

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DENEYSEL ASFİKSİ YENİDOĞAN MODELİNDE İNSAN
GÖBEK KORDONU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİN TEDAVİ EDİCİ ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI

Bilge KOCABIYIK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Özge ÇEVİK

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TPF-20020 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2022

TEŞEKKÜR

Hedeflenen bir yolda, düzen ve sağduyu ile yapılan çalışmaların başarıları sabır, emek ve zaman ister. Bu yolda; kişiliği, bilgisi, tecrübesi ve bilim insanlığını hep örnek alacağım, büyük ilgi ve anlayışla beni destekleyen, hayatıma yol gösterici niteliği ile hep ışık tutan değerli danışman hocam Prof. Dr. Özge ÇEVİK'e çok teşekkür ederim.

Bilimsel sohbetini ilgi ve hayranlıkla dinlediğim, çalışmalarım süresince desteğini, bilgisini ve deneyimlerini benden esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Erkan GÜMÜŞ'e çok teşekkür ederim. Değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Ayşe ANIK'a çalışmalarım süresince gösterdiği ilgi ve yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim. Ayrıca bana her konuda yardımcı olan, bilgisini, desteğini esirgemeyen, samimiyetini, içtenliğini ve bana olan inancını hep hissettiğim canım hocam Dr. Burçin İrem ABAS'a teşekkürü bir borç bilirim.

Dostluklarını, sonsuz desteklerini ve ekip olarak çalışmanın huzurunu hep arayacağım çalışma arkadaşlarım Melike EREN, Dilara USLU, Tuğba CÜCELİ ve Aslı ŞİŞKO'ya teşekkür ederim.

Eğitime ve bilime olan inançları ile beni büyüten, desteklerini, sevgilerini hep yanımda hissettiğim canım babam Turgut KOCABIYIK'a, canım annem Behice KOCABIYIK'a ve canım ablam Özge TÜRKİSTANİ' ye sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ.....	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. KÖK HÜCRE	3
2.1.1. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması	3
2.1.2. Mezenkimal Kök Hücreler	9
2.1.3. Göbek Kordonu (Wharton Jölesi) Mezenkimal Kök Hücreler.....	11
2.1.4. UC-MSc'lerin Biyobelirteçleri	15
2.1.5. Kök Hücrelerin Tedaviye Yönelik Kullanım Alanları	16
2.2. Perinatal Asfiksi	19
2.2.1. Tanım.....	19
2.2.2. Epidemiyoloji	20
2.2.3. Etiyoloji	22
2.2.4. Nöropatoloji.....	23
2.2.5. Patofizyoloji	24
2.2.5.1. Yenidoğanın Fetal-Ekstrauterin Döneme Uyumu ve Fizyolojik Özellikleri.....	25

2.2.5.2. HİE Patofizyolojisi	33
2.2.5.2.1. Oksidatif Stres	34
2.2.5.2.2. Hücre İçi Ca^{+2} Birikimi	35
2.2.5.2.3. Mitokondriyal Disfonksiyon	37
2.2.5.2.4. Eksitotoksisite.....	40
2.2.5.2.5. İnflamasyon	41
2.2.6. Klinik.....	43
2.2.7. Tanı.....	47
2.2.7.1. Maternal Göstergeler	47
2.2.7.1.1. Öykü	47
2.2.7.1.2. Plasenta Patolojisi.....	47
2.2.7.1.3. Fetal Kalp Hızı (FKH).....	49
2.2.7.1.4. Umbilical Kord Kan Gazları.....	49
2.2.7.2. Neonatal Göstergeler	50
2.2.7.2.1. Apgar Skoru ve Etkileyen Faktörler.....	50
2.2.7.2.2. Fiziksel, Nörolojik Muayene ve Nörogörüntüleme.....	51
2.2.7.2.3. Laboratuvar Tetkikleri.....	52
2.2.7.2.4. Konvansiyonel Elektroensefalografi (cEEG) ve Amplitüd Entegre Elektroensefalografi (aEEG)	52
2.2.8. Nöroprotektif-Nöral Rejenerasyon Ajanları Ve Gelecekteki Tedavi Beklentileri	53
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	61
3.1. Gereç.....	61
3.1.1. Cihazlar.....	61
3.1.2. Hayvan Materyali	61
3.2. YÖNTEM.....	62
3.2.1. Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu	62

3.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Pasajlanması	65
3.2.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	65
3.2.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Oct-4, NANOG ve Sox-2 Düzeylerinin qPCR ile Belirlenmesi.....	66
3.2.4.1. RNA, cDNA İzolasyonu ve qPCR	66
3.2.5. Asfiksi Yenidoğan Modeli ve Mezenkimal Kök Hücre Uygulaması.....	70
3.2.5.1. Balb/c Farelerin Gebe Bırakılması, Gebeliğin Doğrulanması.....	71
3.2.5.2. Sezaryen Protokolü.....	72
3.2.5.3. Deneysel Yenidoğan Asfiksi Hastalık Modeli ve Mezenkimal Kök Hücre Uygulama	73
3.2.6. Dokularda Oksidan/Antioksidan Parametrelerinin İncelenmesi	75
3.2.6.1. MDA (Malondialdehit) Ölçümü.....	75
3.2.6.2. GSH (Glutatyon) Ölçümü.....	76
3.2.6.3. SOD (Süperoksit Dismutaz) Ölçümü	76
3.2.6.4. MPO (Miyeloperoksidaz) Ölçümü	77
3.2.6.5. Beyin, Akciğer, Böbrek, Karaciğer ve Kalp Dokularında Bradford Protein Ölçümü	77
3.2.7. NSE, TNF- α , IL-6, GFAP Düzeylerinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi.....	78
3.2.8. H&E Boyama ve TUNEL Apoptozis Deneyi.....	81
3.2.8.1. H&E Boyama	81
3.2.8.2. TUNEL Apoptozis Deneyi	83
3.2.9. İstatiksel Değerlendirme.....	84
4. BULGULAR	85
4.1. UCMSC'lerin izolasyon süreleri ve görüntüleri.....	85
4.2. UC-MSC'lerin Karakterizasyonu	85
4.3. UCMSC Hücrelerinin Oct-4, NANOG ve Sox-2 Düzeylerinin qPCR Sonuçları	86
4.4. NSE, TNF- α , IL-6, GFAP Düzeylerinin Saptanması	87

4.5. Dokularda Oksidan/Antioksidan Parametrelerin Saptanması	88
4.6. Beyin Dokusunda H&E Boyama Sonuçları	95
4.7. Beyin Dokusunda TUNEL Boyama Sonuçları.....	96
5. TARTIŞMA.....	97
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	106
EKLER	107
Ek. 1. Hayvan Deneyleri Etik Kurul Onayı.....	107
Ek. 2. Klinik Araştırma Etik Kurulu	108
KAYNAKLAR.....	109
BİLİMSEL ETİK BEYANI.....	135
ÖZGEÇMİŞ.....	136

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kök hücrelerin sınıflandırılması:	4
Şekil 2. Kök hücre hiyerarşisini gösteren şematik diyagramı.	5
Şekil 3. Embriyonik Kök Hücre Kaynakları.	6
Şekil 4. Kök Hücrelerin Temel Özellikleri	8
Şekil 5. MSC'lerin farklılaşması üzerindeki çeşitli yolların etkisi.	9
Şekil 6. MSC'lerin çoklu farklılaşabilme yeteneği	10
Şekil 7. MSC'lerin çeşitli kaynakları.	11
Şekil 8. İnsan göbek kordonu MSC'leri kullanan kayıtlı klinik deneyler.....	12
Şekil 9. Umbilikal arterler, ven, Wharton jeli ve kordon astarını gösteren kısmen disseke insan UC'si	13
Şekil 10. Üç boyutlu diyagramla birlikte insan göbek kordonunun yapısı	14
Şekil 11. Mezenkimal kök hücrelerin izole edilebildiği çeşitli göbek kordonu bölmeleri..	14
Şekil 12. MSCs fenotipi, farklılaşma potansiyeli ve immünolojik özellikleri. MSCs fenotipinin ve immünolojik profilinin şematik gösterimi	16
Şekil 13. Nöral kök hücreler (NSCs), mezenkimal kök hücreler (MSCs), embriyonik kök hücreler (ESCs) ve uyarılmış pluripotent kök hücreler (iPS)	18
Şekil 14. Kök hücre plastisitesi ve gelecekte kullanım alanları	19
Şekil 15. Fetal Dolaşım	27
Şekil 16. Tahmini intrauterin oksijen satürasyonları.....	28
Şekil 17. Normal fetal ve neonatal kardiyovasküler dolaşımın şeması.....	29
Şekil 18. HIE'nin Patofizyolojisi	34
Şekil 19. Ca^{+2} artışının nöronlardaki etkisi	36
Şekil 20. Neonatal HI hasarından sonra apoptoz ve nekroptoz yollarının iç içe geçmesi ..	39

Şekil 21. IUGR, maternal, fetal, plasental, genetik nedenin sonucu olabilir veya her ikisinin kombinasyonu olabilir	48
Şekil 22. Yenidoğan hipoksik-iskemik beyin hasarının erken tedavisi için mevcut nöroprotektif ajanların sınıflandırılması	54
Şekil 23. Hipoksik-iskemik ensefalopati tedavisinde potansiyel nöroprotektif tedaviler ...	59
Şekil 24. Enzimatik yöntem ile elde edilen UC-MSC'lerin ışık mikroskopunda 5X ve 20X görüntüleri.	85
Şekil 25. CD44-FITC, CD90-Texas Red, CD105-FITC ile işaretli MSC hücrelerinin 10X ve 40X görüntüleri.	86
Şekil 26. UC dokusu ve UCMSC'de kök hücre faktörleri mRNA düzeyleri	87
Şekil 27. Serum NSE, GFAP, TNF-alpha, IL-6 düzeyleri	87
Şekil 28. Beyin dokusunda antioksidan GSH ölçümü sonuçları	89
Şekil 29. Beyin dokusunda oksidan MDA ölçümü sonuçları	89
Şekil 30. Beyin dokusunda SOD ölçümü sonuçları	90
Şekil 31. Beyin dokusunda MPO ölçümü sonuçları	90
Şekil 32. Akciğer dokusunda oksidan/antioksidan parametreleri olan GSH ve MDA ölçümü sonuçları	91
Şekil 33. Akciğer dokusunda oksidan/antioksidan parametreleri olan SOD ve MPO ölçümü sonuçları	91
Şekil 34. Kalp dokusunda dokusunda oksidan/antioksidan parametreleri olan GSH ve MDA ölçümü sonuçları	92
Şekil 35. Kalp dokusunda oksidan/antioksidan parametreleri olan SOD ve MPO ölçümü	92
Şekil 36. Böbrek dokusunda oksidan/antioksidan parametreleri olan GSH ve MDA ölçümü sonuçları	93
Şekil 37. Böbrek dokusunda oksidan/antioksidan parametreleri olan SOD ve MPO ölçümü sonuçları	93
Şekil 38. Karaciğer dokusunda oksidan/antioksidan parametreleri olan GSH, MDA ölçüm sonuçları	94

Şekil 39. Karaciğer dokusunda oksidan/antioksidan parametreleri olan SOD ve MPO ölçümü sonuçları.....	94
Şekil 40. Beyin kortex anterior bölgesinin 10X, 20X H&E boyama görüntüleri	95
Şekil 41. Gruplar arası Histolojik Skor..	95
Şekil 42. Beyin dokularının TUNEL boyama hücre görüntüsü	96
Şekil 43. Gruplar arası TUNEL boyaması apoptotik oranı	96



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Perinatal Asfiksini seçilmiş nedenleri.	23
Tablo 2. Perinatal Asfiksi Risk Faktörleri	23
Tablo 3. HİE-PA’de Nöropatolojik Değişiklikler.....	24
Tablo 4. Apgar Skoru Puanlandırılması ve Değerlendirilmesi.	32
Tablo 5. İskemik sonrası olgunlaşmamış beyin hasarında ana olaylar	39
Tablo 6. Sarnat Skorlamasına Göre HİE	45
Tablo 7. Thompson Skorum Sistemi.....	46
Tablo 8. Perinatal Asfiksini Sistemik Tutulumu	47
Tablo 9. Rahim içi büyüme kısıtlamasının (IUGR) plasental nedenleri.....	49
Tablo 10. Apgar Skorumu Etkileyen Faktörler.....	50
Tablo 11. Nörogörüntüleme Kullarılan Yöntemler.	51
Tablo 12. HİE Tanı Kriterleri	53
Tablo 13. HİE’de Umut Verici Tedavi Yaklaşımları.....	54
Tablo 14. Kullarılan Cihazlar.....	61
Tablo 15. cDNA sentezi için kullarılan reaksiyon içeriğı.....	69
Tablo 16. RT-PCR içeriğı.....	70
Tablo 17. MDA Ölçümü için gerekli çözeltiler ve miktarları	75
Tablo 18. GSH Ölçümü için gerekli bileşenler.....	76
Tablo 19. SOD Ölçümü için gerekli bileşenler.....	76
Tablo 20. MPO Ölçümü için gerekli bileşenler	77
Tablo 21. Bradford Protein Ölçümü için Gerekli Bileşenler	78

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Plasentadan ayrılan göbek kordonu.	62
Resim 2. Yaklaşık 5cm ² 'lik parça halinde kesilmiş göbek kordonunun 2 arter ve ven damarının çıkarılması.	63
Resim 3. Göbek kordonundan çıkarılan Wharton jelinin Kollajenaz Tip 1 ile parçalaması.....	63
Resim 4. Enjektör ile fiziksel parçalama.....	64
Resim 5. Santrifüj sonrası çöken hücre pelletleri.....	64
Resim 6. Hücrelerin six well, dish ve 75 cm ² 'lik flasklara ekimi.....	65
Resim 7. Primer antikor (CD44, CD90, CD105) kuyucuklardaki konumu.	66
Resim 8. Total RNA kiti uygulama şeması.....	68
Resim 9. Total RNA miktarının (A260/A280) Nanodropta ölçümü.....	68
Resim 10. Çiftleşmeden 24 saat sonra gözlemlenen Vajinal Plug görüntüsü.....	71
Resim 11. Smear testi aşamaları.	72
Resim 12. Sezaryen aşamaları.....	73
Resim 13. Deneysel Yenidoğan Asfiksi Modeli oluşturmak için kullanılan özel basınçlı tüp ve tüpe bağlı chamber.	74
Resim 14. Deneysel Yenidoğan Asfiksi Modelinin adım adım oluşturma aşamaları.....	74
Resim 15. Deney sonunda servikal dislokasyon ile öldürülerek, kan ve doku numunelerinin toplanması.	75
Resim 16. Bradford Protein Tayininde Elisa Platelere numunelerin yüklenmesi ve Spektrofotometrede ölçüm alınması.....	78
Resim 17. TNF-alpha, NSE, IL-6 ve GFAP için standartların hazırlanması.	79
Resim 18. TNF- α , NSE, GFAP ve IL-6 Elisa çalışma Prosedürü.	80
Resim 19. Çalışmada kullanılan Doku Takip Cihazı.	81

Resim 20. Sırayla H&E boyama basamakları.....	82
Resim 21. H&E Boyama basamakları aşamaları.....	82
Resim 22. Soldan sağa dokuların hematoksilen ve eozin boya ile boyanma basamakları.	83



ÖZET

DENEYSEL ASFİKSİ YENİDOĞAN MODELİNDE İNSAN GÖBEK KORDONU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN TEDAVİ EDİCİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

**Kocabıyık B. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoteknoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2021.**

Mezenkimal kök hücreler (MSC), perivasküler hücrelerden köken alır ve kemik iliği, yağ dokusu, dental dokular, kordon kanı, kordon gibi çok çeşitli kaynaklardan elde edilip çoğaltılabilir ve aynı zamanda birçok hücreye farklılaşabilmektedir. Asfiksi; hipoksi ve iskeminin bir arada görüldüğü bir süreç olup; yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde görülen önemli sorunlarından biridir. Asfiksi olan bebekte multiorgan sistem disfonksiyonu görülmektedir. Tedavisi için hipotermi dışında henüz beyin hasarını azaltıcı klinik bir uygulama bulunmamaktadır. Bu çalışmada chamber içerisinde gaz karışımı (%4 O₂, %20 CO₂ ve %76 N₂) ile deneysel asfiksi oluşturulan yenidoğan fareler üzerinde insan umbilikal kordundan izole edilen mezenkimal kök hücreler (UCMSC) uygulamasının etkisi araştırılmıştır. UCMSC yüzey belirteçleri (CD44, CD90, CD105) immunfloresan boyamayla ve pluripotensi genler (Nanog, Oct-4, Sox-2) qPCR ile karakterize edildi. UCMSC'ler asfiktik farelere uygulandıktan 20 gün sonra kan, beyin, akciğer, kalp, böbrek ve karaciğer dokuları alındı. Serum TNF- α , NSE, GFAP, IL-6 ve dokuda MDA, MPO, GSH, SOD düzeyleri ELISA ile bakıldı. Dokularda H&E boyama ve TUNEL yapılarak histopatolojik olarak değerlendirildi. Çalışmada UCMSC uygulamasının serum TNF- α , NSE, GFAP, IL-6 düzeylerini asfiksi grubuna göre anlamlı derecede azaltmıştır. Dokularda UCMSC uygulaması asfiksi grubuna göre hücre yenilenmesini hızlandırdığı ve multiorgan hasarından korunduğuna işaret etmektedir.

Sonuç olarak bu çalışma asfikside oluşan multiorgan hasarının erken evrede UCMSC uygulaması ile engellenebileceğini göstermiştir. Klinikte yenidoğan asfiksili bebeklerde UCMSC uygulaması gelecekte yenilikçi bir yöntem olabilir.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal Kök Hücre, MSC Hücre Yüzey Reseptörleri, Multiorgan Hasar, Umbilikal Kord, Prenatal Asfiksi,

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE THERAPEUTIC EFFICACY OF HUMAN UMBILICAL CORD-INDUCED MESENCHYMAL STEM CELLS IN AN EXPERIMENTAL ASPHYXIA NEWBORN MODEL

Kocabıyık B. Aydın Adnan Menderes University Health Sciences Institute of Molecular Biotechnology Program, Master's Thesis, Aydın, 2021.

Mesenchymal stem cells (MSC) originate from perivascular cells and can be obtained and reproduced from various sources such as bone marrow, adipose tissue, dental tissues, cord blood, cord, and can also differentiate into many cells. Asphyxia is a process in which hypoxia and ischemia are seen together. It is one of the crucial problems seen in neonatal intensive care units. Multiorgan system dysfunction is seen in the baby with asphyxia. Except for hypothermia, there is no clinical application to reduce brain damage yet. In this study, the effect of applying mesenchymal stem cells (UCMSC) isolated from the human umbilical cord on the neonatal mouse model caused experimental asphyxia with a gas mixture (4% O₂ 20% CO₂ and 76% N₂) in the chamber was investigated. UCMSC surface markers (CD44, CD90, CD105) were characterized by immunofluorescence staining, and pluripotency genes (Nanog, Oct-4, Sox-2) were characterized by qPCR. Blood, brain, lung, heart, kidney, and liver tissues were collected 20 days after UCMSCs were administered to asphyxiated mice. Serum TNF- α , NSE, GFAP, IL-6 and tissue MDA, MPO, GSH, SOD levels were measured by ELISA. The tissues were evaluated histopathologically by HE staining and TUNEL. In the study, UCMSC administration significantly decreased serum TNF- α , NSE, GFAP, IL-6 levels compared to the asphyxia group. It was determined that UCMSC application in tissues accelerated cell regeneration and protected them from multiorgan damage compared to the asphyxia group.

In conclusion, this study showed that multiorgan damage in asphyxia could be prevented with the application of UCMSC at an early stage. Therefore, UCMSC application in infants with neonatal asphyxia in the clinic may be an innovative method in the future.

Key Words: Mesenchymal Stem Cell, MSC Cell Surface Receptors, Multiorgan Damage, Perinatal Asphyxia, Umbilical Cord,

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACOG	: Amerikan Jinekoloji ve Obstetri Derneği
ADH	: Antidiüretik Hormon
APP/ACOG	: Yeni American Pediatri Akademi
aEEG	: Amplitüd Entegre Elektroensefalografi
ATP	: Adenozin trifosfat
AMPK	: Adenozin monofosfat aktive Protein kinaz
AIF	: Apoptoz İndükleyici Faktör
BID	: Bax İnhibe Edici Peptit
BBB	: Kan Beyin Bariyeri
CFU-F	: Colony forming unit fibroblast
CAD	: Kaspaz ile aktive edilmiş DNA
CT	: Bilgisayarlı Tomografi
cEEG	: Konveksiyonel Elektroensefalografi
CyA	: Siklofilin A
CytC	: Sitokrom C
DWI	: Difüzyon Ağırlıklı Görüntüleme
ETC	: Elektron Taşıma Zinciri
EKH	: Embriyonik Kök Hücreler
EEG	: Elektro Ensefalogram
EPO	: Eritropoetin
FCS	: Fetal Buzağı Serumı
FKH	: Kalp hızı
FAS	: Fetal Akciğer Sıvısı

GVH	: Graft versus host
GABA	: Gama-aminobütirik asit
GFAP	: Glial Fibriler Asidik Protein
GSH	: Glutasyon
HNSC	: İnsan Nöral Kök Hücre
HI	: Hipoksi İskemi
HIE	: Hipoksik İskemik Ensefalopati
HKH	: Hematopoetik Kök Hücre
HLA-ABC	: İnsan Lökosit Antijeni Sınıf I
HLA-DR	: İnsan Lökosit Antijeni Sınıf II
ISCT	: International Society for cellular Therapy
ISSCR	: Uluslararası Kök Hücre Araştırmaları Derneği
IUGR	: Rahim İçi Büyüme Kısıtlaması
IL-6	: Interlökin-6
iPSC	: İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
KİSH	: Kemik İliği Stromal Hücre
MMP	: Matris metaloproteinaz
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
MSC	: Mezenkimal Kök Hücre
MPT	: Mitokondriyal Geçirgenlik Geçışı
MPH	: Mezenkimal Progenitör Hücre
MPO	: Miyeloperoksidaz
MDA	: Malondialdehit
NO	: Nitrik Oksit
NMDA	: N-metail-D-aspartik Asit
NE	: Neonatal Ensefalopati

NSE	: Nöron Spesifik Enolaz
NSC	: Nötral Kök Hücre
PET	: Pozitron Emisyon Tomografisi
PA	: Perinatal Asfiksi
PDHC	: Piruvat Dehidrojenaz Kompleksi
PCD	: Programlanmış Hücre Ölümü
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SSS	: Santral Sinir Sistemi
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktör alfa
UC-V	: Umbilical Kord Ven
UC-A	: Umbilical Kord Arter
USG	: Ultrasonografi
UC MSC	: Umbilical Kord Mezenkimal Kök Hücre
WJ-MSC	: Wharton Jelly Mezenkimal Kök Hücre
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Mezenkimal kök hücreler (MSC'ler), göbek kordonlarından izole edilebilen, immün baskılayıcı ve anti-enflamatuvar özelliklerine ek olarak, çeşitli hücre tiplerine farklılaşma yeteneklerinden dolayı terapötik olarak kullanılan çok hücreli kök hücrelerdir. MKH'lerin etkinliğini araştıran çalışmalar otoimmün hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, karaciğer yetmezliği, osteoartrit, Graft versus host (GVH), solunum bozukluğu, omurilik hasarı, böbrek yetmezliği gibi çok çeşitli hastalıkların tedavisine yönelik olarak sürdürülmektedir (Can, 2008).

Umbilikal kord; fetüsü plasentaya bağlayan, ortalama 50-60 cm (15-120 cm) boyunda, 1.5-2 cm kalınlığında, mesoblastik bir yapıdır. Umbilikal kordun yapısı; fetal kanı plasentaya götüren 2 umbilikal arter ile arteriolize kanı plasentaya getiren umbilikal ven ve damarları çevreleyen pelte kıvamında, lamellar yapıda, mezodermal hücrelerden oluşan bir bağ dokusundan meydana gelir (Wharton Jeli).

Yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde görülen önemli sorunlardan biri asfiksidir. Hipoksik doğan bebeklere ya da hipoksiye maruz kalanlara asfiksi tanısı konur. Tanı ve tedavi yöntemlerindeki tüm gelişmelere rağmen gelişmiş ülkelerde bile asfiksi yenidoğan mortalite ve morbiditesinin en başta gelen sebeplerindendir. Asfiksi; hipoksi ve iskeminin bir arada görüldüğü bir süreç olup; anne, fetus ve plasentadan oluşan biyolojik ünitenin fonksiyonlarının veya postpartum pulmoner gaz değişiminin bozukluğuna bağlı olarak; fetus veya yenidoğanda hipoksemi, hiperkapni ve asidoz ile birlikte klinik bir tablo olarak tanımlanabilir. Perinatal asfiksi doğumdan önce, doğum sırasında veya sonrasında fetüste kan akışı veya gaz alışverişi eksikliğidir. Klinik göstergelere göre asfiksi; düşük apgar skoru, kord kanında asidoz ve hipoksik iskemik ensafalopatiye bağlı yenidoğanda ortaya çıkan klinik bulgudur (Hakobyan et al., 2019).

Perinatal asfiksi, amniyotik sıvı embolisi, uterus rüptürü, plasental abrupsiyon, göbek kordon düğümü veya kompresyon nedeniyle oluşabilir. Asfiksi doğumdan önce ortaya çıkabilir veya doğumdan hemen sonra resüsitasyon gerektiren riskli bir hastada ortaya çıkabilir. Perinatal asfiksi vakalarının çoğunluğu intrapartum, %20'si antepartum, diğer vakalar doğum sonrası erken dönemde görülür. Perinatal asfiksi; maternal olaylar (kanama, amniyotik sıvı embolizmi, hemodinamik çöküş), plasental olaylar (akut düşme),

uterin olaylar (yırtılma), kordon olayları (sıkı nukal kordon, kordon prolapsusu / avülsiyon) ve intrapartum enfeksiyonu (maternal ateş) nedeniyle ortaya çıkabilir (Id et al., 2018)

Hipoksik İskemik Ensafalopati (HİE), perinatal asfiksisinin en ağır sonucudur. Yenidoğanda hayatın erken dönemlerinde solunumun başlama ve sürdürülmesinde güçlük sonucunda, öncelikle beynin oksijensiz kalmasına bağlı olarak kas tonusu ve reflekslerde baskılanma, bilinç düzeyinde bozulma ve çoğunlukla konvülziyonla karakterize bir sendromdur (Odd et al., 2017).

Perinatal asfiksisinin patofizyolojisinde primer olay plasentada yetersiz gaz değişimi veya postnatal olaylar nedeniyle pulmoner düzeyde ventilasyon olayının bozulmasıdır. Bunun sonucunda oksijen ve karbondioksit değişimi bozulmakta böylece arteryel hipoksemi, hiperkarbi ve asidoz gelişimi başlamaktadır (Id et al., 2018), (Berg, 1989).

Asfiksi olan bebekte multiorgan sistem disfonksiyonuna ait bulgular saptanır. Çoklu organ disfonksiyonu kardiyak output'un cilt, kaslar, böbrek, akciğer, karaciğer ve gastrointestinal sistemde azaltılarak kalp, beyin ve adrenal bezlere yönlendirilmesinden kaynaklanır. Eğer mekonyum aspirasyonu ya da akut tubular gibi belli organ tutulumu varsa, bu durumda tedavide spesifik problemlere yönelik tedavi öncelik kazanır.

Asfiksisinin tedavi edilmesine bakıldığı zaman beyin gelişiminde uzun sürecek değişimlere yol açarak SSS inde uzun süreli hasara yol açması sebebiyle konvülziyonlarda ilk tercih barbitüratlardır (C. M. T. Robertson & Perlman, 2006). Barbitüratlar beynin nöral ve glial dokunun metabolik hızını ve enerji kullanımını azaltarak beynin glukoz ve oksijen ihtiyacını azaltır. Fenobarbitalin diğer etkileri serebral kan akımını azaltması ve muhtemelen toksik serbest radikallerini ortamdan temizlemesidir. Bu etkileri akut zedelenmiş beyin dokusunun teorik olarak lehinedir ve santral sinir sistemini ödem, hipotansiyon ve otoregülasyonun kaybı sonucu serebral perfüzyon ve substrat akışının bozulduğu dönemde daha ileri zedelenmeden koruyucudur. Ödemde sekonder gelişecek beyin hasarını azaltıcı stratejiler olarak hiperventilasyon (Palmer & Vannucci, 1993), steroidler, osmotik ajanlar ve diüretiklerin kullanımı öne sürülmüştür (Giacioia, 1993).

Bu bilgiler ışığında asfiksi gibi önemli bir klinik sorun için yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi bir ihtiyaç haline dönüşmüş ve bu alanda yapılacak araştırmalar büyük öneme sahiptir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KÖK HÜCRE

Kök hücreler, farklılaşmamış veya kısmen farklılaşmış hücrelerdir. Gen ekspresyonundaki değişiklikler yoluyla özelliklerini daha özel karakterler benimsemek için değiştirebilir. Bu gen ekspresyon değişiklikleri, epigenetik modifikasyonlarla pekiştirilen transkripsiyon faktörlerinin aktivitesi aracılığıyla gerçekleştirilir. Ortaya çıkan farklılaşmış hücreler, çok hücreli organizmaların fonksiyonel dokularının ve organlarının büyük kısmını oluşturan, kendini yenileme potansiyeline (Self-Renewal) sahip, farklı hücre tiplerine yönlenebilen (differentiations) yamalama (engraftment) yapabilen, klonal hücrelerdir (Narbonne, 2018). Tarihsel olarak bakıldığında ilk kök hücre popülasyonu, McCulloch ve Till adlı araştırmacılar tarafından erişkin fare kemik iliğinde tespit edilmiştir. Daha sonra hematopoetik kök hücreler (HKH) olarak adlandırılacak bu koloni oluşturan hücreler, fare dalak hücreleriyle yapılan öncül bir çalışma ile ortaya konulmuştur. McCulloch ve ekibinin kök hücre popülasyonlarıyla yaptığı bu araştırmalar kök hücre biyolojisi temelini bir dönüm noktasını oluşturmuştur (Weissman, 2002). 20.yüzyılın ortalarından itibaren kök hücre biyolojisiyle ilgili çalışmalar hız kazanarak günümüze kadar ulaşmış olup transplantasyon ve temel bilimsel araştırmalar, tedavi amaçlı taşıma sistemleri gibi birçok alanda çalışmalara öncü olmuştur (Çerçi & Erdost, 2019). Kök hücreler embriyonik ve erişkin dokulardan elde edilebildiği gibi, prenatal ve postnatal olarakta elde edilebilir. Kök hücrelerin farklılaşma yetenekleri köken aldıkları hücre tiplerine göre farklılık göstermektedir (Roobrouck et al., 2008).

2.1.1. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

Kök hücreler, herhangi bir organizmanın farklılaşması ve gelişimi sırasında hücresel hiyerarşide özel bir konuma sahiptir. Bu farklılaşmamış hücreler, özel işlevli başka herhangi bir hücre türü oluşturma potansiyeline sahiptir ve kendilerini yenileme, farklılaşma yetenekleriyle karakterize edilir. Bu hücresel özelliklerin her ikisi de mevcut rejeneratif

tıbbın başarısı için temel gerekliliklerdir (Cai, 2012). Belirli bir soyu farklılaştırma potansiyeline bağlı olarak, kök hücreler beş türe ayrılabilir (Şekil 1).

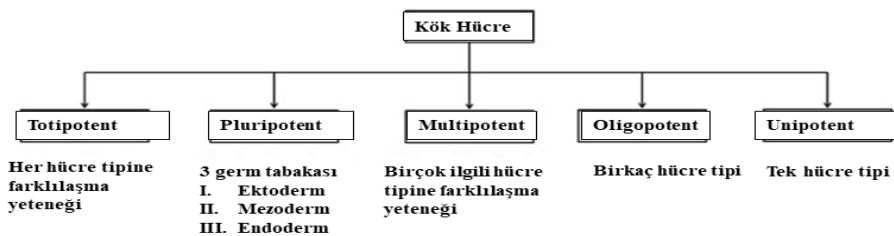
Totipotent Kök Hücreler: Bu gruptaki kök hücreler, tüm embriyonik somatik hücre ve germ hücrelerini oluşturabilme potansiyeli taşırlar. Bu hücreler, canlıdaki tüm hücre tiplerine farklılaşabilme ve doku oluşturabilme yeteneğine sahiptir (Ulloa-Montoya et al., 2005). Embriyonik gelişimin başlangıcı olan zigot ve morula safhasının erken dönem hücreleri bu gruptaki hücrelerdir.

Pluripotent Kök Hücreler: Bu gruptaki kök hücreler ise totipotent hücrelerin devamı niteliğinde olup, embriyonik gelişim sürecinde oluşan blastosist yapısının iç kısmından elde edilen hücrelerdir. Pluripotent kök hücreler, üç temel germ tabakasını (endoderm, mezoderm, ektoderm) oluşturabilme yeteneğine sahip olmasına rağmen, farklılaşma kapasiteleri sınırlanmaya başladığı için ekstraembriyonik membran ve plasenta dokusunu oluşturabilme özelliğine sahip değildirler (Hou et al., 2013).

Multipotent Kök Hücreler: Bu gruptaki kök hücreler ise aynı ya da fonksiyon olarak birbirine yakın doku ve organ içindeki hücrelere farklılaşabilme kapasitesine sahiptirler. Göbek kordonu kanında, yağ, kemik ve kalp dokusunda bulunan mezenkimal kök hücreler bu gruba örnek gösterilebilecek kök hücrelerdir.

Oligopotent Kök Hücreler: Bu gruptaki kök hücreler, yalnızca bazofil, nötrofil, eozinofil, monosit ve trombositlere farklılaştırılabilen lenfoid kök hücreler gibi birkaç hücre tipine farklılaşabilirler (Cai, 2012).

Unipotent Kök Hücreler: Unipotent kök hücreler, hepatosit oluşturan hepatoblastlar gibi yalnızca belirli hücre tipine farklılaşabilirler. Bu hücrelerin öncül (progenitör) hücrelerden farkı kendini yenileyebilme özelliğine sahip olmalarıdır (Ota, 2008).



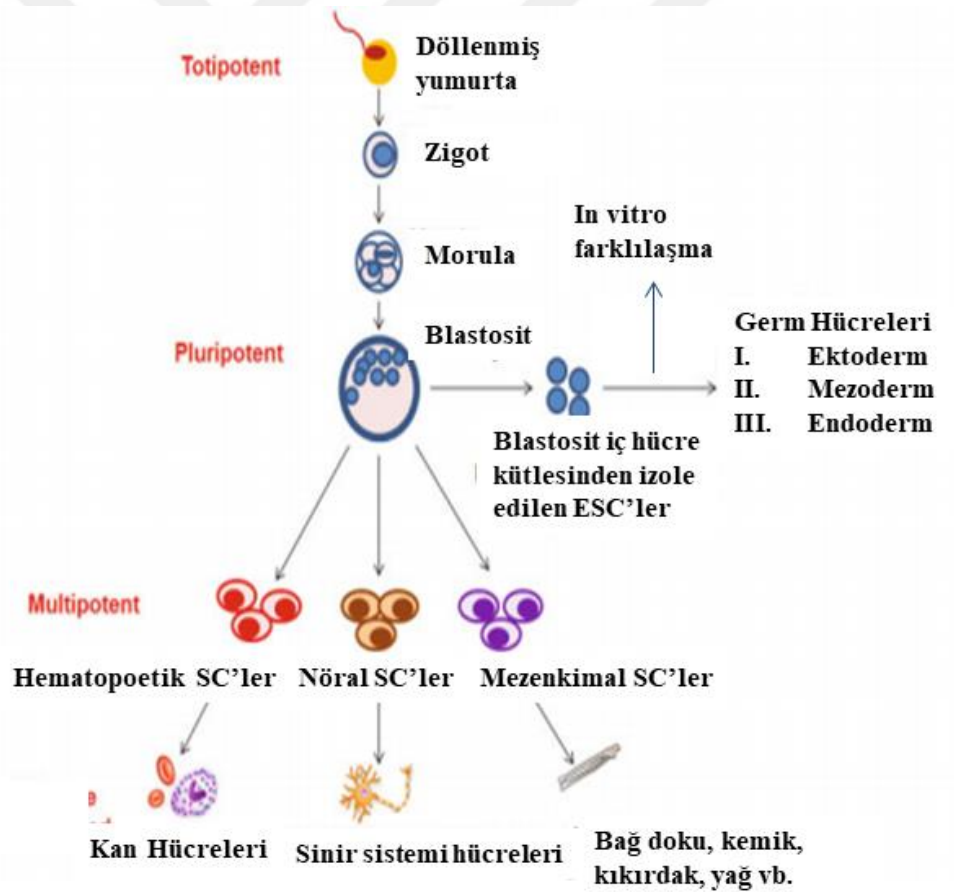
Şekil 1. Kök hücrelerin sınıflandırılması: Farklı soylara farklılaşma potansiyeline bağlı olarak, kök hücreler totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olarak kategorize edilir (Cai, 2012).

Kök hücreler esas olarak iki farklı kaynaktan elde edilebilirler: Embriyonik gelişim sürecinin erken dönemlerinde blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kaynaklardan elde edilen kök hücrelerdir (dokuya özel kök hücreler, doğum sonrası dönemdeki kök hücreler).

Kök hücreler köken aldıkları dokuya göre üç ana başlık altında incelenebilir:

Embriyonik Kök Hücreler: Erken dönemdeki (insanda 5-6 günlük implantasyon öncesi blastokist dönemi) memeli embriyonu blastokistindeki iç hücre kitlesinden elde edilen pluripotent hücreler embriyonik kök hücrelerdir (EKH) (Lim et al., 2013). Vücuttaki herhangi bir farklılaşmış hücreyi oluşturma yeteneğindedirler.

Embriyonik kök hücreden elde edilen hücre kümelerine embriyoid cisimcikler olarak adlandırılmaktadır. Bunlar plesanta dışında, ektoderm, mezoderm ve endoderm tabakalarından köken alan çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilir (Vazin & Freed, 2010).



Şekil 2. Kök hücre hiyerarşisini gösteren şematik diyagramı.

Embriyonik kök hücreler (EKH'ler) pluripotenttir ve üç dermal tabakanın, yani endoderm, mezoderm ve ektoderm hücrelerine farklılaşma kapasitesine sahiptir. Yetişkin kök hücreler multipotenttir ve farklılaşma konusunda daha kısıtlı bir yeteneğe sahiptirler ve belirli bir soyu adarlar (Hayes et al., 2012).

Embriyonik kök hücreler 1981 yılında ilk kez bağımsız iki grup tarafından fare embriyosundan elde edilmiştir (Kaufman & Evans, 1981). İnsan embriyonik kök hücreleri ise 1998 yılında kültüre edilebilmiştir (Thomson, 1998).

EKH'lerin, erişkin kök hücrelerde bulunan, örn. pluripotent özellik ve hematopoetik kök hücrelerin kültürde çoğaltılma zorlukları gibi bazı dezavantajları olmaması nedeniyle, hücresel tedavi ve doku mühendisliği stratejileri için daha iyi bir kaynak oldukları düşünülmektedir. EKH' ler in vitroda potansiyel olarak sınırsız sayıda çoğaltılıp (farklılaşmadan), ortamın değiştirilmesi ile istenilen her hücre tipine farklılaştırılabilmektedir (Dupont et al., 2019).



Şekil 3. Embriyonik Kök Hücre Kaynakları.

Kök Hücreler, amniyotik membran, amniyon sıvı, Wharton jeli ve plasenta dahil olmak üzere tüm ekstra embriyonik dokulardan izole edilmiştir (Marcus & Woodbury, 2008).

Fetal Kök Hücre: 1928'den beri, insan fetal dokuları ve kök hücreleri dünya çapında çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır (Ishii, 2014). Fetal doku, gelişim için yeterli sayıda kök hücre ve progenitör hücre içerir. Yetişkin doku hücrelerine göre fetal doku hücrelerinin kültürü daha kolaydır ve hızlı çoğalırlar (Sells et al., 1985). Kadın hastalıkları ve doğum hastanelerinde spontan abortus, ölü doğum veya ektopik gebelik nedeniyle ameliyat sonrası kadavra fetüslerinden fetal doku elde edilebilir (Marcus & Woodbury, 2008).

Fetal kök hücrelerin iki tipi bulunmaktadır:67

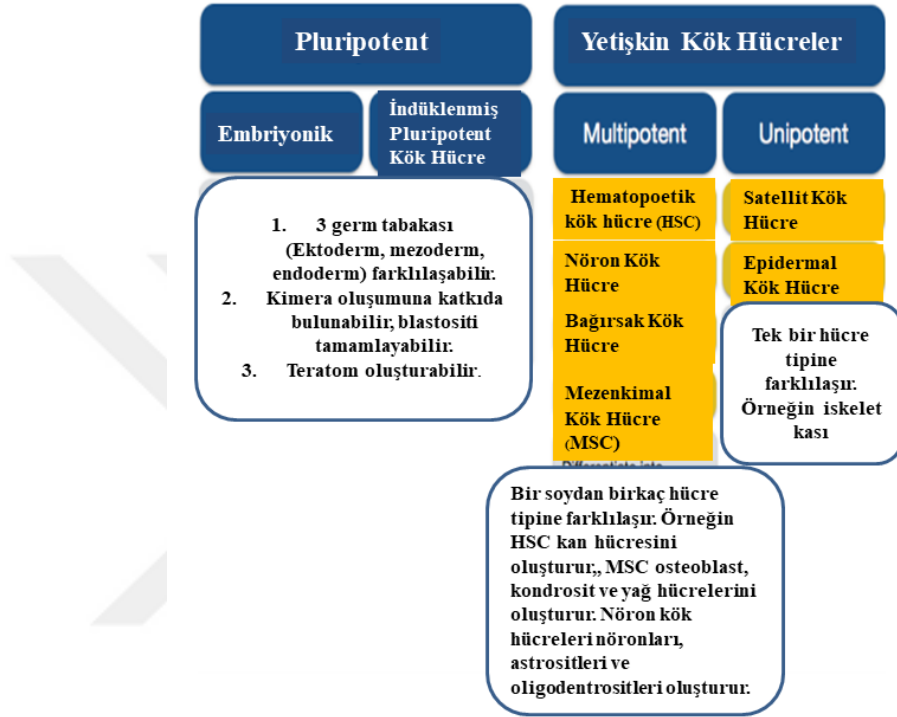
Tam fetal kök hücreler, oluşumunu tamamlamış fetüse ait dokulardan genellikle kürtaj sonrası elde edilmiş kök hücrelerdir. Bu hücreler ölümsüz olmamasına rağmen yüksek bir bölünme kapasitesine sahip olup multipotent hücrelerdir.

Ekstraembriyonik fetal kök hücreler, ekstraembriyonik membranlardan köken almış olup, erişkin kök hücrelerden ayırt edilmemektedir. Bu hücreler ölümsüz olmamasına rağmen yüksek bölünme kapasitesine sahip olup pluripotent kökenlidir.

Erişkin Kök Hücre: Erişkin kök hücreler, doğumdan sonra doku ve organlarda bulunan kök hücrelerdir. Erken embriyo gelişimini tamamlamış bir organizmada bulunan kök hücreler olarak da tanımlanır. Bir doku veya organdaki farklılaşmış hücreler arasında bulunan farklılaşmış hücrelerdir. Embriyonik kök hücrelere göre gelişmenin daha sonraki basamaklarında görülen bu hücreler, organizmanın yaşamı boyunca daha sınırlı olmakla birlikte kendilerini yenileyebilme özelliğini korurlar ve ihtiyaç halinde farklılaşma göstererek doku ve organların tamirini, yenilenmelerini ve yaşamlarını devam ettirmelerini sağlarlar (Cable et al., 2019). Somatik kök hücre de denilen erişkin kök hücrelerinin esas görevleri (fizyolojik işlevleri), doku homeostasisini ve doku hasarından sonra rejenerasyonu sağlamaktır (Toma et al., 2001). Erişkin kök hücreleri daha çok elde edildikleri dokuya dönüşme potansiyelleri vardır. İnsan organizmasında hematopoetik kan yapıcı kök hücrelerin tüm kan elemanlarını vermeleri, gastrointestinal sistem kriptalarındaki kök hücrelerin mukozayı, spermleri yapan kök hücrelerin germ hücrelerini ve derideki epidermis tabakasını oluşturan deri kök hücrelerini oluşturmaları; kök hücrelerin zaman içinde “lineage-restricted” yani belirli bir yönde farklılaşma gösterebilen duruma adapte olduklarını göstermektedir (Dulak et al., 2015). Erişkin kök hücreler “Kök Hücre Niş” lerine ait dokular içinde oturarak uykuda (dormant=quiescent) beklemekte veya ihtiyaç sinyali aldıktan sonra aktive olarak bölünmektedirler (Review, 2016). Erişkin kök hücrelerin;

- Saflaştırılmaları ve tanımlanmaları daha zordur.
- Sınırlı büyüme kapasitesi nedeniyle büyük miktarlarda elde edilmeleri zordur.
- Zamanla özelliklerini kaybedebilirler, sadece belli hücre tipine dönüşebilme yetenekleri vardır.

Erişkin kök hücreler, multipotent-pluripotent kök hücrelerdir (Şekil 4).



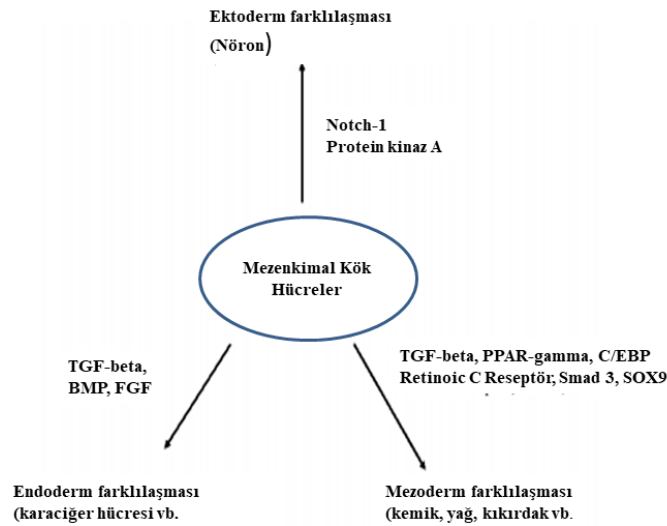
Şekil 4. Kök Hücrelerin Temel Özellikleri

Normal koşullar altında pluripotent kök hücreler yetişkin organizmada bulunmazlar, bunlar blastosistin iç hücre kitlesinin izolasyonu (Embriyonik Kök Hücreler) veya tanımlanmış transkripsiyon faktörlerinin (İndüklenmiş pluripotent kök hücreler) aşırı ekspresyonu ile somatik hücrelerin yeniden programlanması sonucu elde edilir. Yetişkin kök hücreler ya multipotent ya da unipotenttir. Aynı organda, örneğin deride hem multipotent hem de unipotent kök hücre popülasyonları bulunabilir (Dulak et al., 2015).

Erişkin kök hücreler; kemik iliğinde, periferik kanda, kan damarlarında, diş dokusunda, iskelet kasında, karaciğerde, over epitelinde, akciğerlerde, deride, beyinde, medulla spinaliste, miyokardium içinde, paratiroid bezlerde varlıkları gösterilmiştir (Parfejevs et al., 2020).

