



**T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ**

**ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**NEONATOLOJİ BİLİM DALI**

**HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI OLUŞTURULMUŞ  
YENİDOĞAN SIÇANLARDA TÜMÖR NEKROZİS  
FAKTÖR ALFA BASKILAYICISI (ETANERSEPT) VE  
NİTRİK OKSİT SENTAZ BASKILAYICISI (L-NAME)  
UYGULAMASININ NÖRONAL APOPTOZİS VE MOTOR  
YETİLER ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZ. DR. AZİZ ÖZKAN  
YAN DAL UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. AYTUĞ ATICI**

**MERSİN - 2009**



**T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
NEONATOLOJİ BİLİM DALI**

**HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI OLUŞTURULMUŞ  
YENİDOĞAN SIÇANLARDA TÜMÖR NEKROZİS  
FAKTÖR ALFA BASKILAYICISI (ETANERSEPT) VE  
NİTRİK OKSİT SENTAZ BASKILAYICISI (L-NAME)  
UYGULAMASININ NÖRONAL APOPTOZİS VE MOTOR  
YETİLER ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZ. DR. AZİZ ÖZKAN  
YAN DAL UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. AYTUĞ ATICI**

**MERSİN – 2009**

## TEŐEKKÜR

Yan Dal Uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalıőmamda bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, ayrıca çalışma disiplini, hoőgörsü, sabrı, etik ve insancıl davranıőlarını yaőamım boyunca kendime örneğ alacağım tez danıőmanım Sayın Prof. Dr. Aytuğ Atıcı' ya ve eğitimime katkı sağlayan ocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerine; tez çalıőmam süresince katkılarını esirgemeyen Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Hüseyin Beydağı, Araştırma Görevlileri Bora Reőitođlu ve Figen Dağ' a, Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Ayőe Polat' a, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Lölüfer Tamer' e, Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Arzu Kanık ve Araştırma Görevlisi Mehmet Ali Sungur' a; ocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı asistanları ve çalıőanlarına; Neonatoloji Bilim Dalı asistan, hemőire ve çalıőanlarına; Deneysel Araştırma Laboratuvarı çalıőanlarına; sevgi ve özverileriyle güçlüklerin üstesinden gelmemde desteklerini esirgemeyen sevgili eőim Ayőe'ye, kızım Zeynep'e ve tüm aileme en içten duygularla teőekkürlerimi sunarım.

Uz. Dr. Aziz Özkan

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	5
İNGİLİZCE ÖZET .....	7
GİRİŞ VE AMAÇ .....	9
GENEL BİLGİLER .....	12
Hipoksik İskemik Beyin Hasarı .....	12
HİBH'de Patofizyoloji.....	13
HİBH'de Klinik Bulgular .....	20
HİBH'de Histolojik Bulgular .....	23
HİBH Tanısı .....	25
HİBH'de Tedavi .....	28
HİBH'de Prognoz .....	39
Sıçanların Bilişsel ve Lokomotor Yetilerinin Değerlendirilmesi.....	40
Açık Alan Deneyi.....	42
GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	44
Gereçler.....	44
Yöntem.....	46
Histopatolojik Değerlendirme .....	48
Biyokimyasal Değerlendirme.....	49
Açık Alan Deneyi.....	50
BULGULAR .....	52
Apoptoz Bulguları .....	52
Malondialdehid Düzeyi .....	61
Açık Alan Deneyi Bulguları .....	62
TARTIŞMA.....	64
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	73
KAYNAKLAR .....	75
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	89
RESİMLER VE ŞEKİLLER DİZİNİ .....	91
TABLO DİZİNİ .....	93

## ÖZET

Perinatal dönemde oluşan hipoksik iskemik beyin hasarı (HİBH) zeka geriliğinin, görme ve işitme kaybının, motor kusurların, epilepsinin, beyin felcinin ve ölümün en önemli nedenlerinden biridir. Hipoksi-iskemi ve yeniden kanlanma sonrasında gelişen apoptozisin şiddeti beyin hasarının bir göstergesidir.

HİBH önlemeye yönelik olarak apoptozisin baskılanması yeni bir tedavi yaklaşımı olarak görülmektedir. Hipoksi ve iskemiye takiben yeniden kanlanma dönemine geçmeden verilecek tedaviler ile hasarı önleme ya da azaltma mümkün olabilir. Bu çalışmada, HİBH oluşturulan yenidoğan sıçan modelinde nitrik oksit sentaz baskılayıcısı olan L-NAME' in ve tümör nekrozis faktör- alfa ile reseptör düzeyinde yarışmaya girerek baskılayan etanersept'in nöronal apoptozis ve lokomotor aktivite üzerine olan etkileri araştırıldı.

Çalışmaya alınan sıçanlar dört gruba ayrıldı. Grup B (n:30), Grup C (n:30) ve Grup D (n:30)' deki sıçanlara orta hat kesisi yapılarak sağ karotid arterleri bağlandı. Bu sıçanlar %8 oksijen içeren hipoksi odacığında iki saat bekletildi. Hipoksi sonrası Grup B' dekilere serum fizyolojik (SF), Grup C' dekilere etanersept (10 mg/kg) ve Grup D' dekilere L-NAME (50 mg/kg) periton içi yolla (intraperitoneal, i.p) verildi. Grup A' daki sıçanların (n:30) ise karotid arterleri bulundu, fakat bağlanmadı. Bu sıçanlara hipoksi de uygulanmadı. Her gruptan 15 adet sıçan hipoksi sonrası ikinci saatte dekapite edilerek beyinde apoptotik nöron sayısı ve serum malondialdehid (MDA) düzeylerine bakıldı. Kalan sıçanların uzun dönemdeki motor yetileri açık alan deneyi ile değerlendirildi.

TUNEL ve Kaspaz-3 yöntemi ile boyanan apoptotik hücre sayısının grup B' deki sıçanlarda diğer gruptakilere göre anlamlı bir şekilde fazla olduğu saptandı ( $p<0.001$ ). Serum fizyolojik verilen gruplarla karşılaştırma yapıldığında, hipoksi-iskemi sonrası etanersept veya L-NAME verilmesi her iki beyin yarısındaki apoptotik hücre sayılarını anlamlı derecede azalttığı görüldü ( $p<0.001$ ).

Plazma MDA düzeyi de grup B' deki sıçanlarda daha yüksekti ancak, gruplar arası karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Doğumdan sonraki 10. haftada lokomotor aktivite açık alan deneyi ile değerlendirildi. Grup B' deki sıçanların ortalama hareket hızları ve birim

zamanda katettikleri mesafe diğer üç gruptaki sıçanlara göre daha düşük bulundu, ancak bu durumun istatistiksel bir öneminin olmadığı anlaşıldı.

Sonuç olarak çalışmamız; sıçanlarda HİBH oluşturulduktan kısa süre sonra 10 mg/kg dozunda etanersept veya 50 mg/kg dozunda L-NAME kullanımının nöronal apoptozu azaltarak hipoksi-iskeminin akut dönem etkilerini azalttığını ancak belirtilen dozlarda sıçanların lokomotor aktivitelerinde belirgin bir düzelme olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte lokomotor aktivitenin etanersept verilen grupta SF verilen gruba göre daha iyi olması etanersept ile ilgili olumlu düşüncelerimizin devam etmesine yol açmıştır. Benzer deneylerin farklı dozlarda ilaç uygulanarak tekrarlanmasıyla, L-NAME ve etanerseptin beyinde oluşturulan hipoksi-iskemi üzerine muhtemel etkilerinin erken ve geç dönemde değerlendirilmesinin gerekli olduğu kanısına varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Apoptozis, etanersept, hipoksik iskemik beyin hasarı, L-NAME, lokomotor aktivite.

## ABSTRACT

### **The effects of Tumour Necrosis Factor Alpha Receptor Antagonist (Etanercept) and Nitric Oxide Synthase Inhibitor (L-NAME) on Neuronal Apoptosis and Locomotor Activity in Rats after Hypoxic Ischemic Brain Injury**

Perinatal hypoxic ischemic brain injury (HIBI) is encountered one of the major causes of mental retardation, visual and auditory impairment, motor deficiencies, epilepsy, stroke, and death. The severity of hypoxia-ischemia and the increased number of the apoptotic neurons after reperfusion period are indicators of the brain injury.

The suppression of the apoptosis prevent HIBI is regarded as a novel treatment approach. There is the likelihood of preventing or minimizing the injury through the treatments to be administered prior to reperfusion, following hypoxia and ischemia. In this study, the effects of the nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME) and tumor necrosis factor-alpha competitive inhibitor (Etanercept) on neuronal apoptosis and locomotor activity in neonatal rat model of HIBI were investigated. The rats included in the study were divided into four groups. Midline incision was performed on the rats in Group B (n:30), Group C (n:30), and Group D (n:30) and their right carotid arteries were ligated. These rats were kept in a hypoxia chamber containing 8% oxygen for two hours. After the hypoxia, normal saline was administered intraperitoneally to the rats in Group B, etanercept (10 mg/kg) to those in Group C, and L-NAME (50 mg/kg) to those in Group D. The carotid arteries of those in Group A (n:30) were located, but were not ligated. The rats in this group were not exposed to hypoxia either. 15 rats from each group were decapitated two hours later than drug administration. The number of apoptotic neurons in the brain were recorded and plasma malondialdehyd (MDA) levels were measured. The long-term motor capabilities of the remaining rats were evaluated through open field tests.

The number of the apoptotic neurons dyed by TUNEL and Caspase-3 methods was observed to be significantly higher in Group B compared to the other groups ( $p < 0.001$ ). The administration of etanercept or L-NAME to the rats soon after HIBI, significantly reduced the number of apoptotic cells in both hemispheres of the brain compared to those received normal saline ( $p < 0.001$ ).

Plasma MDA levels were also higher in group B rats, but no statistically significant difference was identified in the comparison among the groups.

Locomotor activity was evaluated through open field tests at the 10<sup>th</sup> week of birth. The average speed activity of the rats in group B and the distance they covered in a unit of time were found to be lower compared to those in the other three groups, which was not regarded as statistically significant.

In conclusion, the present study revealed that the administration of etanercept at a dose of 10 mg/kg or L-NAME at a dose of 50 mg/kg to the rats shortly after HIBI significantly reduced neuronal apoptosis and minimized the effects of hypoxic-ischemia during the acute period. There was no apparent improvement in the locomotor activity of the rats by using those drugs at the mentioned dose. However, the fact that locomotor activity in etanercept-administered group was better compared to the group which was administered normal saline supported our views about etanercept. Evaluation of the effects of varying doses of L-NAME and etanercept in the similar experimental settings may give important clues in early and late period of HIBI.

**Key words:** Apoptosis, etanercept, hypoxic-ischemic brain injury, L-NAME, locomotor activity.

## GİRİŞ VE AMAÇ

Yenidoğanda hipoksik iskemik beyin hasarı (HİBH) bu dönemde meydana gelen ölümlerin, beyin felcinin, zeka geriliğinin ve epilepsinin en önemli nedenlerinden biridir<sup>1</sup>. Gelişmiş toplumlarda HİBH görülme insidansı 1000 canlı doğumda 0.4-0.7 olup, buna bağlı ölüm ve nörolojik hasar gelişme insidansı 1000 canlı doğumda 0.2-1.3 olarak bildirilmektedir<sup>2</sup>. Hipoksizde gelişmekte olan beyinde seçilmiş bölgeler hasar görmektedir<sup>3</sup>. Olgunlaşmamış beynin hipoksi ve iskemiye yanıtı olgunlaşmış beyninkinden farklı olduğu bilinmektedir<sup>4,5</sup>.

Hipoksi-iskemi ve yeniden kanlanma sonrasında gelişen apoptozisin şiddeti beyin hasarlanmasının bir göstergesi olabilir. Yapılan çalışmalarda yenidoğan döneminde gelişen hipoksik iskemik beyin hasarında apoptozisin nekrozdan daha önemli olduğu gösterilmiştir<sup>6,7</sup>. Hipoksi ve iskemiye takiben başlayan yeniden kanlanma dönemi ağır hasarın olduğu en kritik evredir. Bu dönem başlamadan yapılacak tedaviler ile HİBH'yi önleme ya da azaltma mümkün olabilir<sup>8</sup>.

Yenidoğanın HİBH modellerinde nöronal hasarı önlemek için çeşitli farmakolojik ilaçlar ve yöntemler kullanılmıştır. Nitrik oksit (NO) çeşitli çalışmalarda HİBH patogenezinde önemli bir mediatör olarak rol oynadığı bildirilmektedir<sup>9,10</sup>. Vücutta bir çok dokuda NO sentezlenmektedir. Nitrik oksit sentaz (NOS) arjininden sitrulin oluşumunu uyarır ve bu reaksiyon sırasında NO oluşur. NO guanilat siklazı uyararak guanozin trifosfatın (cGTP) guanozin monofosfata (cGMP) dönüşümünü sağlar. Artan cGMP' de protein kinazı ve iyon kanallarını aktif hale getirir. Bunun sonucunda hücre içi kalsiyum azalır ve gevşeme sağlanır. NO vasodilatasyon yapıcı, trombosit kümeleşmesini önleyici ve süper oksitleri temizleyici işlevleri ile ilk bakışta koruyucu bir faktör görünümündedir. Ancak kuvvetli oksidanlara dönerek süper oksitlerin toksisitesini artırır. O<sub>2</sub> ile NO' nun birleşmesiyle peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) oluşmakta, bu da OH<sup>-</sup> ne dönüşmektedir<sup>11</sup>. Bu reaksiyonlar sonucunda lipid peroksidasyonu, DNA parçalanması, plazma antioksidanlarının azalması, protein hasarı ve endotelial düz kas gevşemesinin engellenmesi gibi nedenlerle hücrel hasar oluşur. NOS N-metil-L-arginin, N-nitro-L-arginin ve N-amino-L-arginin gibi L-arginin analoglarınınca baskılanmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda NOS inhibitörlerinin doku hasarını koruyucu etkisinin olabileceği ileri

sürülmüştür<sup>12,13</sup>. Jing Chen ve arkadaşları sodyum nitroprusid vererek febril konvulsiyon oluşturdukları sıçan modelinde, plazma NO seviyesinin ve buna bağlı olarak apoptozisin arttığını, L-NAME uygulanmasıyla nöronal apoptozisin baskılandığını göstermişlerdir<sup>14</sup>. NOS baskılayıcısı olan L-NAME' in iskemi öncesi i.p verilmesi ile testislerde germ hücre apoptozisini engellediği ve testiküler iskemik hasarı baskıladığı gösterilmiştir<sup>15</sup>. Ancak L-NAME' in nöronal apoptozis üzerine erken dönemdeki etkileri ve uzun dönemde lokomotor aktivite üzerine olan etkileri bilinmemektedir.

HİBH' de sitokin ilişkili beyin zedelenmesi konusu giderek önem kazanmaktadır. Proinflamatuvar sitokinler içinde TNF-alfa ve IL-1' in sitokin kaskadında çok önemli rolleri vardır. Sitokinlerin başlıca etkileri endotel hücresi aktivasyonu, lökosit endotel yapışması, lökositlerin enflamasyon bölgesine kemotaksisi, serbest oksijen radikalleri salınımı, NO sentezi, degranülasyon, sodyumun hücre içine girişi, fagositoz ve prokoagülan aktivitedir<sup>16</sup>. TNF-alfa' nın apoptozis aktivatörü olduğu bilinmektedir. TNF-alfa esas olarak T lenfositler, makrofajlar, astrositler, mikroglia ve nöronlar tarafından sentezlenir. Gebeliğin 19-20. günlerinde E.Coli lipopolisakkaritleri verilen sıçanların yenidoğan yavrularında beyinde anlamlı TNF- alfa, İL-6, İL-1 beta ekspresyonu saptanmıştır. Ayrıca striatum düzeyinde artmış TUNEL-pozitif hücre (apoptotik hücre) saptanmıştır<sup>17</sup>. Ancel ve arkadaşları ağır HİBH' li ve nöroradyolojik görüntüleme ile beyin zedelenmesi saptanan 20 bebekte yüksek BOS IL-6 ve TNF-alfa düzeylerini saptamışlardır<sup>18</sup>. Yoon ve arkadaşları postmortem incelemelerde periventriküler lokomalazi lezyonlarının geliştiği dokularda histokimyasal olarak TNF- alfa ve İL-6 yüksekliğini göstermişlerdir<sup>19</sup>.

Doku hasarlanmasında önemli bir mediatör olarak rol oynayan TNF-alfa' nın hücreler üzerindeki istenmeyen etkileri reseptör düzeyinde engellenebilir. Etanersept TNF-alfa' nın kompetitif baskılayıcısı olarak hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanmasını engeller ve biyolojik aktivitesini önler. Böylece TNF-alfa' ya bağlı gelişen hücresel yanıtları engellemiş olur. Etanersept, TNF-alfa' ya göre hücre yüzey reseptörlerine daha yüksek affinite ile bağlanırlar. HİBH oluşturulan hayvan modellerinde etanersept kullanımı ve apoptozis üzerine etkileriyle ilgili yayımlanmış bir makale bulunmamaktadır. Orta serebral arter tıkanıklığı yapıldığı deneysel hayvan çalışmasında, iskemiden önce anti-TNF-alfa monoklonal antikörlerin ventrikül içine verilmesi ile bölgesel iskemik

beyin hasarının %20.2 oranında azaldığı gösterilmiştir<sup>20</sup>. Bir diğer orta serebral arter tıkanıklığı yapılarak oluşturulan beyin hasarı modelinde, iskemiden 15 dakika önce TNF-alfa dönüştürücü enzim baskılayıcısının verilmesi ile beyindeki infarkt alanının %43 ila %58, nörolojik defisit ise %23 ila %36 oranında azaldığı gösterilmiştir<sup>21</sup>. Deneysel olarak kolit oluşturulduktan sonra etanersept uygulanmasının enterositlerde apoptozisi azalttığı gösterilmiştir<sup>22</sup>.

Etanersept güçlü bir TNF-alfa reseptör baskılayıcısıdır. Literatürde, deneysel hayvan modellerinde etanersept'in kullanımıyla ilgili sınırlı sayıda çalışma olmasına rağmen, bilgilerimize göre HİBH oluşturulan hayvan modellerinde etanersept kullanımı ve nöronal apoptozis üzerine etkileriyle ilgili yayımlanmış bir makale bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, HİBH oluşturulan yenidoğan sıçan modelinde NOS baskılayıcısı olan L-NAME' in ve TNF- alfa reseptör baskılayıcısı olan etanersept'in nöronal apoptozis üzerine ve uzun dönemde lokomotor aktivite üzerine olan etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## GENEL BİLGİLER

### Hipoksik İskemik Beyin Hasarı

Yenidoğanda hipoksik iskemik beyin hasarı (HİBH) mortalitenin, serebral palsinin, mental geriliğin ve epilepsinin en önemli nedenlerinden biridir<sup>1</sup>. Hipoksi kanda oksijenin normalden az olmasıdır. Hipoksi durumunda kan beyin, kalp ve adrenal beze toplanır. Akciğer, böbrek, barsak ve ciltten uzaklaşır. Hipoksi ağır ise, öncelikle talamus ve beyin sapı hasar görmektedir. Sonrasında ventrikül çevresindeki beyaz cevherde nekroz gelişir<sup>23</sup>. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, hipoksizde gelişmekte olan beyinde seçilmiş bölgeler hasar görmektedir<sup>3</sup>. İskemi ise bir doku veya organdaki kan akımının azalması veya kesilmesini ifade eder. İskemi durumunda dokuya yeterli oksijen ve besin maddeleri gidemeyeceğinden ve toksik maddeler uzaklaştırılamayacağından hipoksiye göre daha ağır bir hasar oluşur. Olgunlaşmamış beynin hipoksi ve iskemiye yanıtı olgunlaşmış beyninkinden farklı olduğu bilinmektedir<sup>4,5</sup>.

Hipoksi ve iskemi, fetüs ve yenidoğanın beyinde hasara yol açan nedenlerin başında gelmektedir. Gelişmiş toplumlarda HİBH görülme insidansı 1000 canlı doğumda 0.4-3.7 olup, buna bağlı ölüm ve nörolojik hasar gelişme insidansı 1000 canlı doğumda 0.2-1.3 olarak bilinmektedir<sup>2</sup>. Gelişmekte olan ülkelerde HİBH görülme oranı daha yüksek olarak bildirilmektedir<sup>24</sup>.

Asfiksi, hipoksi ve iskeminin bir arada görüldüğü bir süreçtir. Anne, fetus ve plasentadan oluşan biyolojik birimin işlevleri veya doğum sonrası akciğerde gaz değişiminin bozukluğu mevcuttur. Buna bağlı olarak fetus ve yenidoğanda hipoksemi, hiperkapni ve asidoz ile birlikte klinik bulgular gelişir<sup>25</sup>. Asfiksi tanısı düşük apgar skoru, kord kanında asidoz ve hipoksik iskemik hasara bağlı yenidoğanda ortaya çıkan klinik bulgularla konur<sup>26</sup>.

