(3), 503–513. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00485-1](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00485-1)
85. Riljak, V., Kraf, J., Daryanani, A., Jiruška, P., & Otáhal, J. (2016). Pathophysiology of perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy - biomarkers, animal models and treatment perspectives. *Physiological research*, 65(Suppl 5), S533–S545. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933541>
86. Sharma, D., Barhwal, K. K., Biswal, S. N., Srivastava, A. K., Bhardwaj, P., Kumar, A., Chaurasia, O. P., & Hota, S. K. (2019). Hypoxia-mediated alteration in cholesterol oxidation and raft dynamics regulates BDNF signalling and neurodegeneration in hippocampus. *Journal of neurochemistry*, 148(2), 238–251. <https://doi.org/10.1111/jnc.14609>
87. Murray D. M. (2019). Biomarkers in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy-Review of the literature to date and future directions for research. *Handbook of clinical neurology*, 162, 281–293. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64029-1.00013-8>
88. Kolgazi, M., Sener, G., Cetinel, S., Gedik, N., & Alican, I. (2006). Resveratrol reduces renal and lung injury caused by sepsis in rats. *The Journal of surgical research*, 134(2), 315–321. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2005.12.027>
89. Shaw, O. E., & Yager, J. Y. (2019). Preventing childhood and lifelong disability: Maternal dietary supplementation for perinatal brain injury. *Pharmacological research*, 139, 228–242.
90. Solevåg, A. L., Schmölzer, G. M., & Cheung, P. Y. (2019). Novel interventions to reduce oxidative-stress related brain injury in neonatal asphyxia. *Free radical biology & medicine*, 142, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.04.028>
91. Reyes-Corral, M., Sola-Idígora, N., de la Puerta, R., Montaner, J., & Ybot-González, P. (2021). Nutraceuticals in the Prevention of Neonatal Hypoxia-Ischemia: A Comprehensive Review of their Neuroprotective Properties, Mechanisms of Action and Future Directions. *International journal of molecular sciences*, 22(5), 2524. <https://doi.org/10.3390/ijms22052524>
92. Novak, I., Morgan, C., Adde, L., Blackman, J., Boyd, R. N., Brunstrom-Hernandez, J., Cioni, G., Damiano, D., Darrah, J., Eliasson, A. C., de Vries, L. S., Einspieler, C., Fahey, M., Fehlings, D., Ferriero, D. M., Fetters, L., Fiori, S., Forssberg, H., Gordon, A. M., Greaves, S., Badawi, N. (2017). Early, Accurate Diagnosis and Early Intervention in Cerebral Palsy:

- Advances in Diagnosis and Treatment. *JAMA pediatrics*, 171(9), 897–907. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2017.1689>
93. Balakrishnan, B., Nance, E., Johnston, M. V., Kannan, R., & Kannan, S. (2013). Nanomedicine in cerebral palsy. *International journal of nanomedicine*, 8, 4183–4195. <https://doi.org/10.2147/IJN.S35979>
 94. Haynes, R. L., Baud, O., Li, J., Kinney, H. C., Volpe, J. J., & Folkerth, R. D. (2005). Oxidative and nitrative injury in periventricular leukomalacia: a review. *Brain pathology*, 15(3), 225-233.
 95. Brochu, M. E., Girard, S., Lavoie, K., & Sébire, G. (2011). Developmental regulation of the neuroinflammatory responses to LPS and/or hypoxia-ischemia between preterm and term neonates: An experimental study. *Journal of neuroinflammation*, 8(1), 1-14.
 96. Johnston, M. V., & Hudson, C. (1987). Effects of postnatal hypoxia-ischemia on cholinergic neurons in the developing rat forebrain: choline acetyltransferase immunocytochemistry. *Brain research*, 431(1), 41–50. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(87\)90193-3](https://doi.org/10.1016/0165-3806(87)90193-3)
 97. Perez, A., Ritter, S., Brotschi, B., Werner, H., Cafilisch, J., Martin, E., & Latal, B. (2013). Long-term neurodevelopmental outcome with hypoxic-ischemic encephalopathy. *The Journal of pediatrics*, 163(2), 454–459. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.02.003>
 98. Fan, L. W., Lin, S., Pang, Y., Rhodes, P. G., & Cai, Z. (2006). Minocycline attenuates hypoxia-ischemia-induced neurological dysfunction and brain injury in the juvenile rat. *The European journal of neuroscience*, 24(2), 341–350. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04918.x>
 99. Wilton J. (2003). Casting, splinting, and physical and occupational therapy of hand deformity and dysfunction in cerebral palsy. *Hand clinics*, 19(4), 573–584. [https://doi.org/10.1016/s0749-0712\(03\)00044-1](https://doi.org/10.1016/s0749-0712(03)00044-1)
 100. Tomhave, W. A., Van Heest, A. E., Bagley, A., & James, M. A. (2015). Affected and contralateral hand strength and dexterity measures in children with hemiplegic cerebral palsy. *The Journal of hand surgery*, 40(5), 900–907. <https://doi.org/10.1016/j.jhssa.2014.12.039>
 101. Schuch, C. P., Diaz, R., Deckmann, I., Rojas, J. J., Deniz, B. F., & Pereira, L. O. (2016). Early environmental enrichment affects neurobehavioral development and prevents brain damage in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. *Neuroscience letters*, 617, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.015>
 102. L Andrew Koman, Beth Paterson Smith, Jeffrey S Shilt, *Cerebral palsy*, *The Lancet*, Volume 363, Issue 9421, 2004, Pages 1619-1631, ISSN 0140-6736, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16207-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16207-7)
 103. Cans, C. (2000). Surveillance of cerebral palsy in Europe: a collaboration of cerebral palsy surveys and registers. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 42(12), 816-824.
 104. Clowry, G. J., Basuodan, R., & Chan, F. (2014). What are the best animal models for testing early intervention in cerebral palsy?. *Frontiers in neurology*, 5, 258.
 105. McQuillen, P. S., Sheldon, R. A., Shatz, C. J., & Ferriero, D. M. (2003). Selective vulnerability of subplate neurons after early neonatal hypoxia-ischemia. *The Journal of neuroscience* : the