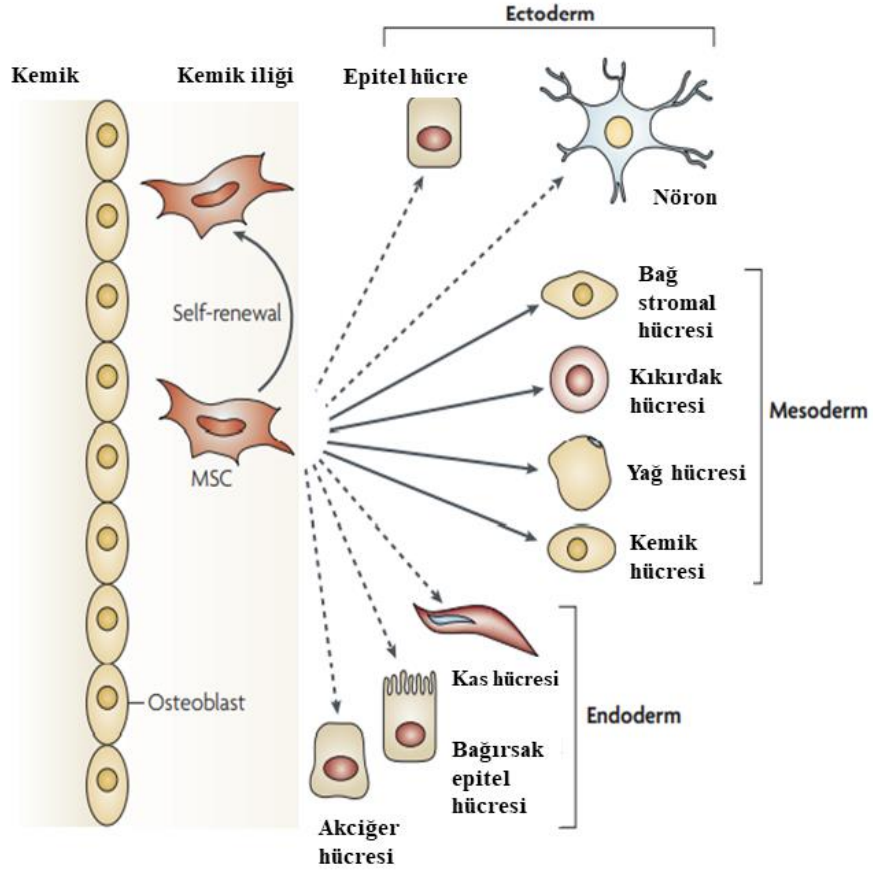
2.1.2. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH), erişkin kök hücre tipidir. Stromal kökenli olmaları nedeniyle genel anlamda “destek hücresi” özelliği taşımaları, MKH’lerin tıbbın birçok alanında kullanım potansiyeli taşıma temelini oluşturmaktadır (Ding & Shyu, 2011). Salgıladıkları çözünür faktörler, hücreler arası veya hücre dışı matriks ile yakın ilişki halinde bulunmaları nedeniyle içinde bulundukları dokuya özel hücrelerin fonksiyonlarına önemli katkı sağlarlar. Doku mikroçevresinin önemli bileşenleri olmaları ve çoğunlukla immün sistem üzerine baskılayıcı özellik taşımalarından dolayı büyük ilgi uyandırmaktadırlar (Uccelli et al., 2008). Bu hücreler ilk kez 1976 yılında Fridenstein tarafından tanımlanmışlardır. Fridenstein, FCS (fötal buzağı serumu) kullanılarak yapılan kemik iliği kültürlerinde adezyon yeteneği gösteren, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen hücre kolonilerinin bulunduğunu ve bunların kemik, yağ hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip olduklarını göstermiştir (Bahsoun et al., 2019). Bu hücrelerin hematopoetik özellikte olmayan kök hücreler olduğu, her üç germ tabakasından köken alan hücrelere farklılaşma yeteneği bulunduğu ortaya konmuştur (ŞEKİL 5).



Şekil 5. MSC’lerin farklılaşması üzerindeki çeşitli yolların etkisi.

MSC’ler, farklı sitokinler ve yollar aracılığıyla çeşitli soylar oluşturmak için farklılaşabilir (Ding & Shyu, 2011).

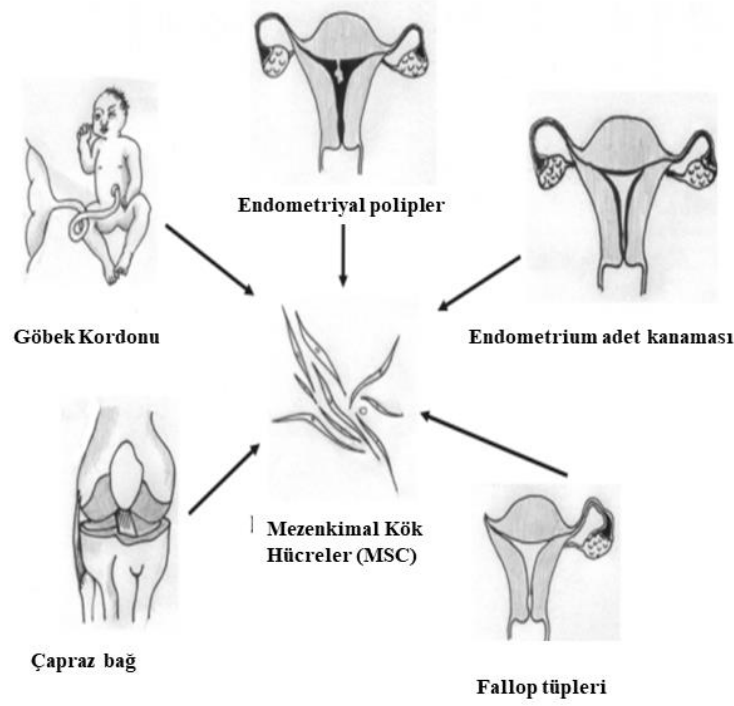


Şekil 6. MSC’lerin çoklu farklılaşabilme yeteneği (Uccelli et al., 2008).

Önceleri, koloni oluşturan birim fibroblast CFU-F (Colony forming unit fibroblast) ve “Kemik iliği stromal fibroblast” ları denilen bu hücreler zamanla yerini şu farklı adlandırmalara bırakmıştır; Kemik iliği stromal hücreleri (KİSH), mezenkimal kök hücreler (MKH) / Stromal hücre ya da mezenkimal progenitör-öncül hücreler (MPH). Bu hücrelerin, ISCT tarafından kök hücre olarak isimlendirilmek yerine “mezenkimal stromal hücre” veya “multipotent mezenkimal stromal hücre/MSC” olarak adlandırılmaları önerilmiştir (Z. Liu et al., 2009).

Mezenkimal kök hücrelerin, elde edildikleri dokudan bağımsız olarak plastik doku kültür kaplarına yapışabilme, fibroblastoid morfoloji gösterme, çok yönlü farklılaşabilme ve bazı yüzey işaretleri taşımaları gibi birçok özellikleri vardır (Prockop, 2009). Uluslararası Hücresel Tedavi Derneğinin (International Society for Cellular Therapy-ISCT), mezenkimal ve doku kök hücre komitesi insan MKH’lerine ait minimal kriterinin CD105, CD73, CD44 ve CD90 markırları için pozitif ekspresyon ve CD14, CD45, CD19, CD34 ve HLA-DR yüzey molekülleri için negatif ekspresyon olmasını önermişlerdir. Ayrıca MKH’lerin standart in-vitro kültür koşullarında plastik yüzeye yapışmaları ve adiposit, osteosit ve kondrositlere farklılaşma kapasitesine sahip olması gerekmektedir. Başta

hematopoetik kök hücre nakilleri, doku mühendisliği, gen tedavileri ve immünsüpresif etkilerinin olması, MKH'lerin rejeneratif tıpta en önemli hücre kaynağı olarak değerlendirilmelerinin önünü açmıştır (Dominici et al., 2006). Son olarak MKH'ler yağ dokusu, periferik kan, kemik iliği gibi yetişkin dokulardan veya kordon kanı, göbek kordonu, amniyotik sıvı gibi neonatal dokulardan elde edilebilirler (Pittenger et al., 1999), (Şekil 7).



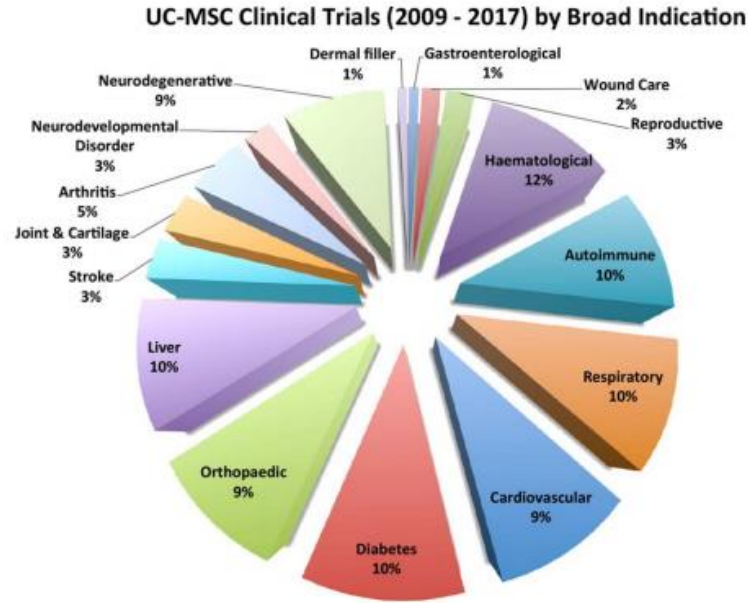
Şekil 7. MSC'lerin çeşitli kaynakları.

Hücreler izole edilir, kültürlenir ve üç germ tabakasına farklılaşabilir (Ding & Shyu, 2011).

2.1.3. Göbek Kordonu (Wharton Jölesi) Mezenkimal Kök Hücreler

İnsan göbek kordonu, hücre tedavisi için geliştirilen ve giderek daha popüler hale gelen bir hücre kaynağıdır. Bu hücreler şu anda insan klinik deneylerinde kullanılmaktadır ve aynı zamanda artan sayıda prelinik ve temel çalışmalar için bir hücre kaynağı sağlamaktadır (Şekil 8). Çeşitli güncel araştırmalar göbek kordonu kaynaklı mezenkimal stromal hücreleri ve bunların terapötik etkinliği potansiyelini yayınlamıştır (Joerger-Messerli et al., 2016). Bununla birlikte, göbek kordonu yapısal ve bileşimsel olarak kemik iliği, yağ veya plasentadan çok daha basit bir doku olmasına rağmen, insan kordonunun bağ

dokusunun yapısı veya burada bulunan hücrelerin çıkarılma yolları konusunda çok az fikir birliği vardır. Bu bol hücre kaynağının popülaritesi arttıkça bu organın yapısına ilişkin değerlendirme ve hangi ekstraksiyon yöntemlerinin kullanılabileceğine yönelik araçların oluşturulması için bir temel sağlamaya ihtiyaç vardır (Kalaszczynska & Ferdyn, 2015).

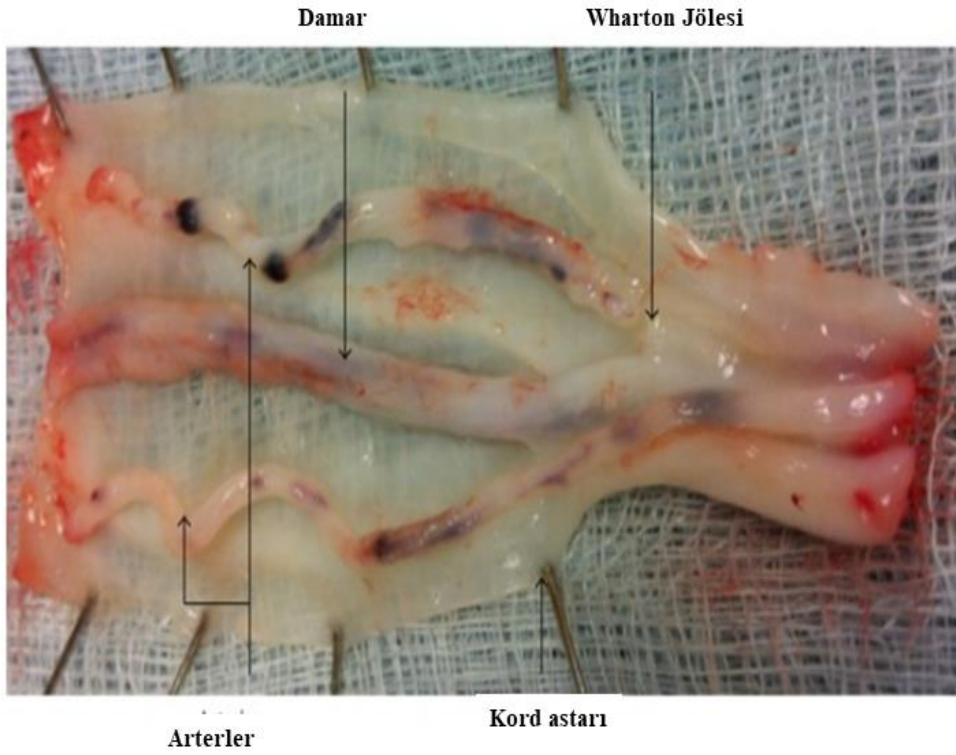


Şekil 8. İnsan göbek kordonu MSC'leri kullanan kayıtlı klinik deneyler (2009-2016).

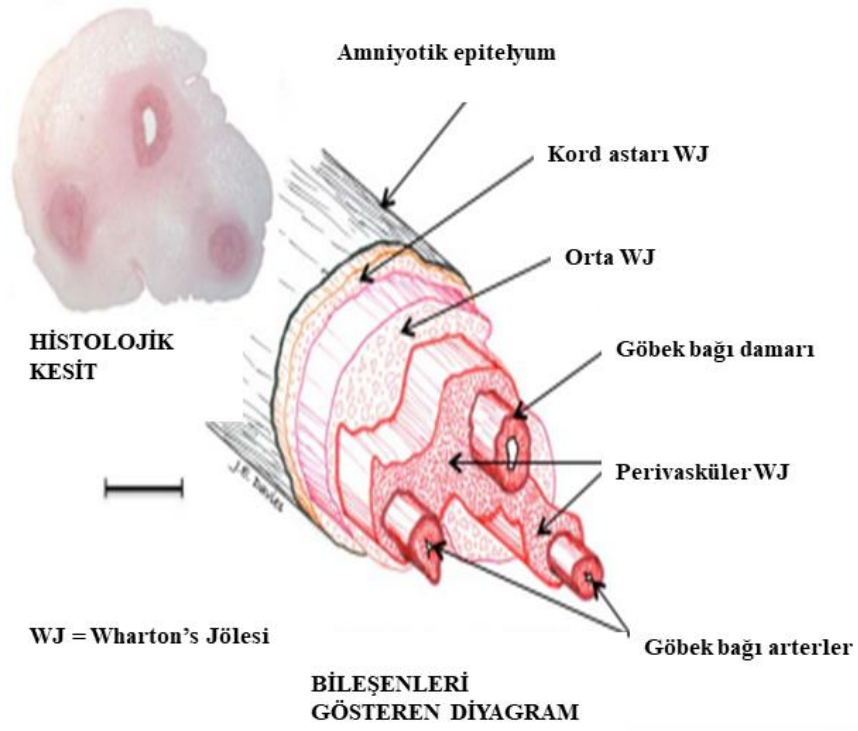
Clinicaltrials.gov verilerine göre ocak 2016 itibariyle toplam 109'u bulmuştur, ancak şuan 34'ü açıktır. Pasta grafik, hedef endikasyonların geniş dağılımını gösterir (kordon kanından olanlar hariç). "Hematolojik" endikasyonlar %12 ile en büyük grup olmasına rağmen, çalışmaların çoğu, bağ dokusu soy farklılaşması kapasitesinden ziyade hücrelerin bağışıklık düzenleyici ve anti-inflamatuvar özelliklerine dayanmaktadır. Bu yüzdeler, "Nöro-dejeneratif" ve "Karaciğer" hedeflerinin toplam klinik araştırma sayısının %60'ını temsil ettiği tüm doku kaynaklarından alınan hücreleri kullanan MSC denemelerinden farklıdır (Kingdom, 2012). Kısaltma: MSC, mezenkimal stromal hücreler.

Plasentalı memelilerde göbek kordonu (Umbilical cord), plasentayı geliştirmekte olan fetüse bağlayan ve insanlarda çevresi 1-2 cm olan 40-60 cm uzunluğunda, 40 gr ağırlığında, böylelikle bir fetal beslenme kaynağı sağlayan mesoblastik bir yapıdır (Nagamura-Inoue, 2014). İnsan göbek kordonu, fetus ile plasenta arasında embriyolojik gastrulasyonun 26. gününde oluşur. Umbilikal kord, fetal kanı plasentaya götüren 2 umbilikal arter ile arteriolize kanı plasentaya getiren umbilikal ven ve damarları çevreleyen pelte kıvamında, lamellar yapıda, mezodermal hücrelerden oluşan bir bağ dokusundan meydana gelir (Wharton Jeli) (Mennan et al., 2013). Vasküler destek ve bir miktar kasılma işlevi olarak

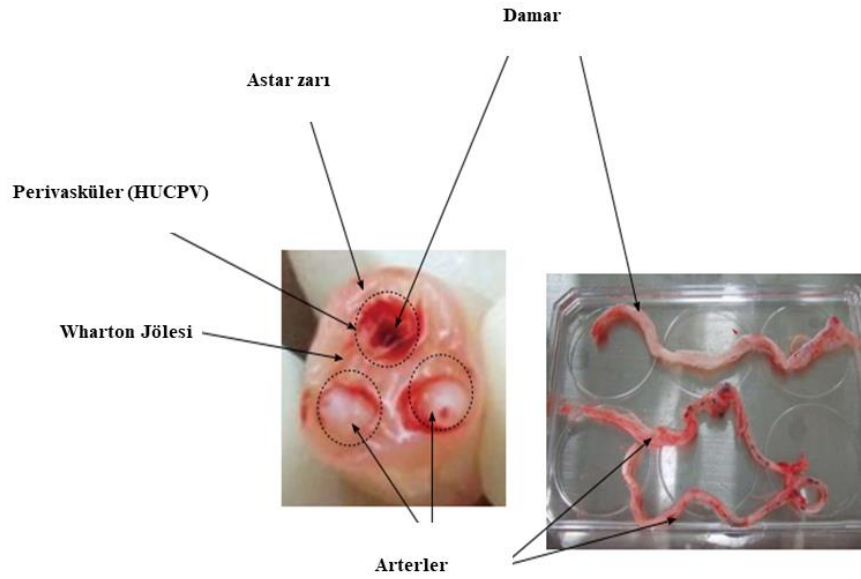
kabul edilen, mukoid bağ dokusu olan "Wharton jeli" ilk olarak 1656'da Thomas Wharton tarafından tanımlanmıştır (Mcelreavey & Irvine, 1991). Wharton jölesi, hyalüronik asitten zengindir ve stromal hücreler (fibroblast benzeri hücreler ve miyofibroblastlar) içermektedir (la Rocca et al., 2012). Wharton jölesi içerisindeki MKH'ler, Wharton jölesi MSC'leri (WJ- MSC) olarak adlandırılmışlardır. WJ- MSC'ler, embriyolojik gelişim sırasında aort-gonad- mezonefroz bölgesine göç ederken kordon çevresinde kalmış primitif MSC'lerdir (Taghizadeh et al., 2011). WJ- MSC'ler minimal kök hücre kriterlerini taşımaktadır (International Society for Cellular Therapy; ISCT) (Dominici et al., 2006).



Şekil 9. Umbilikal arterler, ven, Wharton jeli ve kordon astarını gösteren kısmen disseke insan UC'si (Mennan et al., 2013).



Şekil 10. Üç boyutlu diyagramla birlikte insan göbek kordonunun yapısı (Kingdom, 2012).



Şekil 11. Mezenkimal kök hücrelerin izole edilebildiği çeşitli göbek kordonu bölmeleri (Nagamura-Inoue, 2014). HUCPV: İnsan göbek kordonu perivasküler.

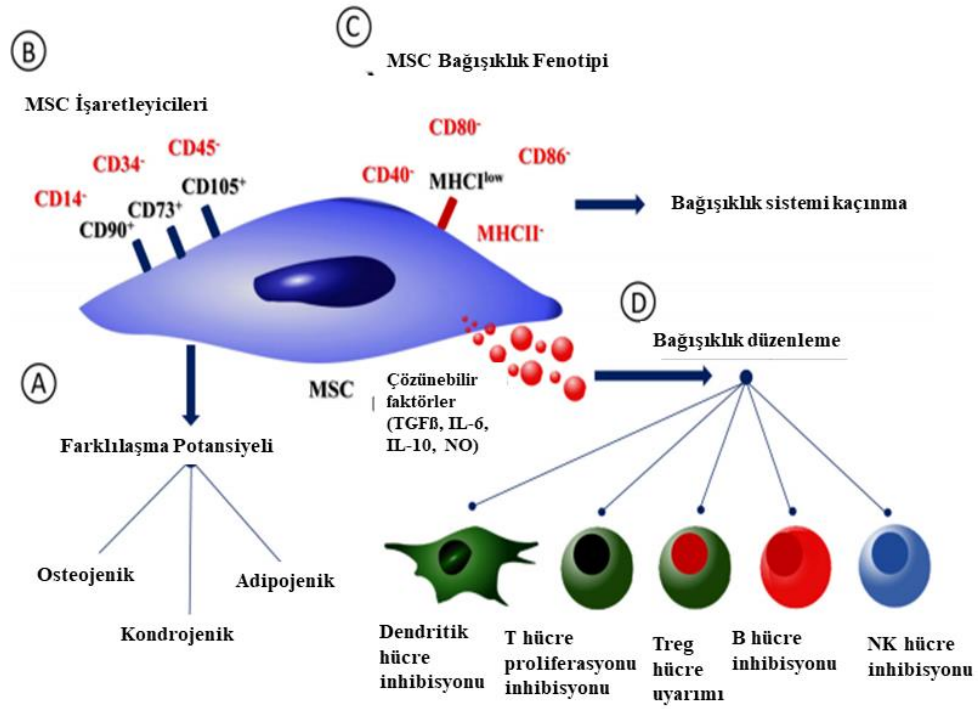
2.1.4. UC-MSK'lerin Biyobelirteçleri

UC-MSK'lerin immüno profili, International Society for Cellular Therapy tarafından açıklanan MSK'ler için standart tanımlara göre akış sitometrisi kullanılarak analiz edilir (Dominici et al., 2006). Çok potansiyelli MSK'leri tanımlamak için kullanılabilecek tek bir spesifik işaret yoktur. MSK'ler, CD29 ve CD44 gibi yapışma markörleri için pozitifdir; CD90, CD73 ve CD105 gibi mezenkimal markörler ve insan lökosit antijeni sınıf I (HLA-ABC). MSK'ler endotelial hücre markörü CD31 için negatifdir; CD34, CD45 ve CD117 gibi hematopoietik hücre markörleri ve insan lökosit farklılaşma antijeni sınıf II (HLA-DR) (Seo et al., 2009). Farklı UC bölmeleri arasında, UC-WJ, UC-V ve UC-A'dan türetilmiş MSK'ler benzer bir fibroblast benzeri bir şekil gösterir ve bu üç doku türünden gelen MSK'ler, immüno profilde önemli bir farklılık göstermez. Bu hücreler %90'ın üzerinde hücresel frekansta CD13, CD29 (integrin $\beta 1$), CD73 (SH3), CD90 (Thy-1), CD105 (SH2; endogrin) ve HLA-ABC için pozitifdir. CD34, CD45, CD133 ve HLA-D hücresel frekansı %1'den az olup negatifdir (Ishige et al., 2009). Karahüseyinoğlu ve arkadaşları, CD73'ün damarlar ve endotelium boyunca eksprese edildiğini ve perivasküler bölgede bulunmadığını, ancak en güçlü ekspresyonun WJ'nin epitel ve subepitelial bölgelerinde gözlemlendiğini gösterdi (Karahüseyinoğlu et al., 2007). CD90 çoğu bölgede pozitifdir ancak endotel lümen kaplamasında negatifdir. Schugar ve arkadaşları, CD146'nın (endotelial progenitor markör) UC'nin damar duvarlarında (%100) ve perivasküler bölgesinde (%62) ifade edildiğini, ancak artık UCWJ-MSK'lerde ifade edilmediğini bildirdi (Conconi et al., 2011). Bu belirteçler, izole edilmiş hücre popülasyonunun gücünün belirlenmesine yardımcı olabilir. UC-MSK'lerin fenotipik karakterizasyonu, kültür pasaj sayısı, kültür ortamı ve kültür yönteminden etkilenebilir.

Ayrıca, Oct4, Nanog, Sox-2 ve KLF4 gibi ESC markörleri, UC-MSK'lerde yalnızca düşük seviyelerde ifade edilir (S. J. Greco et al., 2007). Bu, MSK'lerin ESC'ler ile olgun yetişkin kök hücreler arasında bir yerde ilkel kök hücreler olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, belirli belirteçler kullanılarak pluripotent MSK'lerin kesin bir şekilde izole edilmesi bir sorun olmaya devam etmektedir.

MSK'lerde SSEA3 ve SSEA4'ün rolü tartışmalıdır. UCWJ-MSK'lerdeki SSEA4 ekspresyonu, kültür ortamındaki FBS konsantrasyonu ile önemli ölçüde korelasyon gösterirken, SSEA3 ekspresyonu ters orantılıdır. UCWJ-MSK'lerdeki SSEA4'ün ne

proliferasyon kapasitesi ne de multipotensin bir göstergesi olmadığı sonucuna varılmıştır (He et al., 2014).



Şekil 12. MSCs fenotipi, farklılaşma potansiyeli ve immünolojik özellikleri. MSCs fenotipinin ve immünolojik profilinin şematik gösterimi (Ferreira et al., 2018).

(A) MSC'lerin osteojenik, kondrojenik ve adipojenik soylara farklılaşma kapasitesi.

(B) MSC'lerin fenotipi, Uluslararası Kök Hücre Araştırmaları Derneği'ne (ISSCR) göre.

(C) MSC'lerin immünolojik profili.

(D) MSC'ler tarafından üretilen çözünür faktör aileleri ve bağışıklık hücreleri ile etkileşim profili.

2.1.5. Kök Hücrelerin Tedaviye Yönelik Kullanım Alanları

Kök hücre araştırmaları, temel ve klinik bilimlerin çatısı altında yer alan birçok alanda yürütülmektedir. Bilim insanlarının kök hücrelere ilgi duymalarının başlıca nedenlerinden biri totipotensite ve plastisite niteliklerini açıklayarak, embriyonik gelişim dönemine ışık

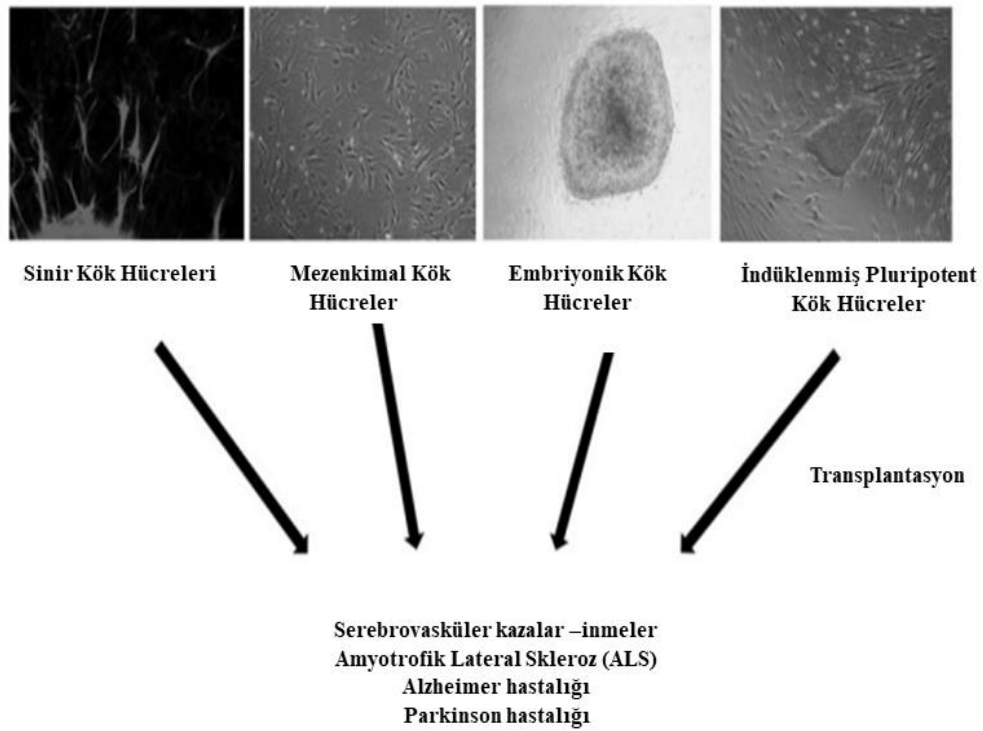
tutmaktır. Bu niteliklerin düzenlenmesinde görevli genlerin ve farklılaşmayı yönlendiren moleküler düzeneklerin belirlenmesi, temel biyolojik bilimlere sağlanacak yararlar arasında başlıcalarıdır ki farklılaşma sürecindeki hataların, doğumsal kusurlar ve ilerleyen dönemde kanser gibi ciddi hastalıkların gelişiminde belirleyici olduğu bilinmektedir (Chu et al., 2020).

Günümüzde hücre tabanlı tedavilerde; insan embriyonik kök hücreleri, göbek kordonu kök hücreleri, fetal kök hücreler ve erişkin kök hücreleri kullanılmaktadır. Embriyonik kök hücreler üzerindeki temel bilimsel araştırmaların, bu hücrelerin klinik tedavisi olmayan birçok hastalığa gelecekte açılım getirecek şekilde kullanımını olanaklaştırması beklenmektedir. Böylece kendini yenileme ve onarım kapasitesi olmayan hücrelerin kaybına bağlı olarak gelişen hastalıklar tedavi edilebilecektir. Bunlar arasında Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, Multipl skleroz, kalp krizi sonucu oluşan kalp kası yetmezliği, kaza sonucu oluşan felçler ve sinir hücrelerinin (nöronların) yitilmesiyle gelişen diğer hastalıklar, kemik ve eklem iltihabı (osteoartrit), kıkırdak ve kemik kayıpları, kanser ve bağışıklık sistemi hastalıkları ile şeker hastalığı (Tip-1 diabetes mellitus) sayılabilir (S. U. Kim & de Vellis, 2009). Yine, kök hücre kaynağı olarak göbek kordonu ve göbek kordonu kanı 1988 yılından beri çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Günümüzde göbek kordonu kök hücreleri; bebeklik çağı hastalıkları olan Krabbe hastalığı, Prenatal asfiksi, Neonatal ensefalopati gibi hipoksi-anoksi ve hipoksik beyin hasarından (HIE) etkilenmiş bebeklerin tedavisinde aynı zamanda çeşitli akut ve kronik lösemeler, Hondgkin lenfoma, orak hücre anemisi gibi birçok malign ve malign olmayan hastalıklarda klinik olarak kullanılmaktadır (Crook et al., 2017).

Yeni ilaçların geliştirilmesinde, etkinliklerinin ve sitotoksitelerinin değerlendirilmesinde, organizmayı oluşturan hücrelerin hasarlanması ya da ölmeleri durumunda, gen tedavisi ve rejeneratif tıpta kök hücrelerin kullanılabileceği öngörülmektedir. Günümüzde embriyonik ya da erişkin dokulardan elde edilen kök hücrelerin, uygun ortam ve koşullar sağlandığında birçok hücre tipine in-vitro koşullarda farklılaştırılmaları sağlanmaktadır. Ancak farklılaştırılan hücrelerin, in-vivo tedavide kullanılması için hücrelerin çoğalma kontrol mekanizlarının ve genetik yapılarının çok iyi bilinmesi gereklidir. Bu hücrelerden oluşturulacak hücre-doku ya da organların hasarlı olan bölgeye aktarılması yerine koyma (reperatif) ve tamir etme (rejeneratif), farklılaşan hücrelerin de-diferansiyasyon ve re-diferansiyasyon potansiyelleri, çoğalma ve göçlerinin kontrolü değerlendirilerek yeni tedavi ve araştırmaların yolunu açacağı öngörülmektedir

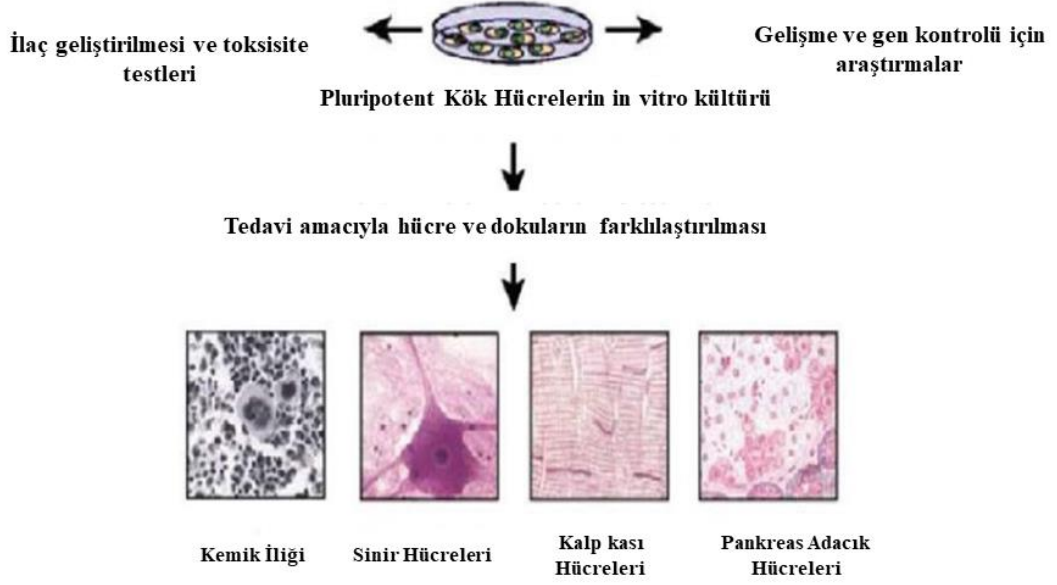
(Vizoso et al., 2017).

Ek olarak, mezenkimal kök hücrelerin (MSC), immünomodülatör özelliklere sahip olması ve konak dokudaki mikro ortamı düzenleyen sitokinleri, immün reseptörleri salgılaması MSC'lerin tedavide önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüs-2'nin (SARS-CoV-2) dünyada korkunç derecede yayılması nedeniyle tedavi olarak MSC'ler tarafından salınan eksozomların kullanıldığı araştırmalar bulunmaktadır. MSC'ler tarafından salınan bu eksozomların; immünomodülatör, antiviral, anti-fibrotik ve doku onarımıyla ilgili işlevler sergilediği kanıtlanmış ve Covid-19 hastalığının tedavisinde başarılı olabileceği düşünülmektedir (Jayaramayya et al., 2020).



Şekil 13. Nöral kök hücreler (NSCs), mezenkimal kök hücreler (MSCs), embriyonik kök hücreler (ESCs) ve uyarılmış pluripotent kök hücreler (iPS) nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde potansiyel uygulanır (S. P. Liu et al., 2013).

Kök Hücre Araştırmalarının Klinik Potansiyeli



Şekil 14. Kök hücre plastisitesi ve gelecekte kullanım alanları (Kansu Emin, 2005).

2.2. Perinatal Asfiksi

2.2.1. Tanım

Doğum asfiksisi, dünya çapında yenidoğan ölümlerinin yaklaşık dörtte biri buna bağlanan neonatal ölümlerin önemli bir nedenidir. Doğum asfiksisine bağlı yenidoğan ölümlerinin çoğu, düşük ve orta gelirli ülkelerde meydana gelir. Hayatta kalanlar artmış nörogelişimsel sakatlık riski altındadır ve risk hipoksik-iskemik ensefalopati (HIE) geliştiren yenidoğanlarda en yüksektir (Rodríguez et al., 2020).

Anoksi, birçok primer nedenlere bağlı olarak gelişebilen, oksijenin tamamen yokluğunun neden olduğu sonuçları tanımlar.

Hipoksemi, arteryal oksijen derişiminin azalması buna bağlı olarak hipoksi, hücreden organlara kadar tüm yapıların oksijenizasyonunun azalmasını tanımlar.

İskemi, hücre düzeyinden organ yapısına kadar tüm aşamalarda canlı yapıların hayati fonksiyonlarını idame ettirmeleri için gerekli kan akımının azalmasını tanımlayan terimdir.

Neonatal ensefalopati, 35. Gebelik haftası ve sonrasında doğmuş, erken neonatal dönemde ortaya çıkan, nörolojik fonksiyonların bozulduğu anormal bilinç durumu ile kendini gösteren ve nöbet, solunumunun başlatılması ve sürdürülmesinde zorluk, kas ve reflekslerde azalma, dolaşım bozukluğu ile tanımlanan klinik bir sendromdur. Amerikan Jinekoloji ve Obstetri Derneği (ACOG), hastalığın neden-sonuç ilişkisinin tam olarak anlaşılmamış olmasından dolayı hipoksik iskemik ensefalopati yerine “neonatal ensefalopati” terimi kullanmayı önermektedir (The American College of Obstetricians and Gynaecologists, 2014).

Perinatal asfiksi, doğum sürecinin hemen öncesinde, sırasında veya sonrasında fetüse veya fetüse kan akışı veya gaz alışverişinin olmamasıdır. Perinatal asfiksi, peripartum dönem sırasında bir fetüse veya bebeğe kan akışının, oksijenin azalmasına bağlı olarak derin sistemik ve nörolojik sekellere neden olabilir. Plasental (doğum öncesi) veya pulmoner (doğum sonrası) gaz değişimi tehlikeye girdiğinde veya tamamen kesildiğinde, hayati organlarda kısmi (hipoksi) veya tam (anoksi) oksijen eksikliği vardır. Bu ilerleyici hipoksemi ve hiperkapni ile sonuçlanır (Sugiura-Ogasawara et al., 2019). Hipoksemi yeterince şiddetli ise, dokular ve hayati organlarda (kas, karaciğer, kalp ve nihayetinde beyin) oksijenizasyon azalması gelişecektir ve buna bağlı olarak anaerobik glikoliz ve laktik asidoz ortaya çıkacaktır. Neonatal hipoksik-iskemik ensefalopati, spesifik olarak perinatal asfiksisinin nörolojik sekelini yani hasar sonucu ortaya çıkan serebral zedelenmeyi ifade eder (Hakobyan et al., 2019).

2.2.2. Epidemiyoloji

Gelişmiş ülkelerde perinatal asfiksi insidansı 1000 doğumda ikidir, ancak anne ve yenidoğan bakımına erişimin sınırlı olabileceği gelişmekte olan ülkelere bu oran 10 kat kadar daha yüksektir. Etkilenen bebeklerin %15-20'si yenidoğan döneminde ölür ve hayatta kalanların %25'ine kadar nörolojik defisitler kalır.

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre dünyadaki yenidoğan ölümlerinin %11 perinatal asfiksi nedeni ile olmaktadır (UNICEF Report, 2014). 2017 yılında Türkiye'de bebek ölümlerinin %49.8'i yenidoğan döneminde olup bu ölümlerin %10'u perinatal asfiksi nedeni ile olmuştur.

Perinatal asfiksini olduğu orta gelirli ülkelerde neonatal ölüm oranını azaltmak zordur ve önemli bir ölüm nedenidir (Kawakami et al., 2021). Doğumdan önce ve sonra anne sağlığı bakımına bağlı olarak doğumdan sonraki ilk hafta içinde yenidoğan ölümleri baskındır. Düşük ve orta gelirli ülkelerde yenidoğan ölüm oranı 5 yaş altı ölümlerin %42'sini oluşturmaktadır (Sendeku et al., 2020).

Kawakami ve arkadaşlarının Brezilya'da yaptığı çalışmaya göre 2004-2013 yılları arasında 5 yaş altı çocuk ölümlerinin başlıca üç nedeninden ikisi yenidoğan, özellikle erken doğum komplikasyonları (%17.8) ve intrapartum ile ilgili olaylar (%11.6) olduğu görülmüştür (Kawakami et al., 2021).

Perinatal asfiksi, dünya çapında neonatal morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenidir. Dünya Sağlık Örgütü raporuna göre perinatal asfiksi, erken doğum (%17) ve pnömoni (%15) sonrasında 5 yaş altı çocuk ölümlerinin (%11) üçüncü önde gelen nedenidir (World Health Organization, 2015), (Wayessa et al., 2018).

Düşük ve orta gelirli ülkelerde, yenidoğan ölümleri, perinatal asfiksi gibi önlenabilir nedenlere bağlı olarak Güney Asya'da 5 yaş altı çocuk ölümlerinin %52'sini, Latin Amerika ve Karayipler'de %53'ünü ve Sahra Altı Afrika'da %34'ünü oluşturmaktadır (L. Liu et al., 2016). Aslam HMSS ve arkadaşları Etiyopya'da da perinatal asfiksi, %34'ünü oluşturan neonatal mortalitenin önde gelen nedenlerinden biridir (Sendeku et al., 2020). Yapılan araştırmalar sonucunda 1000 canlı doğumda perinatal asfiksi sıklığı; Chandra ve arkadaşlarının Hindistan'da 36.3, Stamatios Giannakis ve arkadaşlarının Almanya'da yaptığı çalışmada 0.89-2.1 (Van Wincoop et al., 2021), İsviçre'de yapılan çalışmada 5-8 (Endrich et al., 2017) olduğu saptanmıştır. Bu durum araştırmalarda da görüldüğü üzere ülke gelişmişliği ile doğru orantılıdır.

Ülkemizde ise perinatal asfiksi insidansına ait çalışma sayısı azdır. 2008 yılında Türk Neonatoloji Derneği Hipoksik İskemik Ensefalopati Çalışma Grubu'nun yayınladığı veriye göre, 19857 doğumda 93 bebek HİE tanısı konulmuş ve sıklık 1000 doğumda 2.6, yoğun bakım ünitelerinde ise 1000 doğumda 12 olarak saptanmıştır (TND2018, 2018). 2011 yılında Bilgin ve arkadaşlarının yayınlanan çalışmasında HİE sıklığı yenidoğan bakım ünitesinde izlenen hastalar içinde 1000 canlı doğumda 61 olarak saptanmıştır (Bilgin et al., 2011).

2.2.3. Etiyoloji

Perinatal asfiksi, maternal hemodinamik bozulma (amniyotik sıvı embolisi), uterus koşulları (uterus rüptürü) veya plasenta ve umbilikal kord (plasental abruption, umbilikal kord düğümü veya kompresyon) ve enfeksiyon nedeniyle ortaya çıkabilir. Asfiksi, resüsitasyon gerektiren riskli bir hastada doğumdan önce veya doğumdan hemen sonra ortaya çıkabilir (Viaroli et al., 2018), (Id et al., 2018), (Kapaya et al., 2018). Perinatal asfiksi antepartum (doğum öncesi), intrapartum (doğum esnasında), postpartum (doğum sonrası) dönemde maternal veya fetal sebeplerle oluşabilir (Gomella, n.d.).

Perinatal asfiksi vakalarının çoğu intrapartumda meydana gelir, ancak % 20'si antepartum ve diğer vakalar doğum sonrası erken dönemde ortaya çıkar. Perinatal asfiksi, maternal olaylar (kanama, amniyotik sıvı embolisi; hemodinamik çöküş), plasental olaylar (akut abruption), uterus olayları (rüptür), kord olayları (sıkı ense kordonu, kordon sarkması / avülsiyon) ve intrapartum enfeksiyon (maternal ateş doğum sırasında). Etiyolojiyi belirlemek için dikkatli bir obstetrik ve peripartum geçmişi gereklidir.

Doğum eylemi öncesi risk faktörleri; sosyoekonomik düzey, ailede nöbet veya nörolojik hastalık hikayesi, infertilite tedavisi sonrası gebelik, annede tiroid hastalığı, ciddi preeklamsi, gebelik kanamaları, viral hastalıklar, anormal plasental yerleşim ve zamanından sonra doğumdur (Badawi et al., 1998).

Doğum eylemi sırasında risk faktörleri; baş geliş, akut intrapartum bulgular, operatif vaginal doğum ile risk artar (States & Hospital, 1998).

Doğum sonrası hipoksi nedenleri ise; ciddi anemi, ciddi kanama, hemolitik hastalık, yaşamsal organlara oksijen taşınmasını engelleyecek derecede ciddi şok, doğum sonrası solunan havada arteriyel oksijen saturasyonu yetersizliği, siyanotik doğumsal kalp hastalığı veya akciğer hastalığı gibi kanda yeterli oksijen taşınmasındaki bozukluklar sayılabilir. Bu postpartum sebepler HİE'nin yaklaşık %5-10'unu oluşturur (Jenster et al., 2015).

Perinatal Asfiksi Risk Faktörleri ve Seçilmiş nedenleri Tablo 1-Tablo 2' de özetlenmiştir.

Tablo 1. Perinatal Asfiksini seçilmiş nedenleri.

Maternal	Plasental/Umbilical Kord	Neonatal
Diabetes mellitus (Şeker Hastalığı)	Plasental absürbsiyon	Solunum anomalileri
Hipertansiyon	Fetomaternal kanama	Nörolojik bozukluklar
Preeklampsi	Göbek kordonu sıkışması	Şiddetli kardiyopulmoner hastalık
Hipotansiyon/şok	Enfeksiyon iltihabı	Şiddetli dolaşım bozukluğu (kan kaybı)
Uterin rupturu (Rahim yırtılması)	Velamentöz kordon yerleştirme	Enfeksiyon
Şiddetli anemi	-	İlaç etkisi
Enfeksiyon	-	-

Tablo 2. Perinatal Asfiksi Risk Faktörleri

	Maternal Risk Faktörleri	Fetal/Yenidoğan Risk Faktörleri
Antepartum (Doğum Öncesi)	Hipertansiyon Epilepsi Madde Bağımlılığı İlaç Kullanımı Endokrin Hastalıklar Preeklampsi Maternal Kanama İleri Anne Yaşı Ağır Enfeksiyonlar	Postmatürite Prematürite Çoğul Gebelik Fetal Anemi Fetal Enfeksiyonlar Konjenital anomaliler Fetal Disritmi İnrauterin gelişme geriliği
İntrapartum (Doğum Sırası)	Kord basısı Kord düğümlenmesi Kord prolapsusu Umbilical damar anomalileri Plasenta previa Ablasyo plasenta Anneye aşırı sedatif verilmesi	Sezaryen ile doğum Vakum, forseps kullanımı Uzamış travay İndüksiyonlu doğum Prezentasyon bozuklukları Erken membran rüptürü
Postpartum (Doğum Sonrası)		Sepsis/şok Nöromusküler hastalıklar Prematürite Ağır anemi Kardiyovasküler kollaps Konjenital Kalp Hastalıkları Ağır Pulmoner hastalık

2.2.4. Nöropatoloji

Perinatal asfiksi olarak bilinen perinatal dönemde fetüse kan akışının ve gaz değişiminin kesilmesi, önemli olması halinde, neonatal ensefalopatiye (NE) ve sonuçta uzun vadeli hasara yol açan bir nöronal hasarın artmasını tetikleyebilir. Perinatal hipoksi-iskemiye maruz kalan bebeklerin çoğu hızlı bir şekilde iyileşip tamamen normal bir hayatta kalmaya devam ederken, bir kısmı teşhis net değilse hipoksik-iskemik ensefalopati (HIE) veya NE olarak adlandırılan gelişen bir klinik ensefalopatiden muzdarip olacaktır (Ahearne,

2016). Perinatal asfiksi, yenidoğan döneminde meydana gelen edinilmiş beyin hasarının önemli bir nedenidir ve en çok spastisite olmak üzere motor defisit, koreoteteoz, distoni, nöbetin, taksi ve kognitif defisitlerin eşlik ettiği serebral palsy görülür. Nöropatolojik özellikler yenidoğanın gestasyonel yaşı ile doğrudan ilişkili olup gestasyon yaşı 36 hafta üzerinde olanlarda subkortikal gri madde ve serebral korteks etkilenirken; gestasyon yaşı 36 haftadan küçük olanlar periventriküler beyaz madde yapılarındaki etkiler daha belirgindir (Akisu et al., 2018).