Fetüs ve yenidoğanda asfiksiye neden olan durumlar şunlardır:

#### A. Anneye Ait Nedenler

- a. Anne yaşının 16' dan küçük 40' tan büyük olması
- b. Düşük sosyoekonomik durum
- c. Diyabet
- d. Kronik hastalıklar (böbrek, akciğer, karaciğer vb)
- e. Hipertansif hastalıklar
- f. Annede tiroid hastalıkları
- g. Tüberküloz

- h. Sistemik Lupus Eritematozis
- ı. Psikoz, epilepsi, zeka geriliği
- i. Ağır anemi
- j. İskelet anomalileri
- k. Gebelik toksemisi
- l. Perinatal enfeksiyonlar
- m. Alkol ve narkotik ilaç alışkanlığı
- n. Annenin Magnezyum veya antikonvülzan ilaç kullanması

#### **B. Plasentayla İlgili Nedenler**

- a. Kalsifikasyon
- b. Anormal yerleşim
- c. Gelişim bozuklukları
- d. İnflamatuvar değişiklikler
- e. Ödem veya infarkt olması

#### **C. Göbek Kordonuyla İlgili Nedenler**

- a. Kısa kordon
- b. Kordon sarkması
- c. Kordon dolanması

#### **D. Fetüsle İlgili Nedenler**

- a. Çoğul gebelikler
- b. Zamanından önce doğum veya zamanından sonra doğum
- c. Fetal anomaliler (hidrosefali gibi)
- d. Anemi (hidrops, eritroblastozis fetalis vb.)
- e. Fetal enfeksiyonlar
- f. İri fetus
- g. İntrauterin gelişme geriliği

#### **Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Patofizyoloji**

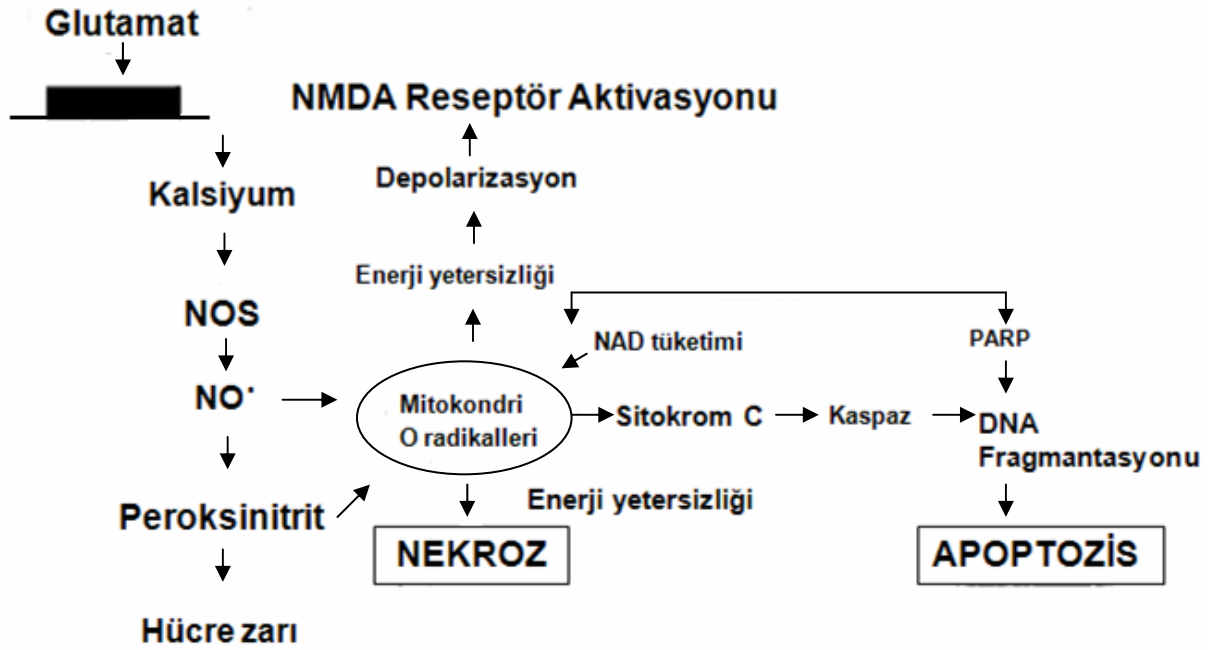
Perinatal hipoksik iskemik beyin hasarının patofizyolojisinden sorumlu temel olay plasentada yetersiz gaz değişimi veya akciğerlerde ventilasyonun bozulmasıdır. Bunun sonucunda oksijen ve karbondioksit değişimi bozulmaktadır. Böylece arteriyel hipoksemi, hiperkarbi ve asidoz oluşmaktadır<sup>25,27</sup>.

Altta yatan patolojik olayın bilinmesi hastalığın tüm yönlerinin anlaşılmasını sağlayacaktır. Yenidoğandaki hipoksik beyin hasarına hipoksi ve

iskemi birlikteliği neden olur. Olgunlaşmamış beynin hipoksi ve iskemiye yanıtının erişkin beyninden farklı olduğu bilinmektedir<sup>28</sup>. Hipoksemi ağır ise çevresel dokularda ve beyinde anaerobik glikolizide artma, laktik asit oluşumunda artma meydana gelir. Ayrıca yüksek enerjili fosfat yapımında azalma, hücre içi kalsiyum ve hücre dışı potasyum birikimi olmaktadır. Bununla birlikte serbest radikal oluşumu, uyarıcı aminoasit metabolizmasında bozulma meydana gelmektedir<sup>29,30</sup>.

Hipoksi ve iskemiye takiben başlayan reperfüzyon dönemi ağır hasarın oluştuğu evredir. Bu dönem başlamadan yapılacak tedaviler ile beyin hasarını önleme ya da azaltma mümkün olabilir<sup>8</sup>. Hipoksi iskemi durumunda öncelikle kalp, beyin, adrenal gibi hayati önemi olan organlara daha fazla kan gitmektedir. Böylece böbrekler, mide-barsak sistemi, karaciğer, kas ve deriye giden kan akımı azalmaktadır. Olayın uzun sürmesi durumunda beyin içindeki kan akımında da yeniden düzenleme olur. Talamus, bazal ganglionlar, beyin sapı ve serebelluma daha fazla kan gönderilmektedir. Olgularda 6-12 saatlik sessiz bir dönemden sonra konvülsiyonlar ortaya çıkmaktadır. 24-48 saat içinde ise genellikle beyin ödemi gelişir.

HİBH'de hücre ölüm nekroz ve/veya apoptozis ile olmaktadır. Bu iki mekanizmada en belirgin fark apoptozisde inflamasyon olmamasıdır<sup>31</sup>. Deneysel çalışmalarda, tek başına hipoksinin değil, hipoksi ile beraber sistemik kan basıncının düşüklüğü varsa beyin hasarının arttığı görülmüştür. HİBH modelinde hücre içi asidoz ve kalsiyum birikimi önemlidir. Hücre içi kalsiyum artışının başlıca nedeni sinapslardan uyarıcı aminoasitlerin salınmasıdır<sup>32,33</sup>. İnsanda en çok bulunan uyarıcı aminoasit glutamattır. Yapılan çalışmalar glutamat reseptörlerinin uyarılması nöronal hücre ölümünde anahtar rol oynadığını göstermektedir<sup>34</sup> (Şekil 1). Glutamat, özgün reseptörleri ile etkileşerek duysal bilgilerin iletilmesi, motor aktivite, spinal reflekslerin düzenlenmesi, hafıza ve öğrenme gibi birçok işlevde önemli rol oynamaktadır<sup>35</sup>.



**Şekil 1: Glutamatın Tetiklediği Nekroz ve Apoptoz**

Glutamat için dört reseptör bilinmektedir.

1. NMDA (N-metil D-aspartat) reseptörü
2. AMPA (alfa amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazol propionik asid) reseptörleri
3. Kainat reseptörleri
4. Metabotropik reseptörler

NMDA reseptörleri glutamatın bağlanması sonrasında sodyum ve kalsiyumun hücre içine girişine, potasyumun ise hücre dışına çıkışına neden olurlar. Hücre içi kalsiyum düzeyinin yükselmesi sonucu, serbest radikal oluşumu ve mitokondriyal hasar meydana gelmektedir<sup>36,37</sup>. AMPA reseptörlerin uyarılması sonucunda sodyum hücre içine girer, potasyum ise hücre dışına çıkar. AMPA reseptörleri quisqualat reseptörleri olarak da bilinirler. Kainat reseptörlerinin, NMDA reseptörlerinin spinal korda eksitator nörotransmisyonunda yönetici özelliği olduğu düşünülmektedir. Hücre içi kalsiyum artışına, hücre içi magnezyumun düşüşüne neden olmaktadır. Hücre içi kalsiyum artışına bağlı olarak proteaz, lipaz, fosfotaz ve endonükleaz gibi litik enzimler uyarılır. Hücre içi magnezyumun düşüşü de nöronal hasarın şiddetlenmesine neden olur. Metabotropik reseptörlerin uyarılması sonucu fosfolipaz C aktif hale gelir ve bunun sonucunda hücre içinde bağlı olan

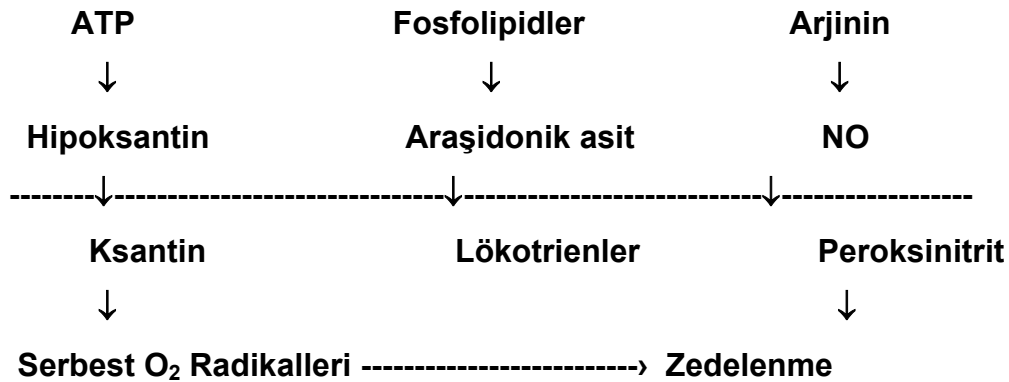
kalsiyum serbest hale gelir.

Hipoksiye ilk metabolik yanıt anaerobik glikolizdir. Ancak bu yolla yeterli ATP üretilmez ve laktik asidoz olur. ATP miktarında azalma ile çeşitli iyon pompaları (özellikle Na-K pompası) görevlerini yerine getiremez hale gelirler. İyon pompasının işlevi kaybolduğunda nöronal membran değişmeye başlar. Bazı nöronlar hiperpolarize (örneğin CA1 ve CA3 hipokampal nöronlar) diğerleri depolarize olur. Eğer anoksi devam ederse bütün hücreler hızlı ve belirgin depolarizasyona uğrarlar. Bunun sonucunda membran potansiyeli tamamen kaybolur. Nöronal membran potansiyeli kaybolduğu zaman belirgin iyon değişiklikleri olur. Bunlar hücre içine sodyum, klor ve kalsiyum girişi ve hücreden potasyum çıkışıdır. Hücre içi kalsiyum yükselir, hücre dışı potasyum önemli miktarda artar ve hücre dışı kalsiyum, sodyum ve klor azalır. Glutamatın hücre dışı yoğunluğunda önemli miktarda artış vardır. Bu durum nörotransmitter salınımında artma ve hücre içine geri almanın azalması sonucu oluşur. Sonuçta nöronal eksitator reseptörlerin aşırı uyarılması ve ölüm gerçekleşir. Eksitotoksinlerin nasıl hücre ölümünü uyardıkları tam olarak açıklanamamıştır. Hızlı hücre ölümü fazla sodyumun iyon kanalları yoluyla içeri girmelerinden dolayı oluşur. Bu da klorun nöronlara girmesine neden olur. Artmış hücre içi klor daha fazla katyonun hücre içine girmesini uyarır. Klor ve katyon girişi suyu hücre içine çeker ve sonuçta osmotik parçalanma olur. Hücrede en önemli hasar kalsiyum girişi ile olur. Hücre içinde aşırı kalsiyum iyonu birikimi bir dizi olaylara sebep olur<sup>38,39</sup>.

1. Fosfolipaz A<sub>2</sub> aktivasyonu
  2. Yağ asitlerinin serbestleşmesi
  3. Toksik eikosanoidlerin sentezi
  4. Serbest radikallerin ortaya çıkması
  5. Kalsiyuma bağımlı ATP aktivasyonu sonucu enerji rezervlerinin tükenmesi
  6. Hücre iskeletinin mikrotubuler ve nörofilament komponentlerinin farklılaşması
  7. Mitokondrial oksidatif fosforilasyonun bozulması
  8. Aksonal dejenerasyon
  9. Proteaz, fosfataz ve endonükleaz gibi litik enzimlerin aktivasyonu
- Hücre içindeki kalsiyumun sürekli artışı katabolik enzimlerin (özellikle

fosfolipazlar, proteazlar ve endonükleazlar) uyarılmasına neden olur. Katabolik enzimlerin uyarılması sonucunda zardaki fosfolipitler bozulur. Hücre içi kalsiyum artması ile fosfolipaz A<sub>2</sub> uyarılır ve araşidonik asit salınır, böylece hücre hasarı oluşur. Proteazların uyarılması ile yapısal zar proteinleri yıkılır. Lipazların uyarılması ile lipid peroksidasyonu olur. Endonükleazların uyarılması ile genetik yapı bozulur. Prostaglandinler salınır, böylece mikrovasküler geçirgenlik ve vazodilatasyon artar. Kalsiyum ayrıca nitrik oksit sentazı uyarır ve nitrik oksit oluşumu artar ve bu da serbest oksijen radikalleri üretimini artırır<sup>40</sup> (Şekil 2). Serbest oksijen elektron transport zinciri içinde suya dönüşürken oksijen radikalleri oluşur (Şekil 3). En zararlı radikal hidroksil (OH<sup>-</sup>) radikalidir. NO siklik GMP oluşumunu bozarak hasara neden olur. NO ayrıca oksijen ile reaksiyona girerek DNA hasarı ve membran lipid peroksidasyonuna neden olan süperoksit, peroksit ve peroksinitrit serbest radikallerini oluşturur<sup>40</sup>. Bunlar apoptozisin potansiyel uyarıcılarıdır. NO'nun deneysel çalışmalarda fokal serebral iskemiye yol açtığı ve bu hasarın NOS inhibitörleri ile önlenebileceği gösterilmiştir<sup>41</sup>.

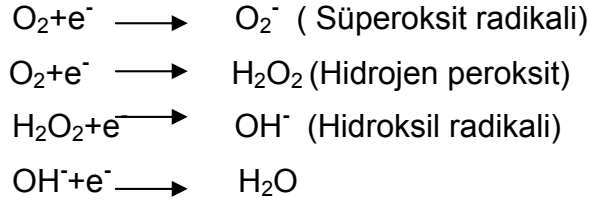
#### Hipoksi – iskemi (eksitatör aminoasit etkisi)



#### Oksijenizasyon-Reperfüzyon

**Şekil 2: Reperfüzyon reoksijenizasyon döneminde serbest O<sub>2</sub> radikallerinin oluşumu**

Yenidoğan beyinde antioksidanların eksik olması hasarın daha da ağır olmasına neden olur.



### Şekil 3: Serbest oksijenin suya dönüşümü

HİBH'de geç dönemdeki nöronal ölüm saatler ve günler içerisinde gelişen apoptozis meydana gelir. Yapılan çalışmalarda yenidoğan döneminde gelişen hipoksik iskemik beyin hasarında apoptozisin nekrozdan daha önemli olduğu gösterilmiştir<sup>6,7</sup>. Apoptoz süreci, DNA hasarına genlerin yanıtı, hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınması (Fas ligandı), hücreye doğrudan proteolitik enzim girişi (granzim) olmak üzere üç farklı şekilde işleyebilir. Bu süreçte belli başlı üç anahtar bileşen vardır. Bunlar: Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1) proteindir. Bu bileşenlerin biyokimyasal aktivasyonu ile apoptozda gözlenen mitokondriyal hasar, çekirdek zarı kırılması, DNA parçalanması, kromatin marjinasyonu ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişiklikler ortaya çıkar<sup>42</sup>. Apoptozis çok sayıda mediatör tarafından düzenlenir. Bunlar arasında, bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (bcl-2), proteinler (p53) ve hatta organeller bulunmaktadır<sup>7</sup>. Apoptozis sürecinde hücre içine sürekli olarak kalsiyum girer. Kalsiyum iyonu da endonükleaz, proteaz, lipaz ve deoksiribonükleaz aktivasyonuna neden olur. Ayrıca kalsiyum reaktif oksijen moleküllerinin artışına neden olur. Seramid apoptotik etkisini proteazları ve endonükleazları aktive ederek DNA parçalanmalarına sebep olarak yaptığı sanılmaktadır<sup>43</sup>. Bcl-2 dış mitokondri zarında bazı proteinler aracılığıyla geçirgenlik artışı sağlayarak apoptozise neden olmaktadır. Bcl-2 ailesinin bir kısmı apoptozisi uyarırken bir kısmı ise inhibe etmektedir (Tablo 1). P53 geni bax proteinini aktive ederek Bcl-2/Bax oranını değiştirerek apoptozise neden olmaktadır. Apoptozisin düzenlenmesi Bcl-2/Bax gen ailesi ile sağlanır<sup>44,45</sup>. Bu ailenin 20 üyesi tanımlanmıştır<sup>46</sup>. Bunlardan bazıları Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Boo, Mcl-1 gibi apoptoz inhibitörüdür. En iyi tanımlanmış antiapoptotik gen bcl-2'dir. Bazı genler ise apoptozu uyarır ve proapoptotik genler olarak tanımlanır. Proapoptotik genler: Bax (Bax, Bak5) ve BH3 (Bik, Blk, Hrk, BNIP3, Bad, Bid

gibi) olmak üzere iki alt aileye sahiptir<sup>43</sup>. Apoptozu başlatan ve engelleyen genler yaşamsal dengenin sağlanmasında önemlidir.

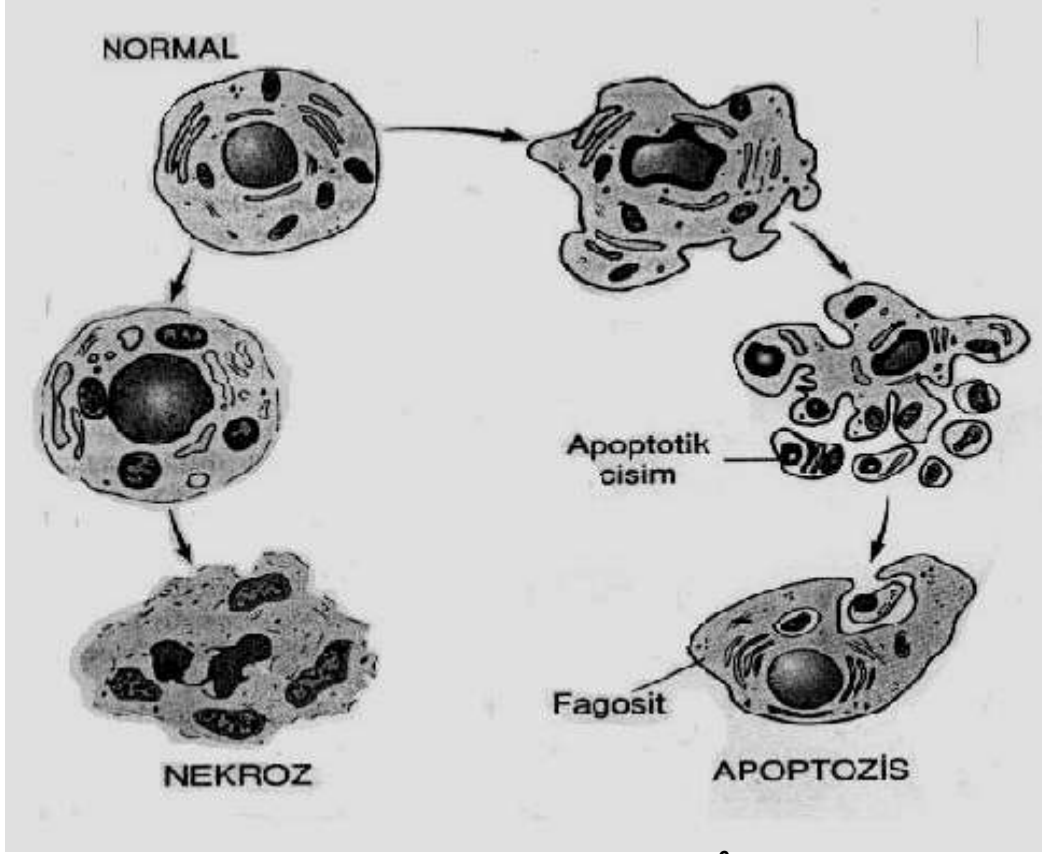
**Tablo 1 : Apoptozis ve Genler**

Apoptozisi baskılayan genler	Apoptozisi uyaran genler
bcl-2	bad Hrk 1
bcl-xl	bax c-myc
bcl-w	bak p53
bfl-1	bcl-xS p21
brag-1	bid
mcl-1	bik

Kaspazlar apoptotik programın önemli bir bileşenidir. Görevleri sitokin üretimine katkıda bulunmak ve proteolizisi başlatmaktır. Kaspaz aktivasyonu hücreye özgüdür. Kaspaz inhibitörlerinin apoptozisi engellediği gösterilmiştir<sup>47,48</sup>. Apoptoz ve nekroz yoluyla meydana gelen hücre ölümü arasında önemli farklar bulunmaktadır (Şekil 4). Bu farklar Tablo 2' de özetlenmiştir. Nekroz patolojik bir olaydır. Apoptozis ise fizyolojik veya patolojik uyaranlarla oluşabilir.