- official journal of the Society for Neuroscience, 23(8), 3308–3315.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-08-03308.2003>
106. Durán-Carabali, L. E., Sanches, E. F., Marques, M. R., Aristimunha, D., Pagnussat, A., & Netto, C. A. (2017). Longer hypoxia-ischemia periods to neonatal rats causes motor impairments and muscular changes. *Neuroscience*, 340, 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.10.068>
 107. Ego, A., Lidzba, K., Brovedani, P., Belmonti, V., Gonzalez- Monge, S., Boudia, B., ... & Cans, C. (2015). Visual–perceptual impairment in children with cerebral palsy: a systematic review. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 57, 46-51.
 108. Weitzdoerfer, R., Pollak, A., & Lubec, B. (2004, August). Perinatal asphyxia in the rat has lifelong effects on morphology, cognitive functions, and behavior. In *Seminars in perinatology* (Vol. 28, No. 4, pp. 249-256). WB Saunders.
 109. Eunson, P. (2015). The long- term health, social, and financial burden of hypoxic–ischaemic encephalopathy. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 57, 48-50.
 110. Ikeda, T., Mishima, K., Yoshikawa, T., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Xia, Y. X., & Ikenoue, T. (2001). Selective and long-term learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats. *Behavioural brain research*, 118(1), 17-25.
 111. Smith, A. L., Hill, C. A., Alexander, M., Szalkowski, C. E., Chrobak, J. J., Rosenkrantz, T. S., & Fitch, R. H. (2014). Spatial working memory deficits in male rats following neonatal hypoxic ischemic brain injury can be attenuated by task modifications. *Brain sciences*, 4(2), 240-272.
 112. Rock, R. B., Gekker, G., Hu, S., Sheng, W. S., Cheeran, M., Lokensgard, J. R., & Peterson, P. K. (2004). Role of microglia in central nervous system infections. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 942-964.
 113. Buser, J. R., Maire, J., Riddle, A., Gong, X., Nguyen, T., Nelson, K., ... & Back, S. A. (2012). Arrested preoligodendrocyte maturation contributes to myelination failure in premature infants. *Annals of neurology*, 71(1), 93-109.
 114. Ninan I. (2014). Synaptic regulation of affective behaviors; role of BDNF. *Neuropharmacology*, 76 Pt C(0 0), 684–695. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.011>
 115. Miranda, M., Morici, J. F., Zanoni, M. B., & Bekinschtein, P. (2019). Brain-derived neurotrophic factor: a key molecule for memory in the healthy and the pathological brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 363. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00363>
 116. Brozzi, F., Arcuri, C., Giambanco, I., & Donato, R. (2009). S100B protein regulates astrocyte shape and migration via interaction with src kinase: Implications for astrocyte development, activation, and tumor growth. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(13), 8797–8811. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805897200>
 117. Sorci, G., Bianchi, R., Riuzzi, F., Tubaro, C., Arcuri, C., Giambanco, I., & Donato, R. (2010). S100B protein, a damage-associated molecular pattern protein in the brain and heart, and