HİE / NE'nin ortaya çıkan komplikasyonları geniş kapsamlıdır ve çocuğun motor, duyuşsal, bilişsel ve davranışsal sonuçlarını etkileyebilir. Orta ve şiddetli ensefalopatisi olanlar için nöroprotektif bir tedavi olarak terapötik hipoterminin ortaya çıkışı, prognozu iyileştirmiştir. Mevcut ve gelişmekte olan nöroprotektif tedavilerden fayda sağlayacak kişileri belirlemek için, doğumdan hemen sonra yaralanmaların ciddiyeti belirlenmelidir. Kan biyokimyası, klinik muayene ve elektrofizyoloji gibi halihazırda mevcut göstergeler sınırlıdır. Ortaya çıkan biyolojik ve fizyolojik belirteçler, müdahaleden en çok fayda sağlayacak bebekleri seçme yeteneğimizi geliştirme potansiyeline sahiptir. Proteomik, metabolomik ve transkriptomikteki çalışmalardan belirlenen biyobelirteçler ile kalp atış hızı değişkenliği gibi fizyolojik belirteçler, EEG analizi ve radyolojik görüntüleme, nöroprotektif önlemlerle birleştirildiğinde HİE/NE'de iyileştirme potansiyeline sahiptir (Tonni et al., 2014).

Tablo 3. HİE-PA'de Nöropatolojik Değişiklikler

HİE-PA'de Görülen Major Nöropatolojik Değişiklikler
Fokal ve multifokal iskemik serebral nekroz-inme
Parasagittal serebral hasar
Selektif nöronal nekroz
Periventriküler lökomalazi

2.2.5. Patofizyoloji

Perinatal asfiksi, perinatal dönemde oksijen yoksunluğu ve perfüzyon eksikliği ile karakterize olup, hipoksik-iskemik ensefalopati ve serebral palsy, mental retardasyon, serebral görme bozukluğu, epilepsi ve öğrenme güçlüğü gibi sekellere yol açar. Hücrelerde PA, oksijen ve glikozdaki düşüşle ilişkilidir. ATP tükenmesine ve riskli bir

mitokondriyal fonksiyona yol açar. Yeniden oksijenlenme ve reperfüzyon üzerine, yenilenen oksijen mevcudiyeti sadece hücre fonksiyonunun restorasyonuna değil, aynı zamanda ikincil enerji yoksunluğu ve nihayetinde hücre ölümüne yol açan zararlı biyokimyasal yolların aktivasyonuna da yol açar. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu, nitrik oksit ve peroksinitrit, nörolojik hasarın gelişiminde merkezi bir rol oynar (Albrecht et al., 2019).

Hipoksik-iskemik ensefalopati (HİE), genellikle göbek kordonunun sıkışması, plasental abrupsiyon, şiddetli mekonyum aspirasyonu, konjenital kalp, pulmoner anomaliler ve bir dizi faktörün neden olduğu perinatal asfiksini bir sonucu olarak ortaya çıkan yenidoğan bir durumdur (Murden et al., 2019). HİE patofizyolojisi oksidatif stres, mitokondriyal enerji üretimi başarısızlığı, glutaminerjik eksitotoksiste ve apoptozu içerir (P. Greco et al., 2020).

2.2.5.1. Yenidoğanın Fetal-Ekstrauterin Döneme Uyumu ve Fizyolojik Özellikleri

Fetal ve ekstrauterin dönem süresince büyüme ve gelişme genetik, çevresel ve sosyal faktörlerin etkisi altındadır. Perinatal dönem tanımı, 28. gebelik haftasından doğum sonrası yedinci güne kadar olan süredir. Yenidoğan dönemi ise doğum ile başlar ve postnatal 28. güne kadar sürer. Yenidoğan dönemi süresince bir bebek üç aşamadan geçer. Birinci aşama doğum ve ilk 24 saati, ikinci aşama 24 saat ile yedi gün arasını ve üçüncü aşama ise 7-28 günler arasını kapsar. 38-42 haftalık (annenin son adet kanamasından sonra) intrauterin gelişimini tamamlayan fetüs zamanında doğmuş bebek olarak adlandırılır. 37. haftadan önce (annenin son adet döneminin birinci gününden itibaren) canlı doğan bebekler erken doğmuş olarak adlandırılmıştır. 42. haftadan sonra doğan bebeklerde geç doğmuş olarak tanımlanmışlardır (Mei et al., 2020).

İntrauterin yaşam embriyonel ve fetal olmak üzere iki döneme ayrılır. İntrauterin yaşamın ilk sekiz haftası embriyonel dönemdir. Embriyonel dönemde döllenmiş yumurta insan şeklinde bir organizmaya dönüşebilmek için hızlı bir farklılaşma gösterir. Fetal dönem ise sekizinci haftadan doğuma kadar geçen süredir. Fetal dönemde organ gelişimi embriyonel döneme göre daha yavaş olmak üzere, büyüme ve gelişme gerçekleşir (Garza, 2015).

Vücut Isısı

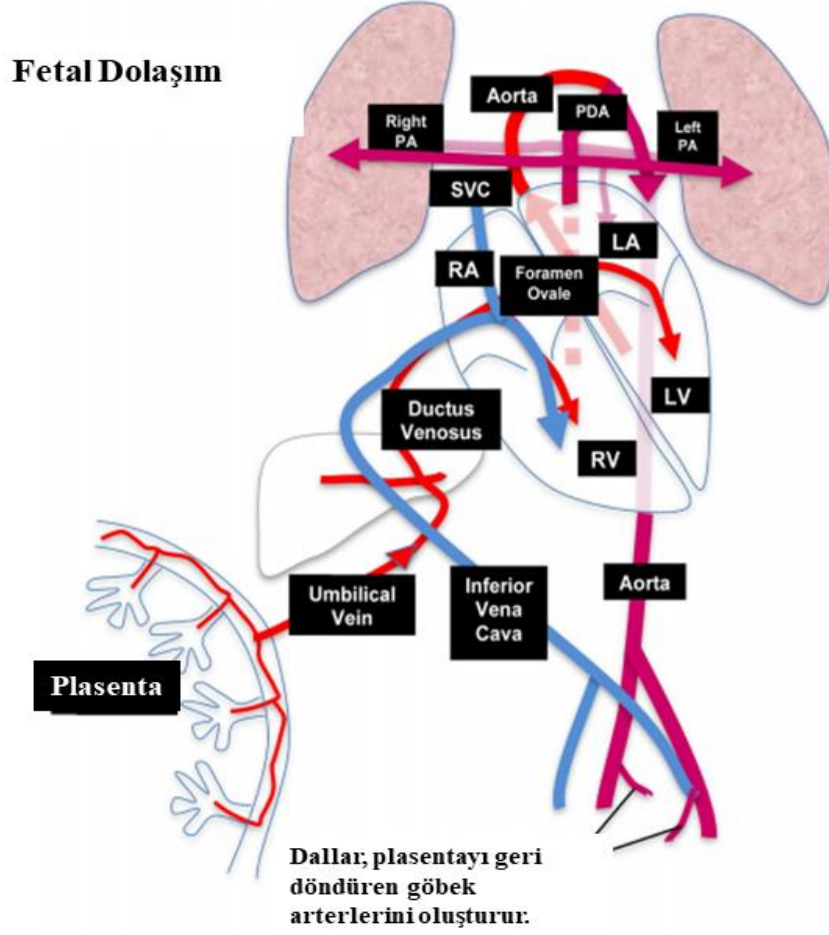
Yenidoğan ısı yanıtının götürücü yolu sempatik sinir sistemidir. En erken olgunlaşma yanıtı derin ısı arteriollerde vazokonstriksiyondur. Böylece ısı kaybı azaltılır. Kahverengi yağ dokusu ısı düzenlenmesini sağlayan ikinci götürücü yoldur (Saely & Geiger, 2012). Erken doğmuş bebeklerde ise azdır. Hayatın ilk üç-altı ayında titremesiz ısı üretimi aktiftir. Erken doğmuş bebeklerde soğuğa karşı en fazla ısı titremesiz ısı üretimi ile sağlanır. Yenidoğanda en uygun ısı koşulu oda ısısı 21-24°C ve nemi %40-60 arasında iken sağlanmış olur. Bebek eğer giydirilemiyorsa, bebeğin ısını korumak için oda ısıtılır, bebek ısıtılmış bir küvöze konur veya bir radyant ısıtıcı altına yerleştirilerek ortam sağlanır (Jcu, 2012).

Dolaşım Sistemi

Besleyici maddelerin ve oksijenin fetüse taşınması ile karbondioksit ve metabolik yıkım ürünlerinin uzaklaştırılması, plasenta aracılığı ile sağlanır. Plasenta uterin damarlardan kan alır, burada oksijen basıncı (PO₂) 15-25 mmHg'dır. Oksijen taşınması açısından plesantanın akciğerlere kıyasla daha yetersiz bir organ olması nedeniyle fetüs kanının oksijen satürasyonu daha düşüktür (Mhairi et al., 2005).

Plesantadan dönen umblikal venöz kan, duktus venozus aracılığı ile inferior vena kavaya girer ve sağ atriya ulaşır. Umblikal venöz kanın inferior vena kavaya girmesiyle kanın bir kısmı vücudun alt tarafından gelen daha az oksijenlenmiş kan ile karışır. Böylece umblikal venöz kanın en fazla 55 mmHg olan PO₂ düzeyi düşer. Fakat dolaşım sisteminin ve fetal organların yapısı, fetal hemoglobinin oksijene karşı afinitesinin yüksek oluşu, fetüste uygun oksijenizasyon için gerekli uyumu sağlar ve PO₂ 35-40 mmHg iken bile oksijen satürasyonu %80 civarında bulunur. Inferior vena kava ile sağ atriya gelen kanın yaklaşık %60'ı açık olan foramen ovale ile sol atriya ve oradan da sol ventriküle geçer. Sol ventriküle geçen kan çıkan aortaya pompalanarak karotis ve koroner arterleri besler ve kalp kası, beyin gibi önemli iki hayati organın dolaşımı daha yüksek oksijen yoğunluğu içeren kan ile sağlanır. Sağ atriya ulaşan kanın %40'ı ise vena kava süperior aracılığı ile vücudun üst tarafından gelen oksijenden fakir kan ile karışarak sağ ventriküle geçer. Akciğer arterollerindeki vazokonstriksiyon nedeniyle sağ ventriküldeki kan, pulmoner arterden duktus arteriozus aracılığıyla inen aortaya geçer. Bu kanın %10'u akciğer damarlarına ulaşır ve pulmoner venlerden sol atriya gelir. Böylelikle fetal dolaşım tamamlanmış olur. Fetüs karbondioksit basıncı (pCO₂) erişkine göre daha yüksektir.

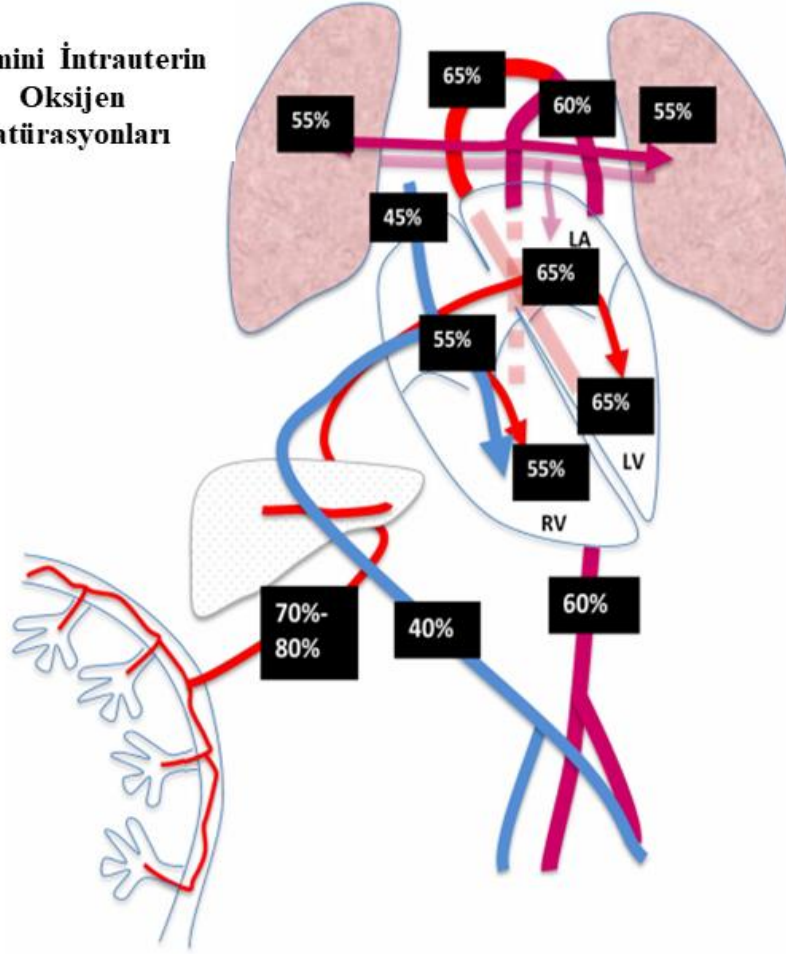
Umbilikal PCO_2 sıklıkla 35-45 mmHg arasındadır. Eğer doğumda fetal dolaşımdan yenidoğan dolaşımına geçiş sağlanamazsa oksijen seviyesinde düşüklük (hipoksi), CO_2 düzeyinde yükselme (hiperkapni) ve metabolik asidoz gelişir (Circulation, 1991).



Şekil 15. Fetal Dolaşım (Physiology, 2017).

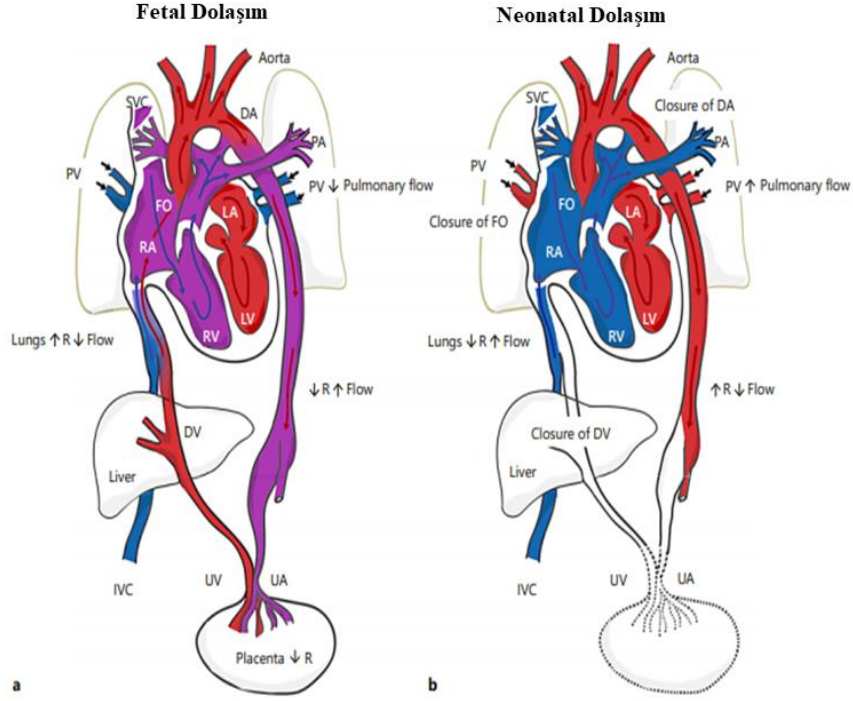
Bu şematik, fetal dolaşımı özetlemektedir. Plasenta, umbilikal ven (UV) yoluyla fetüse oksijen ve besin sağlar. UV, karaciğer seviyesinde bir miktar kanla hepatik dolaşımı perfüze ederek ve geri kalanı duktus venosusa girerek bölünür. Duktus venosustan gelen kanın çoğu foramen ovale üzerinden sol atriya yönlendirilirken, inferior ve superior vena caval kanı tercihen sağ atriya girer. Sağ ventriküler çıkış, patent duktus arteriyozus boyunca inen aorta yönlendirilirken, sol ventriküler çıkış, beyni, koroner arterleri ve üst gövdeyi besleyen preduktal damarlara kan akışı sağlar. Yüksek pulmoner vasküler direnç, patent foramen ovale ve patent duktus arteriyozus boyunca sağdan sola şant nedeniyle intrauterin pulmoner kan akışı başlangıçta sınırlıdır.

**Tahmini İntrauterin
Oksijen
Satürasyonları**



Şekil 16. Tahmini intrauterin oksijen satürasyonları (Physiology, 2017).

Umbilikal ven içindeki kan, fetal dolaşımın geri kalanıyla karşılaştırıldığında en yüksek oksijen satürasyonuna (%70 ila %80, tahmini PO₂ = 32–35 torr) sahiptir. Sol atriya duktus venosus kanının tercihli şantı ve yetersiz oksijenli inferior ve superior vena caval kanı (%40 ila %45, tahmini PO₂ = 12-14) tercihli olarak kalbin sol tarafı olan sağ atriya girmesi nedeniyle kalbin sağ tarafına (%55, tahmini PO₂ = 20-22 tor) kıyasla biraz daha yüksek oksijen satürasyonuna (%65, tahmini PO₂ = 26-28 torr) sahiptir. Sonuç olarak, beyne, koroner arterlere ve üst vücuda giden sol ventrikül çıkışı, çoğunlukla sağ ventrikül çıkışı tarafından sağlanan alt gövdeye kıyasla biraz daha yüksek oksijen satürasyonu/oksijen içeriğine sahiptir.



Şekil 17. Normal fetal ve neonatal kardiyovasküler dolaşımın şeması (Mei et al., 2020)

a. Fetal gelişim sırasında, plasentadan oksijenli ve besleyici yönden zengin fetal kan, umbilikal ven yoluyla fetüse geçer. Bu kanın yaklaşık yarısı karaciğere DV yoluyla atlar ve IVC'ye girer. Kalan kısım, karaciğere besin ve oksijen sağlamak için portal vena girer. RA'ya IVC'den giren kan, akciğerler henüz çalışmadığından RV'yi atlar ve ardından FO yoluyla LA'ya girer. SVC'den gelen kan RA'ya girer, RV'ye geçer ve PA gövdesine hareket eder. Bu kanın çoğu aorta, sağdan sola şant olan DA yoluyla girer. Aorttaki kısmen oksijenlenmiş kan, iç iliak arterlerden ortaya çıkan eşleşmiş UA yoluyla plasentaya geri döner.

b. Normal fizyolojik koşullar altında, doğumda pulmoner solunum başladığında, pulmoner kan basıncı düşer, ana PA gövdesinden gelen kanın sol PA'ya ve sağ PA'ya girmesine, akciğerlerde oksijenli hale gelmesine ve ardından PV yoluyla LA'ya geri dönmesine neden olur. FO ve DA kapanır ve fetal sağdan sola şantları ortadan kaldırır. Kalpteki pulmoner ve sistemik dolaşım artık ayrıdır. Bebek plasentadan ayrılırken UA'lar (proksimal kısımlar hariç) umbilikal ven ve DV ile birlikte tıkanır. Metabolize edilecek kan artık karaciğerden geçer. DV, duktus venosus; UV, umbilikal ven; IVC, inferior vena kava; RA, sağ atriyum; RV, sağ ventrikül; LA, sol atriyum; FO, foramen ovale; SVC, üstün vena

kava; PA, pulmoner arter; DA, duktus arteriosus; UA, umbilikal arterler; PV, pulmoner ven.

Solunum Sistemi

İntrauterin dönemde akciğerler ventilasyon yapamazlar ve fetüse oksijen plasenta aracılığı ile sağlanır. Fetüsün solunum hareketleri, gebeliğin 18. haftasında başlar. Bu hareketler gel-git şeklinde, akciğerlere giren ve çıkan amniyotik sıvının akımı sonucudur. Alveoller gebeliğin 25. Haftasında gelişir. Sürfaktan (Yüzey aktif madde), yeterli miktara 35. gebelik haftasında ulaşır ve görevi alveollerin birbirlerine yapışmasından korur. Solunum hareketleri fetüsün 36. gebelik haftasından itibaren düzenli hale gelir. Fetal dönemde alveoller fetal akciğer sıvısı (FAS) ile doludur. Alveol epitelinde üretilen bu sıvı, amniyotik sıvıya katılır. Gebeliğin son haftalarında FAS miktarı 30-35 ml/kg seviyesindedir (Rekling & Feldman, 1998). Alveol sıvısı plazma ve amniyotik sıvıya göre daha asidiktir. Fetal akciğer sıvısında klor ve potasyum miktarı yüksek, protein miktarı ise düşüktür. Doğumun başlaması ile β adrenarjik uyarı artar bu ise FAS yapımını azaltır. Doğum sonrası ilk güçlü nefes ile oluşturulan yüksek transpulmoner basınç sayesinde alveoler sıvı interstisyuma geçer, bu da pulmoner dolaşım ve lenfatiklerce uzaklaştırılır. Doğumdan hemen sonra akciğer solunumu başlamaması durumunda asfiksi-HİE tablosu gelişir (Kapaya et al., 2018).

Kan Gazları

Havadaki oksijenin akciğerlere oradan kan dolaşımına alınıp vücutta biriken karbondioksitin yine aynı yolla dışarıya verilmesi işlevi solunum ile gerçekleşir. Fetal gelişim sırasında, solunum plesanta ile sağlanır (Mhairi et al., 2005). Dokulara oksijen taşınması; Solunan havadaki oksijen miktarı ve basıncı, arteriyel pH düzeyi, vücut sıcaklığı, kardiyak atım, kan hacmi, hemoglobin yoğunluğu ve hemoglobininin oksijene olan ilgisi gibi etkenlere bağlıdır. Hemoglobine bağlanan oksijen, hücreye geçer ve özellikle mitokontri içi oksidadif olaylarda kullanılır. Mitokontriler belirli bir PO_2 düzeyi altında çalışmadıkları için, hücrelere sürekli oksijen taşınması önemlidir. Yenidoğanlarda ortalama oksijen tüketimi 7 ml/kg/dk olup bu değer erişkindeki oksijen tüketiminin iki katıdır. Hücrede oksijen kullanılarak glikozun aerobik metabolizması sağlanır ve buradan en önemli enerji kaynağı olan adenzintrifosfat (ATP) elde edilir. Oksijenin yetersiz kaldığı durumlarda ise anaerobik glikoliz meydana gelir ve sonuçta pruvik asit ve laktik asit oluşur. Anerobik metabolizma sonucu ortaya çıkan laktik asit kanda tamponlanır. Fetal dönemde PO_2 25-35 mmHg arasında iken, zamanında doğan bebeklerde ilk bir saat içinde 50-70

mmHg'ya çıkar (Ad et al., n.d.). Erken doğanlarda ise PO₂'nin bu düzeye ulaşması zaman alabilir. Periferik dolaşım ve hemoglobin yoğunluğu uygun olduğu takdirde bu oksijen aerobik glikoliz için yeterli olur. Erken doğmuş bebeklerde HbF seviyesi daha fazla olduğu için, düşük PO₂'lerde bile yüksek satürasyonlara ulaşmak mümkündür. Her organ için PO₂ alt sınır değerleri farklı olabilmektedir. PO₂'nin normalin altında olması hipoksemi olarak tanımlanır. Hipoksi ise, metabolik ihtiyaçlarından daha az miktarda dokulara oksijen gitmesidir. Hipoksemi ağır olursa hipoksiye yol açabilir. Ancak, hipokseminin olduğu durumda, kardiyak atımın ve hemoglobin yoğunluğunun artması veya metabolik ihtiyaçların azalması söz konusu ise, doku oksijenisasyonu yeterli derecede sağlanabilir. Tam tersine kardiyak atımın düştüğü, aneminin bulunduğu veya ateş sırasında olduğu gibi metabolik ihtiyaçların arttığı durumlarda, PO₂ normal olmasına rağmen doku hipoksisi gelişebilir. Hipoksemi, doğrudan PO₂ ölçülerek değerlendirilebilir fakat hipoksinin değerlendirilmesi zordur. Hipoksinin iyi bir göstergesi; Oksijen satürasyonu, arteryel kandaki oksijen miktarı ile yakın ilişkilidir. Yenidoğanda, PO₂'nin düşmesine ve PCO₂'nin yükselmesine neden olan faktörler başlıca alveolar hipoventilasyon, ventilasyon/perfüzyon bozuklukları ve akciğer dışı şantlar olarak görülmektedir (Mei et al., 2020). Hipoksi durumunda yenidoğanda solunumsal asidoz oluşur yani pH azalır, PCO₂ artar ve HCO₃ normaldir (Nadeem et al., 2012).

Doğumda Dış Ortama Uyum

Doğum sonrası başarılı bir hayata geçiş bazı dolaşım değişikliklerini gerektirir. Bu da solunum havasının girmesi için alveolar sıvının emilimini ve gaz değişimi için akciğer kan akımının artmasıdır. İlk nefesin alınmasıyla akciğerlerin kan akımı artar (Mhairi et al., 2005). Doğumla beraber solunum fonksiyonu plesantadan akciğere geçtiği için doğumdan sonraki ilk dakikalardan itibaren kardiyovasküler fizyolojide değişiklikler oluşur. Solunumun kendiliğinden başlamasından hemen sonra umbilikal kordonun bağlanması ve umbilikal arterin doğal kasılması ile plesanta dolaşım dışı kalır. Sistemik damar direnci plesantanın dolaşım dışı kalması sonucu birden yükselir. Aynı dönemde kendiliğinden solunum başladığı için akciğerler genişler ve alveoller hava ile dolar (Hospital, 1993).

Yenidoğanlarda ısı, nabız, solunum hızı, deri rengi, solunum tipi, kas tonusu, aktivite ve bilinç değişiklikleri doğum sonrası 30. dakika ile ikinci saatte değerlendirilmelidir. Apgar skoru, yenidoğanın değerlendirilmesinde kullanılan pratik bir yöntemdir (Practice & This, 1996). Doğumdan sonra belirlenen zamanlarda ve birinci, beşinci ve 10. dakikalarda objektif olarak bebeğin durumunu belirlemek için kullanılır. 1952 yılında Columbia

Üniversitesi'nde anestezi uzmanı olan Dr. Virginia Apgar tarafından beş bulguya bağlı olarak bebeğin durumunu belirlemek için önerilmiştir (Apgar, 2015). Bu değerlendirme Apgar skoru olarak bilinir. Skor, bir yenidoğanı doğumdan hemen sonra ve resüsitasyona yanıt olarak değerlendirmek için hızlı bir yöntemdir. Apgar puanlaması, kabul edilen değerlendirme yöntemi olmaya devam etmektedir. Apgar skorlaması, siyanoz, hipoperfüzyon, bradikardi, hipotoni, solunum depresyonu veya apne gibi hemodinamik uzlaşma belirtilerini değerlendirmek için tasarlanmıştır. Apgar skorları gebelik yaşı, doğum ağırlığı, maternal ilaçlar, ilaç kullanımı veya anestezi ve konjenital anomalilere göre değişebilir. Puanın birkaç bileşeni de öznel ve değerlendiriciler arası değişkenliğe eğilimlidir. Bu nedenle, Apgar puanı, bir anda bir bebeğin fizyolojisi hakkında biraz öznel bilgi sağlaması açısından sınırlıdır. Resüsitasyona yanıtın ölçülmesinde faydalıdır, ancak sonuçları tahmin etmek için kullanılmamalıdır, özellikle 1. dakikada uzun vadeli klinik bir önemi yoktur. Apgar skoru tek başına asfiksini kanıtı olarak yorumlanmamalıdır ve yaygın olarak rapor edilmesine rağmen sonuç çalışmalarındaki önemi genellikle uygunsuzdur. Resüsitasyon her zaman klinik skor hesaplamasından önce gelmelidir (England, 2001). Bir Apgar skorunun beş bölümü vardır. Her kategori eşit olarak ağırlıklandırılır ve 0, 1 veya 2 değeri atanır. Bileşenler daha sonra doğumdan 1 ve 5 dakika sonra kaydedilen bir toplam puan verecek şekilde toplanır. Tam ve geç preterm bebeklerde 7-10 arası bir puan güven verici, 4-6 arası bir puan orta derecede anormal ve 0-3 arası bir puan düşük olarak kabul edilir. 5 dakikada, bir bebeğin puanı 7'nin altında olduğunda, Neonatal Resüsitasyon Programı kılavuzları, 20. dakikaya kadar 5 dakikalık aralıklarla kaydın sürdürülmesini önerir (Razaz & Ph, 2020).

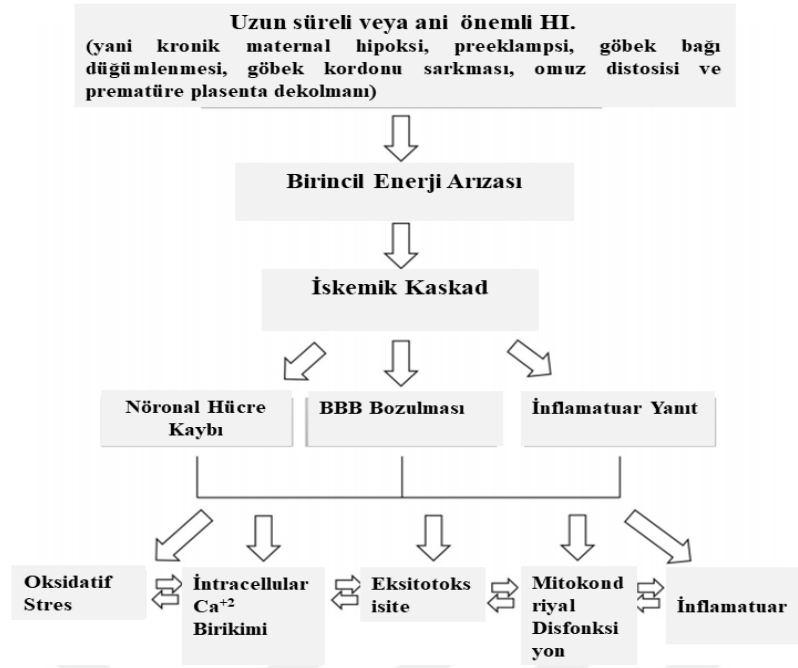
Apgar Skoru ve değerlendirme Tablo 4'de belirtilmiştir.

Tablo 4. Apgar Skoru Puanlandırılması ve Değerlendirilmesi.

Bulgu	0 Puan	1 Puan	2 Puan
Cilt Rengi	Tümüyle mavi-mor	Kollar ve bacaklar mor, diğer bölgeler pembe	Tüm vücut Pembe
Nabız (Kalp atım sayısı)	Kalp atımı	Dakikada 100 ün altında	Dakikada 100 ün üzeri
Refleks (Uyaranlara yanıt)	Yok	Yüz buruşturma (Zayıf cevap)	Hapşırma, öksürme, uyarıyı elle itme
Kas Tonusu (Aktivite)	Gevşek	Kollar ve bacaklar bükülü	Aktif Hareketli
Solunum	Yok	Yavaş ve düzensiz	Düzenli ağlıyor

2.2.5.2. HİE Patofizyolojisi

Fetal beyin, metabolize olan laktat, keton cisimleri ve glikozu elde eden ATP formunda sabit bir enerji kaynağına ihtiyaç duyar. Yetişkinlere kıyasla, fetal beyin, gerektiğinde enerji ayırma kapasitesi nedeniyle, hipoksi iskemisini (HI) tolere etme konusunda daha büyük bir yeteneğe sahiptir. Bununla birlikte, ATP'nin kritik bir şekilde tükenmesi durumunda, fetal beyin yaralanmaya duyarlı hale gelir. Bu kritik ATP tükenmesi, oksijenli serebral bozukluğa yol açan çeşitli koşullardan (örn. Kronik maternal hipoksi, preeklampsi, umbilikal kord düğümlenmesi, göbek kordunun prolapsusu, omuz distosisi ve plasental abrupsiyon) kaynaklanan uzun süreli, ani ve önemli HI'den kaynaklıdır. HI beyin hasarı, birkaç farklı aşamadan oluşan devam eden bir süreçtir (Carps et al., n.d.). Birincil kritik enerji arızası meydana geldiğinde, uyarıcı nörotransmitterlerin kontrolsüz salınımı başlar ve nöronal hücrelere (hem sitoplazmik hem de mitokondri düzeyinde) zarar veren iskemik kademeyi başlatır, beyin-kan bariyerini bozar ve önemli bir enflamatuar yanıtı aktive eder. Bunlar oksidatif metabolizmanın başarısızlığı, sitotoksik ödem ve eksitotoksin birikimi ile sonuçlanır (Montaldo et al., 2014). Serebral dolaşım restorasyonundan sonra, yaklaşık 6 saat süren bir latent faz başlar ve bunu (HI'den 6-15 saat sonra) günlerce sürebilen ikincil bir enerji yetmezliği izler. Bu aşamanın tipik özelliği nöbetler, yenilenmiş sitotoksik ödem, eksitotoksin salınımı, bozulmuş serebral oksidatif enerji metabolizması ve nihayetinde nöronal hücre ölümüdür. HİE patofizyolojisi (Şekil 18), biri diğerleriyle bağlantılı beş ana olayda özetlenebilir: oksidatif stres, hücre içi Ca^{+2} birikimi, mitokondriyal disfonksiyon, eksitotoksisite ve inflamasyondur (P. Greco et al., 2020).



Şekil 18. HIE'nin Patofizyolojisi (P. Greco et al., 2020).

2.2.5.2.1. Oksidatif Stres

Fetal beyin oksidatif strese özellikle duyarlı bir ortamdır, çünkü doymamış yağ asitleri ve serbest radikal reaksiyonlarını katalize eden metaller yoğun olarak bulunurken antioksidan seviyeleri düşüktür. HI tarafından üretilen oksidatif stres ve reaktif oksijen türleri (ROS), lipidlere, proteinlere ve nükleik asitlere önemli bir zarar vererek lipid ve protein oksidasyonuna ve DNA dejenerasyonuna yol açar (Zubrow, Delivoria-papadopoulos, & Ashraf, 2002).

Normalde, esas olarak mitokondride üretilen ROS, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz tarafından temizlenir. HI sırasında, ROS, bozulmuş metabolizma nedeniyle antioksidan enzimler tarafından hemen ortadan kaldırılamaz, bu nedenle aşırı bir ROS birikimi meydana gelir. Bu, lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın oksidatif modifikasyonu ile birlikte, yenidoğan hipoksik-iskemik ardından metabolik yetmezliğe ve mitokondriyal disfonksiyona yol açar.

HIE'de ROS, mitokondriyal elektron taşıma zinciri, NADPH oksidazlar, ksantin oksidaz, araşidonik asit ve nitrik oksit (NO) sentazdan üretilir.

NO sentaz, hipoksiye bağılı enerji tüklenmesi tarafından sağlanan bir mekanizma tarafından etkinleştirilir. Bu, NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptör iyon kanalında değişikliklere neden olarak sitoplazmaya Ca^{+2} infux'unu indükler. Hücre içi Ca^{+2} artışı, bir Ca^{+2} / kalmodüline bağılı mekanizma yoluyla NO sentazının aktivasyonuna yol açar ve NO serbest radikalleri oluşturur.

Hipoksi sırasında üretilen NO, farklı mekanizmalar yoluyla birçok olumsuz nöronal etkiye sahiptir. İlk olarak NO, CREB proteininin CaM kinaz IV aktivitesini ve CaM kinaz IV bağımlı fosforilasyonunu içeren NO aracılı bir yolak yoluyla CREB proteinini aktive ederek apoptotik proteinlerin ekspresyonunu artırır, böylece proapoptotik genlerin ekspresyonunun artmasına yol açar (Zubrow, Delivoria-papadopoulos, Ashraf, et al., 2002).

İkinci olarak, süperoksit ile NO reaksiyonu, hücre zarlarını değiştirdiğı, protein ve reseptör aktivitesine müdahale ettiğı ve apoptotik öncesi yolu aktive ettiğı bilinen toksik bir serbest radikal olan peroksinitriti üretir. Ayrıca NO, lipid peroksidasyonuna, protein oksidasyonuna ve nükleer membranların nitrasyonuna, DNA hasarına ve intranükleer Ca^{+2} 'de artışa neden olur (Paper, 2008). Tüm bu olumsuz nöronal etkiler nedeniyle, NO sentazının inhibisyonu, nöroproteksiyonla ilgili HIE çalışmalarında bir hedef olmuştur.

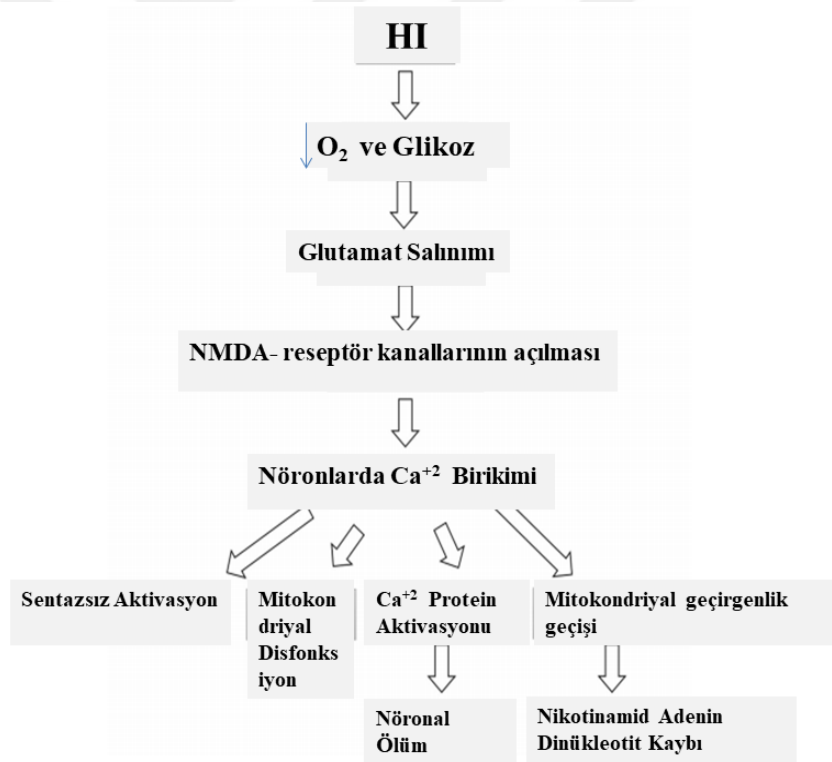
Dahası, ROS fazla glikoz metabolizmasını sınırlar. Aslında aşırı ROS birikimi, piruvat dehidrojenaz kompleksi (PDHC) aktivitesini inhibe eder. PDHC aktivitesindeki bu değişiklik ve glikoliz kaynaklı NADH'den mitokondriye güç aktarımının azaltılmasındaki bozulma nedeniyle, normalde yüksek Ca^{+2} ile aktive edilen laktat dehidrojenaz, sitozolde büyük miktarlarda laktat oluşturmak için NADH'yi kullanacaktır. Asidoz, HI sırasında nöronlarda bu laktat birikiminin bariz sonucudur (Lu et al., 2016).

2.2.5.2.2. Hücre İçi Ca^{+2} Birikimi

Ca^{+2} hücre dışı konsantrasyon 1–2 Mm'ye kadar ulaşabilirken, hücre içi Ca^{+2} normalde çok düşüktür (yaklaşık 100 nM) (Ep & Ska, 1994). Çeşitli mekanizmalar, hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun korunmasına katkıda bulunur. NMDA reseptör kanalı, NMDA antagonistleri üzerinde yapılan çalışmalarda, nöronlarda Ca^{+2} girişini bloke ettiğı ve dolayısıyla HI'den sonra nörodejenerasyonu önemli ölçüde engellediğı bulundu ve nedenle hücre içi Ca^{+2} birikimi nörodejenerasyonun önemli sebebidir (Hillared, 1998).

HI durumunda, anormal kan dolaşımının neden olduğu oksijen ve glikoz yoksunluğu, glutamat salınımının aşırı uyarılmasını tetikler (ŞEKİL 19). Glutamat, NMDA reseptör kanallarının açılmasını uyararak Ca^{+2} 'nın nöronların içine girmesine izin verir (Lu et al., 2016).

Yüksek hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun çeşitli etkileri vardır: bir Ca^{+2} / kalmodülden bağımsız mekanizma yoluyla NO sentazını aktive eder; mitokondriyal disfonksiyonu indükleyebilir ve birkaç Ca^{+2} bağımlı proteinin aktivasyonu yoluyla geri döndürülemez nöron ölümüne aracılık edebilir. Bunların arasında kalpain olarak bilinen hücrenin yeniden şekillenmesi, membran yıkımı ve nöron dejenerasyonunda rol oynayan proteinler vardır (Wang et al., 2012). Ayrıca, ROS ile birlikte intramitokondriyal Ca^{+2} konsantrasyonundaki artış, mitokondriyal geçirgenlik geçişine ve sonuç olarak, ROS detoksifikasyonu ve hücresel enerji metabolik süreçleri için önemli olan nikotinamid adenin dinükleotid kaybına katkıda bulunur (Lu et al., 2016).



Şekil 19. Ca^{+2} artışının nöronlardaki etkisi (P. Greco et al., 2020).

2.2.5.2.3. Mitokondriyal Disfonksiyon

Mitokondri, birçok önemli işlevi yerine getirir ve bunların değiştirilmesi, HI kaynaklı nörodejenerasyonlarda merkezi bir rol üstlenir, böylece HI'ye maruz kalan hücrelerin kaderini belirler. Mitokondri, çoklu hücresel aktiviteler için vazgeçilmez enerji üretir, bu ROS üreten bir süreçtir ve aynı zamanda en önemli hücre içi Ca^{+2} tamponlarıdır. İşlev bozuklukları gerçekten mitokondriyal enerji yetmezliğine ve sonuç olarak hücre içi Ca^{+2} birikimine yol açabilir. Bunun nedeni, membran iyon gradyanını korumak için gereken enerjinin azalması NMDA reseptörlerinin ve voltaj kapılı Ca^{+2} kanallarının HI durumunda açılmasıyla kötüleşmesidir. Dahası, elektron taşıma zincirinin (ETC) normal işleyişi, HI'de bulunan ROS fazlalığı nedeniyle kesintiye uğrar ve böylece mitokondri içermeyen türlerin üretimini artırır (Cassina & Radi, 1996). Mitokondriyal iç zarın proteinlerinin ve lipidlerinin oksidatif değişimi, zar depolarizasyonu meydana geldiğinden geçirgenliğini değiştirir. Bu değişiklik, oksidatif fosforilasyon işlemlerini birbirinden ayırarak ATP üretim eksikliğine neden olur. Bu şiddetli enerjik başarısızlık, hücre zarı depolarizasyonuna ve sonuç olarak Ca^{+2} influx'a katkıda bulunur ve bir tür kısır döngü başlatır (Lu et al., 2016). Bu nedenle mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres, hücre içi Ca^{+2} birikimi ve nöron apoptozuna ve dolayısıyla nörodejenerasyona yol açan mitokondriyal enerji yetmezliği gibi bir dizi ölümcül soruna neden olabilir.

Mitokondriyal enerji başarısızlığına dayanan çalışmalar AMPK rolüne odaklanmıştır. AMPK, bir tür hücre enerjisi sensörüdür ve HI'de olduğu gibi AMP: ATP oranında bir dengesizlik olduğunda etkinleştirilir (Thornton et al., 2012). AMPK etkinleştirildikten sonra enerji tüketimini (yağ asidi / kolesterol sentezi) inhibe etmek ve enerji üretimini desteklemek için hareket ederek enerji dengesini yeniden sağlamaya çalışır. AMPK aktivasyonu iki kinaza bağlıdır: LKB1 ve CaMKK β (Woods et al., 2008). İkincisi, hücre içi Ca^{+2} fazlalığı ile aktive edilir. Ayrıca başka bir AMPK, proapoptotik protein Bim'in ekspresyonu yoluyla eksitotoksisite sırasında apoptoza aracılık eder (Concannon et al., n.d.). Daha spesifik olarak, HI'de görülen eksitotoksisite ve ROS aşırı yüklenmesi, sadece CaMKK β 'yı ve dolayısıyla AMPK'yi aktive etmekle kalmayıp aynı zamanda mitokondriyal solunum zincirini de zorlayan kalsiyum dalgalanmasına neden olur. Bu şekilde AMP: ATP oranındaki dengesizlik artar ve AMPK aktivasyonu güçlendirilir. Bu AMPK aktivasyonu, birincil enerji hasarından sonra ATP'nin bazal seviyesine geri dönüşünü açıklayarak enerji dengesini geri yükler. Enflamasyon gibi HI'de yer alan diğer

mekanizmalar, mitokondriyal işleve bir kez daha zarar vererek, ikinci enerji hasarına ve AMPK'nin aktivasyona göre geri tepmesine neden olur. Bu zararlı olaylar, nihai bir mitokondriyal zorluğa neden olarak mitokondri membran geçirgenliğine ve hücrel apoptoza yol açabilir.

Apoptoz da, diğer birçok HI olayında olduğu gibi, ROS ile birlikte sitoplazmada Ca^{+2} birikimi ile bağlantılıdır. Nitekim Ca^{+2} ve ROS birikimi, mitokondri iç zarındaki mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözenegini (MPTP) aktive ederek mitokondriyal geçirgenlik geçişini (MPT) indükler. HI'de MPTP'nin rolü, MPTP inhibitörü siklosporin A üzerinde yapılan çalışmalarla doğrulanmıştır. MPTP'nin (siklofilin D, CypD) bir bileşenini bağlayarak HI nörodejenerasyonuna karşı korumaya yardımcı olarak MPTP yapısındaki rolünü kesintiye uğrattır (Tachibana et al., n.d.). Bu çalışmalara rağmen, yenidoğan HİE'de yer alan MPT'nin kesin rolü ve varlığı hala belirsizdir ve CypD tabanlı tedavi tartışmalı olmaya devam etmektedir.

MPTP, enerji metabolik reaksiyonları ve ROS detoksifikasyonu için önemli bir kofaktör olan sitoplazma nikotinamid adenin dinükleotidinde (NAD^{+}) salınır. Mitokondriyal sıkıntı, mitokondri dış zarında Bax/Bak megaporlarının oluşumunu belirleyecek; sitokrom c (CytC), apoptoz indükleyici faktör (AIF), endonükleaz G ve Smac / Diablo gibi proapoptotik proteinlerdir. Her proteinin farklı hedefleri vardır, ancak hepsi hücre ölümüne katkıda bulunur. CytC ve Smac/Diablo kaspaz aktivasyonunu tetikleyerek geri döndürülemez bir apoptozu belirlerken AIF, siklofilin A ile etkileşime girdikten sonra DNA parçalanmasına neden olarak çekirdeğe doğru yer değiştirir (Thornton & Hagberg, 2015). Kaspazlar, ROS ve AIF, bir DNA onarım enzimi olan poli (ADPriboz) polimerazı (PARP) aktive eden DNA fragmentasyonunu indükler. DNA onarım işlemi NAD^{+} tüketir. Bu NAD^{+} kaybı, oksidatif başarısızlık, mitokondriyal enerjiyi korumak için gerekli NAD^{+} 'yı tüketerek mitokondriyal disfonksiyonu kötüleştirecek ve neonatal hipoksik-iskemik beyin hasarının bozulmasını uzatacaktır. Nörodejenerasyon sırasında, iki tür nöron ölümü meydana gelebilir: nekroz veya apoptoz.