**Tablo 2: Apoptozis ve Nekrozdaki Özelliklerin Karşılaştırılması**

Nekroz	Apoptozis
Hücre içi dengelerin kaybı	Başlangıçta önemli değişiklik yok
Hücre zarı geçirgenliğinde artma	En azından başlangıçta hücre zarı geçirgenliği değişmez
Potasyum kaybı, sodyum girişi, zar potansiyelinde düşme	Sodyum girişi yok, hücre potasyum yoğunluğu değişmez
Sitoplazmik yapıların tümünde şişme	Sitozol yoğunlaşması
Mitokondri ve diğer organellerde yıkım	Organeller genelde sağlam
Hücre sel enerjide tükenme	Hücre sel enerjide tükenme yok
Düşük makromoleküler sentez	Makromoleküler sentez aktivasyonu gerekli
Bitişik hücreler etkilenir	Sadece ilgili hücre etkilenir
Kromatin ağı gevşek	Kromatin ağı yoğun
Pasif atrofi	Aktif dejenerasyon



**Şekil 4: Apoptozis veya nekroz ile hücre ölümü<sup>6</sup>**

#### **HİBH' de Klinik Bulgular**

HİBH' de klinik bulgular hipoksi ve iskeminin şiddeti, süresi, nörolojik tutulumun şiddeti ve yerine göre değişir. Ayrıca diğer sistemlerin etkilenme dereceleri ve yerleri, bebeğin gebelik yaşı ile ilişkilidir.

HİBH' yi takiben görülen merkezi sinir sisteminin birincil bulguları konvülziyonlar, apne, anormal solunum şekli, huzursuzluk, postür ve hareket bozuklukları, anormal okülomotor ve pupiller cevap, yaygın hipotoni ve ön fontanelde kabarıklığıdır.

Konvülziyonlar orta veya şiddetli beyin hasarı durumunda görülen en önemli bulgudur. Konvülziyonlar genellikle hipoksiden sonraki ilk 24 saat içinde başlar. En sık görülme zamanı ise 6-12 saattir<sup>49</sup>. Konvülziyon şekli multifokal-klonik veya fokal olarak gelişebilir. Zamanından önce doğan bebeklerde desebre postür benzeri nöbetlerin yanı sıra tonik nöbetler daha sık görülür<sup>50</sup>. Hasarın şiddeti ne kadar fazla ise konvülziyonun başlangıcı da o kadar erken olmaktadır. Konvülziyonlar antiepileptik tedaviye dirençli olabilir. Konvülziyona ek olarak bir takım nörolojik bulgular gelişebilir. İlk defa 1976 yılında Sarnat ve Sarnat tarafından önerilen HİBH' nin evreleme işlemi diğer araştırmacılar

tarafından da gözden geçirilmiştir. HİBH' nin değerlendirilmesinde ve prognozun tahmin edilmesinde bu evreleme yöntemi yardımcı olmaktadır<sup>49</sup> (Tablo 3 ).

**Tablo 3: Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Sarnat ve Sarnat Evrelemesi**

Bulgular	Evre 1	Evre 2	Evre 3
Bilinç düzeyi	Hiperalert	Letarjik	Stupor, koma
Adele tonusu	Normal	Hipotonik	Flask
Postür	Normal	Fleksiyon	Desebre
Tendon refleksleri	Hiperaktif	Hiperaktif	Yok
Miyoklonus	Var	Var	Yok
Moro refleksi	Güçlü	Zayıf	Yok
Pupiller	Midriyazis	Miyozis	Eşit değil, ışık refleksi az
Nöbetler	Yok	Sık	Deserebrasyon
EEG	Normal	Nöbet aktivitesine göre değişen düşük voltaj	İzoelektrik hatta burst supresyonu
Semptomların süresi	<24 saat	2-14 gün	Günler-haftalar
Sonuç	Yaklaşık %100 normal	%80 normal, 5-7 günden fazla sürerse anormal	Yaklaşık %50'si ölür. Yaşayanlarda yüksek morbitide gelişir.

Hafif derecede etkilenmiş bir bebekte genellikle hiperirritabilite, derin tendon reflekslerinde artma ve abartılı Moro refleksi olur. Bulgular genellikle 24 saatten uzun sürmez. Orta derecede etkilenmiş bir bebek letarjik görünümlü, hipotonik ve derin tendon refleksleri azalmıştır. Genellikle konvülziyon da görülür.

Volpe doğum sonrası asfiksi sürecini 12'şer saatlik dilimler şeklinde 72 saat ve sonrası bölümler şeklinde inceler. Ağır dereceli asfiksili bir bebek bu sınıflamaya göre, doğumdan sonraki ilk 12 saatte stupor ve koma halindedir. Solunumu düzensizdir. Hipotonisite ile birlikte yenidoğan refleksleri baskılanmıştır. İzleyen 12-24 saatlerde bilinç düzeyi bir miktar düzelme gösterir. Bebekte genel bir hiperirritabilite mevcuttur. Konvülziyonlar bu dönemde başlar. Apneik nöbetler gelişebilir ve solunum desteğine ihtiyaç duyulabilir. 24. saatten sonra beyin ve beyin sapı işlevleri giderek bozulur. Bebek derin komaya girebilir

ve solunum durması gelişebilir. Pupil ışık refleksi alınamaz, 24-72 saatlik dönemde ölümler sıktır.

Bebek 72 saat boyunca hayatta kaldıysa, olumlu gelişmeler olabilir ancak ekstremiteler hipotoniktir, emme-yutma işlevleri zayıftır. Koordinasyon bozukluğu olduğundan sıklıkla beslenme sorunları ile karşılaşılır<sup>27,51</sup>.

HİBH' de beynin yanı sıra organların üçte ikisinde en az iki organ etkilenmiştir. Organ hasarı en sık böbrekte görülür<sup>1</sup>. HİBH' nin sistemik etkileri Tablo 4' de gösterilmiştir.

**Tablo 4: HİBH' nin Sistemik Etkileri**

<b>Sistem</b>	<b>Etki</b>
Merkezi sinir sistemi	Hipoksik-iskemik ensefalopati, beyin ödemi, infarkt, intrakraniyal kanama, hipotoni, hipertoni, konvulsiyonlar
Solunum sistemi	Pulmoner hipertansiyon, surfaktan yıkımı, mekonyum aspirasyonu, akciğer kanaması
Dolaşım sistemi	Triküspit yetmezlik, miyokard nekrozu, şok, hipotansiyon
Mide-bağırsak sistemi	Nekrotizan enterokolit, karaciğer yetmezliği
Böbrekler	Oligüri, akut böbrek yetmezliği, akut tübüler nekroz, idrar debisinde azalma, asfiktik mesane sendromu, renal ven trombozu
Endokrin	Uyumsuz ADH salınımı sendromu, adrenal kanama, adrenal yetmezlik, pankreatik hasar
Metabolik	Metabolik asidoz, hipoglisemi, hipokalsemi, hiponatremi
Hematolojik	Trombositopeni, polisitemi, beyaz küre hücrelerinde sola kayma, yaygın damar içi pıhtılaşma
Deri	Deri altı yağ nekrozu

HİBH olması muhtemel bir bebekte, hipoksik iskeminin ağırlık derecesinin saptanması, ortaya çıkabilecek komplikasyonların önceden tahmin edilmesine yardımcı olur. HİBH sonucunda ağır nörolojik hasar gelişebileceğine işaret eden bulgu ve belirtiler aşağıda sıralanmıştır.

- İlk beş dakikada solunumun başlamaması
- Beşinci dakikada Apgar skorunun dördün altında bulunması

- İlk 12 saatte nöbet öyküsü
- Evre III HİBH olması
- Ağızdan beslenmeye doğumu takiben bir haftada geçilememesi
- Anormal EEG bulguları olması ve yedi güne kadar EEG'nin normale dönmemesi
- Yenidoğan döneminde anormal beyin tomografi ve MRG bulguları saptanmasıdır.

Klinik bulguların düzelme oranı değişkendir ve önceden tahmin edilemez. Genellikle en hızlı düzelme gösteren bebekler en iyi prognoza sahiptirler. Bir haftalıkken normal nörolojik muayenesi olan bebeklerin normal olma şansı çok yüksektir<sup>52</sup>.

### **Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Histolojik Bulgular**

Volpe, hipoksi ve iskemik beyin hasarında önemli nöropatolojik bulgular tanımlamıştır<sup>53</sup>. Bir kişide birden fazla lezyon gözlenebilmektedir. HİBH'den sonra gözlenen klinik ve nöropatolojik anomaliler, hasarın yapısı ve etkilenen bebeklerin gebelik yaşına göre değişmektedir. Zamanından önce doğan bebeklerde germinal matriks veya ventrikül içinde kanamaya neden olabilir. Zamanında doğanlarda patoloji daha çok serebral korteks ve bazal gangliyonlardadır. Bu nedenle zamanında doğan ve zamanından önce doğan bebekteki beyin hasarı ayrı ayrı ele alınmalıdır.

<b>Zamanından Önce Doğan Bebek</b>	: Seçici Nöronal Nekroz Periventriküler İökomalazi Bölgesel ve çoklu bölgesel iskemik beyin nekrozu Periventriküler hemorajik infarkt
<b>Zamanında Doğan Bebek</b>	: Seçici nöronal nekroz Bazal ganglia ve talamusun status marmoratusu Parasagittal serebral nekroz Bölgesel ve çoklu bölgesel iskemik beyin nekrozu

### **Seçici Nöronal Nekroz**

HİBH'nin en sık rastlanan nöropatolojik durumudur. Bu nekroz tipinde temel hasar serebral ve serebellar korteks, talamus, beyin sapı ve spinal kordun

ön boynuz hücrelerini içerir<sup>1</sup>. Yenidoğan döneminde stupor, koma, nöbetler, hipotoni, okülomotor, emme ve yutma bozuklukları gibi klinik bulgular gözlenir. Uzun dönemde değişen derecelerde entelektüel bozulma, motor paraliziler ve nöbetleri içerir. Entelektüel bozulma temel olarak serebral kortikal hasarın sonucunda oluşur. Bebeklerin %10-30'unda nöbetler gelişir. Emme ve yutma bozuklukları lokalize beyin sapı bozukluğunu gösterir. Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu retiküler aktive edici sistem (RAS) hasarı ile ilişkili olabilir<sup>1</sup>.

### **Status Marmoratus**

En az görülen nöropatolojik lezyon olup genellikle zamanında doğan bebeklerde gözlenir. Temel olarak bazal ganglia ve talamusta oluşur ve bölgelerin mermerimsi bir görünümüne neden olur. Yenidoğan dönemindeki kısa dönem etkileri bilinmemektedir. Uzun dönem sekelleri ise entelektüel bozulma, distoni, koreoatetoz ve tremoru içermektedir.

### **Parasagittal Serebral Nekroz**

Serebral korteksin ve serebral konveksitelerin parasagittal bölgelerine lokalize beyaz madde nekrozunu ifade eder. Lezyonlar ön, orta ve arka serebral arterlerin sulama alanlarındadır. Bozulmuş serebrovasküler otoregölasyon bu alanlarda belirgin iskemi ile sonuçlanır. Genellikle bilateral ve simetrik olmakla beraber asimetrikte olabilir.

Kısa dönem etkileri proksimal ekstremitelerin proksimalinde hipotoni ve kuvvet kaybıdır. Üst ekstremiteler alt ekstremitelerden daha fazla etkilenir.

Uzun dönem etkileri spastik kuadriparezi, konuşma bozukluğu ve göz hareketlerinde bozukluktur.

### **Periventriküler Lökomalazi**

Zamanından önce doğup en az birkaç gün yaşayan bebeklerde en sık görülen iskemik lezyondur. Düşük doğum ağırlığı, kalp ve solunum sistemindeki sorunlar nedeniyle ventilatör ihtiyacı olanlarda yüksek oranda izlenir. Periventriküler beyaz cevherle lateral ventriküllerin arka-dış-yan köşelerinde nekroz ve kanamayla kendini gösterir. Hafif vakalarda küçük gliosis alanları, ventriküler dilatasyon ve miyelin azalması görülür. Daha ciddi vakalarda multikistik ensefalomalaziye kadar değişen bulgular ortaya çıkabilir<sup>54</sup>. Daha çok alt ekstremiteleri kapsayan spastik dipleji görülür. Bunun nedeni kortikospinal yolda bacaklara giden liflerin periventriküler alandan geçmeleri ve nekrozdaki

doğrudan etkilenmeleridir. Ayrıca optik traktus ve görsel liflerin etkilenmesi nedeniyle göz hareketleri ve görme alanı bozuklukları ortaya çıkabilir.

### **Bölgesel ve Çoklu Bölgesel İskemik Beyin Nekrozu**

Genellikle zamanında doğan bebeklerde doğumdan sonraki iskemik olaylar sonucunda gözlenir. En sık etkilenen bölge orta serebral arterin beslediği alanlardır. Genellikle tek taraflıdır. Beyin parankiminde infarktlara bağlı oyuklar oluştuğunda porenselalik kist, multikistik ensefalomalazi ve hatta hidrensefali gelişebilir. Bebeklerin en az %80'inde belirgin semptom nöbettir. Bölgesel veya çoklu bölgesel beyin nekrozunun uzun dönem sekelleri spastik hemiparezi, kuadriparezi, bilişsel bozukluklar ve nöbetlerdir.

### **Periventriküler Hemorajik İnfarkt (PVHI)**

PVHI, zamanından önce doğan bebeklerde sıklıkla ciddi ventrikül içi kanama ile birlikte ortaya çıkar. Genellikle iki taraflıdır. Daha çok venöz kaynaklıdır. Venöz infarkt medüller ve uç venlerin tıkanması sonucu oluşur. Kısa ve uzun dönem bulguları zamanından önce doğan bebeklerde diğer bölgesel iskemik lezyonlarda gözlenen klinik özelliklere benzer. İlaveten, kanama sonrası ventrikül genişlemesi veya hidrosefali bulunabilir<sup>54</sup>.

### **HİBH TANISI**

Yenidoğanda hipoksik iskemik beyin hasarının tanısı ayrıntılı bir öykü ve nörolojik bir muayeneyle konur. Öykü, fetüs kalp hızının monitörizasyonunu, fetüsün asit-baz durumu, Apgar skoru, mekonyum varlığı, plasentanın patolojik durumları gibi gebeliğin ve doğumun komplikasyonlarını ayrıntılı olarak içermelidir. Ancak zamanından önce doğan bebekte hipoksik hasarın klinik ve nörolojik bulguları tanımlayıcı olmadığı için gelişmiş tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Nörofizyolojik monitörizasyon ve görüntüleme yöntemleri HİBH tanısında önemli katkılar sağlamaktadır. Ayrıca prognoz hakkında da önemli ipuçları vermektedir. Ayırıcı tanıda merkezi sinir sistemi (MSS) enfeksiyonları, metabolik hastalıklar, organik asit metabolizması bozuklukları ve nörodejeneratif hastalıklar akla gelmelidir.

### **Biyokimyasal Testler**

HİBH tanısında birçok biyokimyasal testten yararlanılmaktadır. Bunlardan bazıları aşağıda belirtilmiştir.

- Kord kanı pH'sının 7.1'in altında olması

- Artmış beyin omurilik sıvısının (BOS) protein düzeyi ve pirüvat/laktat oranı
- Plazma laktat oranında artış
- N-asetil-aspartat (Naa) düzeyinde düşüş
- Naa/kreatinin veya Naa/kolin oranında düşüklük
- Artmış kreatin kinaz (CK), CK-MB, ürik asit, amonyak düzeyleri
- Son zamanlarda CK'nın beyine spesifik izoenzimi(CK-BB) üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. HİE sonrası altı saat içinde ölçülen CK-BB düzeylerinin ölen veya ağır hasarlı olan bebeklerde çok daha yüksek olduğu saptanmıştır.
- BOS' un laktat dehidrogenaz ve hidroksibütirat dehidrogenaz, plazmanın ise hipoksantin, vazopressin, eritropoietin düzeylerinde artış saptanmıştır.
- BOS'da nöron-spesifik enolaz, glial fibriler asidik protein ve eksitatör aminoasitlerin ölçümünün tanıdaki değeri halen araştırılmaktadır.
- Son yıllarda HİBH ile serum malondialdehid düzeyleri arasında bir ilişki olduğu saptanmıştır. Bir çalışmada zamanında doğmuş ve HİBH gelişmiş bebeklerin serum-BOS MDA düzeyleri, BOS/serum MDA oranı kontrol grubu ile karşılaştırılmış, HİBH olan grupta her iki değer de yüksek bulunmuştur. HİBH ağırlaştıkça serum düzeyinin daha belirgin şekilde arttığı tespit edilmiştir. HİBH gelişen bebeklerde MDA düzeyinde artış ne kadar yüksekse HİBH'nin o kadar ağır olduğu ileri sürülmüştür<sup>55</sup>.

### **Elektrofizyolojik testler**

#### **Elektroensefalogram (EEG)**

HİBH' de zedelenmenin derecesini önemli ölçüde belirlemede yardımcı olur. Ayrıca tanı koymak ve prognozu belirlemede EEG'nin çok önemli yeri vardır. EEG bilgilerinin o andaki durumu yansıtmaktan çok geçmişte olanları yansıttığı için önemli bir prognostik değeri vardır. Bu nedenle her hastaya EEG çekilmelidir. Ağır HİBH' den sonra özellikle zamanında doğan yenidoğanlarda özgün EEG bozuklukları görülebilir<sup>56</sup>. İlk olarak amplitüde ılımlı baskılanma, elektrikselsel aktivitede yavaşlama görülür. Ara sıra patlamalarla bölünen voltaj baskılanma dönemleri ve keskin ve yavaş dalga şekli vardır. Zamanından önce

doğan bebeklerde bu değişikliklerin ayırt edilmesi zordur. İlerleyen günlerde daha ciddi voltaj baskılanması ve diken, yavaş dalga patlamaları görülür. Buna patlama baskılanma görüntüsü denir. Bu görüntünün elde edilmesi kötü prognoz anlamına gelir<sup>57</sup>. Klinik bulgular olmasa da sessiz nöbetlerin değerlendirilmesi için şüpheli vakalarda EEG yapılması önerilmektedir<sup>58</sup>.

### **Beyin sapının işitsel ve görsel uyarılmış potansiyelleri (BAEP ve VEP) ölçümü**

Beyin sapının işitsel ve görsel uyarılmış potansiyellerinin ölçümünün sinirsel sağrlık ve görsel bozukluğu retrospektif olarak önceden bildiren yöntemler olduğu kabul edilir. Uyarılmış beyin sapı potansiyelleri perinatal asfiksini tanı, izlem ve prognoz tayininde kullanılmaktadır. Bu testler, beyin sapı yapılarını değerlendirmeye olanak tanır<sup>57</sup>. Zamanında doğan bebeklerde yapılan bir çalışmada ilk 24 saatte normal somato-sensöriyel uyarılmış potansiyeller (SEP) varlığı iyi prognozu önceden belirlemede %94 duyarlı olduğunu gösterilmiştir.

### **Görüntüleme teknikleri**

#### **Kraniyal Ultrasonografi (US)**

Bu yöntem yüksek etkili, zararsız ve ucuz olması nedeniyle sık tercih edilen bir tanı aracıdır. Önemli nöropatolojik lezyonlardan, bazal ganglion ve talamus hasarları, periventriküler lökomalazi (PVL), fokal ve multifokal iskemik beyin hasarının ayırımında son derece yararlıdır. PVL özellikle hemorajik ise daha iyi görüntülenir.

#### **Bilgisayarlı Tomografi (BT)**

BT ağır nöronal nekrozdaki yaygın kortikal hasarı, bazal ganglion ve talamus hasarı, periventriküler lökomalazi, bölgesel ve çoklu bölgesel iskemik beyin nekrozu hakkında önemli tanısal bilgiler verir. Özellikle asfiktik olaydan 1-2 hafta sonra, diffüz kortikal nöronal hasar tayininde en değerli yöntemdir. BT'nin zamanlanması tanı için önemlidir. Akut dönemde lezyonları BT ile ayırt etmek güçtür. Ancak günler veya haftalar sonra damar dağılımında azalma ortaya çıktığından BT'nin değeri artmaktadır.

#### **Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG)**

Parasagittal serebral hasar MRG ile diğer görüntüleme yöntemlerinden çok daha iyi görüntülenebilir. PVL'nin akut döneminde BT ile sıklıkla şüpheli

sonuçlar alınırken, MRG ile kesin tanı konulabilir. Ancak MRG'nin pahalı oluşu ve her yerde bulunmayışı nedeniyle kullanımı sınırlı kalmaktadır.

### **Manyetik Rezonans Spektroskopi (MRS)**

Bu yöntemle hipoksi ve iskeminin erken ve geç bulgularını detaylı bir şekilde değerlendirmek ve bunları prognoz ile ilişkilendirmek mümkündür. MRS ile <sup>31</sup>P kullanılarak fosfokreatinin (PCr) ve inorganik fosfat (Pi) ölçümü yapılabilmektedir. PCr/Pi oranı beyindeki fosforile enerji durumunu yansıtır, asfiktik bebeklerde bu oranın düşük olması kötü prognoza işaret eder.