- beyond. *Cardiovascular psychiatry and neurology*, 2010, 656481. <https://doi.org/10.1155/2010/656481>
118. Nguyen, A. T., Armstrong, E. A., & Yager, J. Y. (2017). Neurodevelopmental Reflex Testing in Neonatal Rat Pups. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (122), 55261. <https://doi.org/10.3791/55261>
 119. Kuperminc, M. N., Gottrand, F., Samson-Fang, L., Arvedson, J., Bell, K., Craig, G. M., & Sullivan, P. B. (2013). Nutritional management of children with cerebral palsy: a practical guide. *European journal of clinical nutrition*, 67 Suppl 2, S21–S23. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2013.227>
 120. Tassinari, I. D., Andrade, M., da Rosa, L. A., Hoff, M., Nunes, R. R., Vogt, E. L., Fabres, R. B., Sanches, E. F., Netto, C. A., Paz, A. H., & de Fraga, L. S. (2020). Lactate Administration Reduces Brain Injury and Ameliorates Behavioral Outcomes Following Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Neuroscience*, 448, 191–205. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.09.006>
 121. Sheffrin, M., Miao, Y., Boscardin, W. J., & Steinman, M. A. (2015). Weight Loss Associated with Cholinesterase Inhibitors in Individuals with Dementia in a National Healthcare System. *Journal of the American Geriatrics Society*, 63(8), 1512–1518. <https://doi.org/10.1111/jgs.13511>
 122. Lubics, A., Reglodi, D., Tamás, A., Kiss, P., Szalai, M., Szalontay, L., & Lengvári, I. (2005). Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behavioural brain research*, 157(1), 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.06.019>
 123. Arteaga, O., Revuelta, M., Urigüen, L., Álvarez, A., Montalvo, H., & Hilario, E. (2015). Pretreatment with Resveratrol Prevents Neuronal Injury and Cognitive Deficits Induced by Perinatal Hypoxia-Ischemia in Rats. *PloS one*, 10(11), e0142424. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142424>
 124. Chen, S., Chen, H., Du, Q., & Shen, J. (2020). Targeting Myeloperoxidase (MPO) Mediated Oxidative Stress and Inflammation for Reducing Brain Ischemia Injury: Potential Application of Natural Compounds. *Frontiers in physiology*, 11, 433. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00433>
 125. Gitto, E., Marseglia, L., Manti, S., D'Angelo, G., Barberi, I., Salpietro, C., & Reiter, R. J. (2013). Protective role of melatonin in neonatal diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, 980374. <https://doi.org/10.1155/2013/980374>
 126. Weinberger, B., Anwar, M., Henien, S., Sosnovsky, A., Hiatt, M., Jochnowitz, N., Witz, G., & Hegyi, T. (2004). Association of lipid peroxidation with antenatal betamethasone and oxygen radical disorders in preterm infants. *Biology of the neonate*, 85(2), 121–127. <https://doi.org/10.1159/000074968>
 127. Fulia, F., Gitto, E., Cuzzocrea, S., Reiter, R. J., Dugo, L., Gitto, P., Barberi, S., Cordaro, S., & Barberi, I. (2001). Increased levels of malondialdehyde and nitrite/nitrate in the blood of asphyxiated newborns: reduction by melatonin. *Journal of pineal research*, 31(4), 343–349. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079x.2001.310409.x>

128. Wu, W., Wei, W., Lu, M., Zhu, X., Liu, N., Niu, Y., Sun, T., Li, Y., & Yu, J. (2017). Neuroprotective Effect of Chitosan Oligosaccharide on Hypoxic-Ischemic Brain Damage in Neonatal Rats. *Neurochemical research*, 42(11), 3186–3198. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2356-z>
129. Wallin, C., Puka-Sundvall, M., Hagberg, H., Weber, S. G., & Sandberg, M. (2000). Alterations in glutathione and amino acid concentrations after hypoxia-ischemia in the immature rat brain. *Brain research. Developmental brain research*, 125(1-2), 51–60. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(00\)00112-7](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(00)00112-7)
130. Lluís, J. M., Morales, A., Blasco, C., Colell, A., Mari, M., Garcia-Ruiz, C., & Fernandez-Checa, J. C. (2005). Critical role of mitochondrial glutathione in the survival of hepatocytes during hypoxia. *The Journal of biological chemistry*, 280(5), 3224–3232. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408244200>



8 EKLER

EK 1: Etik Kurul Onayı



EK 1. Etik Kurulu Onayı (devam)



9 ÖZGEÇMİŞ