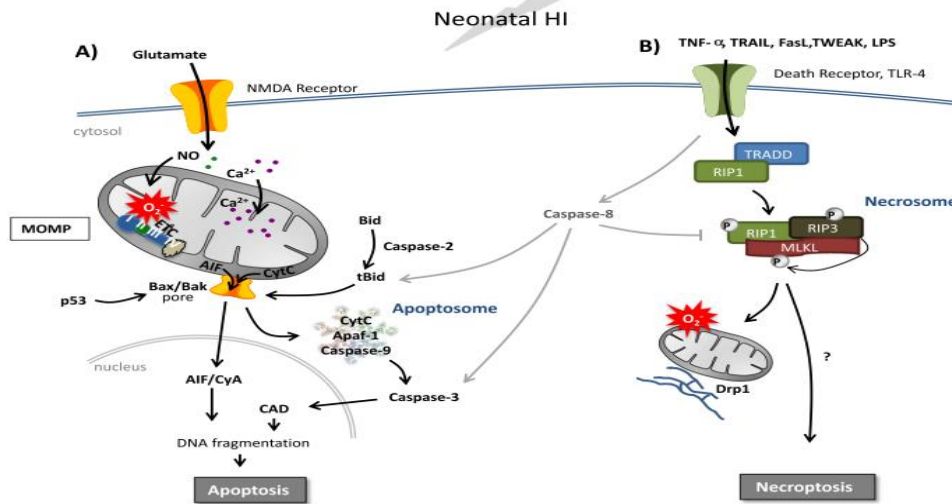
Caspase-3, Bax ve BCI gibi proapoptotik proteinlerin yüksek ekspresyonuna odaklanan birçok çalışma, apoptozun yetişkin modellere kıyasla olgunlaşmamış beyin hasarında daha yaygın bir form olduğu açıkladı (Nakajima et al., 2000). Büyük ölçüde hücre biyolojisindeki ilerlemelere ve deneysel hayvan çalışmalarına bağlı olarak, HİE'deki önemli dejenerasyon biçimleri olarak programlanmış hücre ölümü (PCD) mekanizmalarının aracılık ettiği otofajiye de vurgu yapılmıştır. Örneğin, klinik öncesi kanıtlar artık hipoksik iskeminin neonatal sıçanlarda otofajik fux'u şiddetlendirdiğini, öğrenme ve hafıza bozukluğuna yol

açtığını göstermiştir (Ginet et al., 2009).

Buna göre, son zamanlarda yapılan birkaç çalışma, gelecekteki uygulamalar için umut verici sonuçlar ile Bax inhibe edici peptid (BIP), PARP inhibisyonu, MPT inhibisyonu, NAD uygulaması gibi mitokondriyal ilişkili terapötik hedeflere odaklanmıştır. Özetle, mitokondriyal disfonksiyon, HİE'deki nörodejenerasyonun kilit noktasıdır.

Tablo 5. İskemik sonrası olgunlaşmamış beyin hasarında ana olaylar

Patolojik olaylar	Mekanizma	Sonuçlar
Hücre içi Ca^{+2} birikimi	Eksitotoksitenin neden olduğu NMDA reseptörlerinin kanal açılması ve hücre zarı depolarizasyonunun neden olduğu sitozole Ca^{+2} akışı.	Ca^{+2} bağımlı enzimlerin aktivasyonu ile tetiklenen mitokondriyal disfonksiyon; Ca^{+2} ve ROS tarafından indüklenen MPT oluşumu.
Oksidatif stres ve metabolik bozukluk	Antioksidan enzimlerin yetersizliği; ETC'nin başarısızlığı ve mitokondriyal disfonksiyonun neden olduğu oksidatif fosforilasyonun ayrılması.	Protein, lipid ve DNA'da yıkıcı modifikasyonlar; Hücre zarı depolarizasyon ve daha kötü Ca^{+2} birikimi döngüsü.
Apoptoz	Bax/Bak megapores'ten Cyt c ve AIF'nin salınmasıyla pro-apoptoz proteinlerinin aktivasyonu.	Geri döndürülemez nöron ölümü ve nörodejenerasyon



Şekil 20. Neonatal HI hasarından sonra apoptoz ve nekroptoz yollarının iç içe geçmesi (Thornton & Hagberg, 2015).

A) Yenidoğan HI, mitokondriyal kalsiyum birikimine, reaktif oksijen türlerinin üretiminin artmasına ve MOMP ile sonuçlanan mitokondriyal solunumun bastırılmasına neden olur. Bcl-2 ailesi proteinlerindeki değişiklikler, sitokrom c (cyt c) ve apoptoz indükleyici faktör (AIF) salınma yol açan Bax bağımlı MOMP'yi indükler. Cyt c, kaspaz-3

aktivasyonuna, kaspaz ile aktive edilmiş DNaz'a (CAD) ve DNA bozulmasına yol açan apoptozom oluşumunu indükler. AIF, çekirdeğe yer değiştiren ve kromatinoliz ve apoptotik hücre ölümünü indükleyen siklofilin A (CyA) ile bir kompleks oluşturur.

B) Eşzamanlı olarak, enflamatuvar mikrogliya ve astroglia, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) veya diğer ligandları (FasL, TWEAK, TRAIL ve lipopolisakkarit, LPS) serbest bırakarak ölüm reseptörlerinin aktivasyonuna yol açar ve bu da kaspazların mevcudiyetine bağlı olarak hem apoptozu hem de nekroptozu indükleyebilir. TRADD (veya diğer adaptör proteinler) ve RIP1'in alımı, apoptotik hücre ölümüne yol açan kaspaz-8 aktivasyonuna ve Bid'nin bölünmesine yol açacaktır. Alternatif olarak, kaspaz-8'in inhibe edildiği koşullar altında TRADD, RIP1 ve RIP3'ün etkileşimini ve aktivasyonunu kolaylaştırır. RIP3, MLKL'yi fosforile eder ve daha sonra hem plazma hem de mitokondri ile ilişkili endoplazmik retikulum membranlarına hedeflenebilen, artan reaktif oksijen türlerini, fisyonu ve nekroptozu tetikleyen nekrozoma gönderir. Alternatif mitokondriyal olmayan mekanizmalar da nekroptozun indüksiyonunda rol oynayabilir.

2.2.5.2.4. Eksitotoksisite

1970'lerde ilk kez kullanılan bir terim olan eksitotoksisite, hücre dışı uyarıcı amino asit reseptörlerinin aşırı uyarılmasının aracılık ettiği hücre ölümünü ifade eder (Role et al., 1990). Bu reseptörler, glutamatın fizyolojik uyarıcı etkilerine aracılık eder. HI sırasında, yüksek glutamat seviyeleri ve membran depolarizasyonu tarafından aşırı derecede uyarılırlar, bu da uygunsuz açılmalarına ve sonuç olarak nöronların içinde ölümcül bir Ca^{+2} akışına yol açar. Aslında, uzun süreli HI'yi takiben, hücrel homeostaz, ATP'nin tükenmesi ve iyonik gradyanları sürdürme yetersizliği nedeniyle bozular. Bu, sinaptik glutamat seviyelerini düşük tutan glial pompaların azalmış aktivitesinden dolayı, hücre dışı glutamatın aşırı yüklenmesi ile nöronal depolarizasyona ve glutamatın sinaptik yarığa salınmasına neden olur. Bu, nöronlarda ve glutamat reseptörlerini eksprese eden diğer hücrelerde (glial progenitör hücreler) uygunsuz açılmalarıyla eksitotoksisiteye yol açar (Carps et al., n.d.). Yukarıda tasvir edildiği gibi, nöronlar ve glial progenitör hücreler içindeki sonuçta ortaya çıkan Ca^{+2} akışı, kalsiyuma bağımlı proteazların, lipazların ve deoksiribonükleazların, ROS üretiminin, oksidatif stresin, sitotoksik ödemin, mitokondriyal disfonksiyonun ve nihayetinde proapoptotik hücrel yolların uyarılmasına neden olur.

2.2.5.2.5. İnflamasyon

Olgunlaşmamış beyinde, bir HI yaralanmasından sonraki dakikalar içinde, doğuştan gelen bir bağışıklık tepkisi gerçekleşir. Mikroglia, nötrofiller, lenfositler, sitokinler, seleksiyon ve immünoglobulinlerin tümü, hipoksinin aktive ettiği inflamatuvar süreçte rol oynar.

Mikroglia

Mikroglia, beyne bağışıklık gözetimi sağlar. HI meydana geldiğinde mikroglia, fagositoz, antijen sunumu, inflamatuvar ve anti-inflamatuvar, sitokin üretimi ve kan-beyin bariyerinin (BBB) bozulmasına yol açan matris metaloproteinaz (MMP) salınımı gibi makrofaj benzeri yetenekleri aktive eder ve geliştirir (Iadecola & Anrather, 2011). Sonuç olarak, periferel lökositlerin beyne serbest erişimi vardır ve normalde bağışıklıktan ayrıcalıklı beyin ortamı sistemik tepkilere maruz kalır, bu da inflamasyonu ve beyin hasarlarını daha da kötüleştirir.

Mikroglia'nın HİE'deki rolü farklı çalışmalarla desteklenmektedir: yenidoğan beyinlerinin ölüm sonrası incelemelerine odaklanan bazı çalışmalar, HİE'den ölen hastanın hipokampal dentat girusta yoğun bir mikroglia infiltrasyonu olduğunu, diğer akut nedenlerden ölen yenidoğanlar (travma veya sepsis) önemli ölçüde daha az mikrogliaya sahip olduğu görüldü. Diğer çalışmalar, HI'den sonra aktive mikroglia tarafından salınan sitokine odaklanmıştır, örn. IL-18 ve Kaspaz-1(Hagberg et al., 2015). IL-18 veya Kaspaz-1'in genetik olarak silinmesi beyin hasarını azaltır. Bununla birlikte, hiçbir müdahalenin mikroglia'yı seçici olarak hedeflemediğini vurgulamak önemlidir. Aslında, neonatal inmeden önce mikroglialin farmakolojik olarak tükenmesi, sonucu iyileştirmekten çok, enflamatuvar sitokinlerin salınımını şiddetlendirir. Bu, mikroglialının en azından bir kısmının faydalı etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Aslında, örneğin kalıntıların mikroglial fagositozunun, HI'den sonraki ikinci gecikmiş faz sırasında doku iyileşmesi için kritik olduğu varsayılmıştır. Bu zıt bulgular, farklı mikroglial aktivasyon fenotipleri ile açıklanabilir. Bazı mikroglia akut erken proinflamatuvar yanıtlara katılır ve yaralanmayı şiddetlendirirken diğerleri geç anti-inflamatuvar yanıtlarda rol oynayabilir ve yaralanmaya karşı koruma sağlayabilir (Faustino et al., 2011). Literatürlere göre aslında iki mikroglial aktivasyon fenotipi vardır. Doğuştan gelen bağışıklık tepkisinden sorumlu olan klasik aktivasyon (M1), sitokinlerin, kemokinlerin ve reaktif ara ürünlerin üretimine yol açar

(Varnum & Ikezu, 2012). Anti-enflamatuar sinyallemeden (M2a), ROS ve nitrojen türlerinin (M2b) temizlenmesinden sorumlu başka bir aktivasyon fenotipleri (M2) dir. M1 fenotipleri, M2'ye kıyasla nöron ölümlerinin artmasına neden olabilir, bu nedenle günümüzde mikroglianın klasik aktivasyon modelini kontrol etmeye yönelik artan bir ilgi vardır.

Astrositler

Mikroglia'nın yanı sıra astrositler, yaralanan hücrelerin salgıladığı proinflamatuar araçlar, sitokinler ve ROS tarafından yaralanmadan sonra dakikalar içinde aktive olur. Astrositler HI'de ters bir role sahiptirler: bir taraftan glutatyon ve süperoksit dismutaz (SOD) salgılarlar ve ekstra sinaptik glutamat alımını artırırlar; diğerinden proinflamatuar sitokinler üretir ve salgılarlar (IL-6, TNF- α , IL-1 α ve β ve interferon γ) (Swanson et al., 2004). Bu sitokinler HI hasarını doğrudan nöronal hücre apoptozunu indükleyerek, nörojenezi inhibe ederek ve toksik NO seviyelerini artırarak şiddetlendirir (F. Liu & Mccullough, 2013). Dahası, astrositler, bağışıklık hücrelerini iskemik bölgeye çeken kemokinler salgılar ve böylece beyin hasarını kötüleştirir.

Nötrofiller

Nötrofiller, HI tarafından belirlenen ROS üretimi, sitotoksik ajanların salınımı, MMP-9 sekresyonu ve damarlarda nötrofil birikimi nedeniyle azalmış mikrovasküler akış gibi birçok mekanizma yoluyla belirlenen beyin hasarını kötüleştirebilir. Nötrofil infiltrasyonunun büyük olabileceği yetişkin beyninden farklı olarak, neonatal nötrofillerin kan damarlarından ekstrasvazasyonu azalttığı gerçeği ile kanıtlandığı üzere, yenidoğanlar iskemiden sonra nötrofil yanıtı oluşturma konusunda daha düşük bir kapasiteye sahiptir (F. Liu & Mccullough, 2013).

Sitokinler ve Kemokinler

Aktive mikroglia, astrositler ve endotelial hücreler, kemokinleri ve tümör nekroz faktörü α (TNF- α), dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF- β), IL-1, IL-6, IL-8 ve IL-10 gibi proinflamatuar sitokinleri salgılar. Sitokinler, lökositleri çeker ve beyindeki durmalarını kolaylaştırarak lökositler ve endotel hücreleri üzerinde adezyon moleküllerinin üretimini uyarır. TNF- α ve IL-1, sıklıkla eşzamanlı olarak ifade edilir ve en iyi karakterize edilmiş erken yanıt sitokinlerinden ikisidir ve mikroglia, astrositler ve nöronlar tarafından salgılanır (Yıldız et al., 2017). Bu sitokinler, yaralanan beyindeki enflamatuar hücrelerin birikimini belirleyerek onları çeker. HIE'li yenidoğanlar, kontrol ile karşılaştırıldığında periferik kan örneklerinde daha yüksek TNF- α ve IL-1 seviyelerine sahiptir ve IL-1, HIE şiddeti ile

pozitif korelasyon gösterir (Encephalopathy et al., 2010). HİE modellerinde IL-1 reseptör antagonistinin uygulanmasıyla ilgili çalışmalar, bu tedavinin nöroprotektif potansiyelini göstermiş ve bu sitokinin HİE'deki zarar verici rolünü yeniden sağlamlaştırmıştır (J. H. Lee et al., 2017).

Kemokinler ayrıca HİE'nin enflamatuvar hücre trafiğini kontrol eden serebral hasarda merkezi bir rol oynar. G-protein bağlı reseptör ailesine ait spesifik reseptörler aracılığıyla hareket ederler (Baggiolini, 2001).

Lenfositler ve mast hücreleri

Mikroglia ve nötrofillerden farklı olarak, lenfositlerin ve mast hücrelerinin HI'deki rolü henüz tam olarak açık değildir. HI sonrası neonatal beyindeki lenfosit infiltrasyonu, erişkinlerde olanlardan farklı olarak, lenfoid progenitör hücrelerin olgunlaşmamışlığını yansıtan, daha az derin veya sadece kısa süreli gibi görünmektedir.

Mast hücreleri, hasardan sonra akut enflamasyonu teşvik ediyor ve eksitotoksik hasara katkıda bulunuyor, TNF'yi erken salgılıyor ve dönüştürücü büyüme faktörü $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) toksisitesini şiddetlendiriyor. Bununla birlikte, mast hücrelerinin devam eden hasar veya onarım evrimine katkıları hala belirsizdir.

2.2.6. Klinik

Perinatal asfiksi ve/veya Hipoksik iskemik ensefalopatinin klinik bulgularının tanımlanması erken tedavi ve prognoz bakımından çok önemlidir. Fetal hipoksi olan hastalarda kalp hızı yavaş, düzensiz ve intrauterin büyüme geriliği görülmektedir. Ağır derece etkilenen hastalarda zihin işlev eksikliği, koma, hipoventilasyon ve solunum düzensizlikleri görülmesi karşılaşılan durumdur. Hafif etkilenen hastalarda hipertoni, ağır hastalarda ise hipotoni daha sık karşılaşılmaktadır. Nöbet geçirme, huzursuzluk ve beslenme problemleri görülebilir (Hakobyan et al., 2019).

HİE hastaların postnatal 12 ile 24 saat arasında bilinç düzeyi değişkenlik gösterir. Ağır evre olan hastalarda stupor ve koma görülürken, hafif evre hastalar hiperalert olarak tanımlanır. Ancak hastalığın seyri hafif evreden orta evreye, orta evreden ağır evreye ilerleyebilmektedir. Nöbetle karışan ve çok küçük bebeklerde görülen çene, parmak ve kol titremeleri olarak tanımlanan jitteriness yaklaşık %25 hastada görülmektedir (Lien et al.,

1995).

24 ile 72 saat arasında, ağır evre olan hastaların durumu genellikle daha kötüleşir. Bu durumu solunum yetmezliği, okülomotor refleks kaybı, kafa içi basınç artışı ve nöbetler izler, son klinik durum ise koma ve stupordur. Hafif evre hastalarda genelde bu süreç iyiye gider.

72 saatten daha uzun süre hayatta kalan hastalar birkaç hafta içerisinde iyileşme görülür. Fakat orta ve ağır hastalarda emme, yutma ve beslenme bozuklukları, kas güç kaybı, hipertoni ve hipotoni gibi nörolojik defisitler kalıcı olabilir (Volpe, 2012).

Klinik bulguların, hastalığın evrelerinin, tedaviye uygunluklarının değerlendirilebilmesi ve prognozun tanımlanabilmesi için muayene skorunun belirlenmesi önemlidir. Bu sebeple hastalığın evresinin bilinebilmesi için çeşitli puanla ve skarlama sistemleri mevcuttur.

İlk skarlama sistemi, 1976'da Sarnat ve ark. tanımladığı Sarnat skarlama sistemidir (Sarnat & Sarnat, 1977). Bu sistem 1976 yılında "iyi tanımlanmış bir fetal sıkıntı atağı veya doğumdan bir veya beş dakika sonra Apgar skoru 5 veya daha düşük olan" ensefalopatili yirmi bir yenidoğan üzerinde bir çalışmaya dayanır. Bu çalışmada, klinik belirtilerin ve EEG değişikliklerinin seyrine yönelik evreleme sistemlerinin, nörolojik sonuç için prognoz formülasyonunu kolaylaştırması amaçlanmıştır. Bu tanımlayıcı çalışma, yenidoğan ensefalopatisinin yaygın sorununa sistematik bir yaklaşım öneren türünün ilk örneği olduğu ve kolayca uygulandığı için on yıllar sürmüştür. Sarnat Puanlama Sisteminin modifikasyonları, anormal nörogelişimsel sonuç açısından en yüksek riske sahip yenidoğanların belirlenmesi ve neonatal hipoksik-iskemik ensefalopati (HIE) için terapötik hipotermi denemelerinde kullanılmıştır. Sarnat skoru, ensefalopatili yenidoğanları ve özellikle terapötik hipotermi için uygun olanları tanımlamak için dünya çapında yaygın olarak kullanılan bir sistemdir. Orijinal çalışmalarında Harvey B. ve Margaret S. Sarnat, fetal sıkıntıyı takiben term ve kısa vadeli yenidoğanlarda ensefalopati derecelerini tanımladılar. Bu sistemde hastalar 3 evreye ayrılmış, ayrılma kriteri olarak muayene ve elektroensefalogram (EEG) esas alınmıştır. Evre 1'de bebekler hiperalertlik, hiperrefleksi, sempatik otonomik tepkiler ve normal bir EEG sergilemiş ve bu süre 1-18 saat sürdüğü görülmüştür. Evre 2'de bebeklerde şişkinlik, hafif hipotoni, fleksör duruşu, parasempatik yanıtlar ve nöbetler görülmüştür. Evre 2, bazı durumlarda evre 1'i takip ederken, diğerlerinde ortalama olarak yaklaşık 5 gün süren doğumdan itibaren mevcuttur. Son olarak,

3. evrede bebekler sersemlemiş, sarkık, beyin sapı yok veya baskılanmış ve / veya otonom işlevi ya tamamen zayıflamış ya da anormal şekilde süresiz EEG'leri saptanmıştır. Bu kadar az sayıda denek ile, klinik bakıma genellenebilecek kesin prognostik sonuçlar çıkarmak zordur ve bu sistemi sınırlandırmıştır. Evre 2 süresi beş günden uzun olan bebekler daha kötü sonuçlara sahip olduğu orijinal çalışmada görülmüştür. Sarnat Sınıflandırılması Tablo 6. da gösterilmiştir.

Tablo 6. Sarnat Skorlamasına Göre HIE

Bulgu	Evre 1	Evre 2	Evre 3
Bilinç düzeyi	Hiperalert	Letarjik	Stupor,koma
Kas tonusu	Normal	Hipotonik	Flask
Postür	Normal	Fleksiyon	Deserebre
Tendon	Hiperaktif	Hiperaktif	Alınamaz
refleksler/klonus			
Miyoklonus	Var	Var	Yok
Moro refleksi	Canlı	Zayıf	Alınamaz
Pupiller	Midriyatik	Miyotik	Anizokorik
Nöbetler	Yok	Sık	Deserebrasyon
EEG bulguları	Normal	Düşükvoltajdan nöbet aktivitesine kadar değişken	Burst süpresyonu, izoelektrik aktivite
Süre	24 saatten az	1-14 gün	Birkaç gün- hafta
Sonuç	İyi	Değişken	Ölüm veya ağır sekel

HIE evrelendirilmesi için kullanılan diğer bir skorlama sistemi 1997'de Thompson ve diğerleri HİE'li kırk beş yenidoğanda daha az klinik değerlendirmeye dayalı madde içeren Thompson Ensefalopati Skoru'dur (Thompson et al., 1997). Sarnat ölçeğinin aksine, Thompson skoru ensefalopatinin ciddiyetinin sınıflandırılmasını gerektirmez, bunun yerine ensefalopatinin en yüksek şiddetini tanımlamak için basit bir sayısal puana dayanan bir sistemdir. MRG, CT, serebral fonksiyon izleme, EGG gibi gelişmiş teknolojilerin kullanılmasını gerektirmemektedir (Barnett et al., 1997). Skor, dokuz işaretin klinik değerlendirmesinden oluşur: ton, bilinç seviyesi, nöbetler, duruş, Moro, İç çekme, emme, solunum ve fontaneldir. Her bir kriter 0 ile 3 arasında puanlanır. Tablo 7'de Thompson Skorlama sistemi evrelendirilmesi verilmiştir.

Tablo 7. Thompson Skorlama Sistemi (Thompson et al., 1997)

Belirti	0 Puan	1 Puan	2 Puan	3 Puan
Tonus	Normal	Hipertonik	Hipotonik	Flask
Bilinç	Normal	Hiperalert	Letarjik	Koma
Nöbet	Yok	<3 günde	>2 günde	
Postür	Normal	fisting, çevirme	Distal fleksiyon	Deserebre
Moro	Normal	Parsiyel	Yok	
Yakalama	Normal	Az	Yok	
Emme	Normal	Az	Yok	
Solunum	Normal	Hiperventilasyon	Kısa apne	Solunum desteği
Fontanel	Normal	Gergin	Bombe	

Başka bir ensefalopati skoru 2004'te Miller ve ark. tarafından geliştirilmiştir. Beslenme, uyanıklık, ton, solunum durumu, refleksler ve nöbet aktivitesi değerlendirmelerine göre her biri normal (= 0) veya anormal (= her kategori için 1 puan) olarak puanlanır. Thompson ve Miller skorları, klinik olarak belirgin nöbetlerin varlığını bir kriter olarak içerir, ancak elektrografik bilgileri içermemesi bakımından yenidoğan nöbetlerinin klinik tanısı güvenilir değildir.

Başka bir skorlama sistemi Kuzey Amerika'da geliştirilen NICHD yenidoğan ensefalopati Puanlama sistemi olup İberoamerican Neonatoloji Derneği'nin HİE Skoru (SIBEN) olarak 2016'da geliştirilmiştir (Shankaran et al., 2005). Brezilya'da kullanımı daha yaygındır. Bu puanlama sisteminin amacı ise postnatal ilk 6 saat içerisinde orta, şiddetli hastaları saptamaktır. Geliştirilmiş Skorda (SIBEN) hafif ensefalopati grubu da skora eklenmiştir.

Perinatal asfiksi olan hastalarda iskemik ve hipoksemiye ek olarak sekonder sistemik bulgular açığa çıkabilir. Organ, merkezi sinir sistemi tutulumu meydana gelebilir. Tutulum sıklığı genel olarak hepatik, pulmoner, renal, kardiyak olarak saptanmıştır (Barnett et al., 1997) (Gomella, n.d.). Perinatal asfiksinin sistemik tutulumu tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8. Perinatal Asfiksinin Sistemik Tutulumu

Tutulan Sistem	Tutulum Şekli
Merkezi Sinir Sistemi	HİE, beyin kanaması, beyin ödemi, konvülziyonlar
Solunum Sistemi	Solunum başlamasında gecikme, pulmoner hemoraji, respiratuvar distres sendromu, mekonyum aspirasyon sendromu
Genitoüriner Sistem	Kortikal/tübüler/medüller nekroz, akut böbrek yetmezliği, oligüri
Gastrointestinal Sistem	Hepatik disfonksiyon, Nekrotizan enterokolit
Kardiyovasküler Sistem	Kalp yetmezliği, persistan fetal dolaşım, şok, hipotansiyon, ritm bozukluğu
Hematolojik Sistem	Trombositopeni, polisitemi, beyaz küre hücrelerinde sola kayma
Endokrin Sistem	Uyumsuz ADH (Antidiüretik hormon) salınımı, adrenal yetmezlik, puberte bozuklukları, pankreatik yetmezlik
Metabolik etkiler	Metabolik asidoz, hipoglisemi, hipokalsemi, hiponatremi

2.2.7. Tanı

Perinatal asfiksinin ve/veya HİE nin tanınmasında maternal ve neonatal tanının önemi büyüktür (Donald, 1995). Bunlar ile birlikte öykü, muayene, laboratuvar testleri, USG ve MRG gibi nörogörüntüleme yöntemleri, EGG, amplitüd integre ensefalografi (aEEG) gibi tetkiklerde tanıda önemli belirteçlerdir.

2.2.7.1. Maternal Göstergeler

2.2.7.1.1. Öykü

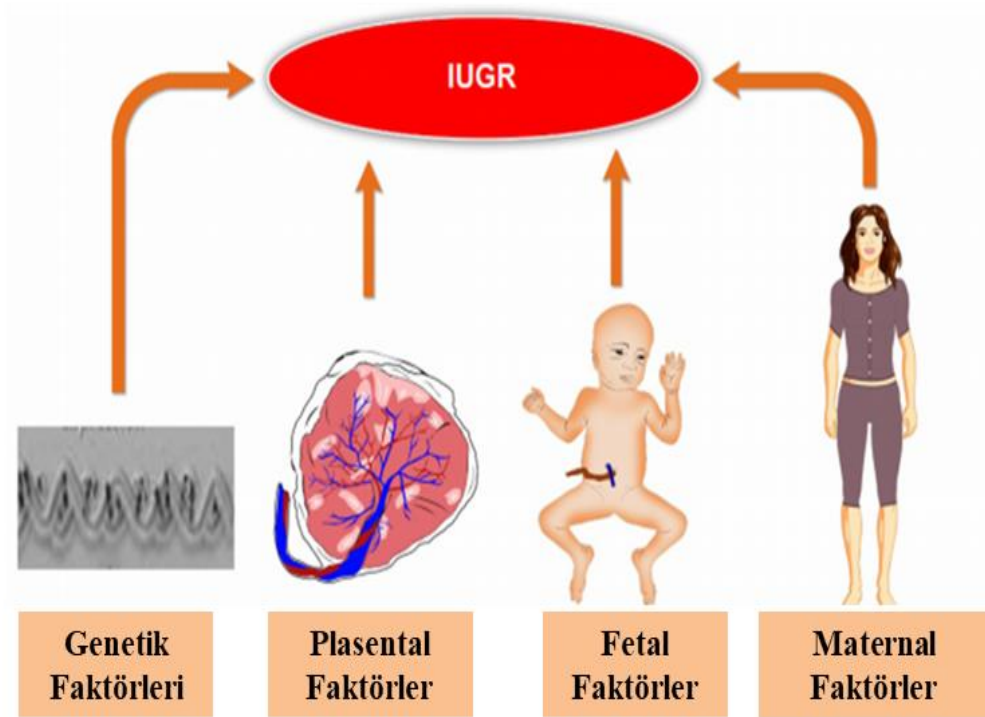
Prenatal, natal ve post natal faktörler HİE ve/veya Perinatal asfikside yer alan faktörlerdir. (Tablo 2) Bu sebeple bu riski arttıran durumlar sorgulanmalıdır. Plasenta gaz değişimini, fetal kan akışını bozabilecek uteroplental yetmezlik gibi maternal durumlar dikkatli değerlendirilmelidir.

2.2.7.1.2. Plasenta Patolojisi

Plasentanın fetal ve maternal yüzüne bakarak neonatal ensefalopati hakkında bilgiler elde edilebilir. Marjinal kord insersiyonu veya kord hematomu gibi patolojik umbilikal kord lezyonları fetal vasküler beslenmede bozulmanın göstergesi olabilir.

Renk değişiklikleri, hemorajik bölgeler, membranöz damarlar ve normalden sapmalar yönünden membranlar değerlendirilmelidir. Membranların plasental diske anormal yapışmaları (circummarginate, circumvallate insersiyonlar) ve bunların dereceleri belirtilmelidir.

Rahim içi büyüme kısıtlaması (IUGR), fetüsün ırk ve cinsiyetine göre belirli bir bebeğin büyüme potansiyeli ışığında normalin altında olan fetal büyüme oranı olarak tanımlanmıştır (Sharma et al., 2016). IUGR, maternal, plasental, fetal veya genetik faktörlerin ortak nihai sonucudur ve IUGR, bu faktörlerin herhangi birinin bir kombinasyonu nedeniyle de ortaya çıkabilir.



Şekil 21. IUGR, maternal, fetal, plasental, genetik nedenin sonucu olabilir veya her ikisinin kombinasyonu olabilir (Sharma et al., 2016).

Tablo 9. Rahim içi büyüme kısıtlamasının (IUGR) plasental nedenleri.

Plasental ağırlık (ağırlık 350 gramdan az)
Anormal uteroplasental damar sistemi
Plasental disfonksiyon (PIH, preeklampsi)
Trombofili ile ilişkili uteroplasental patoloji
Sınırlı plasental mozaizm (CPM)
Avasküler villus
Desidual veya spiral arter arteriti
Çoklu enfarktüs
Kısmi molar gebelik
Sinsityal düğümler
Kronik inflamatuvar lezyonlar
Tek göbek arteri
Abruptio plasenta
Velamentöz kordon
Plasental hemanjiyom
Plasental enfeksiyonlar (Plasental sıtma)
Enfeksiyöz villit
Çoğul gebelik
Etiyolojisi bilinmeyen kronik villit (CVUE)
Redoks düzenlemesi için enzimlerin azaltılmış ifadesi (thiore doxin, glutaredoxin)

2.2.7.1.3. Fetal Kalp Hızı (FKH)

İntrapartum dönemde fetal kalp hızı (FKH) paterni, kan basıncı, kan gazları ve asit-baz durumundaki değişikliklere karşı fetal kardiyak ve santral sinir sistemi cevabının indirekt göstergesidir. FKH monitorizasyonundaki amaç, yetersiz fetal oksijenizasyonla ilişkili FKH değişikliklerini saptamak ve olası hipoksik hasar ve ölümü azaltacak girişimleri zamanında uygulayabilmektir.

2.2.7.1.4. Umbilical Kord Kan Gazları

Kordon kanında gaz ve asit-baz değerlerinin ölçümü gelişmiş ülkelerde rutin yapılan bir uygulamadır. Fetal asit baz dengesinin belirlenmesinde fetal kan örneği şarttır. Bu sebeple gebeliğin çeşitli dönemlerinde farklı teknikler kullanılır. Gebeliğin antenatal döneminde fetal kan örneği sadece kordosentez ile olur. Doğumdan sonra ise umbilikal kord kullanılır. Böylelikle yenidoğan asit-baz ve kan gaz değerleri saptanarak fetal hipoksi, fetal distres, fetal asidoz ve asfiksi gibi tanıya varılmaya çalışılmaktadır (Goldaber & Gilstrap, 1993).

Doğumdan sonraki dakikalar ve saatler içinde umbilical damardan alınan kan fetusun metabolik durumunu incelemek için kullanılır. Normal doğum eyleminin gerçekleşmesi sırasında, fetal oksijenasyon ve pH genellikle azalır.

Umbilikal ven normalde oksijenden zengin kanı fetusa götürürken, her iki umbilikal arter de fetusden gelen kirli kanı plasentaya taşımaktadır. Umbilikal arterde pO₂ ve pH daha düşük iken, pCO₂ umbilikal vene oranla daha yüksek düzeydedir (Goldaber & Gilstrap, 1993) (Thorp et al., 1989).

2.2.7.2. Neonatal Göstergeler

2.2.7.2.1. Apgar Skoru ve Etkileyen Faktörler

İlk kez 1953 yılında Dr. Virginia Apgar tarafından tanımlanmış olup Yeni Amerikan Pediatri Akademisi (AAP)/ACOG bildirisinde, düşük 5. dakika Apgar skorunun neonatal mortalite ile ilişkili olabileceği, ancak 1. ve 5. dakikada düşük Apgar skorunun asfiksinin kesin belirteçleri olmadığı sonucuna varılmıştır. Apgar skorlaması beş parametreye dayanır (TABLO 4) ve bunlar deri görünümü, nabız, yüz buruşturma, aktivite ve solunumdur, İngilizce olarak ifade edildiğinde Apgar olarak kısaltılabilir. Düşük APGAR skoru asfiksi için tanısız değildir. Prematürite, doğumda kullanılan anestezipler, travma, enfeksiyonlar, maternal ilaçlar, nöromusküler sistemi etkileyen konjenital anomaliler ve kardiyopulmoner bozukluklar gibi durumlar düşük APGAR skoruna yol açabilir (Razaz & Ph, 2020).

Hipoksi veya asidoz olmadığı halde düşük APGAR yanlış pozitiflik gibi durumlar veya asidoza rağmen normal APGAR yanlış negatiflik saptanabilmektedir (England, 2001). Tablo 10' da özetlenmiştir.

Tablo 10. Apgar Skorunu Etkileyen Faktörler

Yalancı APGAR Pozitifliği (Yalancı APGAR düşükliği)	Yalancı negatiflik (yalancı APGAR normalliği)
İmmatürite/prematüre	Maternal asidoz
Travma (serebral, spinal)	Yüksek katekolamin düzeyli bebekler
Sepsis, konjenital pnömoni, kanama, hipovolemi	Bazı term bebekler
Myopati, Nöropati, Sinir sistemi anomalileri	
Anneye narkotik, sedatif, magnezyum verilmesi	
Diafragma hernisi, koanal atrezi	

2.2.7.2.2. Fiziksel, Nörolojik Muayene ve Nörogörüntüleme

Fizik muayene bulgularına göre HİE evrelemede Sarnat sınıflandırılması kullanılır (TABLO 6).

HİE’ de nörolojik bulguların tanınması, hasarın varlığı, kapsamı ve yeri hakkında önemli bilgiler sağlar. Muayene sırasında standardizasyon için Sarnat Skorlaması (TABLO 6) , APGAR Skoru (TABLO 4) ve Thompson skorlaması esas alınmaktadır.

Postnatal ilk 6 saatte yapılan nörolojik muayene hipotermi tedavisi, nöroprotektif stratejileri için önemlidir.

Hastalığın tanısında birçok nörogörüntüleme yöntemi mevcuttur. Tablo 11’ da özetlenmiştir.

Tablo 11. Nörogörüntülemelerde Kullanılan Yöntemler.

YÖNTEM	TANIM
Kraniyal Ultrason	Parankimal kanama, ventriküler boyut, majör kraniyal malformasyonlar, parankimal kistik lezyonlar konusunda fikir sahibi olunabilmektedir.
Bilgisayarlı Tomografi	Akut kraniyal kanama ve kemik anormalliklerinin tespitinde önemlidir. Fakat BT’ deki radyasyonun gelişmekte olan yenidoğan beynine zararı açıktır.
Manyetik Rezonans Görüntüleme	Yenidoğan döneminde HİE’deki lezyonların tanınmasında ve bu hastaların takibinde oldukça üstündür. HİE’de MRG bulguları; • Bazal ganglia/talamusta sinyal artışı, • Serebral kortikal yapılarda sinyal artışı, Serebral kortikal beyaz ve gri cevherde diferansiyon kaybı, • Periventriküler beyaz cevherde artmış ya da azalmış sinyal • Hasarlı alanda azalmış difüzyon görülmektedir.
Difüzyon Ağırlıklı Görüntüleme (DWI) ve Difüzyon Tensor Görüntüleme	Beyindeki su difüzyonunun miktarını, yönünü gösterir. Difüzyonun azalması hipoksik iskemik hasarın erken tanısında yüksek duyarlılığa sahiptir.
Manyetik Rezonans Spektroskopisi	HİE olan hastalarda enerji metabolizmasını değerlendirmek amacıyla kullanılabilir. Fakat çekimi zor ve pahalı olması nedeniyle tercih edilmemektedir.
Uyarılmış Potansiyeller	Uyarılmış beyin sapı potansiyelleri (BAER), somatosensör uyarılmış sensörler ve görsel uyarılmış potansiyeller Perinatal Asfiksi tanı ve tedavisinde kullanılmaktadır.

2.2.7.2.3. Laboratuvar Tetkikleri

Periferik yayma ile birlikte tam kan sayımı, kan kültürü, kan üre azotu, karaciğer enzimleri, elektrolitler, kardiyak enzimler ve kan gazlarına ilk gelişte bakılmalı ve gerektiğinde ardından seri olarak tekrar edilmelidir. Tam kan sayımı enfeksiyon, anemi ve trombositopeni değerlendirmek için yapılmaktadır. HİE'ye sık eşlik ettiğinden dolayı kan glukozu bakılmaktadır (Gomella, n.d.).

HİE'de kord kan gazı parametreleri önemli tanı kriteridir ve duruma göre arteriyel veya kapiller kan gazı değerlendirilmeleri yapılmaktadır. Perinatal asfikside sıklıkla tutulan organlardan biri böbrektir. Serum kreatinin ve kan üre azotunun değerinin artışı böbrek hasarı tanısında önemli biyobelirteçlerdir (Karlo et al., 2014). Perinatal asfikside Sistatin C düzeyi böbrek hasarını tespit etmekte faydalı olabileceği saptanmıştır (Treiber et al., 2014).

Nöronal hasardan sonra artan Glial Fibriller Asidik Protein ve Ubiquitin Karboksil Terminal Hidrolaz L1 nöron ve astrositlerde bulunur ve hasar tanısında önemli biyobelirteçlerdir (Chalak et al., 2014). Bunun yanında protein S 100-B astroglial hücrelerde sentezlenir ve bu hücrelerin hasarı sonucu artar (Çeltik et al., 2004). Yine astrosit ve nöronlarda bulunan ve hatta HİE'de hafif, orta, ağır evrelerine göre daha fazla artan biyomarker Kreatinin kinaz BB dir. NSE (Nöron spesifik enolaz) santral ve sinir sisteminde bulunur ve nöronal hasardan sonra düzeyi artar. İnterlökin 6 (IL-6) beyin hasarına spesifik olmamasına rağmen beyin hasarında artan bir belirteçtir (Nagdyman et al., 2001).

2.2.7.2.4. Konvansiyonel Elektroensefalografi (cEEG) ve Amplitüd Entegre Elektroensefalografi (aEEG)

Yoğun bakım ihtiyacı gösteren term ve preterm bebeklerde önemli nörolojik hasara neden olan çok sayıda risk faktörü vardır. Bu hastalarda, beyin hasarının önlenmesi modern neonatolojinin ana hedefi haline gelmiştir. EEG ile yenidoğan beyin fonksiyonlarının sürekli izlenmesi, nörolojik morbidite için risk faktörleri artmış hastaları ve risk faktörlerini tanımlamada yardımcı olmaktadır. cEEG ve aEEG yenidoğan bebeklerde nöbetlerin tespiti ve izlenmesi için kullanılan iki ana yöntemdir (Rakshasbhuvankar et al., 2015).

Çeşitli neonatal cEEG sınıflandırma sistemlerinde simetri, süreklilik, uyku-uyanıklık durumu, amplitüd ve frekans değişkenleri kullanılmaktadır. Hastalarda nöbetlerin varlığı, ensefalopatinin ciddiyeti, hastalığın tedaviye yanıtı, lezyonun lokalizasyonu hakkında bilgiler sağlar.

aEEG yenidoğanda elektriksel aktivitenin sürekli izlenmesi için yaygın olarak kullanılır. Uzman tarafından yorumlanmasına gerek olmaması ve uzun süreli kayıt yapılabilmesi avantajıdır. İlk 6 saatte aEEG'nin önemi nörolojik muayeneden üstündür. Nörolojik muayene ile birlikte aEEG'nin kombinasyonu yüksek spesifiteye sahiptir (Bracci et al., 2006).

Sonuç olarak; Amerikan Obstetrik ve Jinekoloji Derneği tarafından yayınlanan HİE tanı kriterleri Tablo 12'de verilmiştir (The American College of Obstetricians and Gynaecologists, 2014).

Tablo 12. HİE Tanı Kriterleri

Akut olaylar ile birlikte aşağıdaki bulguların eşlik etmesi;
• APGAR skoru 5. ve 10. Dakikada <5 olması
• Çoklu organ yetmezliği olması
• MRG ve MRS'da HİE ile uyumlu beyin hasarı gözlenimi
• Fetal umbilikal arter kan gazında pH<7 veya BE<-12mmol/L olması
Akut peripartum ve intrapartum olayın eşlik etmesi
• Doğumda uterus rüptürü, kord prolapsusu, amniyon sıvı embolisi, maternal hipotansiyon, maternal hipoksemi, ablasyo plasenta, fetomaternal kanama olması
• Görüntülemelerde tipik bulguların olması, kortikal hasar
• Anormal fetal büyüme, fetomaternal kanama, neonatal sepsis kronik plasental lezyonlar gibi durumların olmaması

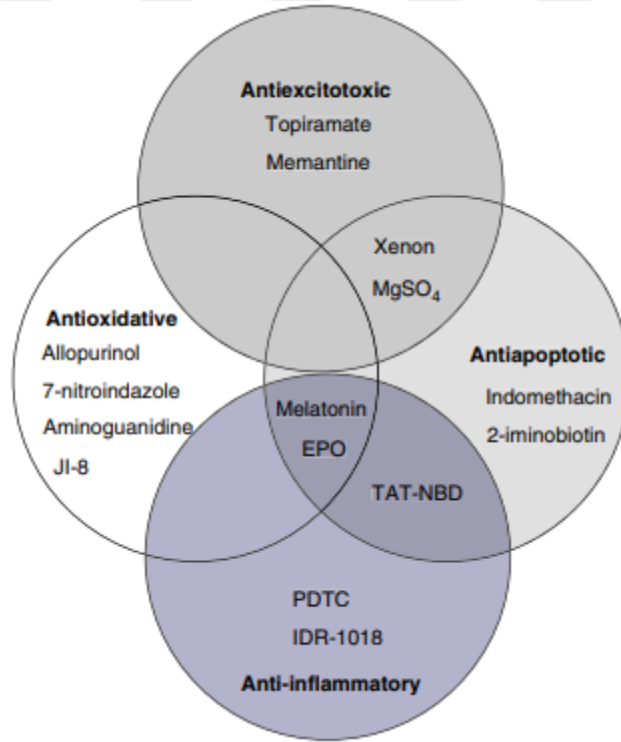
2.2.8. Nöroprotektif-Nöral Rejenerasyon Ajanları Ve Gelecekteki Tedavi Beklentileri

Hipoksi-iskemiden sonra oluşan zararlı etkileri önlemek için farklı potansiyel nöroprotektif tedaviler üzerinde çalışılmaktadır. Hayvan modellerinde test edilen bu ümit verici nöroprotektif ajanlar ve yenidoğan hipoksi-iskemi beyin hasarına ilişkin klinik çalışmalar, yaralanmanın farklı aşamalarını hedefler: eksitotoksisitenin erken evresi, oksidatif stres ve apoptozun yanı sıra geç faz enflamatuvar reaksiyon, nöronal ve oligodendrosit rejenerasyonu.

Neonatal hipoksik-iskemik beyin hasarının erken tedavisi için mevcut nöroprotektif ajanlar, halihazırda bilinen mekanizmalara göre dört kategoriye ayrılmıştır: antioksidasyon, anti-inflamasyon ve antiapoptozdur (Q. Wu et al., 2015).

Tablo 13. HİE’de Umut Verici Tedavi Yaklaşımları (Nair & Kumar, 2018).

Mekanizma	Klinik Denemeler	Klinik Öncesi Çalışmalar
Endogenous	Eritropoietin, darbepoietin Kök Hücre Melatonin	Endokannabinoidler
Exogenous	Monosialgangliosid Ksenon Allopurinol Topiramat Magnezyum sülfat	Argon Azitromisin



Şekil 22. Yenidoğan hipoksik-iskemik beyin hasarının erken tedavisi için mevcut nöroprotektif ajanların sınıflandırılması (Q. Wu et al., 2015)

Ksenon

Ksenonun iki terapötik etkisi vardır (antieksitotoksik ve antiapoptotik). Akut hipoksik-iskemik hakaret, NMDA reseptör aktivasyonuna yol açar. Xenon, NMDA sinyalinin inhibe eder ve bu nedenle akut hücre hasarını azaltmada rol oynayabilir. Domuz yavrusu modelinde doğum asfiksisi çalışmaları, hipotermi ve ksenon tedavisinin birlikteliğinde bir fayda olduğunu düşündürmektedir (S. Faulkner et al., 2011), (Chakkarapani et al., 2010). Ek olarak, ksenonun pahalı bir soy gaz olduğu düşünüldüğünde, alternatif tedaviler şu anda değerlendirilmektedir (S. D. Faulkner et al., 2012).

Argon

Argon, antiapoptotik etkiye sahip daha ucuz bir soy gazdır ve HİE'nin hayvan modellerinde önemli nöroproteksiyonu göstermiştir. Perinatal asfiksi üzerine yapılan kapsamlı bir domuz yavrusu çalışması, %45-50 oranında solunan argonun hipotermik beyin korumasını artırdığını göstermiştir (Frajewicki et al., 2020).

Melatonin ve Eritropoietin (Epo)

Melatonin ve eritropoietin (EPO) üç terapötik etkiye sahiptir (anti-enflamatuvar, antioksidatif ve antiapoptotik). HİE'li term bebeklerde soğutma ile melatoninini değerlendiren randomize kontrollü bir çalışmada, kontrollere kıyasla melatonin ile terapötik hipotermi kombinasyonu, oksidatif stresi azaltmada ve 6 aylıkken olumlu nörogelişimsel sonuçlarla hayatta kalmayı iyileştirmede etkili olmuştur (Aly et al., 2015). Melatonin, yenidoğan beyinlerini perinatal HİE'den korumada güvenli ve faydalı görünmektedir. Bununla birlikte, insanlarda daha büyük randomize kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır.