### **Proton MRS**

HİBH'li bebeklerin beyinlerinde laktat oranında artış ve N-asetil-aspartat (Naa) düzeyinde düşüş olduğu bu yöntemle saptanmıştır. Naa/kreatinin veya Naa/kolin oranındaki düşüklüğün kötü prognozu yansıttığı gösterilmiştir.

### **Renkli Doppler Sonografi**

Bu tanı yöntemiyle serebral arterlerdeki kan akım hızlarının ve serebral kan hacminin ölçümü yapılır. Ayrıca tanı ve prognozun belirlenmesi açısından önemli ipuçları vermektedir. Ön serebral arterden yapılan ölçümlerde diyastol sonu kan akım hızının/sistolik kan akım hızına oranının 0,55'den küçük olmasının prognozun kötü olduğunu belirleyen önemli bir parametre olarak kabul edilir.

### **Kafa İçi Basıncın İzlenmesi**

Kafa içi basıncın devamlı veya sık ölçümleri HİBH'li bebeklerde beyin ödemi, kanama sonrası hidrosefali tanısında değerlidir. Artmış kafa içi basınç kötü prognozla ilişkilidir.

### **HİBH' de Tedavi**

Özellikle ciddi HİBH'li bebekler sıklıkla kalp, akciğer, böbrek ve karaciğeri içeren çoklu organ yetmezliğine sahiptir. HİBH'li bebeklerin çoğunda etkilenme intrauterin dönemde olur. Bu yüzden intrauterin asfiksini önlenmesi çok önemlidir. Yüksek riskli fetusun gebelik ve doğum esnasında yakından takibi, anneye ait risk faktörlerinin belirlenmesi, doğum öncesi bakım kalitesinin artırılması ve doğumların uzmanlar tarafından yaptırılması HİBH gelişiminin önlenmesinde önemli rol oynamaktadır. HİBH oluşuktan sonra uygulanan tedavilerde henüz istenen başarı sağlanamamıştır. Bu yüzden HİBH gelişiminin önlenmesine yönelik çalışmaların önemi devam etmektedir. Yeni tedavi seçeneklerine karşın temel ilke, zamanında ve etkili yeniden canlandırma

uygulamaları, uygun sıvı-elektrolit tedavisi, dengeli ve yeterli beslenme, enfeksiyon ve yaygın damar içi pıhtılaşma sendromundan koruma, nöbetlerin erken tanı ve tedavisi ve metabolik sorunlardan korumadır.

### **HİBH Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar**

Beyni korumanın farklı yöntemleri henüz araştırma aşamasındadır. Yenidoğan bebeklerdeki etkileri henüz tam olarak belirlenmemiştir. Beyin koruması için barbitürat, glutamat reseptör antagonistleri, serbest radikal baskılayıcıları, hipoksantin ve hipotermi gibi çeşitli deneysel yöntemler hala araştırılmaktadır. Çalışmaların çoğu deneysel düzeyde olup, henüz klinik uygulamaya geçmemiştir. HİBH' de yeni tedavi yaklaşımları şunlardır.

- Hipotermi Uygulanması
- Serbest Oksijen Radikalleri (SOR) Oluşumunun Engellenmesi
- Serbest Demirin Temizlenmesi
- Antioksidan Enzimler
- Serbest Radikal Temizleyicileri
- Magnezyum Sülfat Uygulanması
- Glutamatın Zararlı Etkilerini Azaltıcı Tedaviler
- Glutamat Taşıyıcı Proteinlerin Etkileri
- Glutamat Reseptör Kapatıcıların Kullanımı
- N-Metil D-Aspartat (NMDA) Reseptör Kapatıcıları
- Alfa-Amino-3-Hidroksi-5-Metil İzoksazol Propiyanat (AMPA) Reseptör Kapatıcıları
- Kainat Reseptörleri
- Nöronal Büyüme Hormonu Tedavisi
- Kaspazların Baskılanması
- Kök Hücre Nakli Uygulanması
- Deksametazon Tedavisi
- Glikolitik Yol Öncü Maddeleri Uygulanması
- Eritropoetin (EPO) Uygulanması
- Kalsiyum Kanal Kapatıcıları Uygulanması
- Tanshinon Uygulanması
- Nikotinamid Uygulanması
- Östrodiol Uygulanması

- Morfin Uygulanması
- Sodyum Kanal Kapatıcıları Uygulanması
- Endotelin Reseptör Kapatıcı Uygulanması
- Koagülasyonun Baskılanması
- Aşırı Nitrik Oksit Oluşumunun Önlenmesi
- Sitokinlerin Baskılanması

### **Hipotermi Uygulanması**

Hipotermi serebral metabolizma hızını azaltır. Nekrotik ve apoptotik hücre ölümünü başlatan nöronal enerji kaynaklarındaki azalmayı önleyerek apoptozu önler. Ayrıca oksijen metabolizmasını yavaşlatır, sitotoksik ödemi önler, eksitotoksin ve NO salınımını azaltır<sup>59-61</sup>. Deneysel çalışmalarda hafif hiperterminin olasılıkla eksitotoksinleri artırarak hipoksik-iskemik zedelenmeyi arttırdığı gösterilmiştir<sup>62</sup>. Canlandırmaya yanıt alınamayan asfiktik yenidoğanlarda vücut ısısının 30-32°C'ye indirilmesinin mortalite ve morbitide oranını azalttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır<sup>63</sup>. Serebral hipoterminin yararlı etkisi eksitatör amino asitler ve nitrik oksit sentezini azaltması ile apoptozu inhibe etmesine bağlı olduğu öne sürülmektedir<sup>64,65</sup>. Son çalışmalar, doğum odasındaki canlandırmadan sonraki 6-15. saatlerde uygulanan ve 48 saat veya daha uzun süre uygulanan hipotermimin emniyetli bir uygulama olduğu ve daha iyi bir prognozla ilişkili olduğunu göstermektedir<sup>66-68</sup>. On iki zamanında doğan asfiktik yenidoğanda doğum sonrası ortalama dört saatlikken özel bir sistemle baş çevresinde soğuk su dolaşımı 48-72 saat süreyle sağlanmıştır. Mortalite morbitide yönünden sonuçların iyi olduğu saptanmıştır. Hatta tüm vücuda uygulanan hipotermimin sadece başın soğutulmasına göre daha iyi sonuçlar verdiği ileri sürülmektedir. Bu konuda çok merkezli çalışmalar halen devam etmektedir<sup>69</sup>.

### **Kaspazların (caspase) Baskılanması**

Kaspazlar (cysteine-containing aspartate specific protease) kalsiyum bağımsız hücre içi sistein proteaz sınıfının en önemli bölümünü oluştururlar<sup>70,71</sup>. Apoptozis ile ilişki kurulan en önemli olay kaspazların aktivasyonudur.

Bilinen 14 adet kaspaz mevcuttur. Kaspaz 2,8,9,10 apoptozu başlatıcı ve 3,6,7 ise apoptozu yürüten kaspazlar olarak bilinmektedir<sup>31</sup>. Kaspazlar inaktif prekürsörler olarak hücre sitoplazmasında bulunurlar ve çoğu proapoptotiktir.

Sitokrom c'nin sitoplazmaya saliverilmesi ve prokaspaz 9'u uyarması ile apoptoz başlar<sup>31</sup>. Kaspazlar apoptozisi aktive eden sinyaller tarafından tetiklenmektedirler. Kaspazlar belirli proteinleri parçalamaktadırlar. Bu parçalanma sonucunda diğerleri de aktive olarak proteolitik bir süreci başlatırlar. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarı ile başlayan ölüm sinyallerini yürütücü kaspazlara iletirler. Yürütücü kaspazlar ise ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücrenin oluşmasına neden olmaktadır<sup>31</sup>. Kaspaz 1 ve kaspaz 3 iskemide başlayan hücre ölümü mekanizmasında en önemli mediatörlerdir<sup>72,73</sup>. Chen ve arkadaşları kaspaz 3'ün geçikmiş nöronal ölüme aracılık ettiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca kaspaz 3 inhibitörlerinin hücre ölümü üzerine etkilerinin kaspaz 1 inhibitörlerine göre daha etkili olduğunu bildirmişlerdir<sup>74,75</sup>. Kaspazların baskılanması ile apapoptozun önleneyeceği ve HİBH'nin azaltılabileceği düşünülmektedir.

### **Kök Hücre Nakli Uygulanması**

Vasküler endotelial büyüme hormonu ve nöral kök hücre tedavisinin damar içi uygulandığı hipoksik sıçan çalışmasında, iki maddeyi aynı anda alan grupta, tek madde uygulanan ve madde verilmeyen gruplara göre daha yüksek proanjiojenetik etki gözlenmiştir. HİBH'nin azaltılabileceği ileri sürülmüştür<sup>76</sup>.

Fetal sıkıntı nedeniyle sezeryan ile doğurtulan bebeklerle, fetal sıkıntı olmadan sezeryanla doğurtulan bebeklerin göbek kordonu kanları CD34 hücre sayısı bakımından karşılaştırıldığında, fetal sıkıntısı olanlarda CD34 hücrelerin belirgin şekilde arttığı saptanmıştır<sup>77</sup>.

Hipoksik iskemik hasar oluşturulan sıçanlara rekombinant insan granülosit koloni uyarıcı faktör verilmesi sonrası sıçanların yaşam sürelerinin uzadığı, infarkt alanın küçüldüğü, infarkt alanında marjinal zonda CD34 hücreleri arttığı saptanmıştır<sup>78</sup>.

Bir çalışmada sıçanlarda oluşturulan yenidoğanın hipoksik iskemik beyin hasarı modelinde, çok yönlü kök hücre astrositleri hipoksik iskemik sıçanlara verildiğinde hasarlanmış bölgeye doğru göç ettiği gösterilmiştir. Verilen kök hücre astrositleri hasarlanmış bölgelerde nöronlara ve glial hücrelere farklılaştığı gösterilmiştir<sup>79</sup>.

Nörogenesis doğumdan sonra tam olarak tamamlanmaktadır. Ancak gliojenik aktiviteler (myelin oluşumu, oligodentrosit ve astrosit proliferasyonu)

sıçan korteksinde doğumdan sonraki dönemde devam etmektedir. Doğumdan sonraki dönemde hipoksik-iskemik hasarlanmanın etkileri çok az bilinmektedir. Hipoksi-iskemi oluşturulan sıçanların serebral korteksinde glial aktivitenin olduğu gösterilmiştir<sup>80</sup>. Zheng ve ark. doğum sonrasında sıçanlardan 1-6 gün'de supepandimal bölgeden çok yönlü astrositik kök hücreler elde etmiş ve bu astrositik kök hücreleri doğumdan sonraki yedinci günde hipoksi-iskemi oluşturulmuş sıçanlara vermişlerdir. Daha sonra, verilen astrositik hücrelerin nöronlara dönüştüğü ve hasarlanmış bölgede lokalize olduklarını göstermişlerdir<sup>81</sup>. Park ve ark. yenidoğan fare serebellumun germinal tabakasından çok yönlü nöral prekürsör hücreler elde etmişler ve elde edilen kök hücreleri kültüre etmişlerdir. Kültüre edilen kök hücreleri doğumdan sonraki yedinci günde hipoksi-iskemi oluşturulan farelere vermişler ve verilen nöral kök hücrelerin oligodendrositlere ve astrositlere farklılaştıklarını göstermişlerdir<sup>82</sup>.

Takeshi Hayashi ve ark. hipoksi ve iskemiden sonra astroglial, oligodendroglial ve mikroglial hücrelerde artış olduğunu göstermişlerdir. Bu iyileşme aşamasında bu hücrelerin önemli rollerinin olduğu belirtilmektedir. Perinatal beyin hasarlanmasının tedavisinde bu progenitör hücrelerin önemli bir potansiyele sahip olduğu belirtilmektedir<sup>83</sup>. Tomoaki Ikeda ve ark. nöral progenitör hücrelerin hipoksi-iskemi oluşturulan yenidoğan sıçanlarda olgun nöronlara ve astrositlere başarılı bir şekilde farklılaştığını göstermişlerdir. Bu çalışmada Wistar cinsi yedi günlük sıçanlara hipoksi-iskemiden sonraki 5-7. günde 5 bromodeoksiüridin (hücre çoğalmasının erken belirleyicisi) enjekte edilmiş ve hipoksi-iskemiden sonraki 14, 28 ve 42 günlerde beyin kendi kendini onarım yeteneğinin sınırlı olduğu gösterilmiştir<sup>84</sup>. Kon Chu ve ark. insan nöral kök hücrelerini iskemik sıçanlara intravenöz olarak verdikten sonra lezyonlu bölgede insan nöral kök hücreleri tespit etmişler ve iskemik bölgenin işlevlerinde düzelme göstermişlerdir<sup>85</sup>.

Perinatal dönemde hipoksiye maruz kalan yenidoğanlara çok yönlü astrositlerin verilmesi ile oluşan nörolojik hasarın en aza indirilebileceği düşünülmektedir.

### **Koagülasyonun Baskılanması**

Son yıllarda yapılan çalışmalar, değişik uyarılar sonucunda beyinde trombosit uyarıcı faktör (platelet aktive edici faktör-PAF) ve doymamış yağ asitlerinin sentezlendiğini göstermektedir<sup>86</sup>.

İskemi reperfüzyon sonrası gelişen nöronal hasarlanmada PAF önemli bir mediatör olarak görev yapmaktadır. PAF'ın gerek sistemik gerekse bölgesel uygulamalarıyla beyindeki kan dolaşımını olumsuz etkilediği bildirilmektedir<sup>87,88</sup>. Hayvanlarda yapılan iskemi modellerinde, PAF'ın merkezi sinir sisteminde önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir. PAF'ın hücreler üzerindeki istenmeyen etkileri reseptör düzeyinde engellenebileceği düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada, WEB 2170'in sadece hipoksi öncesi etkili olduğu, hipoksi sonrası verilmesinin hasarı engellemediği bildirilmiştir<sup>89</sup>. Diğer bir çalışmada hipoksiden hemen önce ve sonra BN 50730 kullanılmış ve bunun hem doku kaybını azalttığı hem de öğrenme ve hafıza yetisini koruduğu izlenmiştir<sup>90</sup>. PAF reseptör antagonisti olan ABT-491'in hipoksi öncesi veya sonrası periton içine uygulanmasının apoptotik hücre sayısını anlamlı oranda düşürdüğü tespit edilmiştir<sup>91</sup>. Hipoksik iskemik beyin hasarı oluşturulmuş yenidoğan sıçanlarda ABT-491 uygulamasının bilişsel ve motor yetiler üzerine etkisinin değerlendirildiği çalışmada, ABT-491'in HİBH'nin akut dönem etkilerini azalttığı ve bilişsel ve lokomotor yetiler üzerine de olumlu etkileri olabileceği gösterilmiştir<sup>91</sup>. Fosfodiesterazı baskılayarak trombosit işlevlerini azaltan, lipid peroksidasyonunu baskılayan, TNF-alfa, İL-6 ve İL-12 üretimini baskılayan trapidilin de doku hasarını önleyebileceği düşünülmüştür. HİBH oluşturulmuş yenidoğan sıçan modelinde, trapidil verilen sıçanlarda apoptotik hücre sayılarının anlamlı oranda azaldığı gösterilmiştir<sup>92</sup>. Sonuç olarak koagülasyonun baskılanması yenidoğanın HİBH'sinde nöronal apoptozu azaltarak koruyucu ve/veya tedavi edici etkileri olabileceği ileri sürülmüştür<sup>92</sup>.

### **Aşırı Nitrik Oksit Oluşumunun Önlenmesi**

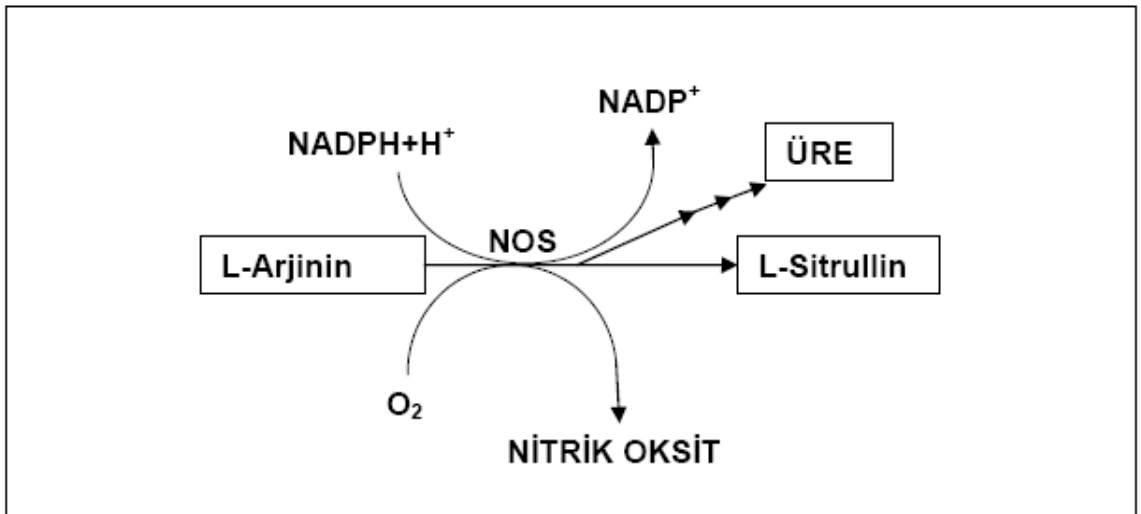
Nitrik oksit (NO), siklik guanozin monofosfat (cGMP) üzerinden etki gösteren güçlü bir çevresel düz kas gevşeticisidir<sup>93</sup>. İlk kez 1979 yılında tanımlanmıştır. NO hem hücre içi hem de hücre dışında düzenleyici işlev gören küçük, reaktif bir serbest radikal moleküldür. Yarı ömrü 2-5 saniyedir. Bir çok hücrel işlemler NO tarafından düzenlenmektedir. Makrofajlar, endotelial

hücreler, bazı nöronlar, damar düz kas hücreleri ve kupffer hücreleri NO sentezleme yeteneğine sahiptirler.

NO hücre zarından serbestçe geçen bir nörotransmitterdir. NO' nun damar tonusunun düzenlenmesi, bağışıklık sistemin düzenlenmesi, düz kas hücrelerin çoğalmasında rol aldığı ve kollajen sentezini engellediği gösterilmiştir<sup>93,94</sup> . NO özellikle vazodilatör etki göstererek, bölgesel kan akımını ve sistemik kan basıncını düzenlediği bilinmektedir<sup>95,96</sup> .

Vücutta bir çok dokuda NO sentezlenmektedir. Nitrik oksit sentaz (NOS) arjininden sitrulin oluşumunu uyarır ve bu reaksiyon sırasında NO oluşur (Şekil 5). NOS' un üç farklı şekli vardır<sup>93</sup> . Nöronal (nNOS), indüklenebilir (iNOS) ve endotelial (eNOS). eNOS ve nNOS, asetilkolin ve bradikinin gibi hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artıran ajanlarca uyarılır. Makrofajlar ve diğer bağışıklık hücrelerinde bulunan iNOS ise sitokinlerce uyarılır. eNOS esas olarak hücre membranına bağlı bulunurken nNOS sitozolde bulunur. Üç NOS izoformu aminoasit dizilişi bakımından %50 benzerlik gösterir.

NO hızlı ve kararlı bir şekilde okside edilerek inaktif bileşikler olan nitrit ve nitrat gibi son ürünlere dönüşür. NO'nun en önemli fizyolojik hedefi, guanilat siklaz enziminin hem grubudur. Düz kas hücrelerine geçen NO, guanilat siklazı uyararak guanozin trifosfatın cGMP'ye dönüşümünü sağlar. Artan cGMP de protein kinazı ve iyon kanallarını aktif hale getirir. Bunun sonucunda hücre içi kalsiyum azalır ve gevşeme sağlanır.



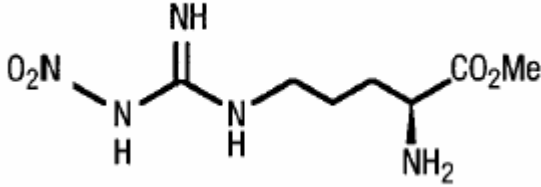
Şekil 5: Arjinin Üre Döngüsünde NO Üretimi

Nitrik oksit, vasodilatasyon yapıcı, trombosit kümeleşmesini önleyici ve süper oksitleri temileyici işlevleri ile ilk bakışta koruyucu bir faktör görünümündedir. Ancak kuvvetli antioksidanlara dönerek süper oksitlerin toksisitesini artırır. Bu görüşe göre  $O_2^-$  ile NO 'nun birleşmesiyle peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) oluşmakta, bu da  $OH^-$ 'ne dönüşmektedir<sup>11</sup>. Bu reaksiyonlar sonucunda lipid peroksidasyonu, DNA parçalanması, plazma antioksidanlarının azalması, protein hasarı ve endotelial düz kas gevşemesinin engellenmesi gibi nedenlerle hücre hasar oluşur. NO'nun serbest radikallerle birlikte iskemi-reperfüzyon hasarına katkıda bulunabileceği görüşünü desteklemek üzere yapılan bir çalışmada, tavşan rektus femoris kasında dört saatlik iskeminin ardından reperfüzyonla birlikte NO ve  $O_2^-$  düzeylerinin arttığı ve NO' nun doku hasarını aktive ettiği gösterilmiştir<sup>97</sup>.

Sıçanlarda oluşturulan bir iskemi-reperfüzyon hasarı modelinde, kas dokusunda NOS aktivitesinin reperfüzyonun ikinci saatinden itibaren artmaya başladığı gösterilmiştir<sup>98</sup>. NO'nun iskemi reperfüzyon hasarındaki rolü üzerine çalışmalar yapılmaktadır. NOS N-metil-L-arginin, N-nitro-L-arginin ve N-amino-L-arginin gibi L-arginin analoglarınca inhibe edilebilmektedir<sup>99,100</sup>. Bu işlem NO'nun biyolojik olaylardaki rolünü anlamak açısından önemli olabilir. Böylece NOS inhibitörlerinin hücre hasarı engelleyebileceği gösterilebilir. Hamada ve ark. hipoksi-iskemi modelinde NOS inhibitörlerinin verilmesi ile beyindeki infarkt alanının %77 oranında küçüldüğünü göstermişlerdir<sup>9</sup>. Higuchi ve ark. da serebral hipoksi-iskemi süresince NOS inhibitörü ile NO metabolitlerinin artışını engellemiştir<sup>10</sup>. Tavşan rektus femoris kasında oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarı modelinde endojen NO'nun etkisini anlamak amacıyla bir nitrik oksit sentaz inhibitörü olan nitro-iminoetil-L-ornitin (L-NIO) infüzyonla verilmiştir. Sonuçta L-NIO'nun oluşan hasarı geri çevirdiği, nötrofil infiltrasyonunun bir göstergesi olan doku miyeloperoksidaz düzeylerini azalttığı ve dokuda meydana gelen ödem önlediği bulunmuştur<sup>12</sup>. Bu bulgular endojen NO' nun iskemi-reperfüzyon durumunda zararlı etkilerinin olabileceğini göstermiştir.

Sıçan iskemi-reperfüzyon hasarı modelinde NOS inhibitörü olan 1400W' nun reperfüzyon esnasında azalan kan akımını, artan nötrofil ekstravazasyonunu ve ödem önlediği gösterilmiş ve NO'nun dokuya zararlı olduğu sonucuna varılmıştır<sup>13</sup>. Nitrik oksit sentaz enziminin inhibitörü olan N-Nitro-L arginin metil ester (L-NAME) (Şekil 6) ile yapılan çalışmalarda oluşan

zararı azalttığı gösterilmiştir<sup>101</sup>. L-NAME'in reperfüzyondan 30 dakika önce ve reperfüzyondan üç saat sonra verilmesiyle dokuyu hasardan koruduğu gösterilmiştir<sup>102</sup>. Ozaki ve ark'nın farelerde yaptıkları bir çalışmada, iskemi-reperfüzyon sonrası yüksek O<sub>2</sub><sup>-</sup> düzeylerinin L-NAME uygulamasıyla önlediği bulunmuştur<sup>103</sup>. Yapılan başka bir çalışmada, fare gastrocnemius kasında iskemi-reperfüzyona bağlı olarak oluşan doku hasarı, ödem ve miyeloperoksidaz aktivitesi L-NAME ile önlenmiş ve NO'nun zararlı olabileceği sonucuna varılmıştır<sup>104</sup>. Diğer bir NOS inhibitörü olan N-Nitro-L Arjinin (7 nitroindazole) verilmesinin NO ve serbest oksijen radikallerin oluşumunu önlediği gösterilmiştir<sup>105,106</sup>. NO sentezini engelleyen tedavilerin HİBH'yi azaltabileceği düşünülmektedir.



**Şekil 6: L-NAME ( N<sup>G</sup> – nitro- L- arginin metil ester)**

### **Sitokinlerin Baskılanması**

İmmün sistem hormonları olarak da tanımlanabilecek olan sitokinler uyaran etkisi ile immün ve immün olmayan hücrelerden sentezlenir ve hedef hücre davranışını etkiler. Yerel ve uzak etkileri olabilir. Sitokinler glikoprotein yapısındadırlar. Sitokinler şu şekilde sınıflandırılabilirler<sup>107,108</sup>.

1. Özgün olmayan immüniteyi ve enflamasyonu arttıranlar (proinflamatuvar sitokinler): IL-1, IL-6, IL-8, TNF.
2. Lenfosit aktivasyonu, büyüme ve farklılaşmasında görev alanlar (özgün immünite): IL-2, IL-4, IL-5, IL-12, IL-13, IL-14
3. Koloni uyarıcıları: Granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF), Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF).
4. Düzenleyici sitokinler: IL-10 (sitokin sentez inhibitör faktör).

Proinflamatuvar sitokinler içinde TNF ve IL-1, sitokin kaskadındaki çok önemli rolleri nedeniyle proinflamatuvar orkestra şefleri olarak tanımlanabilirler.

Sitokinlerin başlıca etkileri; endotel hücresi aktivasyonu, lökosit endotel yapışması, lökositlerin enflamasyon bölgesine kemotaksisi, serbest oksijen radikalleri salınımı, NO sentezi, degranülasyon, sodyumun hücre içine girişi, fagositoz, prokoagülan aktivite şeklinde sıralanabilir<sup>16</sup>. Diğer proenflamatuar mediatörler endotelden TNF- $\alpha$  ve IL-1 etkisi ile salınırlar ve vazodilatötör (NO, PAF, PGE-2) veya vazokonstriktör etki yaparlar<sup>109</sup>. TNF- $\alpha$  proinflamatuar sitokinlerin yanı sıra antiinflamatuar sitokinleri ve doğal sitokin inhibitörü olan IL-1 ra reseptörlerin üretimini de etkiler. Böylece aşırı sitokin yanıtını dengeler<sup>16</sup>. TNF- $\alpha$  esas olarak T lenfositler, makrofajlar, astrositler, mikroglia ve nöronlar tarafından sentezlenen ve sekretuar formu 17 KD, membran formu ise 26 KD olan bir sitokindir. Molekül ağırlıklarına göre P55 reseptörü (TNFRI) ve p75 reseptörü (TNFRII) olmak üzere iki adet reseptörü vardır. P55 birçok biyolojik etkinin başlamasında rol oynar.

Sitokinler özellikle 30 haftadan erken dönemde doğum eyleminin başlamasında ve erken membran rüptürü etiolojisinde rol oynar. Perinatal enfeksiyonlarda en sık artış gösteren sitokinler TNF- $\alpha$  ve IL-6'dır. Yapılan bir çalışmada ilk 24 saatte ölen 11 bebekten dokuzunda amniyotik sıvıda artmış TNF- $\alpha$  düzeyleri saptanmıştır<sup>110</sup>. Başka bir çalışmada, gebeliğin 19-20. günlerinde E.coli lipopolisakkaritleri verilen sıçanların yenidoğan yavrularında beyinde anlamlı TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1beta ekspresyonu, ayrıca striatum düzeyinde artmış TUNEL-pozitif hücre (apoptotik hücre) saptanmıştır<sup>17</sup>. Sitokinler hipertermi, hipotansiyon, beyin kan akımı azalması, iskemi ve asidoz yoluyla serebral zedelenme oluşturabilirler. İntrauterin enfeksiyon ve enflamasyonla beyin zedelenmesi gelişebileceği konusunda giderek artan bir görüş söz konusudur<sup>17,111</sup>. Verma ve ark. korioamniyonitinin ventrikül içi kanama (VİK) ve PVL sıklığını ve ağırlığını arttırdığını göstermişlerdir. Buradan yola çıkarak sitokinlerin fetal dolaşıma katılıp fetal kan basıncı ve serebral kan akımı değişiklikleri yaparak VİK ve PVL etyopatogenezinde rol oynayabileceği düşünülmüştür. Yoon ve arkadaşları postmortem incelemelerde PVL lezyonları olanlarda dokuda histokimyasal olarak TNF- $\alpha$  ve IL-6 yüksekliğini göstermişlerdir<sup>19</sup>.

Doğumdan sonraki ilk iki günde 40 bebekte yapılan kraniyal manyetik rezonans görüntüleme (MRG)'de saptanan beyin zedelenmesi ile kord kanı proinflamatuar sitokin düzeyleri arasında kuvvetli bir ilişki saptanmıştır.

Zamanında doğan ve spastik serebral felç gelişen 31 çocuğun kan örneklerinde TNF-  $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 yüksek bulunmuştur.

Beyin iskemisi de merkezi sinir sisteminde (MSS) enflamatuar mediatörlerin salınmasıyla birliktedir. Normal beyin gelişiminde TNF-  $\alpha$  önemli rol oynamaktadır. Hipoksi-iskemi olgunlaşmamış ve erişkin kemirici beyinde IL-1 ve TNF-  $\alpha$  ekspresyonu ile karakterli bir enflamatuar yanıt nedenidir. Deneysel beyin zedelenmesi modellerinde artmış TNF-  $\alpha$  gösterilmiştir. Hayvan modellerinde hipoksi iskemisi ertesi dördüncü saatte serum ve BOS'ta TNF-  $\alpha$ 'da artışla birlikte beyinde ödem ve nötrofil birikimi olmaktadır<sup>112</sup>.

Hipoksik iskemik beyin hasarında proinflamatuar sitokin-beyin zedelenmesi ilişkisi önemle sorgulanmaktadır. TNF-  $\alpha$ 'nın apoptoz aktivatörü olduğu bilinmektedir. Bu etkisini sitozolde sifingomyelinazı aktive edip seramid artışını sağlayarak yapmaktadır<sup>113</sup>. Hipoksi-iskeminin nöronal hücrelerde lenfosit aracılıklı öldürme işlevi için klasik reseptör olan Fas ekspresyonunu arttırdığı ve antikör-reseptör bağlantısında nöronal apoptoza yol açabilecek durumda olduğu gösterilmiştir<sup>114</sup>. Hipoksi ertesi altıncı saatte zirve yapan geçici bir IL-1beta ve TNF-  $\alpha$  yüksekliği olduğu ve rekombinant IL-1 ra hipoksi öncesi veya sonrasında verildiğinde beyin zedelenmesini engelleyebildiği gösterilmiştir<sup>113</sup>.

Beyindeki bir çok hücre (mikroglia, astrosit, endotel hücresi, nöronlar) sitokin salgılayabilir. Kan beyin engelini geçen sitokin sentez ve salgı yetenekleri olan çevresel kökenli mononükleer fagositler, T lenfositler, NK hücreler ve polimorfonükleer hücreler beyindeki enflamasyon ve gliozise katkıda bulunabilir<sup>111,114</sup>.

Doğumda düşük apgar puanı ve asfiksini klinik bulguları sitokinlerin plasentayı ve fetusun kan-beyin engelini geçerek beyini etkilemesiyle oluşabilir. HİBH' li bebeklerde olayı başlatan neden intrauterin enfeksiyon olabilir. Enfeksiyon ve hipoksini oluşturduğu sitokin yanıtı beyindeki zedelenmede belirleyici olabilir. Sitokinler, NO, serbest oksijen radikalleri nöronal ve glial gelişmeyi etkileyebilir. IL-6 ve TNF kuvvetli prokoagulan, trombojenik ve vazokonstriktör etkileri ile erişkinlerde enfarktüs ve inme nedeni oldukları bilinmektedir. Sitokin kaynaklı hipotansiyon da beyin zedelenmesinde etkili olabilir<sup>111,114,115,116</sup>.

Ancel ve arkadaşları ağır HİBH' li ve nöroradyolojik görüntüleme ile beyin zedelenmesi saptanan 20 bebekte yüksek BOS IL-6 ve TNF-  $\alpha$  düzeylerini saptamışlardır<sup>18</sup>. Oygür ve arkadaşları plazma ve BOS sitokin değerleri ile 12. ayda nörolojik muayene arasında ilişki aramışlar, normal gelişim gösteren 11 hasta, anormal nörolojik bulgusu olan veya erken dönemde kaybedilen 19 hasta karşılaştırıldığında BOS IL-1 beta ve TNF-  $\alpha$  değerleri normal gelişme gösteren grupta daha düşük bulunmuştur<sup>113</sup>. Bu da HİBH' li hastalarda plazma ve BOS IL-1 beta ve TNF-  $\alpha$  düzeylerinin prognozu önceden belirlemede yardımcı olabileceğini göstermektedir.

Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, TNF-  $\alpha$  yapımını azaltan pentoksifilin ve TNF-alfa aktivitesini azaltan TNF bağlayan proteinin kafa travmasından sonra gelişen beyin zedelenmesini azalttığı gösterilmiştir<sup>117</sup>.

Etanersept, rekombinan DNA teknolojisi ile üretilmiş, insan tümör nekrotize edici faktör reseptör p75 ve insan IgG1-Fc proteininin birleştirilmesi ile elde edilen bir insan tümör nekrotize edici faktör reseptör p75-Fc füzyon proteindir. Etanersept, TNF'nin kompetitif inhibitörü olarak hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanmasını engeller ve biyolojik aktivitesini önler. Böylece TNF-  $\alpha$  'a bağlı gelişen hücresel yanıtları engellemiş olur. Ayrıca etanersept, TNF-  $\alpha$  'nın düzenlediği veya adezyon molekülleri ve proteazlar gibi diğer moleküllerin kontrol ettiği biyolojik yanıtları da değiştirebilmektedir. Etanersept, TNF-  $\alpha$ 'ya göre hücre yüzey reseptörlerine daha yüksek affinite ile bağlanırlar. Yarılanma ömrü yaklaşık 68 saattir, daha sonra peptid ve aminoasitlerine yıkılır ve safra ve idrar yolu ile atılır. İskemi-reperfüzyon sonrası gelişen nöronal hasarlanmada önemli bir mediatör olarak rol oynayan TNF-  $\alpha$ 'nın, hücreler üzerindeki istenmeyen etkileri reseptör düzeyinde engellenebilir. HİBH oluşturulan yenidoğan sıçanlarda TNF-  $\alpha$  reseptör antagonistlerinin etkilerini gösteren az sayıda çalışma dikkati çekmektedir. Etanerseptin yenidoğanın HİBH' sinde nöronal apoptozu azaltarak koruyucu ve/veya tedavi edici etkileri olabileceği ileri sürülmektedir.

### **HİBH' de Prognoz**

HİBH'de prognoz hipoksinin şiddeti, süresi, gebelik yaşı ve beyin hasarının yeri ve şekliyle ilgilidir.

Perinatal asfiksiye maruz kalan bebeklerde anormal nörolojik belirtiler yada beyin hasarı meydana gelmeyebilir. Dubowitz'in gözlemlerinde nörolojik

değerlendirilmelerinde sağlıklı olan term bebekler, bir yaşına geldiklerinde sağlıklıdır<sup>51</sup>. Prognozu belirlemede en yararlı faktörler perinatal asfiksini şiddeti ve süresidir. Asfiksini en iyi göstergesi perinatal dönemde Sarnat skalası ile saptanan klinik durumdur. Sarnat ve Sarnat sınıflaması en sık kullanılan prognostik öğelerden birisidir. Bu sınıflamaya göre Evre I'deki olguların %100'ünde, Evre II'deki olguların %80'inde nörolojik durumun normal olması beklenir. Yedi günden uzun süre Evre II belirtileri gösterenlerle, Evre III olgularda %50 ölüm ve kalan %50'de de nörolojik hasar gelişimi beklenmektedir.

Apgar skorunun da prognoz belirlemede önemli yeri vardır. Özellikle uzun süre düşük kalan Apgar skoru ile yüksek mortalite ve morbitide arasında önemli ilişki vardır.

### **Sıçanların Bilişsel ve Lokomotor Yetilerinin Değerlendirilmesi**

Sıçanların bilişsel ve lokomotor yetilerinin değerlendirilmesinde tanımlanmış pek çok hayvan davranış deneyi (HDD) modeli mevcuttur. HDD'ler ile sıçanlarda anksiyete, otonom işlevler, öğrenme, hafıza ve lokomotor aktivite gibi pek çok özelliğin değerlendirilmesi yapılmaktadır. Bilimsel yeterlilik ölçütlerinin tümüne aynı anda sahip olan bir HDD modeli yoktur ve bu modellerin çoğu %100 kesinlikte sonuç sağlayamamaktadır. Ancak bilimsel teknolojideki gelişmelerle birlikte HDD'ler giderek daha ideal ölçütlerde yapılabilmektedir.

#### **Öngörüşel Yeterlilik (Predictive Validity)**

Deney hayvanlarından elde edilen sonuçlar ile klinik araştırmalardan elde edilen sonuçların ilişkisini kapsar. Hayvan deneylerinde elde edilen ilaç etkileri klinik çalışmalarda da gözlenmelidir.

#### **Görüntüşel Yeterlilik (Face Validity)**

Burada hayvan modelinin insandaki hastalık belirtilerini ne ölçüde taklit ettiği önemlidir. Bir HDD modeli insandaki belirtileri taklit ettiği ölçüde bilimsel yeterliliğe sahiptir.

#### **Yapısal Yeterlilik (Constructive Validity)**

Bu kriter hastalığa neden olan klinik koşul ile hastalığın oluşması arasındaki teorik ilişki hakkındadır. Bir davranışsal model insanda hastalığa neden olan risk faktörlerini kapsadığı ve bunların hastalığa olan katkılarını doğru biçimde yansıtabildiği ölçüde bilimsel yeterliliğe sahiptir.

Davranış deneylerinin sıçanların çevresel (nöromotor) gelişimin tamamlandığı 80-85. günlerden sonra yapılması önerilmektedir<sup>118</sup> . Ancak sıçanların doğumu takiben kaç haftalık olduğu belirtilen ya da belirtilmeyen pek çok çalışmada, deneylerin ortalama 180-400 gr ağırlığındaki erişkin erkek sıçanlarla yapıldığı bildirilmiştir<sup>119-121</sup> .

Bu deneylerde sıçanların cinsiyetlerine göre farklı davranışlar sergilediği tespit edilmiştir<sup>122</sup> . Özellikle uzaysal (spatial) öğrenmenin değerlendirilmesinde erkek cinsiyeti daha uygun olduğu saptanmıştır<sup>123-125</sup> . Bu durumun hormonal farklılık ve hipokampus gelişimdeki farktan kaynaklandığı ileri sürülmüştür<sup>123</sup> . Bu nedenle yapılan pek çok çalışmada erkek sıçan kullanılmıştır<sup>119,120,126,127</sup> .

Tüm HDD' lerin  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$  oda sıcaklığında, 12 saatlik gece-gündüz ritminin sağlandığı bir odada ses, ışık, sıcaklık ve bekleme koşullarının standardize edildiği ortamlarda yapılması önerilmektedir. Bu standardizasyonun sağlanabilmesi için tüm hayvan gruplarının deney alanına deney gününden birkaç gün önce getirilmesi, deneylere başlanmadan önce tek tek bekleme kaplarına konmasının gerekliliği belirtilmektedir.

Deney hayvanlarının tümünün daha önce doğum yapmış, bir gebelikte birbirine yakın sayıda yavru doğuran annelerin yavrularından seçilmesi, doğumdan sonra aynı günde süttten kesilerek anneden ayrılması, anneden ayrılan sıçanların her kafeste eşit sayıda olacak şekilde barındırılması, sıçan yemi ile beslenmesi gibi temel koşulların sağlanması önerilmektedir. Burada amaç sıçanların davranış deneylerinin yapılacağı tarihte birbirine yakın ağırlıkta olmalarının, nöromotor gelişiminin eşit düzeyde olmasının sağlanmasıdır. Ayrıca daha önce yavru doğurmuş, yavrularına zarar vermediği bilinen annelerin yavrularının seçilmesi ile deneye alınacak sıçanların anne tarafından reddedilme ya da yenmesini önleme amaçlanmaktadır. Sıçanların her zaman aynı araştırmacı tarafından, aynı yöntemle düzeneklere konması, araştırmacının odada her zaman aynı yerde durması, aynı renk kıyafet giymesi önerilmektedir.

Sıçanlarda bilişsel ve motor yetilerin değerlendirilmesi amacıyla pek çok farklı düzenek kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları rotarot düzeneği, sekiz kollu ışınsal labirent, T labirent, yükseltilmiş artı labirent, açık alan ve Morris su tankıdır.

Anksiyete, korku, öğrenme ve kısa hafıza değerlendirilmesi amacıyla artı labirent (AL) düzeneği kullanılır. AL doğumdan sonraki altıncı haftada ve iki ila üç gün süreyle yapılması önerilmektedir<sup>128,129</sup>.

Sıçanların duygusal durumunu, sedasyonunu, lokomotor aktivitesini ölçmek için açık alan (AA) kullanılır. AA deneyi doğumu takiben 10. haftada yapılması önerilmektedir<sup>130-132</sup>.

Sıçanların öğrenme ve hafızalarını değerlendirmek amacıyla Morris su tankı (MST) düzeneği kullanılır. Doğumdan sonraki 12. haftada beş gün süreyle uzak hafıza (reference memory) değerlendirilir<sup>129</sup>. 14. haftada ise dört gün süreyle yakın hafıza (working memory) değerlendirilir<sup>118</sup>.