Eritropoietin ve darbepoetin (etkili bir eritropoietin analogu), hipoksik-iskemik beyin hasarı ve neonatal inmenin hayvan modellerinde nöroprotektif özelliklere sahiptir (Nair & Kumar, 2018). Hem hipotermi ile birlikte hem de monoterapi olarak yüksek eritropoietin dozları, HİE'li bebeklerde beyin hasarını azaltmak ve motor sonuçları iyileştirmek için yapılan ön çalışmalarda umut vaat etmektedir (Y. W. Wu et al., 2016). Hayatın ilk 12 saatinde hipotermiye yardımcı tedavi olarak darbepoietinin kullanımını değerlendiren ve yaşamın 1 haftasında tekrarlanan küçük bir randomize çalışma, bu ilacın iyi bir güvenlik profili olduğunu göstermiştir (Baserga et al., 2015). Ancak, daha büyük denemelerden onay alınması gerekmektedir.

Allopurinol

Allopurinol, bir terapötik etkiye (antioksidatif) sahip bir ksantin oksidaz inhibitörüdür. Hipoksik beyin dokusunun reperfüzyonundan sonra nöronlarda ve glial hücrelerde ikincil enerji yetmezliğine ve apoptoza katkıda bulunan süperoksit olarak oksijen radikallerinin üretimini azaltır (Chaudhari & McGuire, 2008).

Magnezyum Sülfat

Magnezyum sülfat, preterm doğumlarda nöroproteksiyon için antenatal olarak yaygın olarak kullanılan iki terapötik etkiye (antieksitotoksik ve antiapoptotik) sahip bir NMDA reseptör antagonistidir. Şiddetli asfiksili bebeklerde hipotermi tedavisi olmaksızın MgSO₄ kullanımının prospektif, uzunlamasına, plasebo kontrollü bir denemesi, standart destekleyici tedaviye kıyasla iyi kısa vadeli sonuçlar gösterdi (Bhat et al., 2009). HIE'de MgSO₄ kullanımına ilişkin klinik öncesi kanıtların sistematik bir incelemesi, doz ve uygulama zamanlamasında hiçbir fayda ve çok az fikir birliği olduğunu gösterdi (Galinsky et al., 2014). HIE'de MgSO₄'ü değerlendiren bir başka meta-analiz, kısa vadeli sonuçlarda iyileşme olduğu ve yan etkide artış olmadığı sonucuna varmıştır (Tagin et al., 2013). Bununla birlikte, magnezyumun uzun vadeli faydaları olup olmadığını belirlemek ve güvenliğini doğrulamak için daha büyük çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kök Hücre

Son zamanlarda farklı çalışmalar, bir HI olayından sonra, rejenerasyon yollarında artış olduğunu, sadece beyin hasarını hafifletmek için değil, aynı zamanda perinatal hasardan çok sonra gelişen zihinsel olarak düzensiz bir beyinde hücre onarımını ve rejenerasyonunu teşvik etmek için terapilere yeni araştırmalar açtığını ileri sürdü (Felling et al., 2006) (Alencar et al., 2019). Yenidoğan HIE için eksojen kök hücre nakli umut verici ön sonuçlar göstermektedir. Kök hücre transplantasyonu için dağıtım yolları, intraserebral, intratekal, arteriyel, intravenöz, intraperitoneal ve intranazal yaklaşımları içerir.

Kök hücre temelli tedavi, HI'nın neden olduğu iskemik dokuyu kurtarma ve değiştirme potansiyeline sahiptir ve endojen beyin onarımını kolaylaştırabilir (Daadi et al., 2010). Nöral öncü hücrelerin (embriyonik kök hücrelerden türetilen) HIE yenidoğan sıçanlarının derin motor korteksine implantasyonu, implantasyondan sonraki 3 hafta içinde motor fonksiyonunu iyileştirebilir (Shinoyama et al., 2013).

İnsan nöral kök hücrelerinin (HNSC) intranazal verilmesi, muhtemelen NF-κB sinyalinin modülasyonu ile ilgili olan yenidoğan HI sıçanlarında nörodavranışsal sonuçları iyileştirebilir (Ji et al., 2015).

Noninvaziv burun boşluğu implantasyonu, gelecekte kök hücre nakli gerçekleştirmek için basit bir yöntem sağlar. HNSC'nin klinik uygulaması, HİE'li bebeklerde ilk olarak denenmiştir (Su-qing, 2005). HNSC'nin şiddetli HİE'nin neden olduğu nörolojik engelli 7-5 günlük bir erkek bebeğe nakledildiğini bildirdi; Transplantasyondan 28 gün sonra, sadece miyotonisinde değil, aynı yaştaki normal bebeklerinkine benzeyen zeka ve hareketlerinde de dikkate değer bir gelişme oldu. Pozitron emisyon tomografisi (PET), temporal ve oksipital loblarda önemli ölçüde artmış radyoaktivite gösterdi ve bu da hücresel metabolizmanın büyük ölçüde arttığını düşündürdü. Bu çalışmalar, ileri araştırmalar ve klinik uygulamalar için çok değerli deneyimler sağlamıştır.

Kordon Kanı Mononükleer Hücreler

Kordon kanı nakli, geniş uygulama olanaklarıyla, neonatal HİE için en güçlü terapötik aday olabilir.

Bu hücreler sinir rejenerasyonu için güçlü bir potansiyel gösterir ve elde edilmesi diğer kök hücrelere göre daha kolaydır. Hayvan deneyleri, kordon kanı mononükleer hücrelerinin mikrogliya aktivitesini azaltabildiğini, nöronal hücre ölümünü engelleyebildiğini ve sensorimotor refleks fonksiyonunun iyileşmesini desteklediğini göstermiştir (Pimentel-Coelho et al., 2010). Ayrıca, hücre transplantasyonundan sonra beyindeki hasarlı nöronların iyileşmesine ve gelişmesine nörotrofik faktörün regülasyonuna yardımcı olmak için endojen nöral kök hücrelerin olgun nöronlara farklılaşmasını teşvik edebilirler (T. Yasuhara et al., 2010). Yenidoğan HİE için kök hücre transplantasyonunun optimal zamanlaması, dozu ve dağıtımı için daha fazla çalışma gerekmektedir.

Monosialogangliosid

Gangliosidler, hücre zarı bütünlüğünü korumada önemli bir işleve hizmet eden sfingolipidlerdir. Bir sıçan neonatal hipoksik iskemik yaralanma modelinde, hipokampusta azalmış gangliosid, fosfolipid ve kolesterol içeriği kaydedilmiştir (Ramirez et al., 2003). Monosialogangliosid tedavisinin apoptotik hasara karşı koruduğu (Ferrari et al., 1995) ve beyin hasarını azalttığı (Ballough et al., 1998) gösterilmiştir. Bu, monosialogangliosidlerin HİE'de adjuvan tedavi olarak değerlendirilmesine yol açtı. Yayımlanmış tüm klinik çalışmaların bir meta-analizinde, Sheng ve ark. 787 yenidoğandan oluşan 10 çalışmayı

değerlendirdi. Monosialoganglioside ile adjuvan tedavinin, kısa vadeli klinik etkilerin iyileştirilmesi ve uzun vadeli nörogelişimsel yetersizliklerin azaltılması açısından potansiyel olarak ek faydalar sağladığı sonucuna varmışlardır (Sheng & Li, 2017).

Topiramet

Topiramet, voltaja bağlı sodyum ve kalsiyum kanallarını bloke eder ve ayrıca gama-aminobütirik asidin (GABA) inhibe edici etkilerini arttırırken uyarıcı glutamat yolunu inhibe eder. Tüm bu etkiler, HİE'nin patofizyolojisinde olumlu bir şekilde çalışacaktır. Yenidoğanlarda, hipotermi ile birlikte HİE'nin yönetiminde kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Kısa vadeli verileri, olası nöroprotektif etkilerin araştırılmasında hipotermi ile birlikte kullanımını desteklemektedir (Filippi et al., 2010). HİE'li yenidoğanlarda topiramet uygulaması güvenli olmasına rağmen, mortalite ve ciddi nörolojik sakatlığın kombine sıklığını azaltmadı (Filippi et al., 2018). Topiramet ile birlikte tedavinin epilepsiyi önlemedeki rolü daha fazla çalışmayı hak etmektedir.

Azitromisin

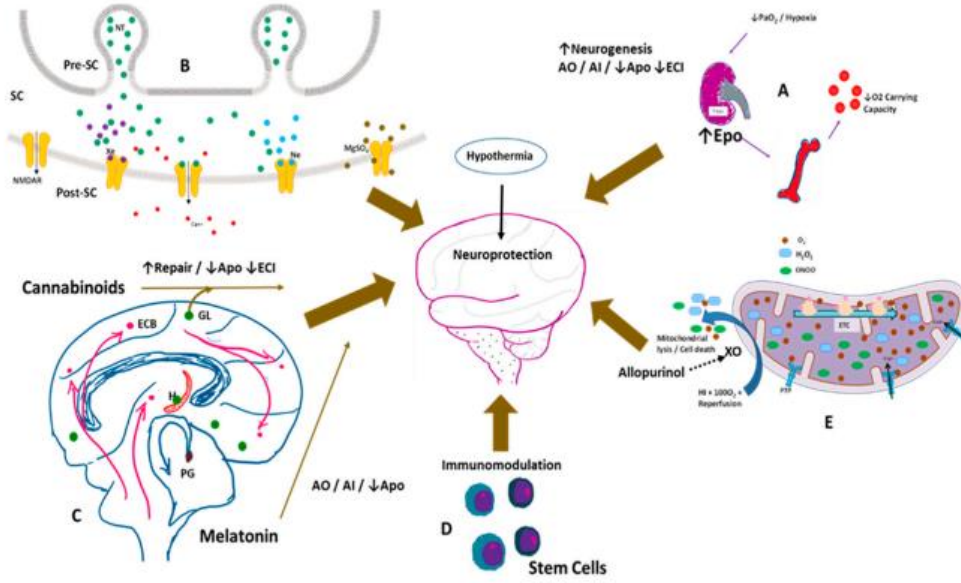
İskemik inme modellerinde yapılan klinik öncesi çalışmalar, azitromisinin nöroprotektif bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur (Amantea et al., 2016). Son çalışmalar, azitromisinin neonatal HİE'de tek başına ve hipotermiye ek olarak kullanım olasılığını araştırmıştır (Daniel E Shumer, 2017). Bu, yerleşik bir güvenlik profiline sahip olan ve yenidoğanlarda halihazırda kullanılmakta olan bir ilaçtır, bu nedenle umut verici klinik öncesi çalışmalar, azitromisini hipotermi tedavisine ek olarak değerlendiren klinik denemelere hızla yol açabilir.

Endokannabinoidler

Endokannabinoid sistem, beyin hasarından korunmada yardımcı olabilecek önemli bir nöro-düzenleyici mekanizma olarak kabul edilmiştir. Bu sistemin aktivasyonunun, glutamat eksitotoksitesini, mikroglia ve hücre ölüm yollarının aktivasyonunu azalttığı gösterilmiştir.

Bir kemirgen yenidoğan HİE modelinde bir kanabinoid (CBD) reseptörü 1 ve 2 (CBR1 ve CBR2) agonisti WIN 55212-2'nin kullanımı, glutamat salınımını, TNF alfa birikimini ve iNOS indüksiyonunu önleyerek hücre ölümünün azalmasıyla sonuçlanan koruyucu etkiler göstermiştir (Fernández-López et al., 2006). CBR agonistlerinin kullanımı, oligodendrosit oluşumunu, hayatta kalmasını ve farklılaşmasını teşvik eder, böylece beyaz cevher hasarından onarıma katkıda bulunur (Fernández-López et al., 2013). Bu tedavinin

kullanımı umut verici olmakla birlikte, klinik öncesi çalışmalarda güvenilirliği ve etkinliği değerlendirilmeye devam etmektedir.



Şekil 23. Hipoksik-iskemik ensefalopati tedavisinde potansiyel nöroprotektif tedaviler (Nair & Kumar, 2018).

(A) Hipoksi, böbrekler tarafından eritropoietin (Epo) üretimini uyarır, kemik iliğinde RBC üretimini artırır, böylece O₂ taşıma kapasitesini artırır. Epo, nörogenezi destekler; bir antioksidandır (AO), antienflamatuardır (AI), apoptozu (Apo) ve eksitotoksik hücre hasarını (ECI) azaltır;

(B) Ksenon (Xe-mor noktalar), neon (Ne-teal noktalar) ve magnezyum sülfat (Mgso4-kahverengi noktalar), NMDA reseptörü (NMDAR) yoluyla N-metil-D-aspartat (NMDA) aracılı eksitotoksisiteyi antagonize eder, hücreye kalsiyum girişini azaltır. SC—sinaptik yarık, SC Öncesi—presinaptik yarık, SC Sonrası—sinaptik sonrası yarık;

(C) Endojen kannabinoidler (ECB'ler) ve melatonin sinir koruyucudur. Gangliosidler (GL) gibi spingolipitler ayrıca apoptotik hasara karşı da koruma sağlar;

(D) Göbek kordonu kanından türetilen kök hücreler ve mezenkimal kök hücreler, bağışıklık sistemini modüle eder ve uzun vadeli sonuçları etkiler;

(E) Allopurinol, ksantin oksidaz (XO) enzimini inhibe ederek reaktif oksijen türlerini, mitokondriyal lizisi ve hücre ölümünü azaltır. O₂—süperoksit, H₂O₂—hidrojen

peroksid, ONOO—peroksinitrit, ETC—elektron transfer zinciri; PTP—iç mitokondriyal zarın geçirgenlik geçiş gözenek.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Cihazlar

Tablo 14. Kullanılan Cihazlar.

Kullanılan Cihazlar	Marka
Laminer Kabin	BIOBASE
Ters Işık Mikroskobu	OLYMPUS IX51
CO ₂ İnkübatör	NÜVE
Etüv	NÜVE
Doku Takip Cihazı	Leica
Parafin Cihazı	Leica
Santrifüj	Hettich Zentrifugen mikro 200R
Sıcak su banyosu	NÜVE BM30
Real Time PCR	ABI
Floresan Mikroskobu	ZEISS AXIO
Chamber	THERMO
Preparat Seti	ISOTHERM
Karıştırıcı / Çalkalayıcı	thermoscientific
Basınçlı Buhar: Otoklav	NÜVE
Cerrahi Set	KLS martin
Mikrotom Cihazı	Leica RM2135
pH Metre Cihazı	METTLER TOLEDO
Derin Dondurucu / Buz Dolabı	VESTEL/SAMSUNG
Mikroplate Spektrofotometre	Epoch Biotek
Nanodrop	Nabi NBI-E-210805
Isıtıcı	Benchmark Hotplate Stirrer

3.1.2. Hayvan Materyali

Deneysel Hayvan çalışmaları için Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 25.12.2019 tarihinde XII nolu toplantısında 139 nolu karar ile onay alındı. Fareler, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edildi. 6-8 haftalık sağlıklı Balb/c cinsi gebe fareler çalışmaya alındı. Şeffaf kafeslerde tutulan farelere çalışma süresince standart yem ve su *ad libitum* verildi.

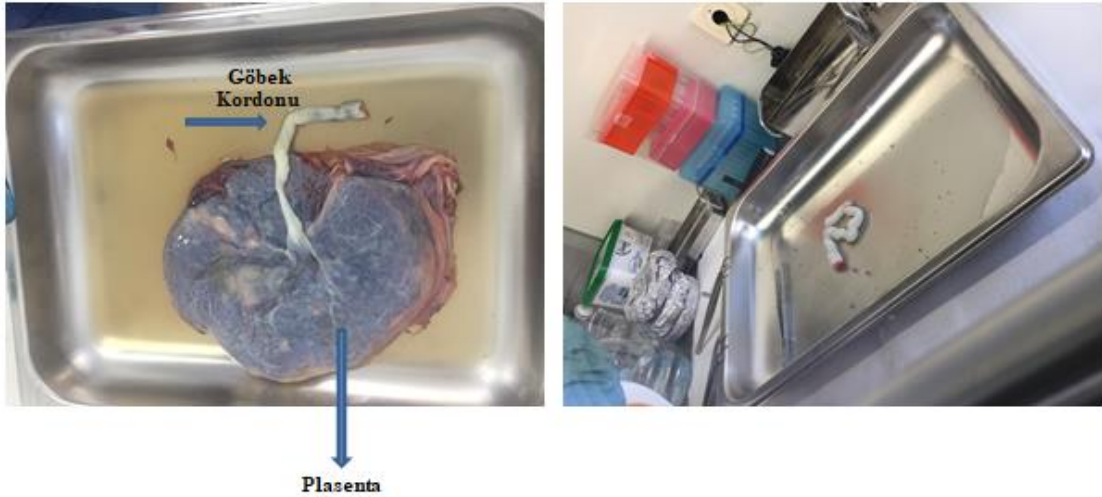
3.2. YÖNTEM

3.2.1. Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu

Çalışmamız Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hastanesi Kadın Doğum Kliniğinde sağlıklı anneden doğan sağlıklı yenidoğanın göbek kordonu alınarak yapılmıştır. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü Tıp Fakültesi Dekanlığı Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 09.01.2020 tarihinde yapılan toplantıda 24 nolu karar ile onay alınmıştır.

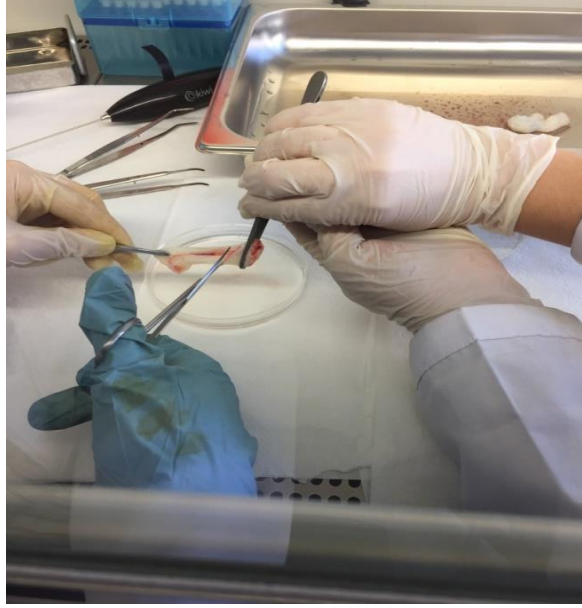
Aydın Adnan Menderes Hastanesinde doğum yapan sağlıklı yenidoğanın göbek kordonu 100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin ve 100 µg/mL amfoterisin B ile fosfat tamponlu salin içerisinde alınmıştır.

Çalışmada kullanılan tüm malzemelerin sterilizasyonu otovlav ile sağlanmıştır. Laboratuvara gelen göbek kordonu %70 EtOH ve dH₂O ile temizlendikten sonra otoklavlanmış kap içerisinde steril kabine alınmıştır. (Resim 1)



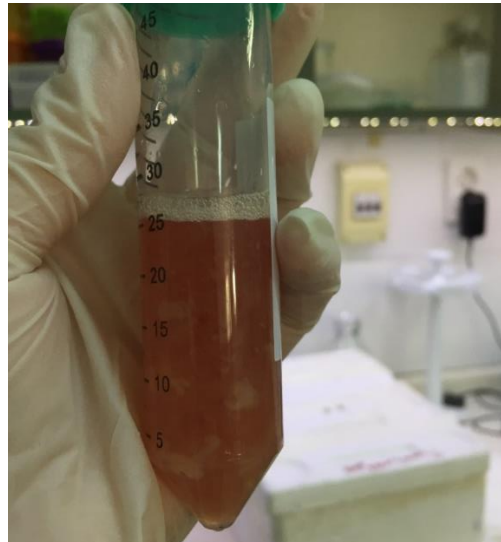
Resim 1. Plasentadan ayrılan göbek kordonu.

Steril kabine alınan göbek kordonu yaklaşık 5 cm²'lik parçalar halinde kesilmiştir. İki arter damarı ve ven damarı cerrahi set aracılığıyla çıkarılmıştır.



Resim 2. Yaklaşık 5cm²'lik parça halinde kesilmiş göbek kordonunun 2 arter ve ven damarının çıkarılması.

Damarları uzaklaştırılan göbek kordonu PBS içeren dish içerisine alınmıştır. Burada 10 mg/mL kollajenaz tip 1 (Sigma) ile 1 saat inkübatörde bekletilerek enzimatik parçalama yöntemi uygulanmıştır.



Resim 3. Göbek kordonundan çıkarılan Wharton jelinin Kollajenaz Tip 1 ile parçalaması

1 saat sonrasında gözle ayırt edilecek düzeyde parçalanan göbek kordonu enjektör yardımıyla da fiziksel parçalama yapılmıştır.

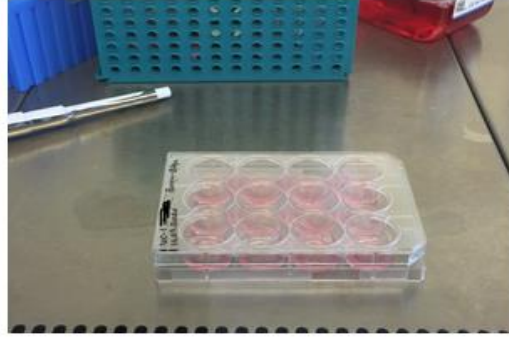


Resim 4. Enjektör ile fiziksel parçalama.

Enjektör ile fiziksel parçalama yapılan göbek kordonu sonrasında 20dk 340xg’de santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet (hücre) 1 mL kültür mediumda çözülerek altı kuyucuklu, 25-75 cm²’lik flaska ve dishe ekilerek, 37 °C’ de %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılmıştır.



Resim 5. Santrifüj sonrası çöken hücre pelletleri.



Resim 6. Hücrelerin 6 kuyucuklu plaka, dish ve 75 cm²'lik flaslara ekimi.

Hücreler olası bir kontaminasyon riskine karşı takip edildi ve 21 gün boyunca büyümelerine izin verildi. İzole edilmiş ve büyütülmüş MSC hücrelerinin morfolojisi, ters mikroskop kullanılarak değerlendirildi.

3.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Pasajlanması

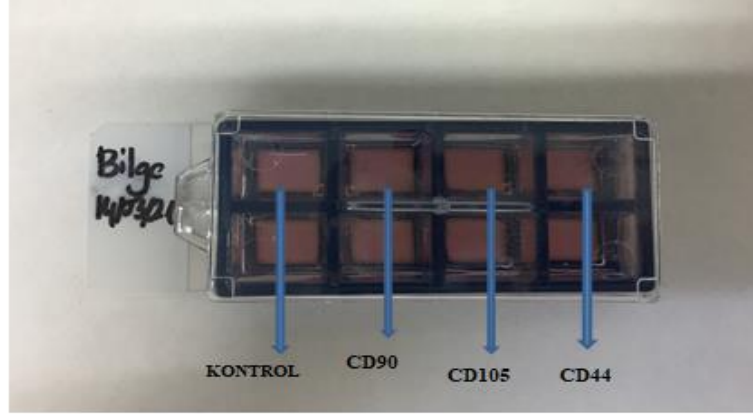
Hücreler büyütülüp, %70-80 oranında çoğaldığında pasajlama işlemi yapıldı. Öncelikle flask ve dishteki besiyeri serolojik pipet ile çekildi. 3 kez DPBS ile yıkandı. %0.25 oranında Tripsin-EDTA kullanılarak hücre kazıyıcı yardımıyla yapışan hücreler nazıkçe kazılarak kaldırıldı. Tripsin-EDTA'nın aktivitesini durdurmak için FBS içeren medium ortama ilava edildi. Hücreler falkona alınarak 1100 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Üst faz atılarak pellet kültür mediumda çözdürüldü. Pasaj numaraları verilerek, çalışma planına göre uygun hücre kültür plaklarına ekildi.

3.2.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

MSC hücrelerinin karakterize edilmesinde hücre yüzey reseptörleri olan CD90, CD105 ve CD44 düzeyleri immunofloresans yöntemle tespit edilmiştir.

Hücreler chamber slidelara (Corning 354688) ekildi ve büyütüldü.

Besiyeri uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuk PBS ile yıkandı. Hücreler formaldehid ile 10-15 dakika fikse edilir. Fikse işleminden sonra PBS ile yıkandı. %2 BSA TBST ile hazırlandı ve kuyucuklara 450 µl ilave edilerek 1 saat blokaja bırakıldı. Blokaj sonrası kuyucuklara primer antikorlar (CD44, CD90, CD105) eklendi ve 1 gece +4 °C’de bırakıldı (Resim 7).



Resim 7. Primer antikor (CD44, CD90, CD105) kuyucuklardaki konumu.

Gece inkübasyondan sonra primer antikorlar kuyucuklardan toplandı ve 3 defa 5 dakika arayla PBS-T ile kuyucuklar yıkandı. Sekonder antikorlar (Texas Red, FITC) 200 µl kuyucuklara eklendi. Oda ısısında karanlıkta bekletildi. Tekrar 3 kez PBS ile yıkama işleminden sonra slayt çıkarıldı, DAPI ile boyanıp lam ile kapatılarak floresan mikroskopta (Zeiss, Axio Vert.A1) görüntü alındı.

3.2.4. Mezekimal Kök Hücrelerin Oct-4, NANOG ve Sox-2 Düzeylerinin qPCR ile Belirlenmesi

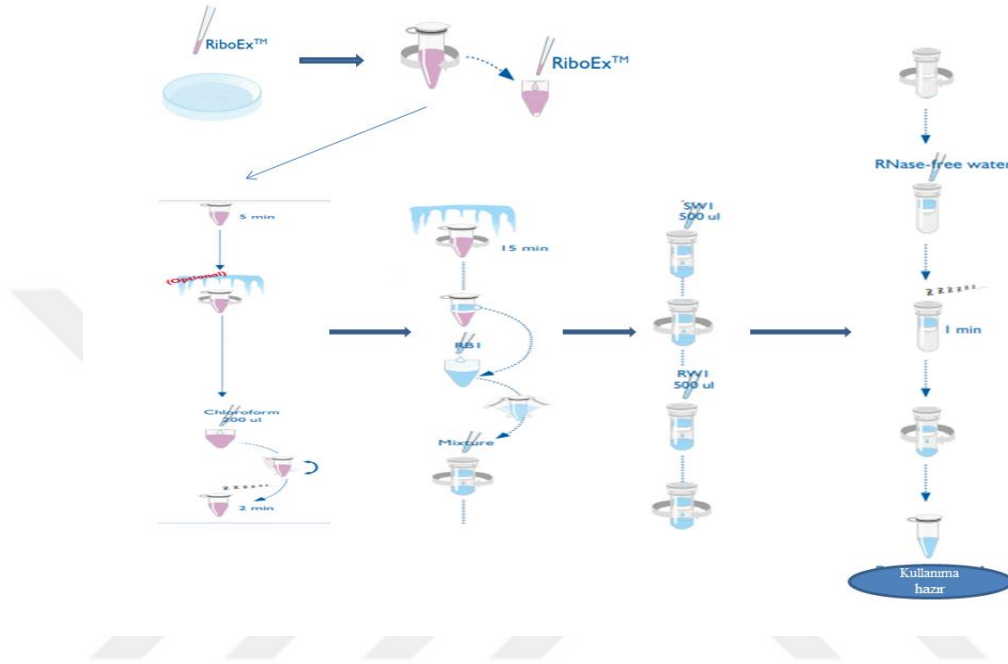
3.2.4.1. RNA, cDNA İzolasyonu ve qPCR

RNA İzolasyonu, GeneAll® Hybrid-RTM (305-101) total RNA purification kiti kullanılarak firmanın önerilerine uygun olarak total RNA izole edildi. Total RNA izolasyon protokolü:

1. Göbek kordonundan izole edilen kök hücreler 20 gün boyunca 37 °C, %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltıldı. Hücrelerin mediumları toplandı. Her bir kuyucuktaki hücreler, kit içerisinde bulunan RiboEx™ RNA hücre patlatma tamponu ile kazındı ve hücre lizatları toplandı. (1 ml RiboEx™ içinde ~ 1 x 10⁷ UC-MSD hücre; 1 ml RiboEx™ içinde 100 mg UC dokusu homojenize edildi.)
2. Homojenat 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu adım, nükleoprotein komplekslerinin tamamen ayrışmasına izin verir.
3. 4°C'de 10 dakika boyunca 12.000 xg'de santrifüjlendi ve süpernatantı yeni bir tüpe aktarıldı. Elde edilen pelet hücre dışı membranlar içerir, polisakkaritler ve yüksek moleküler ağırlıklı DNA, süpernatant RNA içerir.
4. 1 ml RiboEx™ başına 0,2 ml kloroform eklendi. 15 saniye kuvvetlice çalkalandı ve 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
5. 4°C'de 12.000 x g'de 15 dakika santrifüjlendi ve sulu fazı yeni bir tüpe aktarıldı. Karışım üç faza ayrılacaktır; bir alt tabaka, bir ara faz ve bir renksiz üst sulu tabaka. Üst sulu katman, homojenizasyon için kullanılan RiboEx™ hacminin yaklaşık %50'sidir.
6. Numuneye 1 hacim tampon RB1 eklendi ve ters çevirerek iyice karıştırıldı.
7. Karışımın 700 ul'ye kadarını mini bir döndürme kolonuna aktarıldı.
8. Oda sıcaklığında ≥ 10.000 xg'de 30 saniye santrifüjlendi. Kolona geçen sıvı atıldı ve kolon tekrar aynı tüpe takıldı.
9. Numunenin geri kalanını kullanarak adım 7-8'i tekrarlandı.
10. Mini döndürme kolonuna 500 ul tampon SW1 eklendi.
11. Oda sıcaklığında ≥ 10.000 x g'de 30 saniye santrifüjlendi.
12. Mini döndürme kolonuna 500 ul tampon RNW eklendi.
13. Oda sıcaklığında ≥ 10.000 x g'de 30 saniye santrifüjlendi
14. Kalan yıkama tamponunu çıkarmak için oda sıcaklığında 1 dakika daha ≥ 10.000 x g'de santrifüjlendi. Mini döndürme kolonunu yeni bir 1.5 ml tüpe aktarıldı.
15. Mini döndürme kolonundaki zarın merkezine 50 ~ 100 ul RNase içermeyen su eklendi. 1 dakika bekletildi.

16. Oda sıcaklığında 1 dakika boyunca $\geq 10.000 \times g$ 'de santrifüjlendi. Saflaştırılmış RNA, anında analiz için 4°C'de saklandı.

17. Saflaştırılmış RNA, DNA ve protein içermez, total RNA miktarları nanodropta ölçüm alınarak hesaplandı.



Resim 8. Total RNA kiti uygulama şeması



Resim 9. Total RNA miktarının ve kalitesinin (A260/A280) Nanodropta ölçümü.

RNA'nın PCR ile amplifiye için cDNA'ya çevrilmesi gerekmektedir. İzole edilen ve kalıp olarak kullanılan RNA' lardan, revers transkriptaz enzimi ile cDNA sentezi yapıldı. Applied Biosystems High capacity cDNA Reverse Transkription Kit (Katalog no: 4368813) kullanıldı.

Tablo 15. cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon içeriği

RNA	50 µl
10X RT Buffer	2 µl
25X dNTP Mix (100mM)	0.8 µl
10X RT Random Primer	2 µl
Reverse Transkriptaz	1 µl
RNase Inhibitör	1 µl
Nuclease free H ₂ O	3.2 µl
Toplam	60 µl

Random primer ve RNA örnekleri Tablo 16' da verilen oranlarda karıştırılıp 25 °C'de 10 dakika bekletildi. 37 °C'de 2 saat inkübasyon, 85 °C'de 5 dakika inkübasyondan sonra cDNA sentezi gerçekleştirildi ve elde edilen cDNA miktarları nanodropta ölçüldü.

MSC Pluripotensi karakterizasyonu için Oct-4, NaNOG, Sox-2 düzeyleri qPCR ile belirlendi. SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) ile kit prosedürüne uygun olarak yapıldı. Real-time PCR'da GAPDH, Sox-2, NaNOG ve Oct-4 genleri için dizayn edilmiş ticari olarak satın alınan (Sigma, KiCqStart SYBR Green Primers) primerler kullanıldı.

qPCR master mix içeriği (1 örnek için):

SYBR Green Master Mix: 10 µl

F primer: 1 µl

R primer: 1 µl

Tablo 16. qPCR içeriği

Örnek	cDNA	Su	PCR Master mix	Toplam
Örnek 1	6,24 µl	1,76 µl	12 µl	20 µl
Örnek 2	6,32 µl	1,68 µl	12 µl	20 µl

qPCR için cDNA dilüe edildi ve Sybr Green master mix kullanılarak reaksiyon kuruldu. Her bir kuyucukta toplam reaksiyon 20 µl olacak şekilde karışım hazırlandıktan sonra 95 °C 10 dk (1 siklüs), 95 °C 15 sn, 57°C 20 sn, 72 °C 30 sn (40 siklüs), 95 °C 2 dk (1 siklüs) olarak programa uygun şekilde ABI Stepone Plus cihazında qRT-PCR deneyleri kuruldu.

3.2.5. Asfiksi Yenidoğan Modeli ve Mezenkimal Kök Hücre Uygulaması

Deneysel hayvan çalışmaları için Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 25.12.2019 tarihinde XII nolu toplantısında 139 nolu karar ile onay alınmıştır.

6-8 haftalık sağlıklı Balb/c cinsi gebe fareler çalışmaya alındı. Bu fare cinsinde term gebelik süresi 19-21 gündür ve 17-18. günlerde doğumun gerçekleşmesi preterm doğum kabul edilmektedir. Asfiksi için preterm model ve 18. günde sezeryan ile doğan yenidoğan fareler kullanıldı. Bu yenidoğan farelerden deneysel yenidoğan asfiksi modeli gaz karışımı yardımıyla yapıldı. Sezaryan ile alınan yenidoğan fareler hızlı bir şekilde %4 O₂, %20 CO₂ ve %76 N₂ içeren özel basınçlı tüplere bağlı chamberlar içerisine yerleştirildi. Bu chamberda yenidoğan fareler hipoksik koşullara maruz bırakıldı. Çalışmada, MSC hücreleri asfiksi farelere subkutan olarak insülin enjektörü ile 5 gün arayla uygulandı. Farelerde vücut ısı takibi ve besin alım takipleri yapıldı. 20 gün süre sonunda servikal dislokasyon ile öldürülen farelerden kan ve doku numuneleri toplandı ve -80 °C' de saklandı. Dokuların bir kısmı histolojik boyamalar için fiksatif edildi.

3.2.5.1. Balb/c Farelerin Gebe Bırakılması, Gebeliğin Doğrulanması

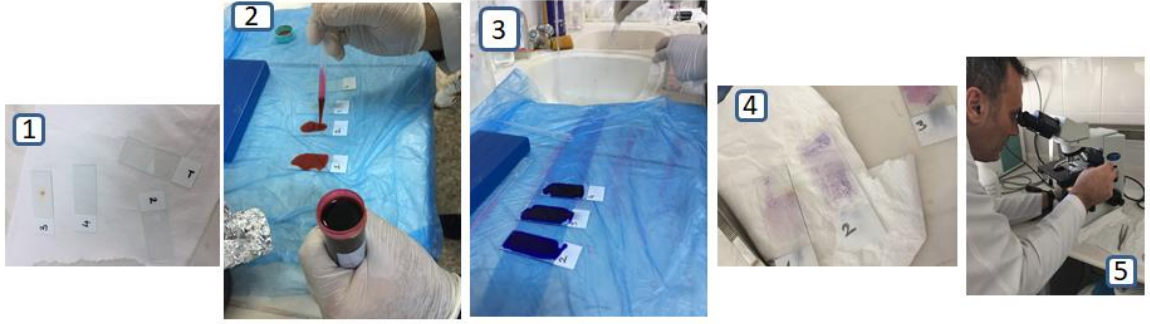
6-8 haftalık yaklaşık 20-22 gr ağırlığında 20 adet dişi ve 8 adet erkek Balb/c cinsi fareler kullanıldı. Her kafeste 6-8 hayvan bulunacak şekilde barındırıldı ve ortam koşulları sağlandı. Dişi fareler gebe bırakılmak üzere erkek fareler ile bir araya getirildi. Aynı kafes içerisine 1 erkek fare, 2-6 adet dişi fare alındı. İki adet dişi, koruyucu anne olacağı için çiftleştirme esas gruptan 4 gün önce yapıldı.

Kurulan sistemde hayvanlar 1 gün boyunca aynı kafeste barındırıldı ve ertesi gün dişilerde vajinal plug gözlemlendi. Farelerde çiftleşmeden 12-24 saat içerisinde çiftleşme sırasında vajinada bir tıkaç oluşur, vajinal plug olarak adlandırılan bu durum çiftleşmenin olup olmadığının göstergesidir. Dişilerde vajinal plug gözlemlendiği gibi aynı zamanda genital bölgeden alınan sürüntü ile smear testi yapılarak dişilerin gebeliği doğrulandı.



Resim 10. Çiftleşmeden 24 saat sonra gözlemlenen Vajinal Plug görüntüsü.

Smear testinde, vajinal plug görülen dişi farelerin genital bölgesinden alınan sürüntüler PBS içeren ependorfa alınarak slaytlara yayıldı ve kuruması beklenildi. Metil alkolle slaytlar 1 dakika fiks edildi ve tekrar kurumaya bırakıldı. Eozin Y ile 10 dakika slaytlar boyanıp, yıkandı. Kuruduktan sonra Taluidin ile 1 dakika tekrardan slaytlar boyanıp, yıkandı ve mikroskopta incelendi. Mikroskopta gözlemlenen spermier çiftleşmenin olduğunu doğruladı ve gebeliğin 1. günü olarak değerlendirildi.

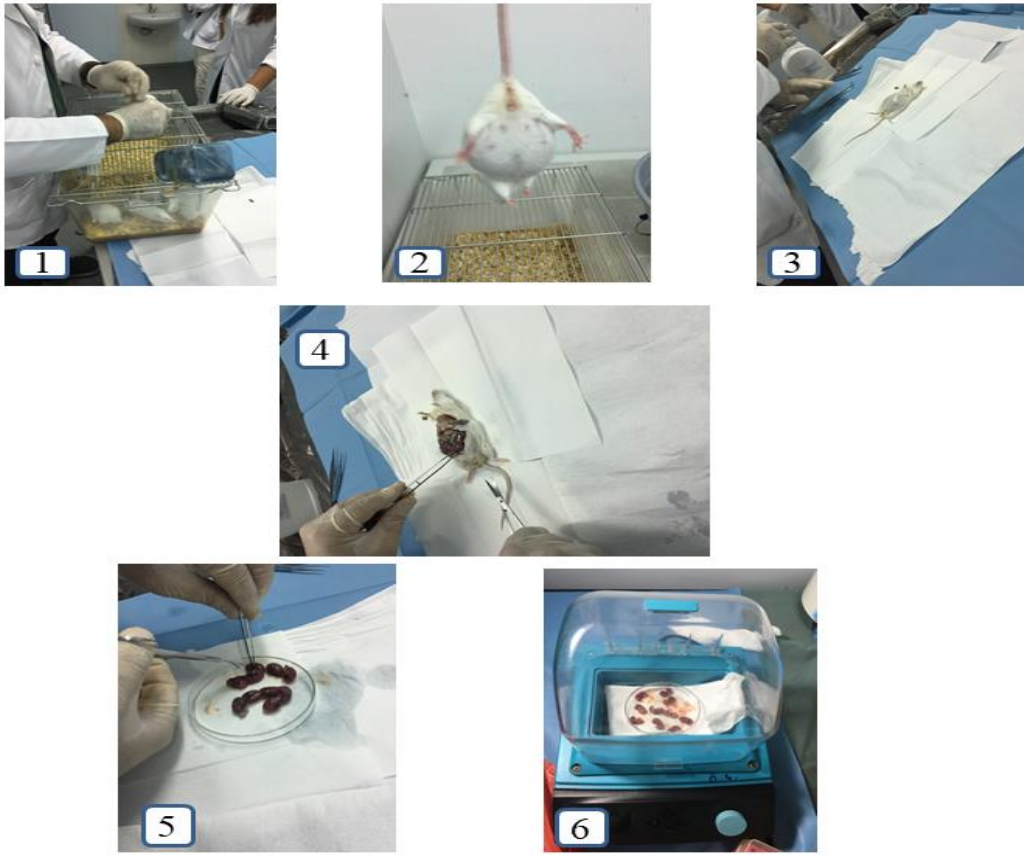


Resim 11. Smear testi aşamaları.

3.2.5.2. Sezaryen Protokolü

Gebeliğin 18. günü dişi farelere sezaryan yapıldı. Tüm ekipmanlar hazırlandı ve steril edildi. Kağıt havlu, Etanollü mendil, %75 etanol, steril örtü, ısıtma plakası, cerrahi ekipmanlar hazırlandı.

- Servikal dislokasyon ile gebe anneler sezeryan için hazırlandı.
- Gebe farenin karını iyice ortaya çıkartıldı ve %75 etanol ile dezenfekte edildi.
- Cerrahi forseps ile cilt kaldırıldı ve cerrahi makas kullanarak orta hat kesimi yapıldı.
- Yavrulara, plasentaya zarar vermeden uterus çıkartıldı. Dikkatli bir şekilde uterus duvarı açıldı. Yavrular amniyondan ve göbek kordonundan ayrıldı.
- Yavrular temiz bir kağıt havluya alındı.



Resim 12. Sezaryen aşamaları.

3.2.5.3. Deneysel Yenidoğan Asfiksi Hastalık Modeli ve Mezenkimal Kök Hücre Uygulama

Sezaryan sonrası yavru fareler randomize olarak bölündü. Denekler her grup için 8 adet olmak üzere 3 gruba rastgele ayrıldı. Çalışmada yer alacak olan gruplar:

Kontrol Grubu (n:8 adet, Normal hava koşullarında + DMEM uygulanan)

Asfiksi Grubu (n:8 adet, Asfiksi oluşturulan + DMEM uygulanan)

Tedavi Grubu (n:8 adet, Asfiksi oluşturulan + MSC uygulanan)

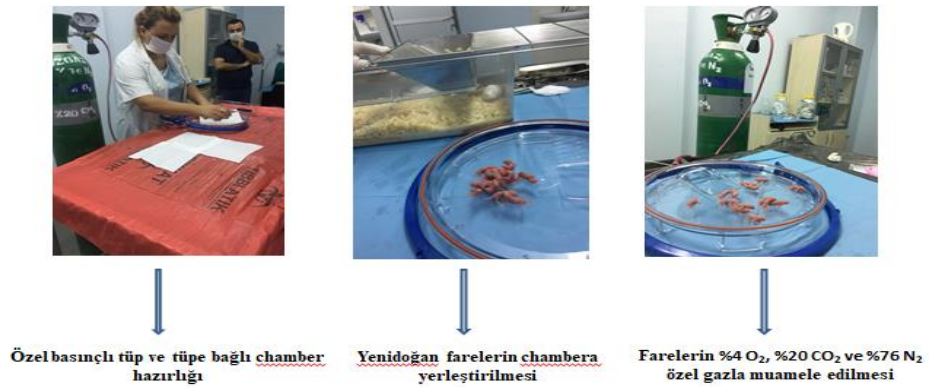
Yenidoğan farelerden deneysel yenidoğan asfiksi modeli gaz karışımı (%4 O₂, %20 CO₂ ve %76 N₂) yardımıyla yapıldı. Sezaryandan sonra yenidoğan fareler asfiksi geliştirilmesi için hızlı bir şekilde özel basınçlı tüplere bağlı özel chamberlar içerisine yerleştirildi. Bu chamberda yenidoğan fareler 33 °C’de 45 dakika hipoksik koşullara ve 30 dakika da 4°C’de hipotermiye maruz bırakıldı. Yenidoğan farelerin beslenebilmesi için

normal doğum yapmış koruyucu annelerin yanına bırakılmadan önce ilk doz MSC veya DMEM enjeksiyonu yaklaşık 50 µl subkutan olarak insülin enjektörüyle yapıldı. Yavruların diğer yavrulardan ayırt etmek için kuyrukları boyandı.

5 gün arayla düzenli olarak enjeksiyonu yapılan yavrular, 20 gün süre sonunda servikal dislokasyon ile öldürüldü. Farelerden kan ve doku numuneleri toplandı ve -80 °C’ de saklandı. Dokuların bir kısmı histolojik boyamalar için fiksatif eklenerek kaldırıldı.



Resim 13. Deneysel Yenidoğan Asfiksi Modeli oluşturmak için kullanılan özel basınçlı tüp ve tüpe bağlı chamber.



Resim 14. Deneysel Yenidoğan Asfiksi Modelinin adım adım oluşturma aşamaları



Resim 15. Deney sonunda servikal dislokasyon ile öldürülerek, kan ve doku numunelerinin toplanması.

3.2.6. Dokularda Oksidan/Antioksidan Parametrelerinin İncelenmesi

Dokularda oksidatif stresin bir göstergesi olan MDA ve oksidatif stres sürecinde rol alan MPO, GSH, SOD düzeyleri doku homojenatları elde edilerek bakıldı. Beyin, kalp, akciğer, böbrek, karaciğer dokuları 0.5 g olacak şekilde tartıldı ve ependorflara alındı. Doku tamponu ile 1.5 mL lizis edildi. Boncuklar ve el homojenitörü kullanarak dokular homojenize edildi. 4°C, 5000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi ve üst fazı ölçümler için yeni ependorflara alındı.

3.2.6.1. MDA (Malondialdehit) Ölçümü

Tablo 17. MDA Ölçümü için gerekli çözeltiler ve miktarları

MDA Ölçümü (Plate)	Hacim
Doku / Serum Örnek	25 µl
Soğuk TCA Çözeltisi	125 µl
TBA Çözeltisi	75 µl

Tüm bileşenler ependorf tüp içerisine konuldu ve vortekslendi. 30 dk 100 °C’de ısıtıcıda bekletildi ve sonrasında soğutulmaya bırakıldı. 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Üst faz pipetle alınıp, her bir doku için dizaynı yapılan 96 kuyucuklu plate yüklendi ve 532 nm’ de spektrofotometrede ölçüldü. MDA derişimleri molar ekstinksiyon katsayısı ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplandı Sonuçlar nmol/mg protein cinsinden hesaplandı.

3.2.6.2. GSH (Glutasyon) Ölçümü

GSH derişimleri Ellman ayracı kullanılarak ölçümler yapıldı.

Tablo 18. GSH Ölçümü için gerekli bileşenler

GSH Ölçümü (Plate)	Hacim
Doku / Serum Örnek	100 µl
Soğuk TCA çözeltisi (%10)	100 µl
Üst Faz	50 µl
1M Sodyum Fosfat Tampon (pH=6.8)	200 µl
Ellman Ayracı (DTNB)	25 µl

Doku/serum örnekleri ve soğuk TCA çözeltisi belirtilen miktarlarda ependorflara konuldu, vortekle karıştırıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi ve üst faz 96 kuyucuklu plate belirtilen miktarda konuldu. Reaktifler kuyucuklara yüklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 412 nm’de ölçüldü. GSH kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar nmol/mg protein cinsinden hesaplandı.