### **Açık Alan Deneyi**

Açık alan, deney hayvanlarının duygusal durumunu, sedasyonunu, lokomotor aktivitesini ölçmede sıkça kullanılan bir düzeneştir<sup>133,134</sup>. Daire, kare, dikdörtgen şeklinde ve ortamı ışıklandırılmış, tünel, platform ve kolonlar ile zenginleştirilmiş olan çok değişik formları vardır<sup>135</sup>. İlk olarak 1934 yılında hayvanların emosyonel durumlarını test etmek için Hall ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Daha sonra 1971 yılında Soubrie kare şeklinde olanını geliştirmiştir<sup>136</sup>. Açık alan deneyinde 80x80x50cm boyutlarında gri PVC' den üretilmiş bir kutu kullanılabileceği gibi 100x100x30cm boyutta, zemini 16 eşit kareye bölünmüş ve pleksiglastan hazırlanmış bir kutuda kullanılabilir (Resim 1).

Açık alana bırakılan hayvanda anksiyete davranışı hayvanın kendi ortamından alınıp tek başına bilmediği bir ortama bırakılması geniş alan korkusu yaratacaktır. Çünkü açık ve geniş ortam hayvanlarda sıkıntı yaratan bir durumdur<sup>137</sup>. Test sırasında hayvanın açık alanda bırakılma süresi 2-20 dakika arasında değişmekle birlikte genellikle 5 dakikadır. Bu süre içerisinde hayvanın hareketleri (bir kareden diğerine geçiş, arka ekstremiteleri üzerinde yükselme), kaşınma davranışı ve defekasyon sayısı tespit edilir. Kaşınma ve defekasyon sayısı otonom fonksiyonların göstergesi sayılır<sup>137</sup>. Kaşınma davranışındaki artış hayvandaki stereotipik aktivite ile ilişkilidir. Artmış stereotipik aktivite deney hayvanının anksiyetesi hakkında dolaylı olarak fikir verebilir. Ancak doğrudan anksiyete değerlendirilmesinde kullanılamaz<sup>138</sup>.

Lokomotor aktivite kare geçme sayısı veya katedilen mesafe ve hareket

hızının ölçümüyle değerlendirilebilir<sup>130,131,132</sup>. Açık alan düzeneğindeki hayvanın kenarlarda mı yoksa merkezde mi daha fazla gezdiği önemlidir. Alıştığı ortamın dışına alınan hayvan alanın ortasına gitmekten kaçınacak, daha az hareket edecek daha fazla defekasyon yapacaktır. Fare ve sıçanlar duvara yakın kısımlarda vakit geçirecektir<sup>135,137</sup>.



**Resim 1: Açık Alan Düzeneği**

Davranış deneylerinde veri kayıtları, bilgisayar programları aracılığıyla veya kronometre kullanarak sıçanların gözle takibi yoluyla yapılabilmektedir<sup>131,139</sup>.

## GEREÇ ve YÖNTEMLER

### Çalışma Ekibi

Bu çalışma Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Fizyoloji ve Patoloji Anabilim Dalları tarafından yürütülmüş, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma ve Fizyoloji Anabilim Dalı Davranış Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

### Etik Komite Onayı

Çalışma için Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'undan onay alınmıştır.

### Gereçler

Deney sırasında, diseksiyon için mikroskop ve çeşitli ebatlarda pens, bistüri, karotid arteri bağlamak için 6.0 ipek, cildin kapatılması için 5.0 ipek ve portegü, ilaç ve SF uygulamalar için enjektörler, hipoksi odacığı (Resim 2), %92 azot ve %8 oksijen karışımını içeren tüp, oksimetre, sıçanların vücut sıcaklığını korumak için ısıtıcı su banyosu (benmary), hipoksi odacığı sıcaklığının kontrolü için termometre, dekapitasyon için pens ve bistüri, çıkarılan beyinleri korumak için saklama kapları, alınan kan örneklerinin taşınması için buz aküleri, ağırlık ölçümleri için hassas terazi, steril örtü ve eldivenler kullanıldı



**Resim 2: Hipoksi Odacığı (25x15x10cm<sup>3</sup>)**

Davranış deneyleri için eni 2.9, boyu 3.9 ve yüksekliği 3.1 metre olan özel bir oda kullanıldı. Bu oda ışık ve sese karşı yalıtılmıştı. Oda sıcaklığı dijital olarak ayarlanabilen klima aracılığıyla sabitlenmişti ve 23°C' de tutuldu. Havalandırma, odadaki iki adet cam tipi aspiratör ile sağlandı. Ayrıca deney sırasında ışık şiddeti

ayarlanabilen dört adet halojen lamba kullanıldı. 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ritmi otomatik bir ayarlayıcı ile sağlandı. Tavanda iki adet, yüksekliği ayarlanabilir gece ve gündüz kayıt alabilen kamera mevcuttu. Tüm deneyler Ethovision XT software aracılığı ile kaydedildi. Ayrıca olabilecek karışıklıkları önlemek amacıyla her sıçan deney alanına konmadan önce, bir tahta ve asetat kalemi kullanılarak hangi grup, hangi deney, kaçınıcı gün ve kaç numaralı sıçan olduğunu belirten bir not yazıldı ve bu bilgi sıçanın deneyi ile birlikte video kamera ile kaydedildi.

Lokomotor aktivite ölçümü için siyah pleksiglastan, zemini 100x100cm ve kenarları 40cm yükseklikte bir açık alan deneyi kutusu kullanıldı. Kutunun iç yüzeyleri parlamamanın önlenmesi için mat siyah toksik olmayan boya ile boyanmıştı (Resim 3).



**Resim 3 : Açık Alanın Üstten Görünüşü**

### **Deney Hayvanları**

Bu çalışmaya ağırlıkları  $12.0 \pm 1.7$ gr olan, Wistar cinsi, 120 adet yedi günlük erkek yavru sıçan dahil edildi (Resim 4). Erken dönemde hipoksi, etanersept ve L-NAME' nin beyin üzerine etkilerini hücresel düzeyde değerlendirmek üzere dekapite edilerek histopatolojik inceleme yapılan 60 adet

ve çalışmanın çeşitli aşamalarında ölen 14 adet sıçan dışında, canlı kalan 46 sıçana davranış deneyleri uygulandı.

Davranış deney tarihlerine iki gün kalana dek tüm sıçanlar Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanı Laboratuvarı'nda; havalandırılma ve iklimlendirme uygulanan, gece-gündüz ritmi otomatik olarak ayarlanan ve nemi ölçülen bir odada; annelerinden ayrıldıkları 24. günden itibaren her kafeste 3-4 adet sıçan olacak şekilde ayrı kafeslerde barındırıldı. Kafesler ve sıçanlar toksik olmayan boya kullanılarak numaralandırıldı.

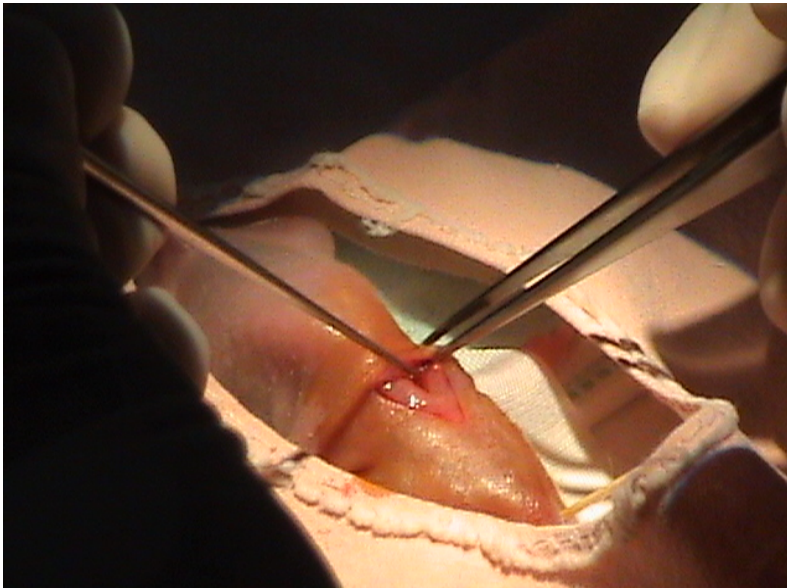
### **Yöntem**

İlaç: N-Nitro-L arginin metil ester (L-NAME 5mg flakon, Sigma) 50 mg/kg intraperitoneal (i.p) yoldan 0.5 ml SF içinde verildi.

Etanersept (Enbrel 25mg flakon, Wyeth) 10 mg/kg intraperitoneal (i.p) yoldan 0.5 ml SF içinde verildi.

### **Hipoksik İskemik Beyin Hasarının Oluşturulması**

Otuz adet anne sıçanın erkek yavruları, rastgele seçilerek dört gruba ayrıldı. Tüm sıçanlara isofloran emdirilmiş pamuk ile bir iki dakika inhalasyon anestezisi verildi. Sıçanlar uyandıkça doz tekrarlandı. İsofloran ile anesteziyi takiben sıçanlar işlem yapılacak masaya dört ayağından flasterle sırt üstü sabitlendi. Ardından boyunda orta hattan kesi yapılarak mikroskop altında sağ karotid arter bulundu. Sham grubu hariç tüm sıçanların sağ karotid arterleri bağlandı (Resim 4).



**Resim 4: Cilt kesisi ve sağ karotid arteri bağlama**

Tüm yavru sıçanlar derlenme ve beslenme süreci için anne yanında bir saat bırakıldı. Bu sürecin sonunda sham grubu dışındaki sıçanlar iki saat süreyle hipoksi odacığına kondu. Hipoksi odacığının kapağına, içerideki havanın oksijen yüzdesini ölçmek için oksimetre algacı yerleştirildi. Sıçanlar hipoksi odacığına yerleştirildikten sonra hipoksi odacığının kapağı kapatıldı. Hipoksi odacıkları sıçanların vücut sıcaklıklarının korunabilmesi için 37 °C' de ısıtılan su üzerine konuldu. Hipoksi odacığına %8 yoğunlukta oksijen ve %92 yoğunlukta azot içeren gaz verildi. İki saatlik hipoksi uygulaması sonunda ilaç veya SF verilen yavru sıçanlar anne yanına verildi. Sham grubu da hipoksi uygulanmamasına karşın annelerinden iki saat süreyle ayrıldı.

**Grup A (Sham) (n:30)** : Sıçanlara anesteziyi takiben sadece boyun diseksiyonu yapılarak karotid arter bulundu, ancak bağlanmadan diseksiyon alanı dikiş ile kapatıldı.

**Grup B (n:30):** Hipoksi sonrası SF i.p verildi.

**Grup C (n:30):** Hipoksi sonrası Etanercept i.p verildi.

**Grup D (n:30):** Hipoksi sonrası L-NAME i.p verildi.

Cerrahi işlem sırasında ve hipoksi odacığında iken her 3 dakikada bir sıçanların solunum, cilt rengi ve hareketleri yakından izlendi.

A, B, C ve D gruplarından 15'er sıçan iki saatlik derlenme sürecini takiben, MDA ölçümü için kalp içi girişimle kan örneği alındıktan sonra erken dönemde nöronal apoptozu değerlendirmek üzere dekapite edildi. Sonuçta her gruptan 15 sıçanın 24 günlük olana kadar anne yanında bırakılması hedeflendi.

Doğumu takiben 24. gün anneden ayrılan sıçanlar bir numaralı sıçanın baş kısmı, iki numaralı sıçanın sırt kısmı, üç numaralı sıçanın kuyruk kısmı boyanıp, dört numaralı sıçan boyasız bırakılarak 1'den 4'e dek numaralandırıldı. Kafeslere 1'den başlayarak numara verildi. Tüm sıçanlar her kafeste 3-4 adeti bir arada olacak şekilde ayrıldı. B grubundan bir adet sıçan hipoksi sırasında öldü. C grubundaki sıçanların ikisi hipoksi sırasında öldü, ikisinin anne tarafından öldürüldüğü anlaşıldı, bir tanesi ilaç verildikten bir gün, bir tanesi de ilaç verildikten iki gün sonra öldü. D grubu sıçanların ikisi hipoksi sırasında öldü, ikisinin anne tarafından öldürüldüğü anlaşıldı, ilaç verildikten bir, iki ve üç gün sonra birer tane olmak üzere üç adet sıçan daha öldü. Böylece A grubundan 15,

B grubundan 14, C grubundan 9 adet ve D grubundan ise 8 adet olmak üzere toplam 46 sıçan ile davranış deneyleri tamamlandı.

Sıçanlara doğumu takiben yedinci gün tamamlandığında deneysel hipoksi-iskemi ve ilaç uygulaması, 10. hafta tamamlandığında açık alan deneyinin yapılacağı bir deney uygulama takvimi oluşturuldu.

### **Deneyin Bitiriliş Şekli**

Deneyin yedinci gününde her bir gruptan rastgele seçilen onbeşer sıçana isofloran anestezisi uygulanarak kalp içinden kan örneği alındı ve servikal dislokasyon ile ötenazi uygulandı. Beyin bütünlüklerini bozmadan dekapitasyon yapıldı ve kafatasından çıkarılan beyin örnekleri bekletilmeden %10'luk nötral formaldehid içeren kaplar içerisine konuldu.

Doğumu takiben 10. haftada açık alan deneylerini tamamlayan sıçanlar daha uzun dönemde yakın ve uzak hafıza deneyleri yapılmak üzere kafeslerinde izleme alındı.

### **Histopatolojik Değerlendirme**

Doğumu takiben yedinci günde, hipoksi sonrasında SF, L-NAME veya Etanersept uygulaması sonrasında çıkarılan beyinlerde TUNEL ve Kaspaz-3 yöntemleri ile immünohistokimyasal olarak "apoptoz" değerlendirildi. Çıkarılan beyinler sıçanların hangi gruptan olduğunu ve sıçanın hangi karotid arterinin bağlandığını bilmeyen bir patolog tarafından değerlendirildi. Bir gecelik formaldehid tespit işlemi ardından beyin dokularının sağ yarısı doku boyası ile işaretlenerek koronal olarak seri kesitler alındı. Subtalamik nükleuslar, hipokampus ve paryatal korteksi temsil eden bir veya iki örnek rutin takip işlemine sokuldu. Hipoksik - iskemik hasara daha duyarlı olduğu için bu bölgelerdeki nöronlar seçildi. Rutin takip işleminde beyin dokuları alkol, ksilol ve parafin solüsyonlarında bekletildiler. Hazırlanan parafin bloklardan elde edilen beş mikron kalınlığındaki kesitler rutin hematoksilen eozin histokimyasal boyası ile boyandı. Preparatlar ışık mikroskopik düzeyde (Nikon Eclipse 80i) incelendi. Koronal kesitlerde rutin boya ile nöronal morfolojik değişiklikler not edildi.

### **TUNEL yöntemi**

Nöronlardaki DNA fragmantasyonunu göstermek için Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated-dUTP nick end labeling (TUNEL) metodu ("in situ apoptosis detection kit" ,Biogen, katalog no S7101) seçildi. Bu işlemde, elde edilen beş mikron kalınlığındaki koronal beyin kesitleri, deparafinizasyon ve

alkol takip işlemleri ardından proteinaz K ile 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi (10µl/2.5 ml, fosfat tampon solüsyonu). Fosfat tampon solüsyonunda yıkandıktan sonra kesitler, buharlı kabin içerisine yerleştirildi ve üzerlerine terminal deoksi transferaz (tdt) reaksiyon karışımı damlatılarak 37°C de etüv içerisinde bir saat inkübe edildi. Kromojen olarak 3,3- diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), zemin boyaması için metil yeşili kullanıldı. Kesitler kapama maddesi ile kapatıldı. Pozitif kontrol olarak germinal merkezleri belirgin tonsil kesitleri kullanıldı.

### **Kaspaz-3 Yöntemi**

Elde edilen beş mikron kalınlığındaki koronal beyin kesitlere, deparafinizasyon ve alkol takip işlemleri ardından, Avidin Biotin kompleks immün peroksidaz yöntemi ile poliklonal tavşan antikoru, Kaspaz antikoru (1:100 dilüsyon, Neomarkers, RB-1197-B0) uygulandı. İmmünohistokimyasal boyama yönteminde Lab-Vision, Ultravision Large Volume Detection System Anti-Polyvalent, HRP (Ready to Use) biokimyasal kit, zemin boyaması için Mayer hematoksilen kullanıldı. Preparatlar Nikon E 600 ışık mikroskopunda değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak germinal merkezleri belirgin tonsil kesitleri kullanıldı.

### **Apoptozun Değerlendirilmesi**

Sağ yarıları doku boyası ile işaretlenen koronal beyin kesitleri, TUNEL metodu ve Kaspaz immünohistokimyasal boyama işlemlerinden sonra ışık mikroskopunda değerlendirildi. Her iki beyin yarısı ayrı, ayrı değerlendirildi ve her iki taraftaki subtalamik nükleuslar, hipokampus ve paryatal korteksteki TUNEL ve Kaspaz ile immünreaktivite gösteren nöronlar sayıldı. Sayım için kesitler ışık mikroskopik düzeyde önce küçük büyütmede ve X40 büyütme alanında taranarak sağ ve sol yarı için sayım yapılacak alanlar seçildi. Sayım için uygun 5 alan X400 büyütme (her büyük büyütme =152 µm<sup>2</sup>, toplam alan 760 µm<sup>2</sup>) tarandı. TUNEL ve Kaspaz-3 ile pozitif boyanan toplam nöronlar sayıldı.

### **Biyokimyasal Değerlendirme**

Doğumu takiben yedinci günde dekapite edilen sıçanlardan kalp içi girişim yoluyla alınan kan örneklerinde, lipid peroksidasyonunda ikincil ürün olarak oluşan MDA düzeyleri ölçüldü. Grup A' daki bir örnek kanın, Grup B' deki beş örnek kanın yetersiz olması, Grup C'deki iki örnek kanın hemolizli olması ve Grup D'deki iki örnek kanın hemolizli ve üç örnek kanın yetersiz olması nedeniyle

çalışma dışı bırakıldı. Deneyin bu aşaması 47 örneğin incelenmesi ile tamamlandı.

Aerobik şartlarda örneklerin pH: 3.4' de ve 95 °C ısıda tiyobarbitürik asit (TBA) ile inkübasyonu yoluyla MDA varlığı tespit edildi. Oluşan MDA ve TBA pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve renk şiddetinin 532 nm' de spektrofotometrik olarak ölçümü ile lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyleri saptanmaktadır. Tüplere alınan kan örnekleri dakikada 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek elde edilen plazma çalışılana kadar -20 °C' de saklandı. İşlem yapılacağı gün hazırlanan solüsyonlar 95 °C' de 30 dk inkübe edildi. Daha sonra musluk suyunda soğutuldu. 1 ml distile su ve 5 ml n-bütanol: piridin (14/1 oranında hazırlandı) solüsyonu eklendi. Vortekste karıştırıldı, dakikada 4000 devirde 15 dakika santrifüje edildi. Üstteki kısmı alınarak spektrofotometrede 532 nm'de absorpsiyonu okundu. Sonuçların değerlendirilmesinde 1.1.33 tetraetoksypropane ile hazırlanan standart eğri kullanıldı.

### **Açık Alan Deneyi**

Her deneyden iki gün önce deneyin uygulanacağı gruptaki sıçanlar davranış laboratuvarına getirildi. Tüm sıçanların aynı streslere maruz kalması, ortama alışmaları için eşit süre geçirmeleri sağlandı. Tüm deneyler boyunca sıçanlar aynı araştırmacı tarafından düzeneğe kuyruklarından tutularak konuldu. Araştırmacı deneyler süresince aynı renk kıyafet giydi ve odada aynı yerde durdu. Dört adet şeffaf, plastikten yapılmış, talaşsız ve kuru kap bekleme kafesi olarak kullanıldı. Her sıçan düzeneğe konmadan önce 10 dakika süreyle bu kaplarda bekletildi. Her gün deneylerin bitiminde bu kaplar yıkandı. Her sıçanın alana konulmasından önce açık alan temizlendi. Hayvanların barındığı kafesler üç gün aralarla düzenli olarak temizlendi, ancak gerek görüldüğünde daha sık kafes temizliği yapıldı.

Bu deneyde lokomotor aktivitenin değerlendirilmesi amaçlandı. Tüm sıçanlara 10. haftayı tamamlamalarını takiben bir gün, bir kez ve 5 dk süreyle, saat 09:00 ile 13:00 arasında uygulandı. Ekrandaki görüntüye göre sağ alt köşe başlangıç alanı olarak seçildi. 100x100cm ölçülerindeki zeminde beş dakika süreyle katettikleri mesafe (cm) ve hareket hızları (cm/sn) kaydedildi.

## **İstatistiksel Yöntemler**

Bu çalışmadaki tüm veriler ortalama  $\pm$  standart sapma (SS) olarak hesaplandı ve P değerinin 0.05'in altında olması anlamlı kabul edildi.

Apoptotik hücre sayısı değerlendirmesinde, beyin bir yarısındaki apoptotik hücre sayılarının gruplar arası karşılaştırılması varyans analizi (ANOVA) testi ile yapıldı. Her boyama yöntemi için, her grubun kendi sağ ve sol beyin yarıları arasındaki apoptotik hücre sayılarının karşılaştırılmasında eş yapma t testi (Paired Samples t Test) kullanıldı.

Serum malondialdehid düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılmasında varyans analizi (ANOVA) testi yapıldı.

Açık alan deneyinde katedilen mesafe ve hızların karşılaştırılmasında varyans analizi (ANOVA) testinden yararlanıldı.

İstatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) for Windows Release 11.5.1, Standard Version paket programında yapılmıştır (SPSS Inc.,1989-2002). Grafik çizimlerinde ikinci bir araç olarak Microsoft Office Standard Edition for Students and Teachers, Microsoft ® Office Excel 2003-2007 modüllerinden yararlanılmıştır.

## BULGULAR

### Apoptoz Bulguları

Doğumu takiben yedinci günde dekapite edilen sıçan beyinlerinin her iki yarısı makroskopik olarak değerlendirildi. Tüm gruplardaki sıçanların beyinlerinin her iki yarısı normal görünümdeydi. Koronal kesitler yapıldığında normal makroskopik bulgular mevcut olup, kanama, ödem ve infarkt alanı görülmedi. Rutin hematoksilen eozin boyası ile apoptotik nöronlar normal morfoloji sergileyen nöronlara göre yuvarlak sınırlı, nükleer kondansasyon ve sitoplazmik büzüşme sergilemekteydi.

Normal morfoloji sergileyen nöronlarda TUNEL ile pozitif boyanma görülmedi. Apoptotik morfoloji sergileyen nöronların çoğu TUNEL ile nükleer pozitif olarak boyandı. Kaspaz-3 ile apoptotik olan nöronlarda sitoplazmik ve nükleer pozitif boyanma görülürken; normal morfoloji sergileyen nöronlarda Kaspaz-3 ile boyanma görülmedi.

### TUNEL Yöntemiyle Beyindeki Apoptotik Hücrelerin Değerlendirilmesi

Beynin sağ yarısında TUNEL yöntemiyle boyanan apoptotik hücre sayılarının değerlendirilmesinde; uygulanan hipoksi-iskemi (Hİ) modeliyle beyindeki apoptotik hücre sayısında artış gözlemlendi (Resim 5,6). Hİ sonrası SF uygulanan (Grup B), etanersept uygulanan (Grup C), ve L-NAME uygulanan (Grup D) yavru sıçanların sağ beyin yarısındaki ortalama apoptotik hücre sayıları sırasıyla  $14 \pm 3.1$ ,  $11 \pm 1.8$ , ve  $11 \pm 2.1$  iken; Grup A' daki sıçanlarda (Sham) ortalama apoptotik hücre sayısı  $3 \pm 0.9$  olarak bulundu (Tablo 5 , Şekil 7 ).

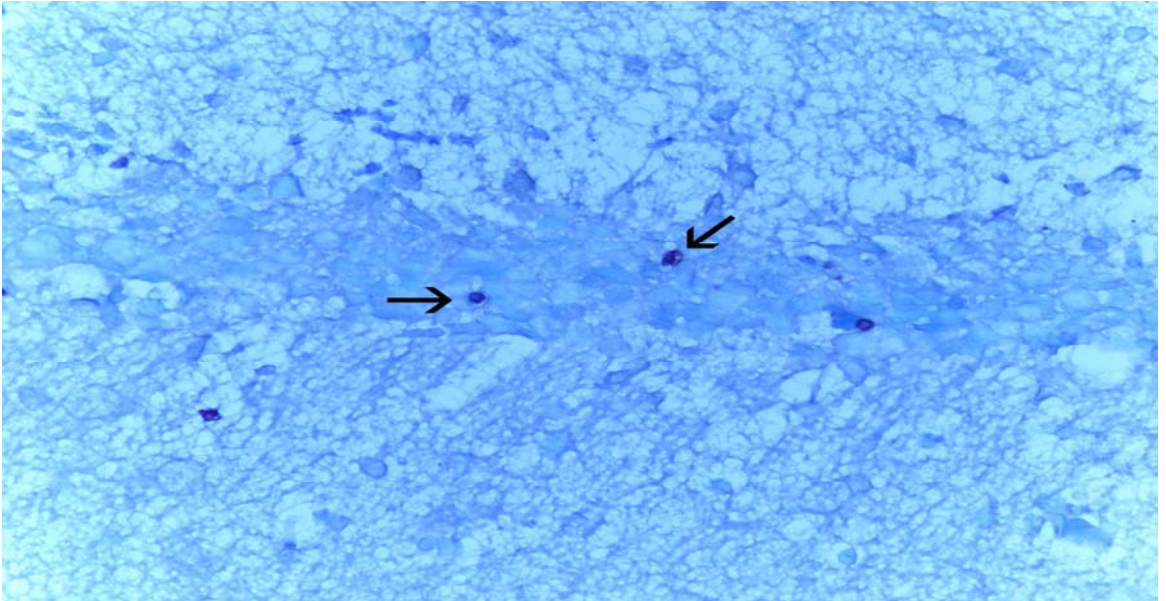
Grup B' deki sıçanların beyinlerinin sağ yarısında TUNEL yöntemiyle boyanan apoptotik hücre sayıları, grup A, C ve D ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu (sırasıyla  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$  ve  $p < 0,001$ ). Hipoksi sonrası etanersept uygulanan Grup C ve hipoksi sonrası L-NAME uygulanan Grup D ' deki sıçanların beyinlerinin sağ yarısında TUNEL yöntemiyle boyanan apoptotik hücre sayıları grup A (Sham)' dakilerle karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p < 0,001$ ) (Tablo 5 ).

Hİ sonrası etanersept uygulanan Grup C'deki sıçanların beyinlerinin sağ yarısında TUNEL yöntemiyle boyanan apoptotik hücre sayıları Grup D (L-NAME)' ninki ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

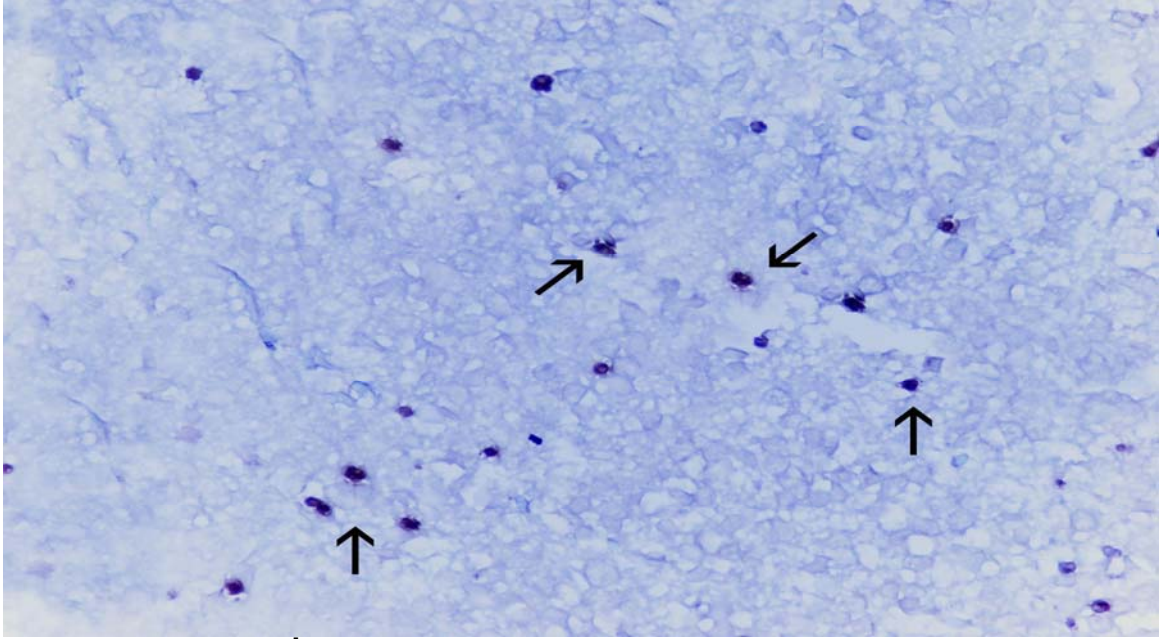
Beynin sol yarısında TUNEL yöntemiyle boyanan apoptotik hücre sayılarının değerlendirilmesinde; grup B, C ve grup D' deki ortalama apoptotik hücre sayısı sırasıyla  $12 \pm 2.7$ ,  $10 \pm 1.2$  ve  $9 \pm 1.3$  olup grup A (sham)' da saptanan ortalama apoptotik hücre sayısından ( $2.8 \pm 0.7$ ) istatistiksel olarak anlamlı derecede fazlaydı ( $p < 0,001$ ) (Tablo 5, Şekil 8). Grup B' deki sıçanların beyinlerinin sol yarısında TUNEL yöntemiyle boyanan apoptotik hücre sayıları grup C ve D ile karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p < 0,001$ ). Grup C ve D' deki sıçanların beyinlerinin sol yarısında TUNEL yöntemiyle boyanan apoptotik hücre sayılarının grup A ile karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı ( $p < 0,001$ ) (Şekil 8).

Hİ sonrası etanersept uygulanan Grup C' deki sıçanların beyinlerinin sol yarısında TUNEL yöntemiyle boyanan apoptotik hücre sayıları Grup D (L-NAME)' ninki ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Beynin sağ ve sol yarısında TUNEL yöntemiyle saptanan apoptotik hücre sayılarının her bir grup için karşılaştırılmasında; Grup A' da istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmaz iken ( $p:0,189$ ), Grup B, C ve D'de beynin sağ yarısında saptanan apoptotik hücre sayıları sol taraftakine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti (Grup B, C, D sırasıyla  $p < 0,001$ ,  $p < 0,008$  ve  $p < 0,001$ ) (Tablo 5, Şekil 9).



**Resim 5: Sham Grubunda Hipokampal Nöronlarda TUNEL Yöntemiyle Apoptotik Hücrelerin Gösterilmesi (ok ile işaretli)**

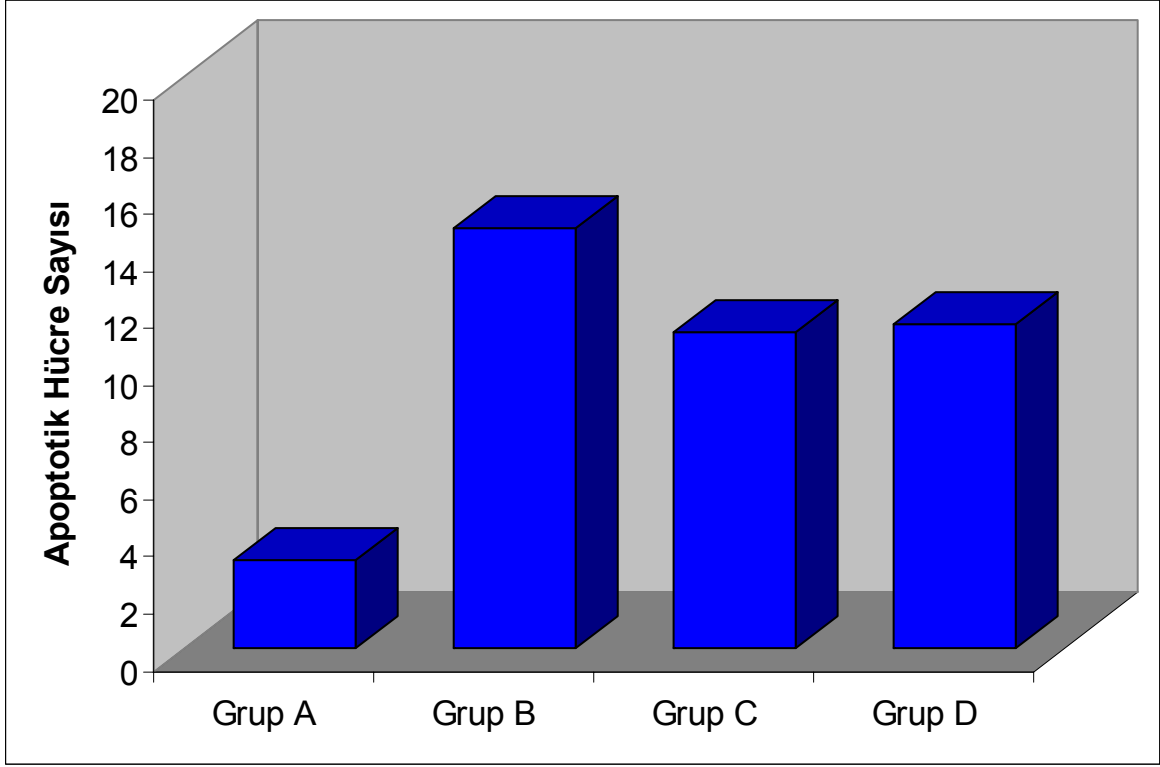


**Resim 6:Hipoksi-İskemi Sonrasında SF verilen Grupta Hipokampal Nöronlarda TUNEL Yöntemiyle Apoptotik Hücrelerin Gösterilmesi (ok ile işaretli)**

**Tablo 5: Gruplara göre beynin sağ ve sol yarısındaki apoptotik hücre sayılarının karşılaştırılması (TUNEL Yöntemi)**

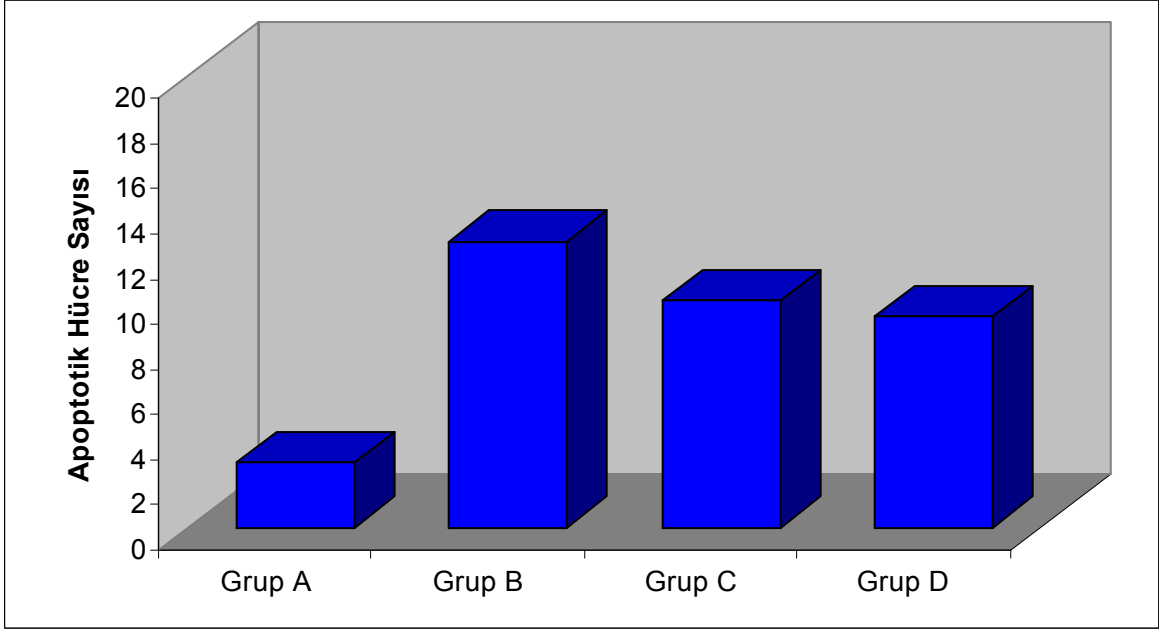
Grup	A	B	C	D
Beynin sağ yarısı	3± 0.9	14±3.1	11±1.8	11±2.1
Beynin sol yarısı	2.8 ± 0.7	12 ± 2.7	10 ± 1.2	9 ± 1.3
p (sütun)	p:0,189	p<0,001	p<0,001	p<0,001

(Beynin sağ ve sol yarısı için Grup B ile Grup A, Grup B ile C ve Grup B ile D karşılaştırması p<0.001, beynin sağ ve sol yarısı için Grup C ile Grup A ve Grup D ile Grup A karşılaştırması p<0.001, beynin sağ ve sol yarısı için Grup C ile Grup D karşılaştırması p>0.05)



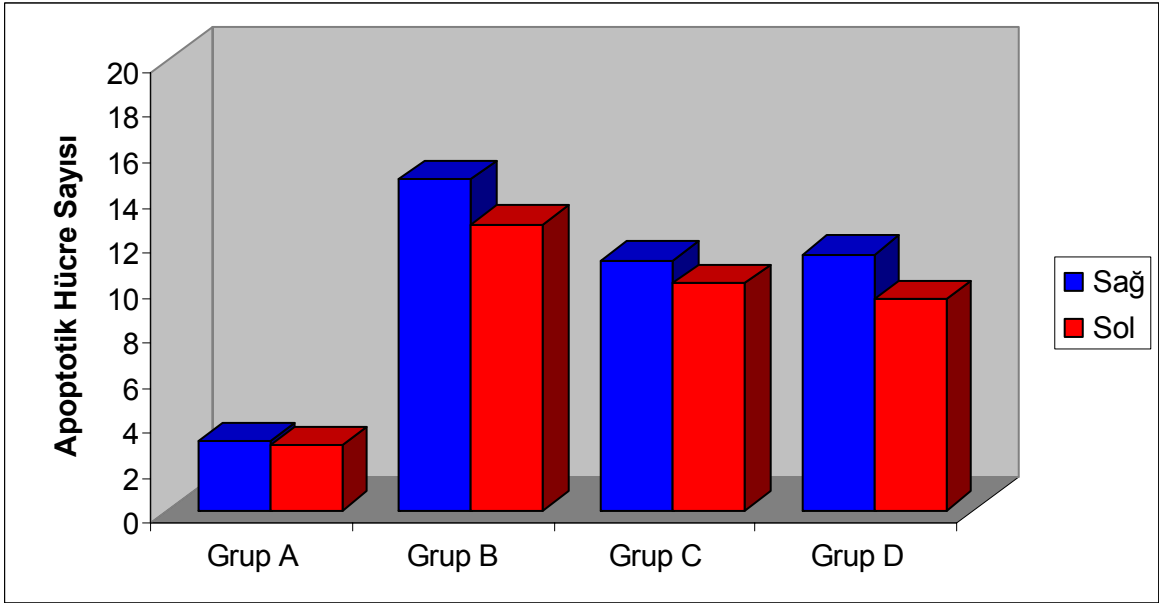
**Şekil 7: Beynin Sağ Yarısındaki Apoptotik Hücrelerin Gruplara Göre Dağılımı (TUNEL Yöntemi)**

*(Grup B ile A, Grup B ile C ve Grup B ile D karşılaştırması  $p < 0.001$ , Grup C ile A ve Grup D ile A karşılaştırması  $p < 0.001$ , Grup C ile D karşılaştırması  $p > 0.05$ )*



**Şekil 8: Beynin Sol Yarısındaki Apoptotik Hücrelerin Gruplara Göre Dağılımı (TUNEL Yöntemi)**

(Grup B ile A, Grup B ile C ve Grup B ile D karşılaştırması  $p < 0.001$ , Grup C ile A ve Grup D ile A karşılaştırması  $p < 0.001$ , Grup C ile D karşılaştırması  $p > 0.05$ )



**Şekil 9: Beynin Sağ ve Sol Yarısındaki Apoptotik Hücre Sayıları (TUNEL Yöntemi)**

(Grup A' da beynin sağ ve sol yarısındaki apoptozisin karşılaştırması  $p > 0.05$ , Grup B, C, D' de beynin sağ ve sol yarısındaki apoptozisin karşılaştırması  $p < 0.001$ ).

### **Kaspaz-3 İmmünohistokimya Yöntemiyle Beyindeki Apoptotik Hücrelerin Değerlendirilmesi**

Beynin sağ yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle yapılan apoptotik hücre sayılarının değerlendirilmesinde; uygulanan hipoksi ve iskemi modeliyle beyindeki apoptotik hücre sayısında artış gözlemlendi (Resim 7,8). Grup B, C ve grup D' deki ortalama apoptotik hücre sayıları sırasıyla  $13.9 \pm 2.4$ ,  $10.9 \pm 1.7$  ve  $11 \pm 2.1$  iken; grup A (sham)' nin ortalama apoptotik hücre sayısı  $3 \pm 0.7$  olarak bulundu (Tablo 6, Şekil 10). Grup B, C ve D' nin beyin sağ yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle belirlenen ortalama apoptotik hücre sayıları grup A ile karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu (sırasıyla  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$  ve  $p < 0,001$ ).

Grup C ile Grup B' de beyin sağ yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle saptanan apoptotik hücre sayıları karşılaştırıldığında ise grup C' deki apoptotik hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu saptandı ( $p < 0,001$ ) (Tablo 6, Şekil 10). Grup D ile grup B' de beyin sağ yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle saptanan apoptotik hücre sayıları karşılaştırıldığında da Grup D' deki apoptotik hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu saptandı ( $p < 0,001$ ).