3.2.6.3. SOD (Süperoksit Dismutaz) Aktivite Ölçümü

Tablo 19. SOD Aktivite ölçümü için gerekli bileşenler

SOD Ölçümü (Plate)	Hacim
Doku/Serum örnek (1/10 dilüe)	5 µl
Fosfat Tamponu (pH=7.8)	220 µl
o-dianisidin	25 µl
Riboflavin	50 µl

Tüm bileşenler sıra ile kuyucuklara eklendi. 0. Dakikada 460 nm’de absorbands ölçüldü. 10 dakika floresans ışık altında bekletildikten sonra tekrar absorbandsı ölçüldü. Standart grafikten faydalanarak sonuçlar U/mg protein cinsinden hesaplandı.

3.2.6.4. MPO (Miyeloperoksidaz) Aktivite Ölçümü

Tablo 20. MPO Aktivite ölçümü için gerekli bileşenler

MPO Ölçümü (Plate)	Hacim
Doku/serum örnek	50 µl
HETAB Çözeltisi	50 µl
Üst Faz	30 µl
Tampon (pH= 6.0)	150 µl
H ₂ O ₂ Çözeltisi	20 µl
o-dianisidin çözeltisi	50 µl

Doku/serum örnekleri ve HETAB çözeltisi ependorf tüp içerisine konuldu ve vorteksle karıştırıldı. -20 °C’ye konuldu, 3 defa dondur-çöz yapıldı. 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi ve kuyucuklara yüklendi. Üst faz, Tampon (pH=6.0), H₂O₂ çözeltisi, o-dianisidin çözeltisi sıra ile kuyucuklara yüklendikten sonra 0. Dakikada 460 nm’de absorbands ölçüldü. 37 °C’de 5 dakika inkübasyondan sonra tekrar 460 nm’de absorbands ölçüldü. MPO için molar absorbtivite katsayısı $\epsilon = 39000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak alınmıştır. Sonuçlar U/mg protein cinsinden hesaplandı.

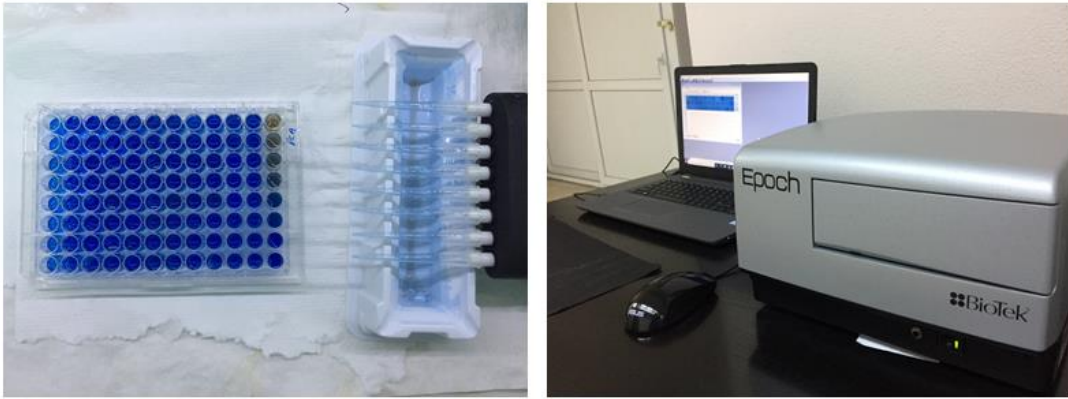
3.2.6.5. Beyin, Akciğer, Böbrek, Karaciğer ve Kalp Dokularında Bradford Protein Ölçümü

Total protein tayininde Bradford Yöntemi kullanılmıştır. Bu yönteme göre proteinlerin fosforik asitli ortamda Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası ile kompleks yapma esasına dayanır. Çalışmada yer alan beyin, akciğer, böbrek, karaciğer ve kalp dokularında Bradford yöntemi ile protein miktarı mg/mL olarak belirlendi.

Tablo 21. Bradford Protein Ölçümü için Gerekli Bileşenler

Bradford Protein Ölçümü (Plate)	Örnek	Standart
Doku/serum Örnek	25 µl	-
BSA Standart	-	25 µl
Bradford Çözeltilisi (1/5 dilüe)	250 µl	250 µl

Doku örnekleri ve standartlar kuyucuklara yüklendi. Oda ısısında, karanlıkta 10 dakika inkübe edildi ve 595 nm’de absorbansı ölçüldü.



Resim 16. Bradford Protein Tayininde Elisa mikropalakaya numunelerin yüklenmesi ve 595 nm’de absorbanslarının spektrofotometrik belirlenmesi.

3.2.7. NSE, TNF- α , IL-6, GFAP Düzeylerinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi

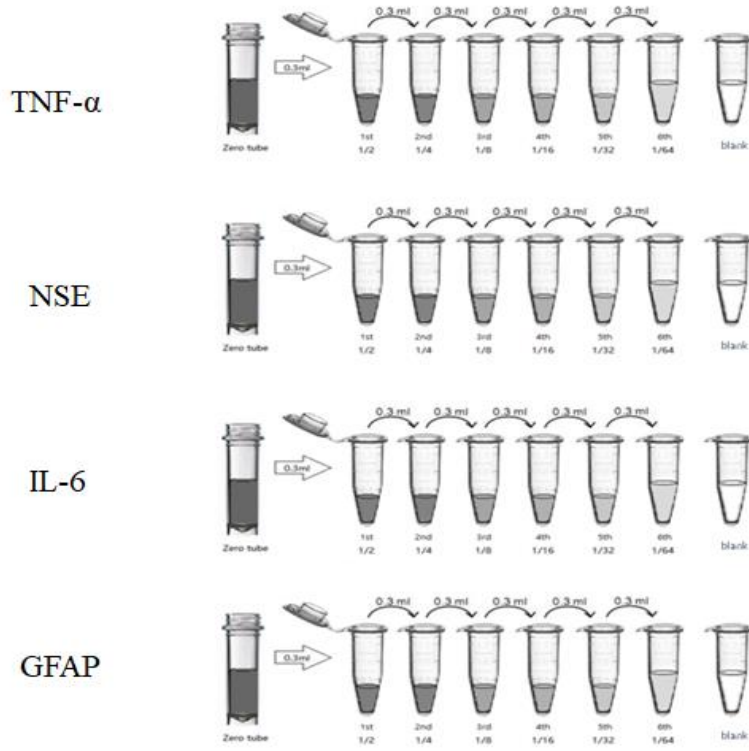
Kontrol, Asfiksi ve Tedavi gruplarından toplanan kan numuneleri santrifüjden sonra elde edilen serum örneklerinde ELISA kiti (Fine-Test) kullanıldı. (Mouse TNF- α Elisa Kit code: EM0183, Mouse IL-6 Elisa Kit code: EM0123, Mouse GFAP Elisa Kit code: EM0335, Mouse NSE Elisa Kit code: EM1242).

Reaktif Hazırlama ve Saklama

1. Yıkama Tamponu: 30 mL Konsantre yıkama tamponu, 750 mL dH₂O ile tamamlandı.

2. Standart Hazırlama: Bir Standart tüpe (sıfır tüp olarak etiketlenmiş) 1 ml Örnek Seyreltme Tamponu eklendi, tüp 10 dakika oda sıcaklığında tutuldu ve iyice karıştırıldı. 7

ependorf tüpü sırasıyla 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 ve boş olarak etiketlendi. Her tüpe 0,3 ml Örnek Seyreltme Tamponu eklendi. 1. tüpe Standart solüsyondan (sıfır tüpten) 0.3 mL eklendi ve iyice karıştırıldı. 1. tüpten 2. tüpe 0.3 mL aktarıldı ve iyice karıştırıldı. 2. tüpten 3. tüpe 0.3 mL aktarıldı ve iyice karıştırıldı. Kör kontrol için Örnek Seyreltme Tamponu kullanıldı.



Resim 17. TNF-alpha, NSE, IL-6 ve GFAP için standartların hazırlanması.

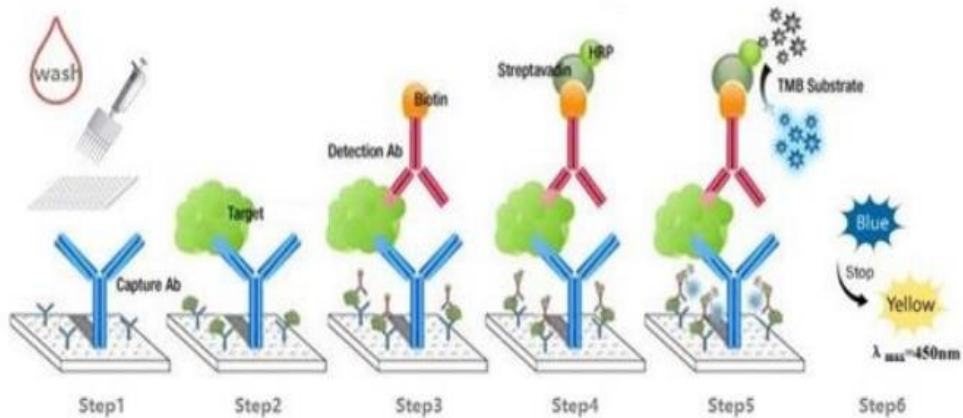
3. Biotin-etiketli Antikor Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması: Biotin saptama antikoru Antikor Seyreltme Tamponu ile 1:100 oranında seyreltili ve iyice karıştırıldı. 10 mL Antikor Seyreltme Tamponuna 100 μ l Biotin saptama antikoru ilave edildi.

4. HRP-Streptavidin Konjugat (SABC) Çalışma Çözeltisinin Hazırlanması: SABC'yi SABC Seyreltme Tamponu ile 1:100 oranında seyreltili ve iyice karıştırıldı. 10 mL SABC Seyreltme Tamponuna 100 μ l SABC eklendi.

Test Prosedürü

1. Standart ve numuneler Elisa plakalara eklenmeden önce 2 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı.
2. Hazırlanan standartlar belirlenen düzende kuyucuklara eklendi.

3. 80 mL Örnek seyreltme tamponu kuyucuklara eklendi ve üzerine 20 µl örnekler ilave edildi.
4. Plaka kapakla kapatıp, etüvde 37°C'de 90 dakika inkübe edildi.
5. 90 dakika sonrasında kapak çıkartıldı ve plaka içeriği atıldı. Plate Yıkama Tamponu ile 2 kez yıkandı.
6. Tüm kuyucuklara 100 ul Biotin-etiketli antikor çalışma solüsyonu eklendi. Plaka kapatıldı ve 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.
7. 60 dakika sonrasında kapak çıkartıldı ve plaka 3 defa Yıkama Tamponu ile yıkandı.
8. Her kuyucuğa 100 ul SABC Çalışma Solüsyonu eklendi, plaka kapatıldı ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
9. 30 dakika sonrasında plate 5 defa Yıkama Tamponu ile yıkandı. Yıkama Tamponu 1-2 dakika kuyucuklarda kalarak yıkama yapıldı.
10. Her kuyucuğa 90 ul TMB Substrat eklendi, plaka kapatıldı ve 37°C'de karanlıkta 10-20 dakika inkübe edildi. Renk değişimi (mor) 10 dakikada gerçekleşti.
11. Her kuyucuğa 50 ul Durdurma Solüsyonu eklendi. Renk hemen sarıya döndü.
12. Durdurma solüsyonunu ekledikten hemen sonra Mikroplaka Okuyucuda 450 nm'de absorbans ölçüldü.



Resim 18. TNF- α , NSE, GFAP ve IL-6 Elisa çalışma Prosedürü.

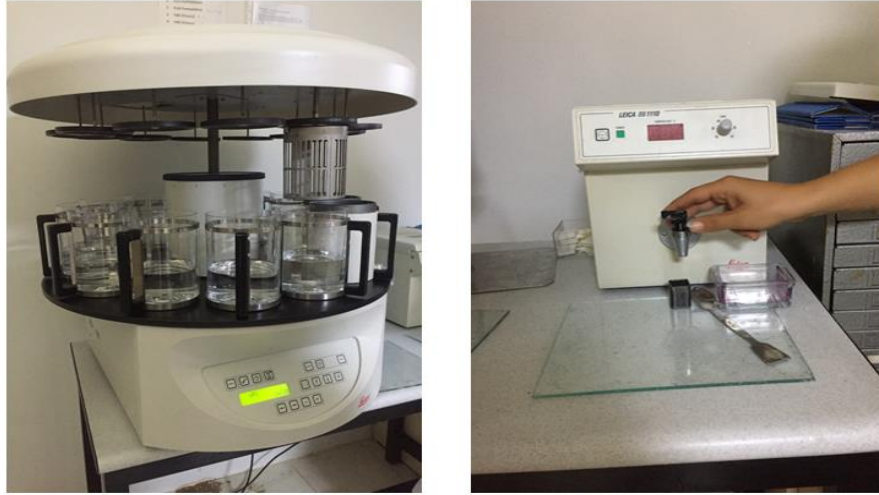
3.2.8. H&E Boyama ve TUNEL Apoptozis Deneyi

Rutin histolojik takibi yapılan dokular histopatolojik yönden değerlendirildi. TUNEL yöntemiyle dokularda apoptoz oranları belirlendi.

3.2.8.1. H&E Boyama

Kontrol, Asfiksi, MSC ve tedavi gruplarındaki hayvanların servikal dislokasyon ile sonucunda kalp, beyin, akciğer, karaciğer, böbrek dokuları histolojik olarak incelenmek üzere %4 paraformaldehit fiksatifine alınır.

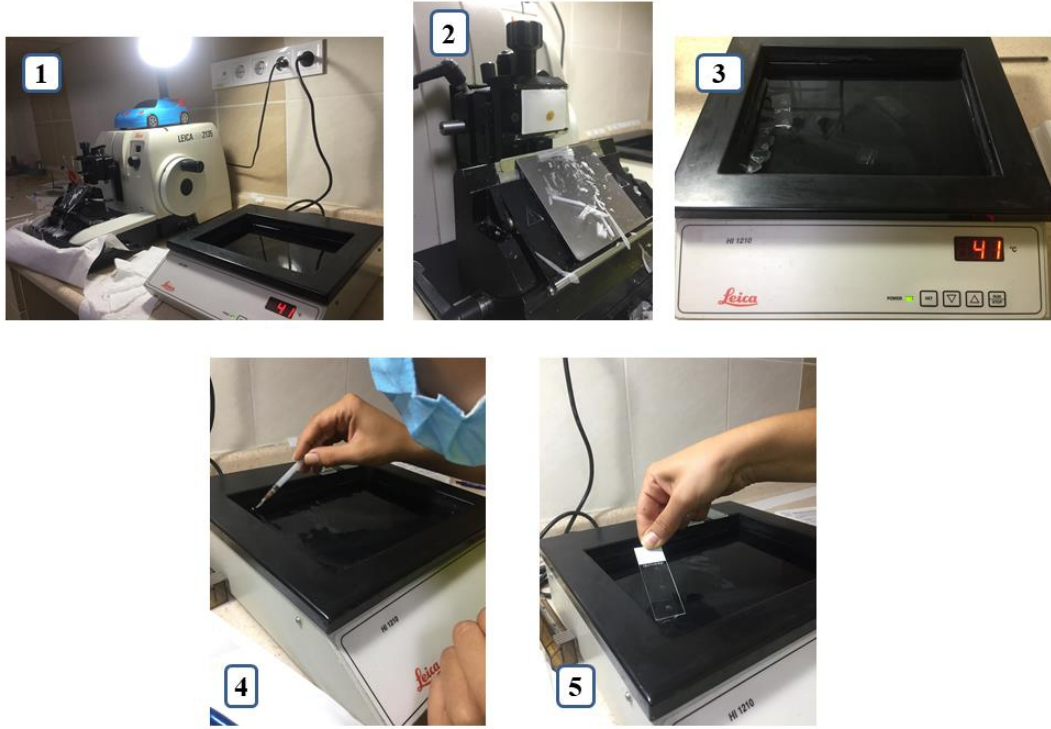
Doku takip cihaz ile doku takibi yapıldı ve dokular parafine gömüldü. Bu işlem dokuların alınması, fiksasyon, dehidrasyon, şeffaflaştırma, emdirme ve gömme basamaklarını içerir.



Resim 19. Çalışmada kullanılan Doku Takip Cihazı.

H&E Boyama protokü;

1. Parafine gömülmüş dokular kesit alınmak üzere -20 °C çıkartıldı. Mikrotom cihazında yaklaşık 5 mikronluk kesitler alındı. Kesitler sıcak su banyosuna alınarak insülin iğnesi yardımıyla ayrılarak lam üzerine alındı ve kuruması için bekletildi.



Resim 20. Sırayla H&E boyama basamakları.

2. Kuruyan lamalar bir sepete yerleştirilerek yüksek dereceli etüve alındı ve parafinin erimesi sağlandı (1 saat).



Resim 21. H&E Boyama devamı.

3. Etüvden çıkartılan lamalar boyanmak üzere hazırlandı. Çoğu hücre ve hücrelerarası madde renksizdir. Bu dokuları inceleyebilmek adına boyama işlemi yapılır. Parafinden

tamamen uzaklaştırmak için deparafinizasyon Ksilol ile yapıldı. Ksilol 1, ksilol 2 serisinden 4 dakika geçirilen lamalar alçalan alkol serilerinden 1dakika geçirildi (%100, %80, %70 etanol). Buradaki amaç dokudaki ksilolu tamamen uzaklaştırmaktır. 2 dakika distile suda bekletildikten lamalar boyamaya hazır hale geldi. Bazik bir boya olan Hematoksilen dokuyu mavi-mor renge boyadı. 5 dakika boyada bekletildikten sonra musluk suyu altında boyadan uzaklaştırıldı ve asidik bir boya olan Eozin (5 dakika) içerisine alındı. Dokuyu pembe-kırmızı renge boyayan Eozindeki lamalar sırayla %70, %80, %100 alkol serilerinden geçirildikten sonra Ksilol 1, ksilol 2 de bekletildi.



Resim 22. Soldan sağa dokuların hematoksilen ve eozin boya ile boyanma basamakları.

4. Boyama işleminden sonra lamalar dokuya zarar vermeyecek şekilde peçeteye kurulandı. Lamel ile kapatılması için dokunun üzerine dokuyu kaplayacak şekilde entellan damlatıldı ve 45 derecelik açı ile lameller kapatıldı. Lamelin kaymaması için üzerine demir halka civatalar konuldu. Bir gün boyunca bekletildi ve mikroskopta incelendi.

3.2.8.2. TUNEL Apoptozis Deneyi

Beyin kontrol, beyin asfiksi, beyin tedavi grupları H&E boyamadan sonra TUNEL deneyi için hazır hale getirildi. TUNEL; terminal "deoksiniukleotidil-transferaz-aracılı deoksiüridin trifosfat nick-end" işaretleme yöntemidir. DNA kırıklarının *in situ* olarak belirlenmesi prensibine dayanır. TUNEL için gerekli kimyasallar taze hazırlandı. 50 mM

Tris-HCl tamponu (pH=7.5), 0,1 M Sitrat tamponu (pH=6), %3 BSA ve %20 Goat Serum içeren 0,1 M Tris-HCl (pH=7) hazırlandı.

Protokol:

1. Slaytlar 15 dakika PBS solüsyonu içerisinde bekletildi ve dikkatlice döküldü.
2. Yarım saat 15-25 °C’de immersiyon solüsyonu içerisinde bekletildi. (%3 BSA ve %20 Goat Serum içeren 0,1 M Tris-HCl (pH=7))
3. Tekrar 15 dakika PBS ile slaytlar yıkandı.
4. Dokuların çevresi çizilerek, Roche In Situ Cell Death Detection kit ve enzim solüsyon kullanıldı.
5. Label solüsyonundan 450 µl alınarak, 50 µl enzim solüsyonuyla karıştırıldı ve slaytların üzerine damlatıldı. Label solüsyonunda kalan 50 µl Negatif kontrol için kullanıldı.
6. 37 °C’de 1 saat etüvde bekletildi. Sonrasında PBS içerisinde 3 defa slaytlar yıkandı.
7. Karanlıkta inkübe edildi ve saklandı.

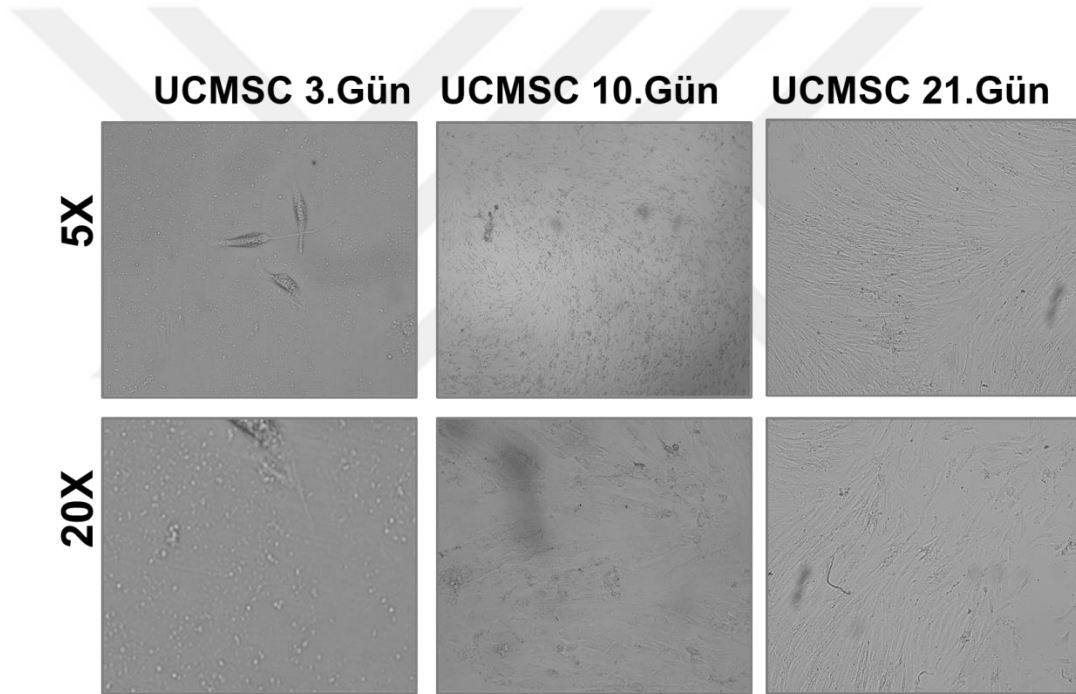
3.2.9. İstatistiksel Değerlendirme

Deneyler sonucunda elde edilen veriler varyans analizleri ile iki grup arasındaki karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi (Bonferroni düzeltmesi ile) ve uygun olduğunda Student-t testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde tanımlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. UCMSC'lerin izolasyon ve görüntüleri

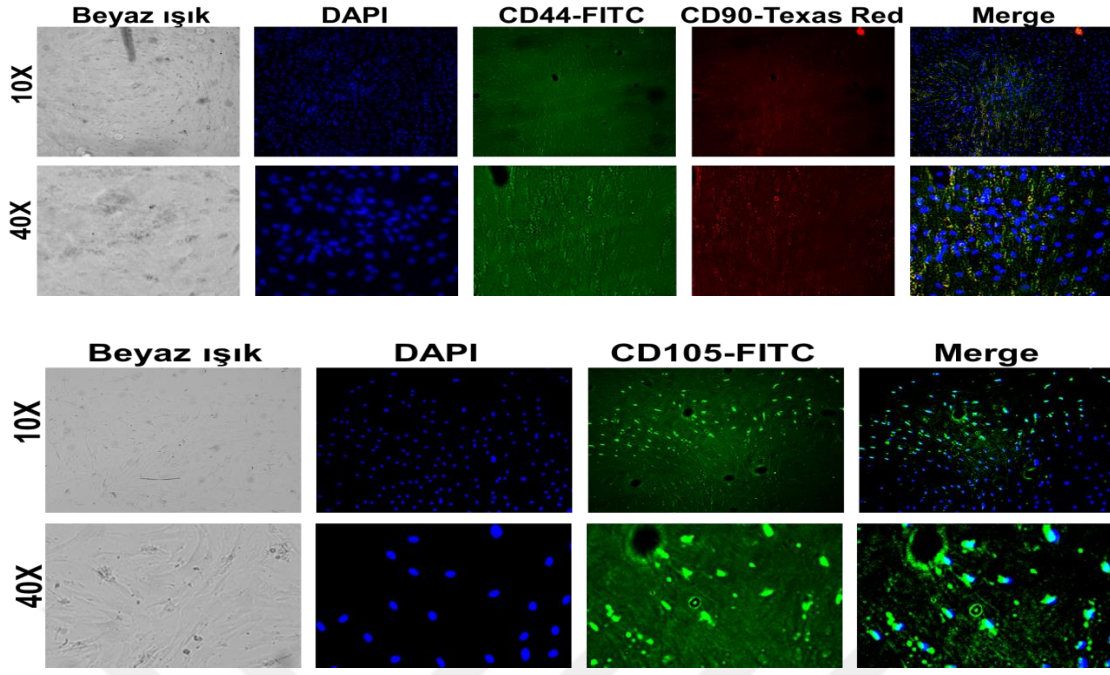
Çalışmamızda UC-MSK izolasyonu detaylı olarak gereç ve yöntemler kısmında anlatıldı. Enzimatik yöntemi ile izole edilen UC-MSK hücreleri 3. gün, 10.gün ve 21. gün büyüme ve morfolojileri kontrol edildi. Fibroblast benzeri morfolojik yapıda olduğu ve iş şeklinde kolonileşerek büyüme sergiledikleri görülmüştür (Şekil 24).



Şekil 24. Enzimatik yöntem ile elde edilen UC-MSK'lerin ışık mikroskopunda 5X ve 20X görüntüleri.

4.2. UC-MSK'lerin Karakterizasyonu

İzole edilen kök hücrelerin, mezenkimal kök hücre belirteçleri olan CD44, CD90 ve CD105 antikorlarını eksprese ettikleri immunfloresans yöntem ile saptandı.

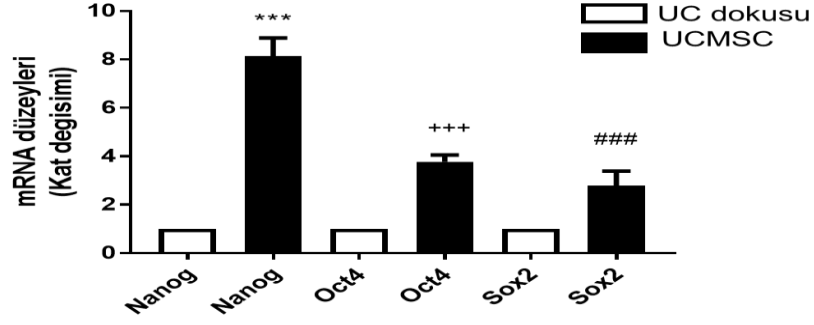


Şekil 25. CD44-FITC, CD90-Texas Red, CD105-FITC ile işaretli MSC hücrelerinin 10X ve 40X görüntüleri.

UCMSC de izole edilen hücrelerin yüzey belirteçlerinde temel MSC lerde bulunan CD44, CD90 ve CD105 pozitifliği gösterdiği boyamalarla tespit edilmiştir.

4.3. UCMSC Hücrelerinin Oct-4, NANOG ve Sox-2 Düzeylerinin qPCR Sonuçları

UC dokusu ve UC dokusundan izole edilen UCMSC hücrelerinde kök hücre faktörleri olan Oct-4, NANOG, Sox-2 düzeyleri qPCR yöntemiyle analiz edildi ve pluripotensi düzeyleri mRNA düzeylerinin karşılaştırılması ile belirlendi.

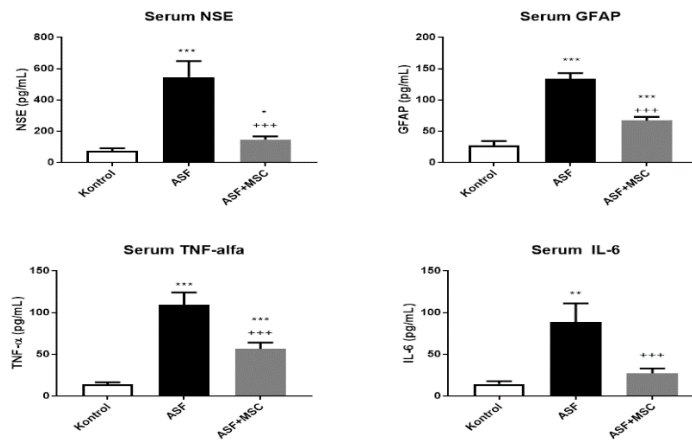


Şekil 26. UC dokusu ve UCMSC’de kök hücre faktörleri mRNA düzeyleri (*,+,# UC dokusuna göre kıyaslama)

NANOG mRNA düzeyleri UCMSC grubunda, UC dokusuna göre anlamlı olarak daha fazla ekspresyon olduğunu göstermiştir. Oct-4 mRNA düzeyleri UCMSC grubunda, UC dokusuna göre anlamlı olarak daha fazla ekspresyon olduğunu göstermiştir. Sox-2 mRNA düzeyleri UCMSC grubu, UC dokusuna göre anlamlı olarak daha fazla ekspresyon olduğunu göstermiştir.

4.4. NSE, TNF- α , IL-6, GFAP Düzeylerinin Saptanması

Asfiksi teşhis ve tedavisi konusunda izlenen temel biyobelirteçlerden TNF- α , IL-6, GFAP ve NSE serum düzeyleri ELISA kit yardımıyla bakıldı.



Şekil 27. Serum NSE, GFAP, TNF-alpha, IL-6 düzeyleri (* kontrol grubuna göre kıyaslama, + ASF grubuna göre kıyaslama)

Enolaz 2 veya gama-enolaz olarak da bilinen NSE, glikolitik yolda bulunan bir enzimdir. Enolazlar, 2-fosfoglisaratın fosfoenolpiruvata dönüşümünü katalize eder. NSE izoenzimi, memelilerin olgun nöronlarında 78 kD homodimer olarak spesifik olarak eksprese edilir. Beyin omurilik sıvısında NSE tespiti, travmatik beyin hasarı, felç ve bunama için bir belirteç olarak kullanılabilir. Çalışmamızda ASF grubunda kontrole kıyasla NSE düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu belirlendi. Tedavi grubunda (ASF+MSC) NSE düzeylerinin ASF grubuna göre anlamlı bir şekilde daha düşük olduğu saptandı. Tedavi grubu, kontrol grubuna göre NSE artmış ve tedaviye istatistiksel olarak anlamlı miktarda yanıt vermiştir.

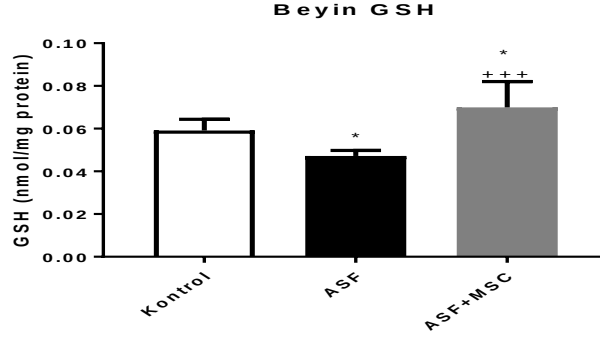
Glial Fibriller Asidik Protein (GFAP), astrositlerin temel ara filament proteinidir. Nörodejeneratif hastalıklarda görülen astrogliozisi saptamada önemli bir biyobelirteçtir. Çalışmamızda ASF grubu, kontrol grubuna göre yüksek miktarda astrogliozis saptamış olup anlamlı bulundu. Tedavi grubunda (ASF+MSC) ise GFAP düzeyleri kontrol ve ASF grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu analiz edilmiştir. Bu ASF grubunun MSC ile muamelesinin astrogliozisi azalttığını düşündürmektedir.

Perinatal Asfikside inflamasyon belirteci olan TNF- α ; tedavi grubu (ASF+MSC), ASF ve kontrol grubuna kıyasla yüksek düzeyde olduğu görülmüş ve bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ASF grubu, kontrol grubuna kıyasla TNF- α düzeyi artmış ve istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu ASF grubunun kontrole kıyasla yüksek düzeyde bir inflamasyon oluştuğunu ve MSC enjeksiyonundan sonra tedaviye yanıt verdiğini göstermektedir.

Perinatal Asfikside bir diğer inflamasyon belirteci olan IL-6 ise, ASF grubu, kontrole kıyasla IL- düzeyi yükselmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tedavi grubu (ASF+MSC), ASF grubuna kıyasla IL-6 düzeyleri düştü ve anlamlı bulundu.

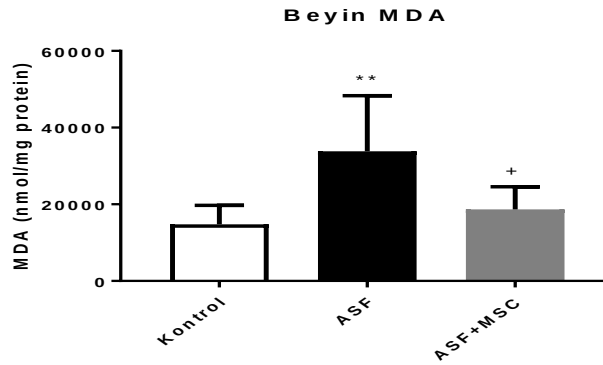
4.5. Dokularda Oksidan/Antioksidan Parametrelerin Saptanması

Dokularda oksidatif stresin bir göstergesi olan MDA ve oksidatif stres sürecinde rol alan MPO, GSH, SOD düzeyleri beyin, akciğer, kalp, böbrek ve karaciğerde analiz edildi.



Şekil 28. Çalışma gruplara ait beyin dokularında GSH düzeyleri (* kontrol grubuna göre kıyaslama, + ASF grubuna göre kıyaslama)

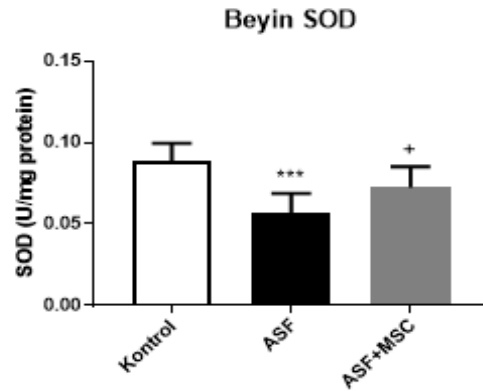
Antioksidan glutatyon (GSH), birçok dokuda olduğu gibi beyin hücrelerinde de reaktif oksijen türlerinin hücresel detoksifikasyonu için gereklidir. Beyindeki bozulmuş bir GSH sistemi, nörolojik hastalıklarda meydana gelen oksidatif stres ile bağlantılıdır. Çalışmamızda ASF grubunun Glutatyon miktarı, kontrol grubuna göre bir miktar azalmıştır ve istatistiksel olarak anlamlıdır. GSH düzeyleri tedavi grubunda (ASF+MSC) ASF grubuna kıyasla yüksek olup anlamlı olarak değiştiği tespit edilmiştir. Ayrıca GSH seviyelerinin ASF+MSC grubunda kontrol grubuna kıyasla da anlamlı derecede daha yüksek olduğu belirlenmiştir (ŞEKİL 28).



Şekil 29. Çalışma gruplara ait beyin dokularında MDA düzeyleri (* kontrol grubuna göre kıyaslama, + ASF grubuna göre kıyaslama)

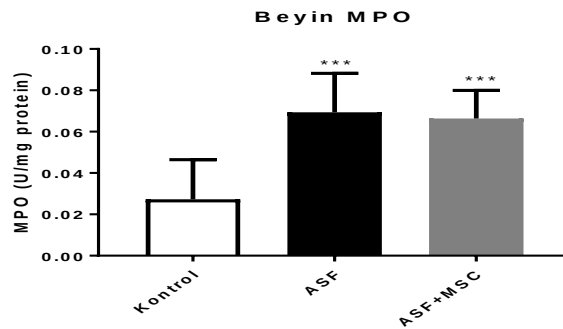
Oksidatif stres biyobelirteci olan MDA, lipid peroksidasyonunun son ürünüdür. Membrandaki lipidlerin oksidatif hasarını gösterir. Çalışmamızda ASF grubunda, kontrole kıyasla MDA düzeyleri anlamlı olarak artmaktadır. MDA düzeyleri tedavi grubunda

(ASF+MSC), ASF grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır.



Şekil 30. Çalışma gruplara ait beyin dokularında SOD düzeyleri (* kontrol grubuna göre kıyaslama, + ASF grubuna göre kıyaslama)

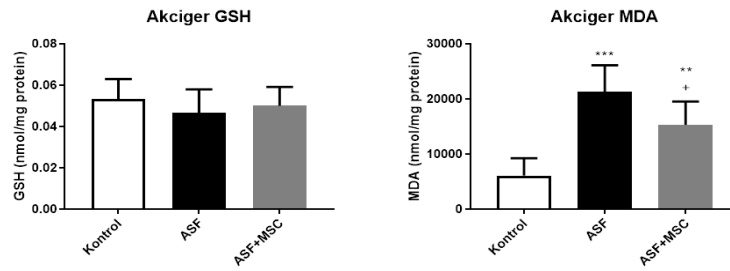
Endojen antioksidan olarak bilinen süperoksit dismutaz enzimi, süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Fizyolojik fonksiyonu, oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Çalışmamızda SOD aktivite düzeyleri ASF grubunda kontrole kıyasla anlamlı olarak daha düşük olduğu saptanmıştır. SOD aktivite düzeylerinin tedavi grubunda (ASF+MSC), ASF grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek düzeyde olduğu saptanmıştır.



Şekil 31. Çalışma gruplarına ait beyin dokularında MPO düzeyleri (* kontrol grubuna göre kıyaslama, + ASF grubuna göre kıyaslama)

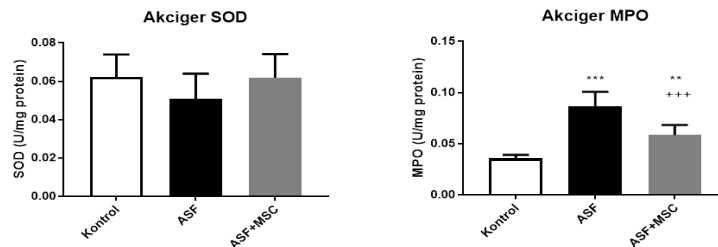
Myeloperoksidaz, nötrofillerin granüllerinde bulunan bir enzimdir. Patojen

mikroorganizmalara karşı önemli bir savunma sistemi kabul edilmekte ve dokuda nötrofil filtrasyonunun, dolayısıyla inflamasyonun en önemli göstergelerinden biridir. Çalışmamızda beyin dokusunda MPO aktivite düzeylerinin ASF grubunda kontrole kıyasla anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu, ASF grubunda artan oksidatif strese işaret edebilir. Tedavi grubunda (ASF+MSC) MPO aktivite düzeyleri kontrole kıyasla anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirlenirken, ASF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.



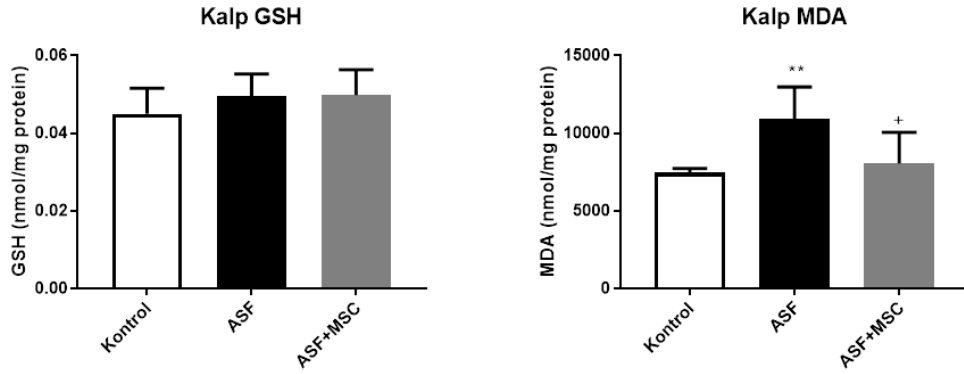
Şekil 32. Çalışma gruplarına ait akciğer dokusunda GSH ve MDA düzeyleri (* kontrol grubuna göre kıyaslama, + ASF grubuna göre kıyaslama)

Gruplara ait akciğer dokularında GSH düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. MDA düzeyleri akciğer dokusunda ASF grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak daha yüksek tespit edilmiştir. Tedavi grubunda (ASF+MSC) MDA düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tedavi grubunda (ASF+MSC), ASF grubuna göre akciğer MDA seviyeleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur.



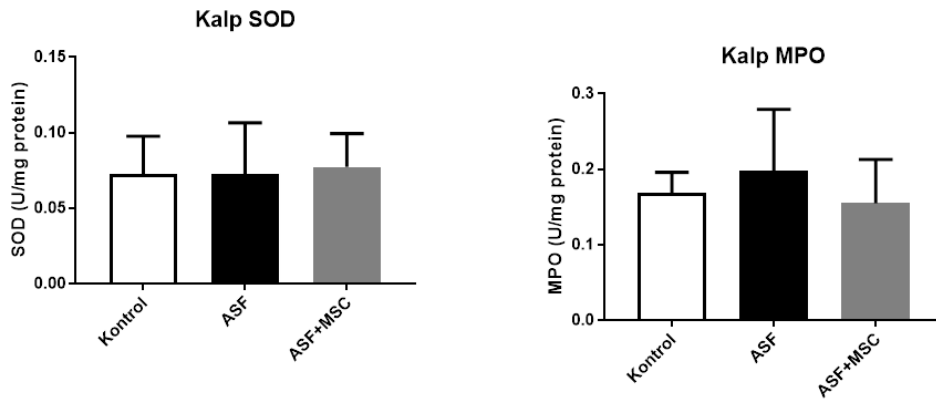
Şekil 33. Çalışma gruplarına ait akciğer dokusunda SOD ve MPO düzeyleri (* kontrol grubuna göre kıyaslama, + ASF grubuna göre kıyaslama)

Akciğer SOD düzeyi gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. ASF grubunda MPO düzeyi, kontrol grubuna kıyasla yükselmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tedavi grubunda (ASF+MSC) akciğer MPO düzeyleri ASF grubuna göre düşüş göstermiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, kontrol grubuna kıyasla artmış ve anlamlıdır.



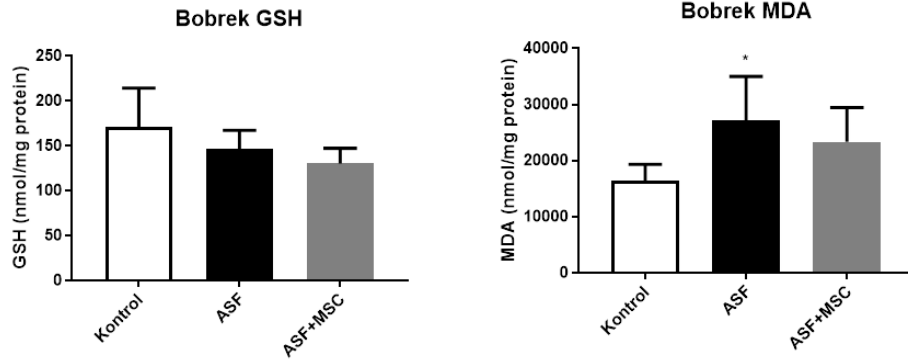
Şekil 34. Çalışma gruplarına ait kalp dokusunda GSH ve MDA düzeyleri (* kontrol grubuna göre kıyaslama, + ASF grubuna göre kıyaslama)

Kalp GSH, ölçümünde kontrol, ASF ve Tedavi (ASF+MSC) gruplarında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. ASF grubunda MDA düzeyi, kontrol grubuna kıyasla yükselmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tedavi grubunda (ASF+MSC) MDA düzeyi ASF grubuna kıyasla azalmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



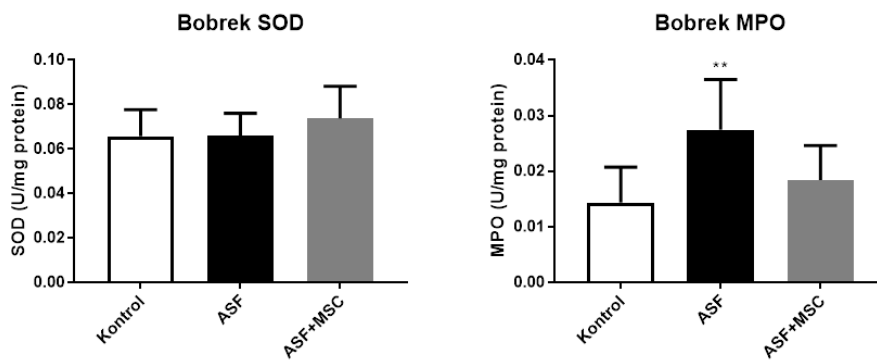
Şekil 35. Çalışma gruplarına ait kalp dokusunda SOD ve MPO düzeyleri (* kontrol grubuna göre kıyaslama, + ASF grubuna göre kıyaslama)

Kalp SOD ve MPO düzeylerinde kontrol, ASF ve tedavi (ASF+MSC) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir.



Şekil 36. Çalışma gruplarına ait böbrek dokusunda GSH ve MDA ölçümü (* kontrol grubuna göre kıyaslama, + ASF grubuna göre kıyaslama)

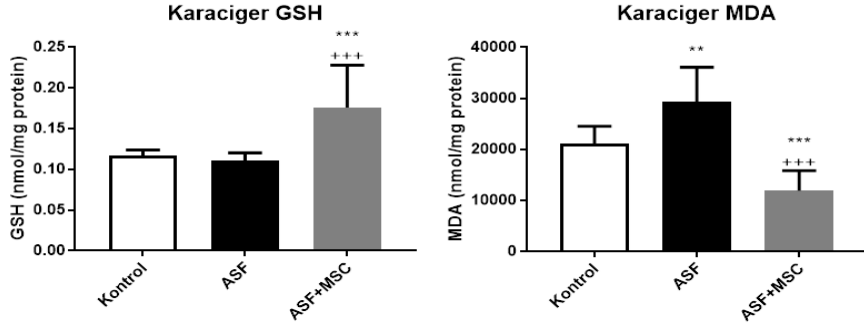
Böbrek GSH düzeyi gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. MDA düzeyi ASF grubunda, kontrol grubuna kıyasla artmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Fakat tedavi grubu (ASF+MSC), ASF ve kontrol grubuna kıyasla böbrek MDA düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir.



Şekil 37. Çalışma gruplarına ait böbrek dokusunda SOD ve MPO ölçümü (* kontrol grubuna göre kıyaslama, + ASF grubuna göre kıyaslama)

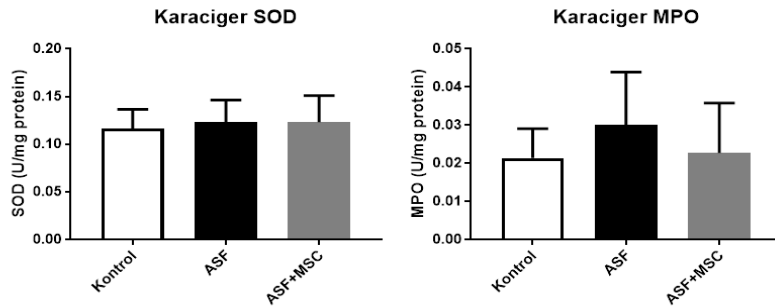
Böbrek SOD düzeyi gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. ASF grubunda böbrek MPO düzeyi, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak

anlamli bir artiş göstermiştir. Fakat Tedavi grubu (ASF+MSC), ASF ve Kontrol grubuna kıyasla böbrek MPO düzeyi istatistiksel olarak anlamli bir farklılık bulunmamıştır.



Şekil 38. Çalışma gruplarına ait karaciğer dokusunda GSH, MDA düzeyleri (* kontrol grubuna göre kıyaslama, + ASF grubuna göre kıyaslama)

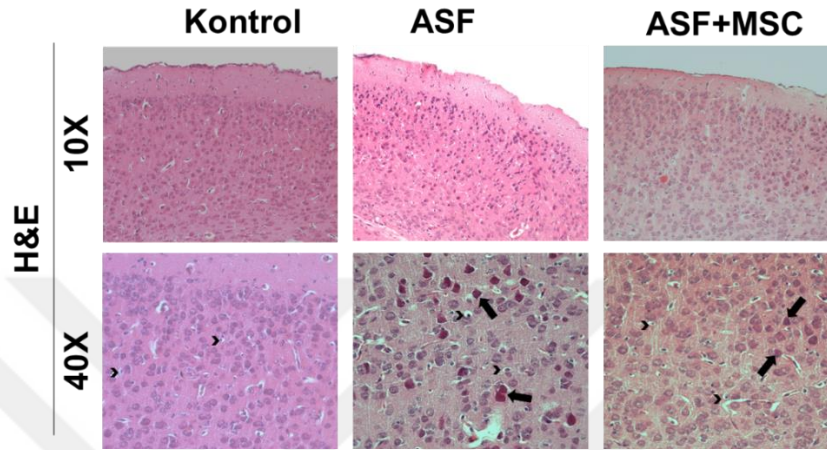
Karaciğer GSH düzeyi ASF grubunda kontrol grubuna göre değişiklik göstermemiştir. Ancak Tedavi grubunda (ASF+MSC) hem ASF hemde kontrol grubuna göre karaciğer GSH düzeyinin yükseldiği görülmüş ve istatistiksel olarak anlamli bulunmuştur. ASF grubunda karaciğer MDA düzeyi kontrol grubuna kıyasla artmış ve istatistiksel olarak anlamli bulunmuştur. Tedavi grubu (ASF+MSC), hem kontrol hem de ASF grubuna göre MDA düzeyleri azalmış ve istatistiksel olarak anlamli bulunmuştur.



Şekil 39. Çalışma gruplarına ait karaciğer dokusunda SOD ve MPO düzeyi (* kontrol grubuna göre kıyaslama, + ASF grubuna göre kıyaslama)

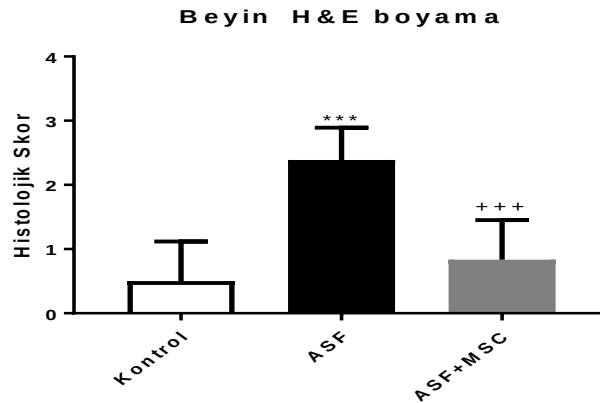
Karaciğer SOD ve MPO düzeyi gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

4.6. Beyin Dokusunda H&E Boyama Sonuçları



Şekil 40. Beyin korteks anterior bölgesinin 10X, 40X H&E boyama görüntüleri

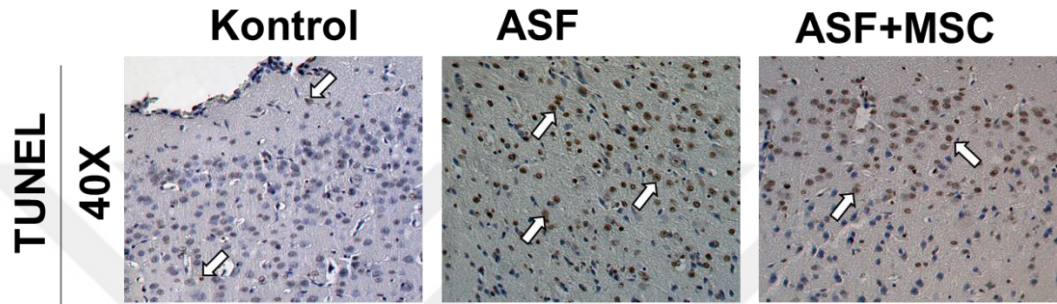
Çalışmamızda yapmış olduğumuz Hematoksilen-eozin boyama sonucu kontrol grubunda beyin korteksi dokularının normal yapıda olduğu görülmüştür. %4 O₂, %20 CO₂ ve %76 N₂ özel gazla hasar verilen ASF grubunda ise histomorfolojik değişimler, gliosis ve hücre sınırlarında kayıplar, piknotik hücreler gözlemlenmiştir. Tedavi grubu olan (ASF+MSC) fare beyin dokularında ise mezenkimal kök hücre enjeksiyonu nöronal hücrelerin miktarını etkili bir şekilde arttırdığı gözlemlendi (Şekil 40).



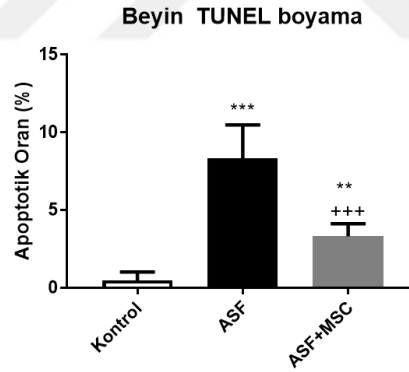
Şekil 41. Gruplar arası Histolojik Skor (* kontrol grubuna göre kıyaslama, + ASF grubuna göre kıyaslama)

%4 O₂, %20 CO₂ ve %76 N₂ özel gazla hasar verilen ASF grubu, kontrol grubuna kıyasla hipoksik-iskemik beyin hasarı skoru yükselmiş olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tedavi grubu (ASF+MSC), ASF grubuna göre beyin hasarı skoru azalmıştır ve anlamlı bulunmuştur.

4.7. Beyin Dokusunda TUNEL Boyama Sonuçları



Şekil 42. Beyin dokularının TUNEL boyama ile hücre görüntüsü



Şekil 43. Gruplar arası TUNEL boyaması apoptotik oran (* kontrol grubuna göre kıyaslama, + ASF grubuna göre kıyaslama)

TUNEL boyaması, perinatal asfiksi modeli (ASF) oluşturulan farelerde apoptoz oranı, kontrole kıyasla artış göstermiştir ve istatistiksel olarak anlamlıdır. Tedavi grubu (ASF+MSC) apoptotik oranı, ASF grubuna kıyasla düşüş göstermekte anlamlıdır. ASF+MSC grubu kontrol grubuna kıyasla apoptotik oran yükselmiş ve anlamlı olduğu saptanmıştır.

5. TARTIŞMA

Çeşitli dokulardan izole edilen mezenkimal kök hücrelerin klinik çalışmalarda etkinliklerinin belirlenmesinin birçok bilimsel çalışmada yer aldığı ve bu konuda yapılan çalışmaların sayısının hızla arttığı görülmektedir. Çok sayıda çalışma olmasına rağmen şuana kadar olan klinik çalışmalarda bunların izolasyonu ve karakterizasyonu için standartlaştırılmamış yöntemlerin, MSC tabanlı hücresel terapiler için tutarsız sonuçlarında oluşabileceğini göstermiştir (Galipeau, J. et al. 2016). Umbilikal kord dokusu mezenkimal kök hücre açısından zengin bir kaynak olup kord içerisinde bulunan wharton jeli kaynaklı mezenkimal köklerin *in vitro* olarak kolayca elde edilir, izole edilir ve genişletilir olmasından dolayı klinik çalışmalar için son yıllarda öne çıkmaktadır (Devito et al., 2019). MSC hücre izolasyonunda literatürde enzimatik ve eksplant olmak üzere iki yöntem mevcuttur. Enzimatik yöntemde, kollajenaz/hiyalüronidaz/tripsin (CHT), kollajenaz/tripsin (CT), tripsin gibi enzim ve enzim kombinasyonları kullanarak izolasyon yapılmaktadır (Salehinejad et al., 2012). Kültür ortamı, kullanılan kimyasallar ve miktarları, antifungal gibi solüsyonlar kök hücre izolasyonunda önemli kriterlerdir. Tsagieas et al., çalışmalarında göbek kordonu (UC) mezenkimal kök hücre izolasyonunu enzimatik yöntemle yapmışlardır ve verimli bir kök hücre yoğunluğu elde etmişlerdir. Bu yöntemde sterilizasyonu yapılan göbek kordonunun tüm damarları çıkartılmış ve sonrasında sırasıyla 2.7 mg/mL kollajenaz tip 1, 0.7 mg/mL hiyalüronidaz serilerinden geçirildikten sonra 3 saat 37°C'de inkübe etmişler, son seri %2.5 Tripsinde 30 dakika bekletmişlerdir. Bu yöntemle verimli bir kök hücre elde ettiklerini ve eksplant yönteme göre daha iyi sonuç verdiğini belirtmişlerdir (Tsagias et al., 2011). Yine başka bir çalışmada, enzimatik izolasyonda küçük parçalara ayrılmış ve damarları çıkartılmış göbek kordonu %0.2 kollajenez ve %0.1 hiyalüronidaz kombinasyonu ile 16 saat gece boyunca bekletilmiştir. Daha sonra %0.25 Tripsin-EDTA ile 37°C'de 30 dakika bekletilmiş ve 75 cm² kültür kaplarında α -minimum esansiyel ortam, 2 mmol/L l-glutamin, 100 U penisilin/1000 U streptomisin, %15 FBS ile kültürlenmiştir (Chatzistamatiou et al., 2014). Biz çalışmamızda kollajenez ile enzimatik yöntemi kullanarak umbilikal korddan mezenkimal kök hücre izolasyonunu kullandık ve izolasyondan sonra 20. günde yoğun miktarda sağlıklı MSC hücreleri elde ettik. MSC hücreleri morfolojik olarak fibroblastlara benzemekte ve iğsi yapıda gruplaşarak büyümekte olup hücrelerimizin 3.gün, 10.gün ve 20. günde yapılan kontrollerde bu yapıyı koruyarak

çoğalabildiklerini gözlemledik. Mezenkimal kök hücre belirteçleri izole edilen hücrelerin saflığında ve tanımlanmasında önemli olup genellikle CD90, CD44 ve CD105 yüzey belirteçleri ile tayin edilir (Ranjbaran et al., 2017). Bu çalışmada ise, immunofloresans etiketleme ile izole ettiğimiz hücrelerin MSC yüzey belirteçlerinden CD44, CD90 ve CD105 için pozitif olduğunu tespit ettik.

Perinatal asfiksi, çoklu organ yetmezliği ile ilerleyici hipoksemi, hiperkapni ve metabolik asidoza yol açan bir durum olarak yenidoğanın doğumdan sonra yeterli solunumu başlatamaması ve sürdürememesi olarak tanımlanır. Amerikan Kadın Hastalıkları ve Doğum Uzmanları Koleji ve Amerikan Pediatri Akademisi'ne göre, göbek kordonu arteriyel pH'ı < 7 ise, 5 dakikadan uzun süre 0-3 Apgar skoru, neonatal nörolojik belirtiler (nöbetler, koma veya hipotoni) ve multisistem organ disfonksiyonu (kardiyovasküler, gastrointestinal, hematolojik, pulmoner veya renal sistem) görülmesi perinatal asfiksinin tanımlayıcı belirteçleridir (Workineh et al., 2020).

Küresel olarak, her 1000 term yenidoğandan 2 ila 10'u perinatal asfiksi ile karşı karşıyadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) raporu, doğum asfiksisi nedeniyle yılda 4 milyon yenidoğan ölümünün meydana geldiğini belirtmektedir. Çoğu gelişmiş ülkede doğumda asfiksi insidansı, yeni doğan ölümlerinin %0,1'inden azını oluşturmaktadır. Ancak, gelişmekte olan ülkelerde, 4.6/1000 ila 7-26/1000 canlı doğum arasında bu durum değişmektedir (Bhutta, 2013).

Perinatal Asfiksi ile ilgili deneysel model oluşturmada farklı yöntemler kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada wistar sıçan yavrularında hipoksik-iskemik ensefalopati (HIE) hastalık modeli oluşturmak için doğumla birlikte 45 dakika boyunca %4 O₂ ve %20 CO₂ gazıyla muamele edilmiştir. Aynı çalışmada aralıklı asfiksiyi taklit etmek için de 5 dakikalık aralıklarla O₂ seviyesinin %5-%9 arasında değiştirilerek model oluşturulmuştur (Summanen et al., 2018). Yine başka bir çalışma gebe kuzular kullanılmış ve göbek kordonu tıkanıklığı ile asfiksi modeli geliştirilmiştir. Çalışmada 132 günlük gebelikte göbek kordonu tıkanıklığı oluşturularak kısa bir asfiksiyel hasarın kuzunun hayatta kalması ve davranışı üzerine etkileri araştırılmıştır (Castillo-Melendez et al., 2013). Biz bu tez çalışmasında 6-8 haftalık gebe farelerin sezaryan ile alınan yenidoğan farelerine %4 O₂, %20 CO₂ ve %76 N₂ içeren özel gaz karışımı ile hastalık modeli oluşturulmuştur.

Perinatal asfiksi tedavi yaklaşımı olarak birçok yöntem denenmekte olup orta dereceli hipotermi (33.5°C) şu anda belirlenmiş tek standart tedavisidir. Orta şiddetli HİE term ve terme yakın bebeklerde hipotermi'nin ölüm ve sakatlığı azalttığını ancak hipotermi tedavisinin birçok bebekte etkisiz olduğu da gösterilmiştir (Leite et al., 2020). Bir başka çalışmada orta dereceli hipotermi tedavisinin etkisini güçlendirmek için nöropektanlar araştırılmış ve eritropoietin (EPO) kullanılmıştır. Yenidoğan perinatal asfiksi hayvan modelinde hipotermi ile birlikte EPO tedavisi daha az beyin felcine yol açtığı ve yapılan Faz II çalışmalarında bu kombine tedavinin umut verici olduğu gösterilmiştir (Oorschot et al., 2020).

Perinatal asfikside temel biyobelirteçler hem teşhiste hem de tedavinin izlenmesinde önem taşımaktadır. Bu nedenle asfiksinin belirlenmesi için birçok biyobelirteç çalışmasında devam etmektedir. Nörona özgü enolazın (NSE) hipoksik-iskemik ensefalopati geliştirme riski olan hastalarda tanımlandığı bildirilmektedir. NSE, glikolitik enzim enolazın bir izoenzimidir ve nöronal hücre gövdelerinde, aksonlarda ve nöroendokrin kökenli hücrelerde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Son on yılda, asfiksi sonrası beyin hasarının biyokimyasal göstergeleri araştırılmıştır. Serum proteini S-100 β ve CK-BB aktivitesinin yükselmesinin, doğum asfiksisinden sonra HİE'nin güvenilir göstergeleri olduğunu göstermiştir. Protein S-100, çeşitli hücre tiplerinin sitozolünün ana bileşenini oluşturan dimerik asidik kalsiyum bağlayıcı bir proteindir. Protein S-100B ($\beta\beta$ alt birimleri) ve S-100A1 ($\alpha\beta$) ağırlıklı olarak astrositlerde ve Schwann hücrelerinde bulunur. Glikolitik enzim enolazın dimerik bir izoenzimi olan NSE ise nöronların sitoplazmasında ve nöroendokrin farklılaşması olan hücrelerde bulunur (Nagdyman et al., 2003). Eksitotoksiste, hücre içi kalsiyum, serbest radikaller, nitrik oksit (NO), sitokinler ve apoptoz gibi birbiriyle ilişkili birkaç patofizyolojik mekanizma HİE'yi açıklayabilir. Mikroglia, beyindeki yerleşik bağışıklık hücreleridir ve mikrogliyal aktivasyon, merkezi sinir sisteminin (CNS) inme de dahil olmak üzere çeşitli uyaranlara karşı enflamatuvar tepkilerinde ilk adımdır. Ayrıca, HİE tarafından indüklenen mikrogliyal hücreler, CNS'nin genel yapısına zarar veren proinflamatuvar sitokinler üretir. Asfiksi bebeklerin beyin omurilik sıvılarında (BOS) yüksek konsantrasyonlarda IL-6, IL-8 bulunur ve beyin hasarının boyutu bu sitokinlerin konsantrasyonlarıyla doğrudan ilişkilidir. Nörona özgü enolaz (NSE) ve S-100B gibi diğer biyokimyasal belirteçler, özellikle travmatik beyin hasarı gibi akut beyin hasarı olan bozukluklarda kanda yüksek seviyelerde mevcut olabilir (Romner et al., 2000). GFAP, merkezi sinir sisteminin astroglia'sında bulunan bir hücre iskeleti ara filament proteini ve

farklılaşmış astrositlerin spesifik bir belirtecidir. Serum GFAP beyin dokusuna özgüdür ve rutin olarak kanda salgılanmaz, ancak astrosit ölümünden sonra salınır. Bu onu yenidoğanlarda beyin hasarı için ideal bir kan belirteci yapar. Glial fibriler asidik protein, akut beyin hasarı ve ölümü ile önemli ölçüde ilişkilidir. Beyin hasarı biyobelirteçleri, sonuçları iyileştirmek ve yeni tedavileri kıyaslamak için yardımcı olabilir (Bembea et al., 2011).

Bir günlük domuz yavrularında hafif veya şiddetli hipoksik model oluşturulan bir çalışmada hipoksiye maruz kalan domuz yavrularının serumunda çeşitli zamanlarda NSE ve S100B ölçülmüştür. NSE ve S100B'nin sırasıyla 24 ve 48 saat sonra önemli ölçüde artmış ve histolojik sonuç ile korelasyon göstermiştir. NSE ve S100B, hipoksik/iskemik reperfüzyon hasarından sonraki izlenmesinin yararlı olabileceği öngörülmüştür (Kecskes et al., 2005). Asfiksi teşhisi konulan 32 term yenidoğan bebeklerde yapılan bir çalışmada ise bebekler hafif, orta ve şiddetli HİE olarak sınıflandırılmış ve inflamatuvar sitokinlerden TNF- α , IL-1 β ve IL-6 düzeyleri ölçülmüştür. Yapılan çalışmada elde edilen sonuçlarda HİE yenidoğanlarda serum sitokin düzeylerini değerleri, doğumda sağlıklı yenidoğanlara kıyasla IL1 β , IL-6 ve TNF- α mRNA ve serum düzeylerinde önemli artışlar ortaya çıkmıştır. Ek olarak, HİE yenidoğanlarda S100 mRNA ve serum seviyeleri, sağlıklı kontrollere kıyasla önemli ölçüde arttığı görülmüştür (Chaparro-Huerta et al., 2017). Göbek kordon kanında ölçüldüğünde GFAP'ın ensefalopati derecesini ve nörolojik sonucu tahmin etme yeteneğini inceleyen bir çalışmada ise perinatal asfiksi (PA ve HİE'den şüphelenilen bebekler çalışmaya alınmış ve toplamda 169 bebek (83 kontrol, 56 PA, 30 HİE) çalışmaya dahil edilmiştir. GFAP'nin ekspresyon seviyeleri ELISA ile ölçülmüş fakat GFAP seviyeleri, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında ve belirli HİE derecelerine bölündüğünde, vaka bebeklerinin göbek kordon kanında PA/HİE oranında değişmediği görülmüştür (Looney et al., 2015). Bu çalışmada, kontrol, asfiksi (ASF) ve mezenkimal kök hücreyle tedavi edilen (ASF+MSC) gruplarından toplanan kan ile, asfiksi teşhis ve tedavisi konusunda izlenen temel biyobelirteçlerden TNF- α , IL-6, GFAP ve NSE düzeyleri serumda ELISA kit yardımıyla bakılmıştır. Çalışmamızda ASF grubunda HİE için temel belirteçlerden, TNF- α , IL-6, GFAP ve NSE düzeylerinin yükseldiği ve MSC uygulaması ile bu hasarın azalarak tedavinin olumlu yanıt verdiğini serumda izlenmiştir.

Oksidatif stres, bir uyarıcı tarafından üretilen aktif oksidanlarla vücudun baş edemediği durumlarda oluşan bir durumdur (Zdeňka Ďuračková, 2010). Oksidatif stres, makromoleküler oksidatif hasarı içerir, doku protein denatürasyonunu, DNA hasarını ve

lipid peroksidasyonunu indükler ve vücudun normal metabolik aktivitesine müdahale ederek hastalıkların ortaya çıkmasına ve/veya gelişmesine yol açar. Oksidatif stresin pnömoni (Katsoulis et al., 2005), pankreatit (Österreicher et al., 2007), diyabetik nefropati (Nam et al., 2009), kardiyovasküler hastalık (Kasap et al., 2007), sinir sistemi hastalığı (Martin, 2008) ve kanser (Feng et al., 2012) gibi çeşitli hastalıklarda rol oynadığı doğrulanmıştır (Eroglu et al., 2013). Glutasyon (GSH), vücut sıvılarında mikromolar (microM)-konsantrasyonlarında ve dokuda milimolar (mM) konsantrasyonlarda bulunan aerobik hücrelerde en bol bulunan antioksidandır. GSH, beyni oksidatif stresten korumak için kritik öneme sahiptir, serbest radikal temizleyici ve lipid peroksidasyonunun inhibitörü olarak görev yapar. GSH ayrıca çeşitli glutasyon peroksidazlar tarafından hidrojen peroksitin detoksifikasyonuna katılır (Owen & Butterfield, 2010). Biyomembranlarda çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sıklıkla reaktif oksijen türevlerine maruz kalma ile oluşur. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda MDA meydana gelir. Lipid peroksidasyonunun başlıca son ürünlerinden olan MDA oksidan hasarı değerlendirmede sıklıkla kullanılır (Peroxidation, 1974).). Miyeloperoksidaz (MPO), güçlü pro-oksidatif ve proinflamatuvar özellikler ile karakterize edilen, esas olarak aktive nötrofiller tarafından salınan iyi bilinen bir enzimdir. MPO aktivitesi, substrat olarak hidrojen peroksit ve o-dianisidin dihidroklorür kullanılarak spektrofotometrik deneylerle kanda ve dokularda ölçülebilir (Loria et al., 2008). Süperoksit dismutazlar (SOD'lar), vücutta oksidatif strese karşı çok önemli bir antioksidan savunma oluşturur (Landis & Tower, 2005). Enzim, reaktif oksijen türlerinin aracılık ettiği hastalıklara karşı iyi bir terapötik ajan olarak görev yapar. Kanser, enflamatuvar hastalıklar, kistik fibroz, iskemi, yaşlanma, romatoid artrit, nörodejeneratif hastalıklar ve diyabet gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik durumlarda SOD'un terapötik etkileri araştırılmaktadır (Younus, 2018), (Yasui & Baba, 2006). Vücuttaki doğal SOD seviyeleri, vücut yaşlandıkça düşer ve dolayısıyla yaşlandıkça, kişi oksidatif stresle ilişkili hastalıklara daha yatkın hale gelir (Sunal & Inal, 2001).

HİE modeli oluşturularak yapılan çalışmalar incelendiği zaman çok çeşitli ajanların ve terapötiklerin kullanıldığı görülmektedir. Bunlardan bazıları incelendiği zaman HİE'nin hipotermi tedavisine alternatif ya da hipotermi ile birlikte kullanılabilecek etkin bir tedavi şeklinin bulunmasına yönelik olduğu görülmektedir. Yapılan bir çalışmada, perinatal asfiksi sonucu oluşan HİE modeli erkek Sprague Dawley sıçanları üzerinde oluşturulmuş ve tedavi kurkumin ile yapılmıştır. Nükleer faktör eritroid-2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2), merkezi sinir

sistemi hastalığına karşı nöroprotektif etkileri olan bir nükleer transkripsiyon faktörüdür. Heme oksijenaz 1 (HO-1), doku proteinlerini, mitokondriyal membranları ve sitomembranları stabilize edebilen, nörosit yaralanmalarını giderebilen ısı şoku protein ailesine etki eder. Nrf2/HO-1 yolağının, kurkuminin hipoksik-iskemik beyin hasarı üzerindeki koruyucu etkisinin altında yattığını ve kurkuminin yenidoğan sıçanlarda Nrf2 ve HO-1 indüksiyonu yoluyla hipoksik-iskemik beyin hasarını azalttığını göstermiştir (Cui et al., 2017). Nükleer faktör eritroid-2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2), merkezi sinir sistemi hastalığına karşı nöroprotektif etkileri olan bir nükleer transkripsiyon faktörüdür. Heme oksijenaz 1 (HO-1), doku proteinlerini, mitokondriyal membranları ve sitomembranları stabilize edebilen, nörosit yaralanmalarını giderebilen ısı şoku protein ailesine etki eder. Nrf2/HO-1 yolağının, kurkuminin hipoksik-iskemik beyin hasarı üzerindeki koruyucu etkisinin altında yattığını ve kurkuminin yenidoğan sıçanlarda Nrf2 ve HO-1 indüksiyonu yoluyla hipoksik-iskemik beyin hasarını azalttığını göstermiştir (Jatana et al., 2006).

Aly ve arkadaşlarını yaptığı bir çalışmada, melatonin nöroprotektif olduğu gösterilmiş ve melatoninin, hipoksik-iskemik ensefalopatili (HIE) yenidoğanlarda klinik, biyokimyasal nörofizyolojik ve radyolojik sonuçları üzerinde etkisi incelenmiştir. 45 yenidoğan (30'u HIE + 15'i sağlıklı) üzerinde yapılan çalışmada HIE bebekleri rastgele olarak Hipotermi grubu (n=15; 72 saat tüm vücut soğutması), ve melatonin/hipotermi grubu (n=15; hipotermi ve 5 günlük 10gr melatonin) olarak ayrılmıştır. Serum melatonin, SOD ve serum nitrik oksit (NO) düzeyleri tüm gruplarda ölçüm yapılmış ve aynı ölçümler 5. günde de tekrar edilmiştir. Serum melatonin konsantrasyonu ve SOD konsantrasyonunun hipotermi ile birlikte melatonin uygulaması ile yaşamın 5. gününde arttığı ve sağlıklı kontrollere yaklaştığı belirtilmiştir. NO konsantrasyonlarının ise hipotermi tedavisi ile birlikte melatonin uygulaması ile 5 gün içinde azaldığı gösterilmiştir (Aly et al., 2015). Perinatal asfiksi domuz yavru ile yapılan bir modelin kullanıldığı başka bir çalışmada ise melatoninin, hipotermimin nöroprotektif rolünü arttırdığı, serebral enerji metabolizmasının gelişimine katkıda bulunarak beyin hasarını azalttığı rapor edilmiştir (N. J. Robertson et al., 2013). Bu tez çalışmasında, dokularda hasarın ve iyileşmenin göstergesi olan oksidan/antioksidan parametreleri; MDA (Malondialdehit), GSH (Glutatyon), SOD (Süperoksit dismutaz), MPO (Nötrofil miyeloperoksidaz) düzeyleri beyin, akciğer, kalp, böbrek ve karaciğerde analiz edildi. Beyin dokusunda asfikside uygulanan MSC tedavisinin GSH ve SOD düzeylerini arttırdığı, MDA ve MPO düzeylerini azalttığı, gösterilmiştir. Akciğer dokusunda asfikside uygulanan MSC tedavisinin GSH ve SOD düzeylerinde

değişiklik yaratmadığı fakat MDA ve MPO düzeylerini azalttığı, gösterilmiştir. Kalp dokusunda asfiksida uygulanan MSC tedavisinin GSH, SOD ve MPO düzeylerini değiştirmedeği ancak MDA düzeylerini azalttığı, gösterilmiştir. Böbrek dokusunda asfiksida uygulanan MSC tedavisinin GSH, SOD, MDA ve MPO düzeylerinde anlamlı değişiklik göstermediği tespit edilmiştir. Karaciğer dokusunda asfiksida uygulanan MSC tedavisinin GSH düzeylerinin arttığı, MDA düzeylerinin azaldığı, SOD ve MPO düzeylerini değiştirmedeği gösterilmiştir. Çalışmada beyin doku incelemelerinde asfiksida oluşan gliozis ve hücre sınırlarında kayıplar ile piknotik hücrelerin MSC tedavisi ile azaldığı görülmektedir. Ayrıca asfiksida MSC uygulamasının nöronal hücrelerin miktarını etkili bir şekilde arttırdığı gözlemlenmiştir. Hücrelerde TUNEL yöntemi ile yaptığımız apoptoz çalışmalarında asfiksida uyguladığımız MSC tedavisinin apoptotik hücre oranını azalttığı tespit edilmiştir.

Literatürde yenidoğan hayvan modellerinde MSC'lerin transplantasyonu ile iskemik beyin hasarının tedavisinin lezyon hacmini azaltmada ve fonksiyonel sonucu iyileştirmede etkili olduğu gösterilmiştir. Hala gelişmekte olan yenidoğan beyni, yetişkin beynine kıyasla genç beynin daha fazla plastisitesi göz önüne alındığında, muhtemelen yetişkin beyninden daha büyük bir yenilenme potansiyeline sahiptir. MSC transplantasyonu, endojen hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını artırır, lezyon hacminin azalmasına, motor fonksiyonun iyileşmesine neden olur. MSC'ler serebral ortamdaki tehlikeyi hissedebilir, büyüme ve farklılaşma faktörü profillerini çevrenin taleplerine uyarlayarak onu onarımı teşvik eden bir ortama dönüştürür. Endojen ve eksojen kök hücreler arasındaki iletişim, hem nakledilen hem de yerleşik kök hücrelerin davranışı üzerinde önemli etkilere sahiptir. Beynin yaralanmadan sonra anlamlı onarım potansiyeli, bu çift yönlü iletişime bağlıdır (Ekdahl et al., 2009), (Czeh & Kaindl, 2011). MSC'lerin transplantasyonu, serebral iskemi, Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı dahil olmak üzere yetişkin nörolojik bozukluklar için hayvan modellerinde başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Pimentel-Coelho et al., 2010), (Kil et al., 2009), (Levy et al., 2008), (Velthoven et al., 2009).). Yenidoğan modellerinde yapılan birkaç deneysel çalışma, iskemik beyin hasarından sonra MSC'lerle tedavinin fonksiyonel sonuç üzerinde faydalı etkileri olduğu gösterilmiştir (J. I. N. A. Lee et al., 2010), (Takao Yasuhara et al., 2006), (Van Velthoven et al., 2010).

Son yıllarda perinatal asfiksi tedavisinde kök hücrelerin kullanımı daha umut vericidir. Kök hücreler, yeni farklılaşmış hücreler sağlayarak homeostazı düzenlemeye ve dokuları onarmaya yardımcı olur (Gage & Temple, 2013). Kök hücrelerin HİE'de

etkinliğini değerlendiren birçok çalışma yapılmıştır. Kemik iliği, göbük kordonu, wharton jölesi, plasenta gibi dokulardan türetilen mezenkimal kök hücreler HİE’de, lezyonların boyutunu küçülterek ve bilişsel motor davranışlarını iyileştirdiği açıklanmıştır (Van Velthoven et al., 2010). Çalışmada dokuz günlük farelere serebral hipoksik beyin hasarı oluşturulmuş ve endojen hücre proliferasyonu BrdU ile belirlenmiştir. Endojen hücre proliferasyonunun hipoksik iskemiden  gün sonra olduğu gözlenmiştir. Hipoksik beyin hasarı oluşturulduktan  gün sonra cerrahi işlem ile beyine MSC transplantasyonu yapılmış ve hipoksik farelerde 21 gün sonra nöronal kaybının %42 ve oligodendrosit kaybını %31 oranında azaldığı grlmştir. MSC tedavisinin hipokampus ve kortekste yakın zamanda bölünmüş nöronların ve oligodendrositlerin yüzdesini arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca, MSC tedavisinin beyinde lezyon boyutunda önemli bir azalmayı sağladığı ve davranışsal sonuçlarda iyileşme neden olduğu bulunmuştur. MSC transplantasyonunun, endojen onarım süreçlerinin uyarılması yoluyla neonatal beyin hasarından sonra davranışsal sonucu ve serebral lezyon hacmini iyileştirmek için güçlü bir tedavi olduğunu öne srlmştir (Van Velthoven et al., 2010). Bir yenidoğan ensefalopati domuz yavrusu modelinde hipotermi tedavisine ek tedavi olarak insan göbük kordonundan türetilen MSC’lerin (huMSC’ler) etkisi araştırılmıştır. Enzimatik yöntem ile izole edilen MSC’lerin karakterizasyonu (CD105, CD90, CD45) immunofloresans ile belirlenmiş, intravenöz ve intranazal olarak farklı iki şekilde domuz yavrularına uygulanmıştır. Standart tedavi olan hipotermi tedavisi ile karşılaştırıldığında intranazal olarak verilen insan MSC’nin yenidoğanlarda amplitüd entegre ensefalografisinde hızlı iyileşme ve beyin enerjisi metabolizmasında düzelmelerin olduğu saptanmıştır. Hipotermi tedavisi ile birlikte intravenöz olarak verilen insan MSC’lerin tek başına hipotermi tedavisi ile karşılaştırıldığında hiçbir etkisinin olmadığı gözlemlenmemiştir. Sonuç olarak, intranazal huMSC’ler, orta ila şiddetli yenidoğan ensefalopatili bebeklerin tedavisinde umut vaat eden potansiyel olarak güçlü bir terapötik olduğu sonucuna varılmıştır (N. J. Robertson et al., 2021). Yapılan bir başka çalışmada doğum sonrası 9. gün C57BL/6 farelerde hipoksi-iskemi yapılmış ve ardından 4 saat akut hipotermi tedavisi uygulanmıştır. Bu farelere murin kemik iliğinden türetilen MSC’ler 12 gün sonra intranazal olarak uygulanmıştır. MSC verilmesinden 24 saat sonra sitokin ve büyüme faktörü seviyeleri değerlendirilmiştir. Bir hafta sonra deney sonlandırılmış, doku hasarı ve nöroinflamatuvar yanıtlar incelenmiş, uzun vadeli motor-bilişsel sonuçlarda farklı gruplarda 5 hafta sonra değerlendirilmiştir. Hem MSC hem de hipotermi tedavisinin, motor açıkları iyileştirirken, bilişsel işlev yalnızca MSC tarafından geri dönüşebildiği gösterilmiştir. Ancak kombine tedavininde artan endotel aktivasyonu ve periferik immün

hücre infiltrasyonunu arttırdığında gösterilmiştir. Çalışmada hipotermiye MSC kombinasyon tedavisinin ek hücre bazlı tedavilerle birlikte iyi bir şekilde tasarlanması gerektiği ve bu konuda çeşitli sınırlılıklarının olması nedeniyle araştırmaların yapılması gerektiği vurgulanmıştır (Herz et al., 2018).). Yapılan başka bir çalışmada pluripotent düzeyi yüksek olan embriyonik kök hücrelerden elde edilen MSC'ler (ES-MS) ve amniyotik sıvıdan elde edilen MSC'ler (AF-MS) %8 oksijen, %92 nitrojen içeren gaz karışımı ile 36°C'de 1 saatte oluşturulan hipoksi-iskemi fare modelinde takiben tek doz kontralateral enjeksiyonla terapötik potansiyelleri araştırılmıştır. İndüklenmiş pluripotent kök hücre kaynaklı MSC'lerin NF-κB sinyali ve IL-13 üretimini sağlayarak nöroprotektif potansiyellerinin olduğunu göstermişlerdir. Çalışmada embriyonik kök hücrelerin kullanımıyla ilişkili etik sorunların üstesinden gelindiğinde neonatal hipoksik-iskemik ensefalopatiye karşı otolog kullanımının olabileceği potansiyel bir hücre kaynağı oldukları bildirilmiştir (Hawkins et al., 2018).

Multipotent yetişkin progenitör hücrelerin (MAPC'ler) intraserebral transplantasyonunun, yenidoğan hipoksi-iskemi sıçan yaralanma modelinde davranışsal iyileşme ve iskemik hücre kaybında azalma ile sonuçlandığını gösterilmiştir. Yedi günlük Sprague-Dawley sıçanları tek taraflı hipoksi-iskemi yaralanmasına maruz bırakılmış, 7 gün sonra allojenik sıçan MAPC'lerinin intraserebral veya intravenöz enjeksiyonları yapılmıştır. Transplantasyon sonrası 7. ve 14. günlerde, intraserebral veya intravenöz yoldan MAPC alan hayvanların beyin dokuları incelendiğinde iskemik hipokampal bölgede hem intraserebral hem de intravenöz transplante edilmiş MAPC'lerin saptandığını ortaya konulmuştur. MAPC'lerin daha az invaziv yöntem olarak intravenöz verilmesinin klinik kullanım potansiyeli olan uygulanabilir ve etkili bir hücre tedavisi olduğunu göstermiştir (Takao Yasuhara et al., 2008).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Asfiksi; hipoksi ve iskeminin bir arada görüldüğü bir süreç olup; anne, fetus ve plasentadan oluşan biyolojik ünitenin fonksiyonlarının veya postpartum pulmoner gaz değişiminin bozukluğuna bağlı olarak; fetus veya yenidoğanda hipoksemi, hiperkapni ve asidoz ile birlikte klinik bir tablo olarak tanımlanabilir. Perinatal asfiksinin güncel olarak tek uygulanan tedavisi hipotermi olup başarı oranı yüksek değildir bu nedenle bu hastalığın tedavisi için dünyada yeni stratejilerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada perinatal asfikside görülen beyin hasarı ile birlikte multiorgan hasarının göbek kordonundan izole edilen mezenkimal kök hücre tedavisi ile giderilebileceği pre-klinik olarak gösterilmiştir. Doğum esnasında atılan ve kullanılmayan göbek kordonunun kök hücre izolasyonunda kullanılması ve perinatal asfikside bu hücrelerin uygulanabileceğinin gösterilmesi klinik araştırmalar için yeni bir yaklaşım geliştirmesi yönünde literatüre önemli bir katkıları sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Ad, D., Do, Y., & Do, Y. (n.d.). *Yenidoğan Fizyolojisi*. 1–23.
- Ahearne, C. E. (2016). Short and long term prognosis in perinatal asphyxia: An update. *World Journal of Clinical Pediatrics*, 5(1), 67. <https://doi.org/10.5409/wjcp.v5.i1.67>
- Akisu, M., Kumral, A., & Canpolat, F. E. (2018). Turkish neonatal society guideline on neonatal encephalopathy. *Turk Pediatri Arsivi*, 53, 32–44. <https://doi.org/10.5152/TurkPediatriArs.2018.01805>
- Albrecht, M., Zitta, K., Groenendaal, F., van Bel, F., & Peeters-Scholte, C. (2019). Neuroprotective strategies following perinatal hypoxia-ischemia: Taking aim at NOS. *Free Radical Biology and Medicine*, 142(November 2018), 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.02.025>
- Alencar, J. P. D. O., Alencar, G. D. O., & Lima, I. S. P. (2019). Atividade Neuroprotetora Da Minociclina Na Isquemia Cerebral: Revisão Sistemática. *Infarma - Ciências Farmacêuticas*, 31(3), 146–154. <https://doi.org/10.14450/2318-9312.v31.e3.a2019.pp146-154>
- Aly, H., Elmahdy, H., El-Dib, M., Rowisha, M., Awny, M., El-Gohary, T., Elbatch, M., Hamisa, M., & El-Mashad, A. R. (2015). Melatonin use for neuroprotection in perinatal asphyxia: A randomized controlled pilot study. *Journal of Perinatology*, 35(3), 186–191. <https://doi.org/10.1038/jp.2014.186>
- Amantea, D., Certo, M., Petrelli, F., Tassorelli, C., Micieli, G., Corasaniti, M. T., Puccetti, P., Fallarino, F., & Bagetta, G. (2016). Azithromycin protects mice against ischemic stroke injury by promoting macrophage transition towards M2 phenotype. *Experimental Neurology*, 275, 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.10.012>
- Apgar, V. (2015). *A Proposal for a New Method of Evaluation of the Newborn Infant*. 120(5), 1056–1059. <https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e31829bdc5c>

- Badawi, N., Kurinczuk, J. J., Keogh, J. M., Alessandri, L. M., Sullivan, F. O., Burton, P. R., Pemberton, P. J., & Stanley, F. J. (1998). *Antepartum risk factors for newborn encephalopathy: the Western Australian case-control study*. 317(December), 1549–1553.
- Baggiolini, M. (2001). *Chemokines in pathology and medicine*.
- Bahsoun, S., Coopman, K., & Akam, E. C. (2019). The impact of cryopreservation on bone marrow - derived mesenchymal stem cells: a systematic review. *Journal of Translational Medicine, April*. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-02136-7>
- Ballough, G. P. H., Cann, F. J., Smith, C. D., Forster, J. S., Kling, C. E., & Filbert, M. G. (1998). GM1 monosialoganglioside pretreatment protects against soman-induced seizure-related brain damage. *Molecular and Chemical Neuropathology*, 34(1), 1–23. <https://doi.org/10.1007/BF02815133>
- Barnett, C. P., Perlman, M., & Ekert, P. G. (1997). Clinicopathological correlations in postasphyxial organ damage: A donor organ perspective. *Pediatrics*, 99(6), 797–799. <https://doi.org/10.1542/peds.99.6.797>
- Baserga, M. C., Beachy, J. C., Roberts, J. K., Ward, R. M., Digeronimo, R. J., Walsh, W. F., Ohls, R. K., Anderson, J., Mayock, D. E., Juul, S. E., Christensen, R. D., Loertscher, M. C., Stockmann, C., Sherwin, C. M. T., Spigarelli, M. G., & Yoder, B. A. (2015). Darbepoetin administration to neonates undergoing cooling for encephalopathy: A safety and pharmacokinetic trial. *Pediatric Research*, 78(3), 315–322. <https://doi.org/10.1038/pr.2015.101>
- Bembea, M. M., Savage, W., Strouse, J. J., Schwartz, J. M. E., Graham, E., Thompson, C. B., & Everett, A. (2011). Glial fibrillary acidic protein as a brain injury biomarker in children undergoing extracorporeal membrane oxygenation. *Pediatric Critical Care Medicine*, 12(5), 572–579. <https://doi.org/10.1097/PCC.0b013e3181fe3ec7>
- Berg, A. T. (1989). Indices of fetal growth-retardation, perinatal hypoxia-related factors and childhood neurological morbidity. *Early Human Development*, 19(4), 271–283. [https://doi.org/10.1016/0378-3782\(89\)90062-5](https://doi.org/10.1016/0378-3782(89)90062-5)
- Bhat, M. A., Charoo, B. A., Bhat, J. I., Ahmad, S. M., Ali, S. W., & Mufti, M. U. H. (2009). Magnesium sulfate in severe perinatal asphyxia: A randomized, placebo-controlled trial. *Pediatrics*, 123(5). <https://doi.org/10.1542/peds.2007-3642>

- Bhutta, Z. A. (2013). Paediatrics in the Tropics. In *Manson's Tropical Diseases: Twenty-Third Edition* (Twenty Thi). <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5101-2.00081-9>
- Bilgin, L. K., Aladağ, N., Aygün, C., & Altay, D. (2011). *HİPOKSİİskemikEnsefalopati : 63 TermYenidoğanDeğerlendirilmesi Hypoxic Ischemic Encephalopathy : Evaluation of 63 Term Neonates*. 5(15), 89–94.
- Bracci, R., Perrone, S., & Buonocore, G. (2006). The timing of neonatal brain damage. *Biology of the Neonate*, 90(3), 145–155. <https://doi.org/10.1159/000092517>
- Cable, J., Fuchs, E., Weissman, I., Jasper, H., Glass, D., Rando, T. A., Blau, H., Debnath, S., Oliva, A., & Park, S. (2019). *Adult stem cells and regenerative medicine — a symposium report*. 1–10. <https://doi.org/10.1111/nyas.14243>
- Cai, W. (2012). Engineering in translational medicine. In *Engineering in Translational Medicine* (Vol. 9781447143). <https://doi.org/10.1007/978-1-4471-4372-7>
- Can, A. (2008). A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turkish Journal of Hematology*, 25(2), 57–59.
- Carps, C. A. P., Edwards, A. B., Anderton, R. S., Knuckey, N. W., & Meloni, B. P. (n.d.). *brain sciences Neuroprotective Peptide Therapies: A Case for*. 15–20. <https://doi.org/10.3390/brainsci8080147>
- Cassina, A., & Radi, R. (1996). *Differential Inhibitory Action of Nitric Oxide and Peroxynitrite on Mitochondrial Electron Transport*. 328(2), 309–316.
- Castillo-Melendez, M., Baburamani, A. A., Cabalag, C., Yawno, T., Witjaksono, A., Miller, S. L., & Walker, D. W. (2013). Experimental modelling of the consequences of brief late gestation asphyxia on newborn lamb behaviour and brain structure. *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077377>
- Çeltik, C., Acunaş, B., Öner, N., & Pala, Ö. (2004). Neuron-specific enolase as a marker of the severity and outcome of hypoxic ischemic encephalopathy. *Brain and Development*, 26(6), 398–402. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2003.12.007>
- Çerçi, E., & Erdost, H. (2019). Stem cell. *Ataturk Universitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 14(2), 221–228. <https://doi.org/10.17094/ataunivbd.483253>

- Chakkarapani, E., Dingley, J., Liu, X., Hoque, N., Aquilina, K., Porter, H., & Thoresen, M. (2010). Xenon enhances hypothermic neuroprotection in asphyxiated newborn pigs. *Annals of Neurology*, 68(3), 330–341. <https://doi.org/10.1002/ana.22016>
- Chalak, L. F., Sánchez, P. J., Adams-Huet, B., Laptook, A. R., Heyne, R. J., & Rosenfeld, C. R. (2014). Biomarkers for severity of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy and outcomes in newborns receiving hypothermia therapy. *Journal of Pediatrics*, 164(3), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.10.067>
- Chaparro-Huerta, V., Flores-Soto, M. E., Merin Sigala, M. E., Barrera de León, J. C., Lemus-Varela, M. de L., Torres-Mendoza, B. M. de G., & Beas-Zárate, C. (2017). Proinflammatory Cytokines, Enolase and S-100 as Early Biochemical Indicators of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy Following Perinatal Asphyxia in Newborns. *Pediatrics and Neonatology*, 58(1), 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2016.05.001>
- Chatzistamatiou, T. K., Papassavas, A. C., Michalopoulos, E., Gamaloutsos, C., Mallis, P., Gontika, I., Panagouli, E., Koussoulakos, S. L., & Stavropoulos-Giokas, C. (2014). Optimizing isolation culture and freezing methods to preserve Wharton's jelly's mesenchymal stem cell (MSC) properties: An MSC banking protocol validation for the Hellenic Cord Blood Bank. *Transfusion*, 54(12), 3108–3120. <https://doi.org/10.1111/trf.12743>
- Chaudhari, T., & McGuire, W. (2008). Allopurinol for preventing mortality and morbidity in newborn infants with suspected hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006817.pub2>
- Chu, D.-T., Nguyen, T. T., Tien, N. L. B., Tran, D.-K., Jeong, J.-H., Anh, P. G., Thanh, V. Van, Truong, D. T., & Dinh, T. C. (2020). Recent Progress of Stem Cell Therapy in Cancer Treatment: Molecular Mechanisms and Potential Applications. *Cells*, 9(3), 563. <https://doi.org/10.3390/cells9030563>
- Circulation, F. (1991). *Perinatal Circulatory Physiology*. 441–451.

- Concannon, C. G., Tuffy, L. P., Weisová, P., Bonner, H. P., Dávila, D., Bonner, C., Devocelle, M. C., Strasser, A., Ward, M. W., & Prehn, J. H. M. (n.d.). *AMP kinase-mediated activation of the BH3-only protein Bim couples energy depletion to stress-induced apoptosis*. 189(1), 83–94. <https://doi.org/10.1083/jcb.200909166>
- Conconi, M. T., Liddo, R. Di, Tommasini, M., Calore, C., & Parnigotto, P. P. (2011). Phenotype and Differentiation Potential of Stromal Populations Obtained from Various Zones of Human Umbilical Cord: An Overview. *Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal*, 4(SPEC. ISSUE 1), 6–20. <https://doi.org/10.2174/1875043501104010006>
- Crook, J. M., Kravets, L., Peura, T., & Firpo, M. T. (2017). Derivation of Human Embryonic Stem Cells. *Methods in Molecular Biology*, 1590(1), 115–129. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6921-0_8
- Cui, X., Song, H., & Su, J. (2017). Curcumin attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats through induction of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 and heme oxygenase-1. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(2), 1512–1518. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4683>
- Czeh, M., & Kaindl, M. (2011). *The Yin and Yang of Microglia*. 199–209. <https://doi.org/10.1159/000328989>
- Daadi, M. M., Davis, A. S., Arac, A., Li, Z., Maag, A. L., Bhatnagar, R., Jiang, K., Sun, G., Wu, J. C., & Steinberg, G. K. (2010). Human Neural Stem Cell Grafts Modify Microglial Response and Enhance Axonal Sprouting in Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Stroke*, 41(3), 516–523. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.573691>
- Daniel E Shumer, N. J. N. N. P. S. (2017). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(12), 139–148. <https://doi.org/10.1038/s41390-019-0408-6>. Repurposing
- Devito, L., Klontzas, M. E., Cvaro, A., Galleu, A., Simon, M., Hobbs, C., Dazzi, F., Mantalaris, A., Khalaf, Y., & Ilic, D. (2019). Comparison of human isogeneic Wharton's jelly MSCs and iPSC-derived MSCs reveals differentiation-dependent metabolic responses to IFNG stimulation. *Cell Death and Disease*, 10(4). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1498-0>

- Ding, D., & Shyu, W. (2011). *Mesenchymal Stem Cells*. 20, 5–14.
<https://doi.org/10.3727/096368910X>
- Dominici, M., Blanc, K. Le, Mueller, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells . The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317.
<https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Donald, D. M. A. C. (1995). *Asphyxia*. 9(3), 579–594.
- Dulak, J., Szade, K., Szade, A., Nowak, W., & Józkwicz, A. (2015). *Adult stem cells : hopes and hypes of regenerative medicine **. 62(3), 329–337.
- Dupont, G., Yilmaz, E., Loukas, M., Macchi, V., De Caro, R., & Tubbs, R. S. (2019). Human embryonic stem cells: Distinct molecular personalities and applications in regenerative medicine. *Clinical Anatomy*, 32(3), 354–360.
<https://doi.org/10.1002/ca.23318>
- Ekdahl, C. T., Kokaia, Z., & Lindvall, O. (2009). REVIEW BRAIN INFLAMMATION AND ADULT NEUROGENESIS : THE DUAL ROLE OF MICROGLIA. *NSC*, 158(3), 1021–1029. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.06.052>
- Encephalopathy, H., Liu, J., & Feng, Z. (2010). *Increased Umbilical Cord Plasma Interleukin-1 b Levels was Correlated with Adverse Outcomes of Neonatal*. 56(3), 178–182. <https://doi.org/10.1093/tropej/fmp098>
- Endrich, O., Rimle, C., Zwahlen, M., Triep, K., Raio, L., & Nelle, M. (2017). Asphyxia in the newborn: Evaluating the accuracy of ICD coding, clinical diagnosis and reimbursement: Observational study at a swiss tertiary care center on routinely collected health data from 2012-2015. In *PLoS ONE* (Vol. 12, Issue 1).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170691>
- England, T. N. (2001). *THE CONTINUING VALUE OF THE APGAR SCORE FOR THE ASSESSMENT OF NEWBORN INFANTS*. 344(7), 467–471.
- Ep, M., & Ska, C. (1994). *IONS A N D ENERGY IN MAMMALIAN BRAIN*. 43(94).

- Eroglu, M., Yilmaz, N., Yalcinkaya, S., Ay, N., Aydin, O., & Sezer, C. (2013). Enhanced HDL-cholesterol-associated anti-oxidant PON-1 activity in prostate cancer patients. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 29(7), 368–373. <https://doi.org/10.1016/j.kjms.2012.11.004>
- Faulkner, S., Bainbridge, A., Kato, T., Chandrasekaran, M., Kapetanakis, A. B., Hristova, M., Liu, M., Evans, S., De Vita, E., Kelen, D., Sanders, R. D., Edwards, A. D., Maze, M., Cady, E. B., Raivich, G., & Robertson, N. J. (2011). Xenon augmented hypothermia reduces early lactate/N-acetylaspartate and cell death in perinatal asphyxia. *Annals of Neurology*, 70(1), 133–150. <https://doi.org/10.1002/ana.22387>
- Faulkner, S. D., Downie, N. A., Mercer, C. J., Kerr, S. A., Sanders, R. D., & Robertson, N. J. (2012). A xenon recirculating ventilator for the newborn piglet: Developing clinical applications of xenon for neonates. *European Journal of Anaesthesiology*, 29(12), 577–585. <https://doi.org/10.1097/EJA.0b013e3283583c4b>
- Faustino, J. V, Wang, X., Johnson, C. E., Klibanov, A., Derugin, N., Wendland, M. F., & Vexler, Z. S. (2011). *Microglial Cells Contribute to Endogenous Brain Defenses after Acute Neonatal Focal Stroke*. 31(36), 12992–13001. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2102-11.2011>
- Felling, R. J., Snyder, M. J., Romanko, M. J., Rothstein, R. P., Ziegler, A. N., Yang, Z., Givogri, M. I., Bongarzone, E. R., & Levison, S. W. (2006). Neural stem/progenitor cells participate in the regenerative response to perinatal hypoxia/ischemia. *Journal of Neuroscience*, 26(16), 4359–4369. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1898-05.2006>
- Feng, J. F., Lu, L., Zeng, P., Yang, Y. H., Luo, J., Yang, Y. W., & Wang, D. (2012). Serum total oxidant/antioxidant status and trace element levels in breast cancer patients. *International Journal of Clinical Oncology*, 17(6), 575–583. <https://doi.org/10.1007/s10147-011-0327-y>
- Fernández-López, D., Lizasoain, I., Moro, M. Á., & Martínez-Orgado, J. (2013). Cannabinoids: Well-Suited candidates for the treatment of perinatal brain injury. *Brain Sciences*, 3(3), 1043–1059. <https://doi.org/10.3390/brainsci3031043>

- Fernández-López, D., Martínez-Orgado, J., Nuñez, E., Romero, J., Lorenzo, P., Moro, M. Á., & Lizasoain, I. (2006). Characterization of the neuroprotective effect of the cannabinoid agonist WIN-55212 in an in vitro model of hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Pediatric Research*, 60(2), 169–173. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000228839.00122.6c>
- Ferrari, G., Anderson, B. L., Stephens, R. M., Kaplan, D. R., & Greene, L. A. (1995). Prevention of Apoptotic Neuronal Death by GM1 Ganglioside. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 270, Issue 7, pp. 3074–3080). <https://doi.org/10.1074/jbc.270.7.3074>
- Ferreira, J. R., Teixeira, G. Q., Santos, S. G., Barbosa, M. A., Almeida-Porada, G., & Gonçalves, R. M. (2018). Mesenchymal stromal cell secretome: Influencing therapeutic potential by cellular pre-conditioning. *Frontiers in Immunology*, 9(December), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02837>
- Filippi, L., Fiorini, P., Catarzi, S., Berti, E., Padriani, L., Landucci, E., Donzelli, G., Bartalena, L., Fiorentini, E., Boldrini, A., Giampietri, M., Scaramuzzo, R. T., la Marca, G., Della Bona, M. L., Fiori, S., Tinelli, F., Bancale, A., Guzzetta, A., Cioni, G., ... Guerrini, R. (2018). Safety and efficacy of topiramate in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy treated with hypothermia (NeoNATI): a feasibility study. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 31(8), 973–980. <https://doi.org/10.1080/14767058.2017.1304536>
- Filippi, L., Poggi, C., La Marca, G., Furlanetto, S., Fiorini, P., Cavallaro, G., Plantulli, A., Donzelli, G., & Guerrini, R. (2010). Oral topiramate in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy treated with hypothermia: A safety study. *Journal of Pediatrics*, 157(3), 361–366. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2010.04.019>
- Frajewicki, A., Laštůvka, Z., Borbélyová, V., Khan, S., Jandová, K., Janišová, K., Otáhal, J., Mysliveček, J., & Riljak, V. (2020). Perinatal Hypoxic-Ischemic Damage: Review of the Current Treatment Possibilities. *Physiological Research*, 69(Supplement 3), S379–S401. <https://doi.org/10.33549/PHYSIOLRES.934595>
- Gage, F. H., & Temple, S. (2013). Neural stem cells: Generating and regenerating the brain. *Neuron*, 80(3), 588–601. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.037>

- Galinsky, R., Bennet, L., Groenendaal, F., Lear, C. A., Tan, S., Van Bel, F., Juul, S. E., Robertson, N. J., Mallard, C., & Gunn, A. J. (2014). Magnesium is not consistently neuroprotective for perinatal hypoxia-ischemia in term-equivalent models in preclinical studies: A systematic review. *Developmental Neuroscience*, 36(2), 73–82. <https://doi.org/10.1159/000362206>
- Garza, C. (2015). *Fetal , Neonatal , Infant , and Child International Growth Standards : An Unprecedented Opportunity for an Integrated Approach to Assess*. 383–390. <https://doi.org/10.3945/an.114.008128>.
- Giacchia, G. P. (1993). Asphyxia! brain damage in the newborn: New insights into pathophysiology and possible pharmacologic interventions. In *Southern Medical Journal* (Vol. 86, Issue 6, pp. 676–682). <https://doi.org/10.1097/00007611-199306000-00018>
- Ginet, V., Puyal, J., Clarke, P. G. H., & Truttmann, A. C. (2009). *Enhancement of Autophagic Flux after Neonatal Cerebral Hypoxia-Ischemia and Its Region-Specific Relationship to Apoptotic Mechanisms*. 175(5), 1962–1974. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.090463>
- Goldaber, K. G., & Gilstrap, L. C. (1993). Correlations between obstetric clinical events and umbilical cord blood acid-base and blood gas values. In *Clinical Obstetrics and Gynecology* (Vol. 36, Issue 1, pp. 47–59). <https://doi.org/10.1097/00003081-199303000-00008>
- Gomella, T. L. (n.d.). *NEONATOLOGY: MANAGEMENT , PROCEDURES , ON-CALL PROBLEMS , DISEASES , AND DRUGS*.
- 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>
- Greco, S. J., Liu, K., & Rameshwar, P. (2007). Functional Similarities Among Genes Regulated by Oct4 in Human Mesenchymal and Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 25(12), 3143–3154. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0351>

- Hagberg, H., Mallard, C., Ferriero, D. M., Vannucci, S. J., Levison, S. W., Vexler, Z. S., & Gressens, P. (2015). The role of inflammation in perinatal brain injury. *Nature Publishing Group*, 11(4), 192–208. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.13>
- Hakobyan, M., Dijkman, K. P., Laroche, S., Naulaers, G., Rijken, M., Steiner, K., Van Straaten, H. L. M., Swarte, R. M. C., Ter Horst, H. J., Zecic, A., Zonnenberg, I. A., & Groenendaal, F. (2019). Outcome of Infants with Therapeutic Hypothermia after Perinatal Asphyxia and Early-Onset Sepsis. *Neonatology*, 115(2), 127–133. <https://doi.org/10.1159/000493358>
- Hawkins, K. E., Corcelli, M., Dowding, K., Ranzoni, A. M., Vlahova, F., Hau, K. L., Hunjan, A., Peebles, D., Gressens, P., Hagberg, H., de Coppi, P., Hristova, M., & Guillot, P. V. (2018). Embryonic Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Have a Superior Neuroprotective Capacity Over Fetal MSCs in the Hypoxic-Ischemic Mouse Brain. *Stem Cells Translational Medicine*, 7(5), 439–449. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0260>
- Hayes, M., Curley, G., Ansari, B., & Laff, J. G. (2012). *Clinical review Stem cell therapies for acute lung.*
- He, H., Nagamura-Inoue, T., Tsunoda, H., Yuzawa, M., Yamamoto, Y., Yorozu, P., Agata, H., & Tojo, A. (2014). Stage-specific embryonic antigen 4 in wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells is not a marker for proliferation and multipotency. *Tissue Engineering - Part A*, 20(7–8), 1314–1324. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0333>
- Herz, J., Köster, C., Reinboth, B. S., Dzierko, M., Hansen, W., Sabir, H., van Velthoven, C., Bendix, I., & Felderhoff-Müser, U. (2018). Interaction between hypothermia and delayed mesenchymal stem cell therapy in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain, Behavior, and Immunity*, 70, 118–130. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.02.006>
- Hillered, L. (1998). *Mitochondrial Function and Energy Metabolism After Hypoxia-Ischemia in the Immature Rat Brain : Involvement of NMD A-Receptors.* 297–304.
- Hospital, T. N. (1993). *Resuscitation of Asphyxic Newborn Infants with Room Air or 100 % Oxygen.* 34(6), 6–9.

- Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., Zhao, T., Ye, J., Yang, W., Liu, K., Ge, J., Xu, J., Zhang, Q., Zhao, Y., & Deng, H. (2013). Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*, 341(6146), 651–654. <https://doi.org/10.1126/science.1239278>
- Iadecola, C., & Anrather, J. (2011). review The immunology of stroke : from mechanisms to translation. *Nature Publishing Group*, 17(7), 796–808. <https://doi.org/10.1038/nm.2399>
- Id, C. C. E., Andoh, H. D., & Frimpong-barfi, A. (2018). *Parental costs for in-patient neonatal services for perinatal asphyxia and low birth weight in Ghana*. 1–14.
- Ishige, I., Nagamura-Inoue, T., Honda, M. J., Harnprasopwat, R., Kido, M., Sugimoto, M., Nakauchi, H., & Tojo, A. (2009). Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord. *International Journal of Hematology*, 90(2), 261–269. <https://doi.org/10.1007/s12185-009-0377-3>
- Ishii, T. (2014). Fetal stem cell transplantation: Past, present, and future. *World Journal of Stem Cells*, 6(4), 404. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i4.404>
- Jatana, M., Singh, I., Singh, A. K., & Jenkins, D. (2006). Combination of systemic hypothermia and N-acetylcysteine attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Pediatric Research*, 59(5), 684–689. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000215045.91122.44>
- Jayaramayya, K., Mahalaxmi, I., Subramaniam, M. D., Raj, N., Dayem, A. A., Lim, K. M., Kim, S. J., An, J. Y., Lee, Y., Choi, Y., Kirubhakaran, A., Cho, S. G., & Vellingiri, B. (2020). Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells and mesenchymal stem-cell-derived exosomes for COVID-19 treatment. *BMB Reports*, 53(8), 400–412. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2020.53.8.121>
- Jcu, R. (2012). *Temperature measurement and thermoregulation in the term and preterm infant*.
- Jenster, M., Bonifacio, S. L., Ruel, T., Rogers, E. E., Tam, E. W., Partridge, J. C., Barkovich, A. J., Ferriero, D. M., & Hannah, C. (2015). *HHS Public Access*. 76(1), 93–99. <https://doi.org/10.1038/pr.2014.47>.Maternal

- Ji, G., Liu, M., Zhao, X. F., Liu, X. Y., Guo, Q. L., Guan, Z. F., Zhou, H. G., & Guo, J. C. (2015). NF- κ B Signaling is Involved in the Effects of Intranasally Engrafted Human Neural Stem Cells on Neurofunctional Improvements in Neonatal Rat Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 21(12), 926–935. <https://doi.org/10.1111/cns.12441>
- Joerger-Messerli, M. S., Marx, C., Oppliger, B., Mueller, M., Surbek, D. V., & Schoeberlein, A. (2016). Mesenchymal Stem Cells from Wharton's Jelly and Amniotic Fluid. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 31, 30–44. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2015.07.006>
- Kalaszczynska, I., & Ferdyn, K. (2015). Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells: Future of regenerative medicine? Recent findings and clinical significance. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/430847>
- Kansu Emin. (2005). Kök hücre biyolojisi ve plastisitesinde güncel kavramlar. *Hacettepe Medical Journal*, 36(4), 191–197.
- Kapaya, H., Williams, R., Elton, G., & Anumba, D. (2018). *Can Obstetric Risk Factors Predict Fetal Acidaemia at Birth ? A Retrospective Case-Control Study. 2018.*
- Karahuseyinoglu, S., Cinar, O., Kilic, E., Kara, F., Akay, G. G., Demiralp, D. Ö., Tukun, A., Uckan, D., & Can, A. (2007). Biology of Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: In Situ and In Vitro Surveys. *Stem Cells*, 25(2), 319–331. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0286>
- Karlo, J., Bhat, B. V., Koner, B. C., & Adhisivam, B. (2014). Evaluation of renal function in term babies with perinatal asphyxia. *Indian Journal of Pediatrics*, 81(3), 243–247. <https://doi.org/10.1007/s12098-013-1068-x>
- Kasap, S., Gönenç, A., Şener, D. E., & Hisar, I. (2007). Serum cardiac markers in patients with acute myocardial infarction: Oxidative stress, C-reactive protein and N-terminal probrain natriuretic peptide. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 41(1), 50–57. <https://doi.org/10.3164/jcbn.2007007>
- Katsoulis, K., Kontakiotis, T., Baltopoulos, G., Kotsovili, A., & Legakis, I. N. (2005). Total antioxidant status and severity of community-acquired pneumonia: Are they correlated? *Respiration*, 72(4), 381–387. <https://doi.org/10.1159/000086252>

- Kaufman, M. H., & Evans, M. J. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(July), 154–156.
- Kawakami, M. D., Sanudo, A., Teixeira, M. L. P., Andreoni, S., de Castro, J. Q. X., Waldvogel, B., Guinsburg, R., & de Almeida, M. F. (2021). Neonatal mortality associated with perinatal asphyxia: a population-based study in a middle-income country. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 21(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12884-021-03652-5>
- Kecskes, Z., Dunster, K. R., & Colditz, P. B. (2005). NSE and S100 after hypoxia in the newborn pig. *Pediatric Research*, 58(5), 953–957. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000182591.46087.7D>
- Kil, J., Kyung, H., & Bae, J. (2009). *Neuroscience Letters Bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduce brain amyloid- β deposition and accelerate the activation of microglia in an acutely induced Alzheimer ' s disease mouse model.* 450, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.11.059>
- Kim, D. W., Staples, M., Shinozuka, K., Pantcheva, P., Kang, S. D., & Borlongan, C. V. (2013). Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: Phenotypic characterization and Optimizing their therapeutic potential for clinical applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 11692–11712. <https://doi.org/10.3390/ijms140611692>
- Kim, S. U., & de Vellis, J. (2009). Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: A review. *Journal of Neuroscience Research*, 87(10), 2183–2200. <https://doi.org/10.1002/jnr.22054>
- Kingdom, U. (2012). *T Issue -S Pecific P Rogenitor And S Tem C Ells Concise Review : Limbal Stem Cell Deficiency , Dysfunction , and Distress.* 110–115.
- la Rocca, G., Corrao, S., Lo Iacono, M., Corsello, T., Farina, F., & Anzalone, R. (2012). Novel immunomodulatory markers expressed by human WJ-MSC: An updated review in regenerative and reparative medicine. *Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal*, 5(1), 50–58. <https://doi.org/10.2174/1875043501205010050>
- Landis, G. N., & Tower, J. (2005). *Superoxide dismutase evolution and life span regulation.* 126, 365–379. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.08.012>

- Lee, J. H., Kam, E. H., Kim, J. M., Kim, S. Y., Kim, E. J., Cheon, S. Y., & Koo, B. (2017). *Intranasal Administration of Interleukin-1 Receptor Antagonist in a Transient Focal Cerebral Ischemia Rat Model*. 25(2), 149–157.
- Lee, J. I. N. A., Kim, B. I. L., Jo, C. H., Choi, C. W. O. N., Kim, E., Kim, H., Yoon, K., Choi, J., L, D. P. J. A., Orthopedics, C. H. J., National, S., & National, S. (2010). *Mesenchymal Stem-Cell Transplantation for Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rat Model*. 67(1), 42–46.
- Leite, P. N. M., Teixeira, R. B., da Silva, G. D., Reis, A. T., & Araujo, M. (2020). Therapeutic hypothermia in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: Integrative review. *Revista Enfermagem*, 28, 1–7. <https://doi.org/10.12957/REUERJ.2020.42281>
- Levy, Y. S., Barzilay, R., Burshtein, A., Bulvik, S., Barhum, Y., Panet, H., Melamed, E., & Offen, D. (2008). Regenerative effect of neural-induced human mesenchymal stromal cells in rat models of Parkinson ' s disease. *Cytotherapy*, 10(4), 340–352. <https://doi.org/10.1080/14653240802021330>
- Lien, J. M., Towers, C. V., Quilligan, E. J., De Veciana, M., Toohey, J. S., & Morgan, M. A. (1995). Term early-onset neonatal seizures: Obstetric characteristics, etiologic classifications, and perinatal care. *Obstetrics and Gynecology*, 85(2), 163–169. [https://doi.org/10.1016/0029-7844\(94\)00375-N](https://doi.org/10.1016/0029-7844(94)00375-N)
- Lim, W. F., Inoue-Yokoo, T., Tan, K. S., Lai, M. I., & Sugiyama, D. (2013). Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research and Therapy*, 4(3). <https://doi.org/10.1186/scrt222>
- Liu, F., & Mccullough, L. D. (2013). Inflammatory responses in hypoxic ischemic encephalopathy. *Nature Publishing Group*, 34(9), 1121–1130. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.89>
- Liu, L., Oza, S., Hogan, D., Chu, Y., Perin, J., Zhu, J., Lawn, J. E., Cousens, S., Mathers, C., & Black, R. E. (2016). Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *The Lancet*, 388(10063), 3027–3035. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31593-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31593-8)

- Liu, S. P., Fu, R. H., Huang, S. J., Huang, Y. C., Chen, S. Y., Chang, C. H., Liu, C. H., Tsai, C. H., Shyu, W. C., & Lin, S. Z. (2013). Stem cell applications in regenerative medicine for neurological disorders. *Cell Transplantation*, 22(4), 631–637. <https://doi.org/10.3727/096368912X655145>
- Liu, Z., Zhuge, Y., & Velazquez, O. C. (2009). *Cellular Biochemistry*. 991(January), 984–991. <https://doi.org/10.1002/jcb.22091>
- Looney, A. M., Ahearne, C., Boylan, G. B., & Murray, D. M. (2015). Glial fibrillary acidic protein is not an early marker of injury in perinatal asphyxia and hypoxic-Ischemic encephalopathy. *Frontiers in Neurology*, 6(DEC), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00264>
- Loria, V., Dato, I., Graziani, F., & Biasucci, L. M. (2008). *Myeloperoxidase : A New Biomarker of Inflammation in Ischemic Heart Disease and Acute Coronary Syndromes*. 2008. <https://doi.org/10.1155/2008/135625>
- Lu, Y., Tucker, D., Dong, Y., Zhao, N., & Zhuo, X. (2016). *HHS Public Access*. 2(1), 706–721.
- Marcus, A. J., & Woodbury, D. (2008). Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: Do not discard: Stem Cells Review Series. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(3), 730–742. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00221.x>
- Martin, L. J. (2008). DNA damage and repair: Relevance to mechanisms of neurodegeneration. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 67(5), 377–387. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31816ff780>
- Mcelreavey, K. D., & Irvine, A. I. (1991). a Range. *Biochemical Society Transactions*, 19(1), 29S.
- Mei, C., Tan, J., & James, A. (2020). *The Transitional Heart : From Early Embryonic and Fetal Development to Neonatal Life*. 373–386. <https://doi.org/10.1159/000501906>
- Mennan, C., Wright, K., Bhattacharjee, A., Balain, B., Richardson, J., & Roberts, S. (2013). Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/916136>
- Mhairi, G., Mary, M. K., & Martha, D. (2005). *Avery 's Neonatology , 6th Edition*.

- Montaldo, P., Pauliah, S. S., Lally, P. J., Olson, L., & Thayyil, S. (2014). Seminars in Fetal & Neonatal Medicine Cooling in a low-resource environment : Lost in translation. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2014.10.004>
- Murden, S., Borbélyová, V., Laštůvka, Z., Mysliveček, J., Otáhal, J., & Riljak, V. (2019). Gender differences involved in the pathophysiology of the perinatal hypoxic-ischemic damage. *Physiological Research*, 68(Giussani 2016), S207–S217. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934356>
- Nadeem, M., Elnazir, B., & Grealley, P. (2012). *Congenital Pulmonary Malformation in Children*. 2012, 1–7.
- Nagamura-Inoue, T. (2014). Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. *World Journal of Stem Cells*, 6(2), 195. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i2.195>
- Nagdyman, N., Grimmer, I., Scholz, T., Müller, C., & Obladen, M. (2003). Predictive value of brain-specific proteins in serum for neurodevelopmental outcome after birth asphyxia. *Pediatric Research*, 54(2), 270–275. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000072518.98189.A0>
- Nagdyman, N., KMen, W., Ko, H. K., Müller, C., & Obladen, M. (2001). Early biochemical indicators of hypoxic-ischemic encephalopathy after birth asphyxia. *Pediatric Research*, 49(4), 502–506. <https://doi.org/10.1203/00006450-200104000-00011>
- Nair, J., & Kumar, V. (2018). Current and Emerging Therapies in the Management of Hypoxic Ischemic Encephalopathy in Neonates. *Children*, 5(7), 99. <https://doi.org/10.3390/children5070099>
- Nakajima, W., Ishida, A., Lange, M. S., Gabrielson, K. L., Wilson, M. A., Martin, L. J., Blue, M. E., & Johnston, M. V. (2000). *Apoptosis Has a Prolonged Role in the Neurodegeneration after Hypoxic Ischemia in the Newborn Rat*. 20(21), 7994–8004.

- Nam, S. M., Lee, M. Y., Koh, J. H., Park, J. H., Shin, J. Y., Shin, Y. G., Koh, S. B., Lee, E. Y., & Chung, C. H. (2009). Effects of NADPH oxidase inhibitor on diabetic nephropathy in OLETF rats: The role of reducing oxidative stress in its protective property. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 83(2), 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2008.10.007>
- Narbonne, P. (2018). The effect of age on stem cell function and utility for therapy. *Cell Medicine*, 10, 215517901877375. <https://doi.org/10.1177/2155179018773756>
- Odd, D., Heep, A., Luyt, K., & Draycott, T. (2017). Hypoxic-ischemic brain injury: Planned delivery before intrapartum events. *Journal of Neonatal-Perinatal Medicine*, 10(4), 347–353. <https://doi.org/10.3233/NPM-16152>
- Oorschot, D. E., Sizemore, R. J., & Amer, A. R. (2020). Treatment of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy with erythropoietin alone, and erythropoietin combined with hypothermia: History, current status, and future research. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4). <https://doi.org/10.3390/ijms21041487>
- Österreicher, C. H., Schultheiss, J., Wehler, M., Homann, N., Hellerbrand, C., Künzli, B., Friess, H., Seitz, H. K., & Stickel, F. (2007). Genetic polymorphisms of manganese-superoxide dismutase and glutathione-S-transferase in chronic alcoholic pancreatitis. *Mutagenesis*, 22(5), 305–310. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem017>
- Ota, K. I. (2008). Fuel Cells: Past, Present and Future. *IEEJ Transactions on Fundamentals and Materials*, 128(5), 329–332. <https://doi.org/10.1541/ieejfms.128.329>
- Owen, J. B., & Butterfield, D. A. (2010). Chapter 18 Measurement of Oxidized / Reduced Glutathione Ratio. *Protein Misfolding and Cellular Stress in Disease and Aging. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, 648(1), 269–277. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-756-3>
- Palmer, C., & Vannucci, R. C. (1993). Potential new therapies for perinatal cerebral hypoxia-ischemia. *Clinics in Perinatology*, 20(2), 411–432. [https://doi.org/10.1016/s0095-5108\(18\)30401-9](https://doi.org/10.1016/s0095-5108(18)30401-9)
- Paper, O. (2008). Nitrotyrosine in Human Neonatal Spinal Cord after Perinatal Asphyxia. 1–6. <https://doi.org/10.1159/000106432>

- Parfejevs, V., Sagini, K., Buss, A., Sobolevska, K., & Llorente, A. (2020). *Adult Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles in Cancer Treatment : Opportunities and Challenges*. 1–30. <https://doi.org/10.3390/cells9051171>
- Peroxidation, P. O. F. (1974). Dogma Disputed. *The Lancet*, 303(7854), 399–401. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(74\)93161-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(74)93161-4)
- Physiology, F. (2017). *HHS Public Access*. 43(3), 395–407. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2016.04.001.Fetal>
- Pimentel-Coelho, P. M., Magalhães, E. S., Lopes, L. M., Deazevedo, L. C., Santiago, M. F., & Mendez-Otero, R. (2010). Human cord blood transplantation in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain damage: Functional outcome related to neuroprotection in the striatum. *Stem Cells and Development*, 19(3), 351–358. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0049>
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). *Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells*. 284(April), 143–148.
- Practice, O., & This, G. (1996). *Abuse OF PEDIATRICS of the Apgar*. 98(1).
- Prockop, D. J. (2009). Repair of Tissues by Adult Stem / Progenitor Cells (MSCs): Controversies , Myths , and Changing Paradigms. *Molecular Therapy*, 17(6), 939–946. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.62>
- Rakshasbhuvankar, A., Paul, S., Nagarajan, L., Ghosh, S., & Rao, S. (2015). Amplitude-integrated EEG for detection of neonatal seizures: A systematic review. *Seizure*, 33, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2015.09.014>
- Ramirez, M. R., Muraro, F., Zylbersztejn, D. S., Abel, C. R., Arteni, N. S., Lavinsky, D., Netto, C. A., & Trindade, V. M. T. (2003). Neonatal hypoxia-ischemia reduces ganglioside, phospholipid and cholesterol contents in the rat hippocampus. *Neuroscience Research*, 46(3), 339–347. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(03\)00100-7](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(03)00100-7)
- Ranjbaran, H., Abediankenari, S., Mohammadi, M., Jafari, N., Khalilian, A., & Rahmani, Z. (2017). *Wharton ' s Jelly Derived-Mesenchymal Stem Cells : Isolation and Characterization*. 8.

- Razaz, N., & Ph, D. (2020). *Apgar Score and Risk of Neonatal Death among Preterm Infants*. 49–57. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1915075>
- Rekling, J. C., & Feldman, J. L. (1998). *COMPLEX AND PACEMAKER NEURONS : Hypothesized Site and Kernel for Respiratory Rhythm Generation*. 385–405.
- Review, E. (2016). *Adult Stem Cell Therapy and Heart Failure, 2000 to 2016 A Systematic Review*. 7. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2016.2225>
- Robertson, C. M. T., & Perlman, M. (2006). Follow-up of the term infant after hypoxic-ischemic encephalopathy. *Paediatrics and Child Health*, 11(5), 278–282. <https://doi.org/10.1093/pch/11.5.278>
- Robertson, N. J., Faulkner, S., Fleiss, B., Bainbridge, A., Andorka, C., Price, D., Powell, E., Lecky-thompson, L., Thei, L., Chandrasekaran, M., Hristova, M., Cady, E. B., Gressens, P., Golay, X., & Raivich, G. (2013). *Melatonin augments hypothermic neuroprotection in a perinatal asphyxia model*. 2012, 90–105. <https://doi.org/10.1093/brain/aws285>
- Robertson, N. J., Meehan, C., Martinello, K. A., Avdic-Belltheus, A., Boggini, T., Mutshiya, T., Lingam, I., Yang, Q., Sokolska, M., Charalambous, X., Bainbridge, A., Hristova, M., Kramer, B. W., Golay, X., Weil, B., & Lowdell, M. W. (2021). Human umbilical cord mesenchymal stromal cells as an adjunct therapy with therapeutic hypothermia in a piglet model of perinatal asphyxia. *Cytotherapy*, 23(6), 521–535. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.10.005>
- Rodríguez, M., Valez, V., Cimarra, C., Blasina, F., & Radi, R. (2020). Hypoxic-Ischemic Encephalopathy and Mitochondrial Dysfunction: Facts, Unknowns, and Challenges. *Antioxidants and Redox Signaling*, 33(4), 247–262. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8093>
- Role, T. H. E., Glutamate, O. F., & Death, I. N. (1990). *THE ROLE OF GLUTAMATE*.
- Roobrouck, V. D., Ulloa-Montoya, F., & Verfaillie, C. M. (2008). Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Experimental Cell Research*, 314(9), 1937–1944. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.03.006>
- Saely, C. H., & Geiger, K. (2012). *Brown versus White Adipose Tissue : A Mini-Review*. 15–23. <https://doi.org/10.1159/000321319>

- Salehinejad, P., Banu Alitheen, N., Ali, A. M., Omar, A. R., Mohit, M., Janzamin, E., Samani, F. S., Torshizi, Z., & Nematollahi-Mahani, S. N. (2012). Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 48(2), 75–83. <https://doi.org/10.1007/s11626-011-9480-x>
- Sarnat, H. B., & Sarnat, M. S. (1977). Neonatal encephalopathy following fetal distress. *Obstetrical and Gynecological Survey*, 32(5), 295–297. <https://doi.org/10.1097/00006254-197705000-00011>
- Sells, M. A. N. N., Chernoff, J., Cerda, A., Bowers, C., Shafritz, D. A., Kase, N., Christman, J. K., & Acs, G. (1985). ~Received 27 June 1984; accepted 16 November 1984). 21(4).
- Sendeku, F. W., Azeze, G. G., & Fenta, S. L. (2020). Perinatal asphyxia and its associated factors in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis. *BMC Pediatrics*, 20(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12887-020-02039-3>
- Seo, K. W., Lee, S. R., Bhandari, D. R., Roh, K. H., Park, S. B., So, A. Y., Jung, J. W., Seo, M. S., Kang, S. K., Lee, Y. S., & Kang, K. S. (2009). OCT4A contributes to the stemness and multi-potency of human umbilical cord blood-derived multipotent stem cells (hUCB-MSCs). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 384(1), 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.04.094>
- Shankaran, S., Laptook, A. R., Ehrenkranz, R. A., Tyson, J. E., McDonald, S. A., Donovan, E. F., Fanaroff, A. A., Poole, W. K., Wright, L. L., Higgins, R. D., Finer, N. N., Carlo, W. A., Duara, S., Oh, W., Cotten, C. M., Stevenson, D. K., Stoll, B. J., Lemons, J. A., Guillet, R., & Jobe, A. H. (2005). Whole-Body Hypothermia for Neonates with Hypoxic–Ischemic Encephalopathy. *New England Journal of Medicine*, 353(15), 1574–1584. <https://doi.org/10.1056/nejmcps050929>
- Sharma, D., Shastri, S., & Sharma, P. (2016). Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects. *Clinical Medicine Insights: Pediatrics*, 10, CMPed.S40070. <https://doi.org/10.4137/cmped.s40070>

- Sheng, L., & Li, Z. (2017). Adjuvant treatment with monosialoganglioside may improve neurological outcomes in neonatal hypoxic–ischemic encephalopathy: A meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS ONE*, 12(8), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183490>
- Shinoyama, M., Ideguchi, M., Kida, H., Kajiwar, K., Kagawa, Y., Maeda, Y., Nomura, S., & Suzuki, M. (2013). Cortical region-specific engraftment of embryonic stem cell-derived neural progenitor cells restores axonal sprouting to a subcortical target and achieves motor functional recovery in a mouse model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(AUG), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00128>
- States, T. U., & Hospital, H. (1998). *Neonatal encephalopathies*. 317(December), 1537–1538.
- Su-qing, Q. U. (2005). 人神经干细胞移植治疗重度新生儿 缺氧缺血性脑病一例. 43(8), 580–583.
- Sugiura-Ogasawara, M., Ebara, T., Yamada, Y., Shoji, N., Matsuki, T., Kano, H., Kurihara, T., Omori, T., Tomizawa, M., Miyata, M., Kamijima, M., & Saitoh, S. (2019). Adverse pregnancy and perinatal outcome in patients with recurrent pregnancy loss: Multiple imputation analyses with propensity score adjustment applied to a large-scale birth cohort of the Japan Environment and Children’s Study. *American Journal of Reproductive Immunology*, 81(1), 1–14. <https://doi.org/10.1111/aji.13072>
- Summanen, M., Bäck, S., Voipio, J., & Kaila, K. (2018). Surge of peripheral arginine vasopressin in a rat model of birth Asphyxia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12(January), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00002>
- Sunal, E., & Inal, M. E. (2001). *Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging*. 305, 75–80.
- Swanson, R. A., Ying, W., & Kauppinen, T. M. (2004). *Astrocyte Influences on Ischemic Neuronal Death*. 193–205.
- Tachibana, T., Shiiya, N., Kuniyama, T., Wakamatsu, Y., Kudo, A. F., Ooka, T., Watanabe, S., & Yasuda, K. (n.d.). *Immunophilin ligands FK506 and cyclosporine A improve neurologic and histopathologic outcome after transient spinal cord ischemia in rabbits*. 129(1), 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2004.04.047>

- Taghizadeh, R. R., Cetrulo, K. J., & Cetrulo, C. L. (2011). Wharton's Jelly stem cells: Future clinical applications. *Placenta*, 32(SUPPL. 4), S311–S315. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.06.010>
- Tagin, M., Shah, P. S., & Lee, K. S. (2013). Magnesium for newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Perinatology*, 33(9), 663–669. <https://doi.org/10.1038/jp.2013.65>
- The American College of Obstetricians and Gynaecologists. (2014). Executive summary: Neonatal Encephalopathy and Neurologic Outcome, Second Edition. *Obstetrics and Gynecology*, 123(4), 896–901.
- Thompson, C. M., Puterman, A. S., Linley, L. L., Hann, F. M., Van Der Elst, C. W., Molteno, C. D., & Malan, A. F. (1997). The value of a scoring system for hypoxic ischaemic encephalopathy in predicting neurodevelopmental outcome. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, 86(7), 757–761. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1997.tb08581.x>
- Thomson, J. A. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145–1147. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- Thornton, C., & Hagberg, H. (2015). Clinica Chimica Acta Role of mitochondria in apoptotic and necroptotic cell death in the developing brain. *Clinica Chimica Acta*, 451, 35–38. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.01.026>
- Thornton, C., Rousset, C. I., Kichev, A., Miyakuni, Y., Vontell, R., Baburamani, A. A., Fleiss, B., Gressens, P., & Hagberg, H. (2012). *Molecular Mechanisms of Neonatal Brain Injury*. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/506320>
- Thorp, J. A., Sampson, J. E., Parisi, V. M., & Creasy, R. K. (1989). Routine umbilical cord blood gas determinations? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 161(3), 600–605. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(89\)90362-1](https://doi.org/10.1016/0002-9378(89)90362-1)
- TND2018. (2018). *TürkNeonatolojiDerneği NeonatalEnsefalopatiRehberi*. 1–32.
- Toma, J. G., Akhavan, M., Fernandes, K. J. L., Barnabé-heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D. R., & Miller, F. D. (2001). *Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin*. 3(September).

- Tonni, G., Leoncini, S., Signorini, C., Ciccoli, L., & De Felice, C. (2014). Pathology of perinatal brain damage: Background and oxidative stress markers. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 290(1), 13–20. <https://doi.org/10.1007/s00404-014-3208-6>
- Treiber, M., Gorenjak, M., & Pecovnik Balon, B. (2014). Serum cystatin-C as a marker of acute kidney injury in the newborn after perinatal hypoxia/asphyxia. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 18(1), 57–67. <https://doi.org/10.1111/1744-9987.12054>
- Tsagias, N., Koliakos, I., Karagiannis, V., Eleftheriadou, M., & Koliakos, G. G. (2011). Isolation of mesenchymal stem cells using the total length of umbilical cord for transplantation purposes. *Transfusion Medicine*, 21(4), 253–261. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2011.01076.x>
- Uccelli, A., Moretta, L., & Pistoia, V. (2008). *Mesenchymal stem cells in health and disease*. 8(SepTembeR), 726–736. <https://doi.org/10.1038/nri2395>
- Ulloa-Montoya, F., Verfaillie, C. M., & Hu, W. S. (2005). Culture systems for pluripotent stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(1), 12–27. <https://doi.org/10.1263/jbb.100.12>
- UNICEF Report, P. (2014). Committing to Child Survival: A Promise Renewed Progress Report 2014. In *Progress Report 2012*. www.apromiserenewed.org
- Van Velthoven, C. T. J., Kavelaars, A., Van Bel, F., & Heijnen, C. J. (2010). Repeated mesenchymal stem cell treatment after neonatal hypoxia-ischemia has distinct effects on formation and maturation of new neurons and oligodendrocytes leading to restoration of damage, corticospinal motor tract activity, and sensorimotor function. *Journal of Neuroscience*, 30(28), 9603–9611. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1835-10.2010>
- Van Wincoop, M., De Bijl-Marcus, K., Lilien, M., Van Den Hoogen, A., & Groenendaal, F. (2021). Effect of therapeutic hypothermia on renal and myocardial function in asphyxiated (near) term neonates: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 16(2 February), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247403>
- Varnum, M. M., & Ikezu, T. (2012). *The Classification of Microglial Activation Phenotypes on Neurodegeneration and Regeneration in Alzheimer ' s Disease Brain*. 251–266. <https://doi.org/10.1007/s00005-012-0181-2>

- Vazin, T., & Freed, W. J. (2010). Human embryonic stem cells: Derivation, culture, and differentiation: A review. *Restorative Neurology and Neuroscience*, 28(4), 589–603. <https://doi.org/10.3233/RNN-2010-0543>
- Velthoven, C. T. J. Van, Kavelaars, A., Bel, F. Van, & Heijnen, C. J. (2009). Regeneration of the ischemic brain by engineered stem cells: Fuelling endogenous repair processes. *Brain Research Reviews*, 61(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.03.003>
- Viaroli, F., Cheung, P., Reilly, M. O., Polglase, G. R., Pichler, G., & Schmölzer, G. M. (2018). *Reducing Brain Injury of Preterm Infants in the Delivery Room*. 6(October), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00290>
- Vizoso, F. J., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J., & Perez-Fernandez, R. (2017). Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9). <https://doi.org/10.3390/ijms18091852>
- Volpe, J. J. (2012). Neonatal encephalopathy: An inadequate term for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Annals of Neurology*, 72(2), 156–166. <https://doi.org/10.1002/ana.23647>
- Wang, H., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., & Shibasaki, F. (2012). *Ca²⁺-Induced Apoptosis Through Calcineurin Dephosphorylation of BAD*. 339(1999). <https://doi.org/10.1126/science.284.5412.339>
- Wayessa, Z. J., Belachew, T., & Joseph, J. (2018). Birth asphyxia and associated factors among newborns delivered in Jimma zone public hospitals, Southwest Ethiopia: A cross-sectional study. *Journal of Midwifery & Reproductive Health*, 6(2), 1289–1295. <https://doi.org/10.22038/JMRH.2018.10483>
- Weissman, I. L. (2002). The road ended up at stem cells. *Immunological Reviews*, 185(17), 159–174. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2002.18514.x>
- Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G. D., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., & Carling, D. (2008). *LKB1 Is the Upstream Kinase in the AMP-Activated Protein Kinase Cascade*. 13, 2004–2008. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.10.031>

- Workineh, Y., Semachew, A., Ayalew, E., Animaw, W., Tirfie, M., & Birhanu, M. (2020). Prevalence of perinatal asphyxia in East and Central Africa: systematic review and meta-analysis. *Heliyon*, 6(4). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03793>
- World Health Organization. (2015). Part II: Global health indicators. *World Health Statistics 2015*, 39–160.
- Wu, Q., Chen, W., Sinha, B., Tu, Y., Manning, S., Thomas, N., Zhou, S., Jiang, H., Ma, H., Kroessler, D. A., Yao, J., Li, Z., Inder, T. E., & Wang, X. (2015). Neuroprotective agents for neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Drug Discovery Today*, 20(11), 1372–1381. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.09.001>
- Wu, Y. W., Mathur, A. M., Chang, T., McKinstry, R. C., Mulkey, S. B., Mayock, D. E., Van Meurs, K. P., Rogers, E. E., Gonzalez, F. F., Comstock, B. A., Juul, S. E., Msall, M. E., Bonifacio, S. L., Glass, H. C., Massaro, A. N., Dong, L., Tan, K. W., Heagerty, P. J., & Ballard, R. A. (2016). High-dose erythropoietin and hypothermia for hypoxic-Ischemic encephalopathy: A phase II trial. *Pediatrics*, 137(6). <https://doi.org/10.1542/peds.2016-0191>
- Yasuhara, T., Hara, K., Maki, M., Xu, L., Yu, G., Ali, M. M., Masuda, T., Yu, S. J., Bae, E. K., Hayashi, T., Matsukawa, N., Kaneko, Y., Kuzmin-Nichols, N., Ellovitch, S., Cruz, E. L., Klasko, S. K., Sanberg, C. D., Sanberg, P. R., & Borlongan, C. V. (2010). Mannitol facilitates neurotrophic factor up-regulation and behavioural recovery in neonatal hypoxic-ischaemic rats with human umbilical cord blood grafts. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(4), 914–921. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00671.x>
- Yasuhara, Takao, Hara, K., Maki, M., Mays, R. W., Deans, R. J., Hess, D. C., Carroll, J. E., & Borlongan, C. V. (2008). Intravenous grafts recapitulate the neurorestoration afforded by intracerebrally delivered multipotent adult progenitor cells in neonatal hypoxic-ischemic rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28(11), 1804–1810. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.68>
- Yasuhara, Takao, Matsukawa, N., Yu, G., Xu, L., Mays, R. W., Kovach, J., Deans, R. J., Hess, D. C., Carroll, J. E., & Borlongan, C. V. (2006). *Behavioral and Histological Characterization of Intrahippocampal Grafts of Human Bone Marrow-Derived Multipotent Progenitor Cells in Neonatal Rats With Hypoxic-Ischemic Injury*. 14, 231–238.

- Yasui, K., & Baba, A. (2006). *Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation*. 55, 359–363. <https://doi.org/10.1007/s00011-006-5195-y>
- Yıldız, E. P., Ekici, B., & Tatlı, B. (2017). Expert Review of Neurotherapeutics Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy : an update on disease pathogenesis and treatment and treatment. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 0(0), 1–11. <https://doi.org/10.1080/14737175.2017.1259567>
- Younus, H. (2018). *Therapeutic potentials of superoxide dismutase*.
- Zdeňka Ďuračková. (2010). Some current insights into oxidative stress. *Physiological Research*, 8408, 459–469. http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/59/59_459.pdf
- Zubrow, A. B., Delivoria-papadopoulos, M., & Ashraf, Q. M. (2002). *Nitric oxide-mediated Ca²⁺ / calmodulin-dependent protein kinase IV activity during hypoxia in neuronal nuclei from newborn piglets*. 335, 5–8.
- Zubrow, A. B., Delivoria-papadopoulos, M., Ashraf, Q. M., & Ballesteros, J. R. (2002). *Nitric oxide-mediated expression of Bax protein and DNA fragmentation during hypoxia in neuronal nuclei from newborn piglets*. 954, 60–67.