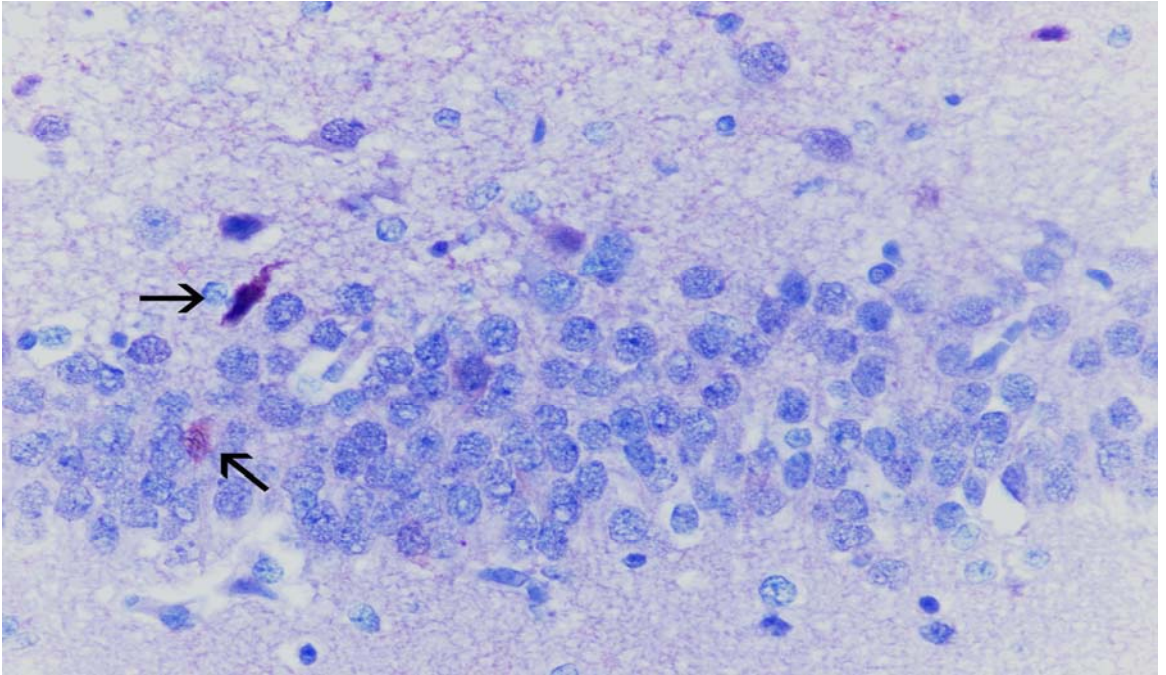
Hİ sonrası etanersept uygulanan Grup C'deki sıçanların beyinlerinin sağ yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle saptanan apoptotik hücre sayıları Grup D (L-NAME)' ninki ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Beynin sol yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle saptanan apoptotik hücre sayılarının değerlendirilmesinde; Grup B, C ve Grup D' deki ortalama apoptotik hücre sayısı sırasıyla  $11 \pm 1.9$ ,  $8.8 \pm 1.3$  ve  $8.6 \pm 1.7$  olup grup A' dan ( $3.2 \pm 1$ ) istatistiksel olarak anlamlı derecede fazlaydı (sırasıyla  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$  ve  $p < 0,001$ ) (Tablo 6).

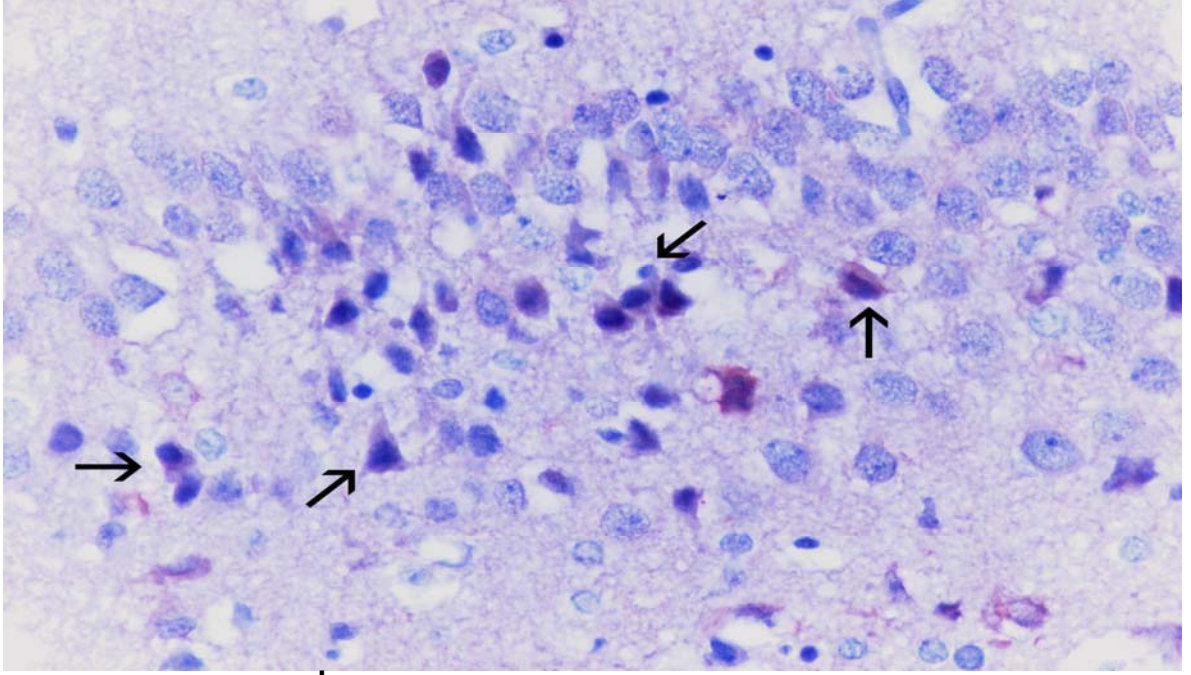
Grup C ile Grup B' de beyin sol yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle saptanan apoptotik hücre sayıları karşılaştırıldığında ise Grup C' deki apoptotik hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu saptandı ( $p < 0,001$ ) (Tablo 6, Şekil 11). Grup D ile grup B' de beyin sol yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle saptanan apoptotik hücre sayıları karşılaştırıldığında da Grup D' deki apoptotik hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu saptandı ( $p < 0,001$ ).

Hİ sonrası etanersept uygulanan Grup C' deki sıçanların beyinlerinin sol yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle saptanan apoptotik hücre sayıları Grup D (L-NAME)' nin ki ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Beynin sağ ve sol yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle saptanan apoptotik hücre sayılarının her bir grup için karşılaştırılmasında; Grup A' da istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmaz iken ( $p:0,413$ ), Grup B, C ve D' de beynin sağ yarısında saptanan apoptotik hücre sayısı sol taraftakine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ( $p<0,001$ ) (Tablo 6, Şekil 12).



**Resim 7: Sham Grubunda Hipokampal Nöronlarda Kaspaz-3 Yöntemiyle Apoptotik Hücrelerin Gösterilmesi (ok ile işaretli)**

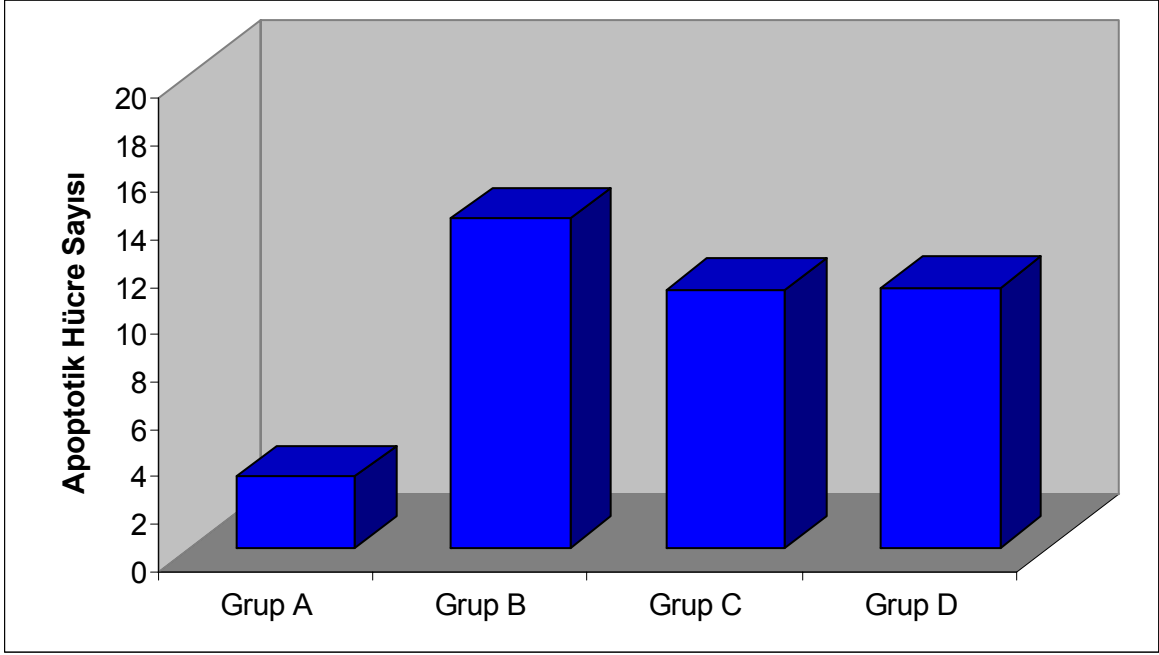


**Resim 8: Hipoksi-İskemi Sonrasında SF Verilen Grupta Hipokampal Nöronlarda Kaspaz-3 Yöntemiyle Apoptotik Hücrelerin Gösterilmesi (ok ile işaretli)**

**Tablo 6: Gruplara göre beynin sağ ve sol yarısındaki apoptotik hücre sayılarının karşılaştırılması (Kaspaz-3 Yöntemi)**

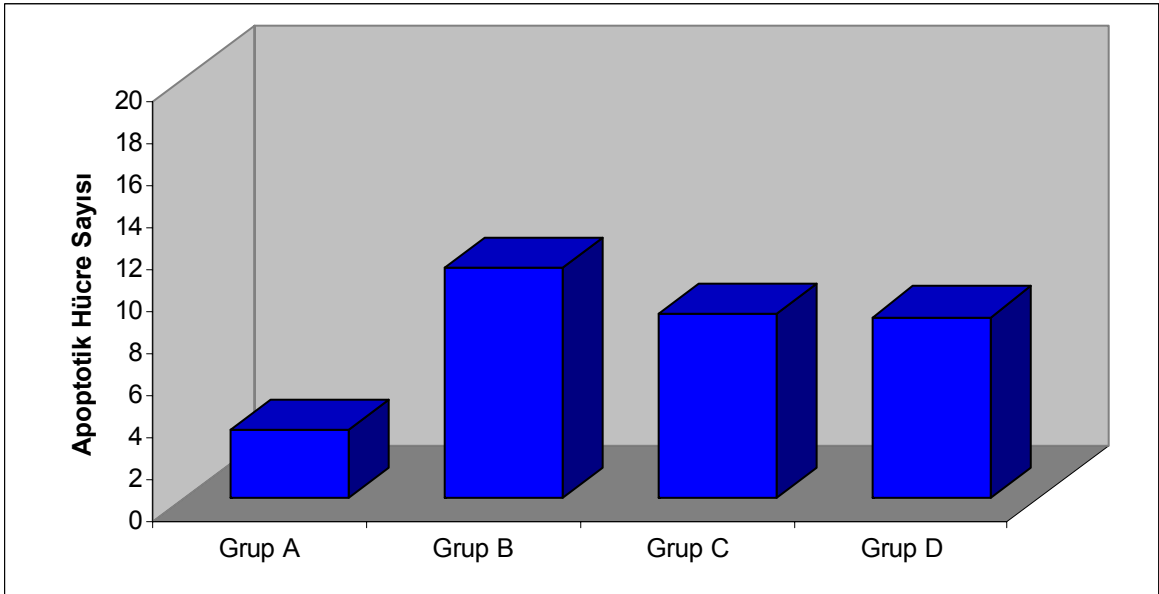
Grup	A	B	C	D
Beynin sağ yarısı	3 ± 0.7	13.9 ± 2.4	10.9 ± 1.7	11 ± 2.1
Beynin sol yarısı	3.2 ± 1	11 ± 1.9	8.8 ± 1.3	8.6 ± 1.7
p (sütun)	p: 0,413	p<0,001	p<0,001	p<0,001

*(Beynin sağ ve sol yarısı için Grup B ile A, Grup B ile C ve Grup B ile D karşılaştırması p<0.001, beynin sağ ve sol yarısı için Grup C ile A, Grup D ile A karşılaştırması p<0.001, beynin sağ ve sol yarısı için Grup C ile D karşılaştırması p>0.05)*



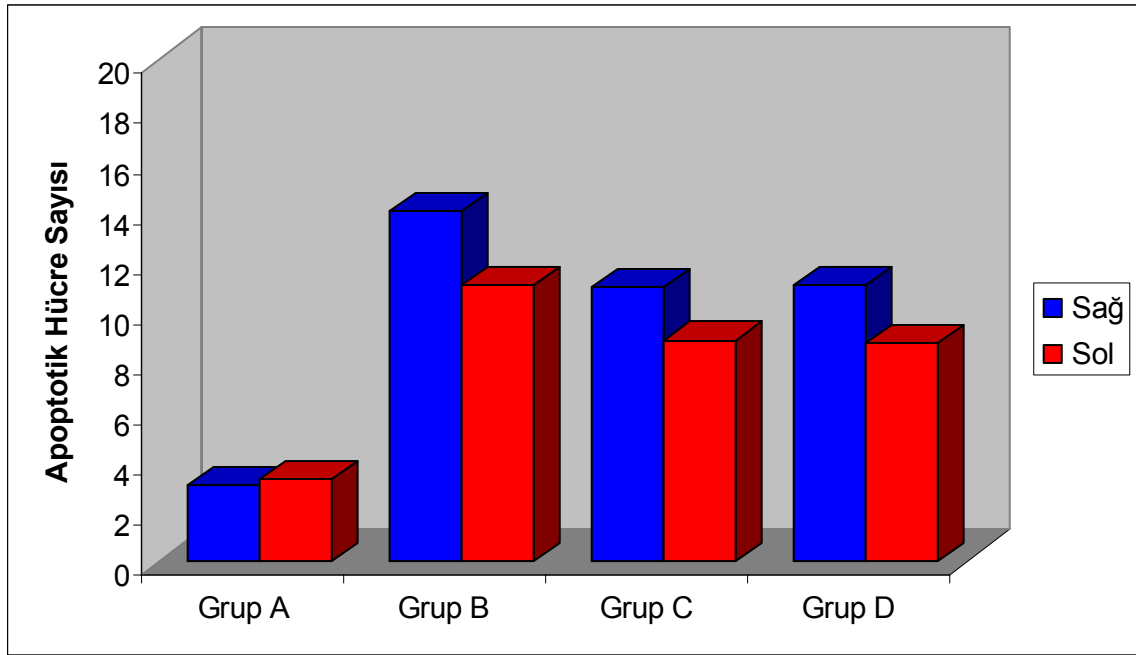
**Şekil 10: Beynin Sağ Yarısındaki Apoptotik Hücrelerin Gruplara Göre Dağılımı (Kaspaz-3 Yöntemi)**

(Grup B ile A, Grup B ile C ve Grup B ile D karşılaştırması  $p < 0.001$ , Grup C ile A ve Grup D ile A karşılaştırması  $p < 0.001$ , Grup C ile D karşılaştırması  $p > 0.05$ )



**Şekil 11: Beynin Sol Yarısındaki Apoptotik Hücrelerin Gruplara Göre Dağılımı (Kaspaz-3 Yöntemi)**

(Grup B ile A, Grup B ile C ve Grup B ile D karşılaştırması  $p < 0.001$ , Grup C ile A ve Grup D ile A karşılaştırması  $p < 0.001$ , Grup C ile D karşılaştırması  $p > 0.05$ )



**Şekil 12: Beyinin Sağ ve Sol Yarısındaki Apoptotik Hücre Sayıları (Kaspaz-3 Yöntemi)**

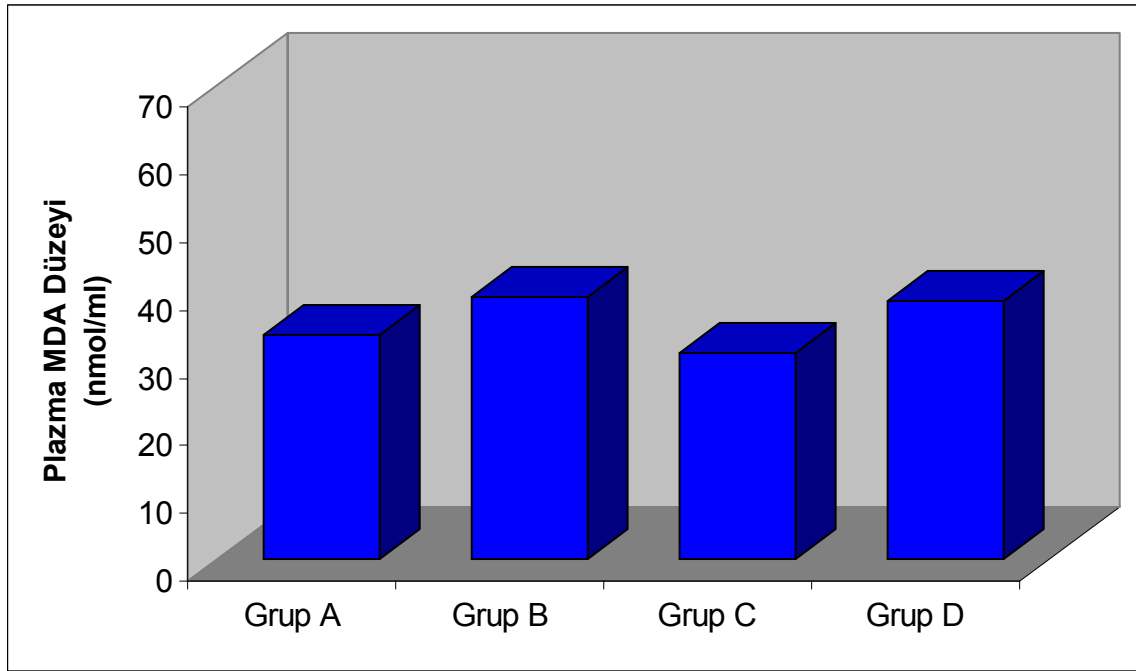
(Grup A' da beyinin sağ ve sol yarısındaki apoptozisin karşılaştırması:  $p>0.05$ , Grup B,C,D' de beyinin sağ ve sol yarısındaki apoptozisin karşılaştırması:  $p<0.001$ )

#### Malondialdehid Düzeyi

Doğumu takiben yedinci gün yapılan HİBH' den sonra kalp içi girişimle alınan kan örneklerinde en yüksek ortalama MDA düzeyi grup B' deki sıçanların plazmalarında saptanırken, en düşük MDA düzeyi ise grup C' deki sıçanların plazmalarında saptandı. Serum MDA düzeyleri grup A' da  $33,1 \pm 10,5$ , grup B' de  $38,7 \pm 7,2$ , grup C' de  $30,3 \pm 10,0$  ve grup D' de  $37,0 \pm 9,7$  nmol / ml olarak ölçüldü. Plazma MDA düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ( $p: 0,083$ ) (Tablo 7) (Şekil 13).

**Tablo 7: Gruplara göre plazma MDA düzeylerinin karşılaştırılması**

Grup	A	B	C	D
MDA düzeyi (nmol/ml)	$33,1 \pm 10,5$	$38,7 \pm 7,2$	$30,3 \pm 10,0$	$37,0 \pm 9,7$



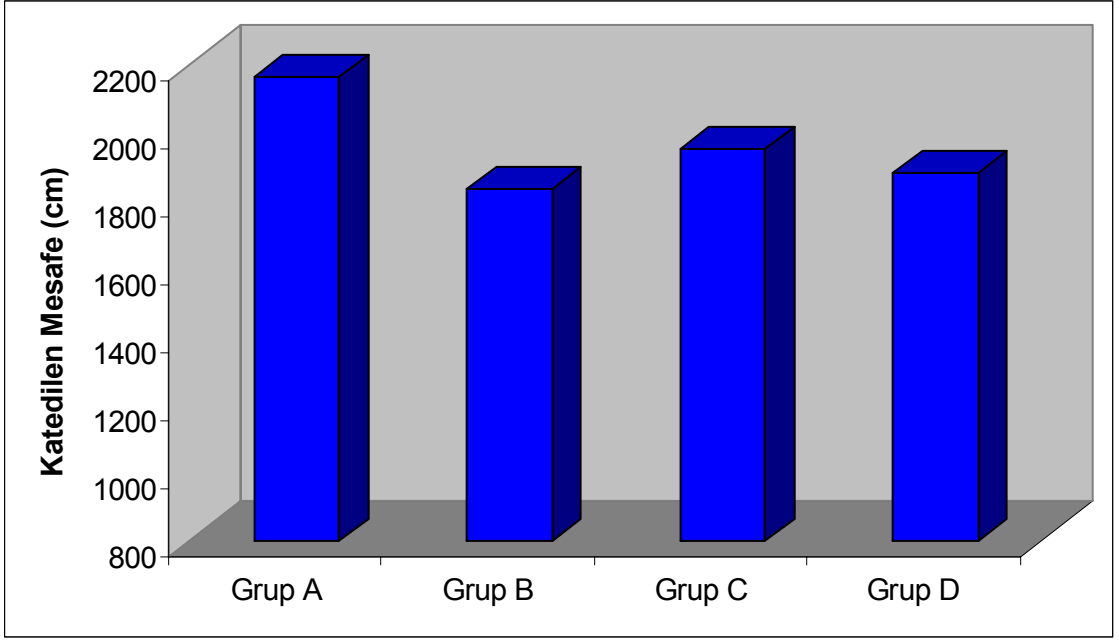
**Şekil 13: Plazma MDA Düzeyinin Gruplara Göre Dağılımı (p >0,05)**

#### **Açık Alan Deneyi Bulguları**

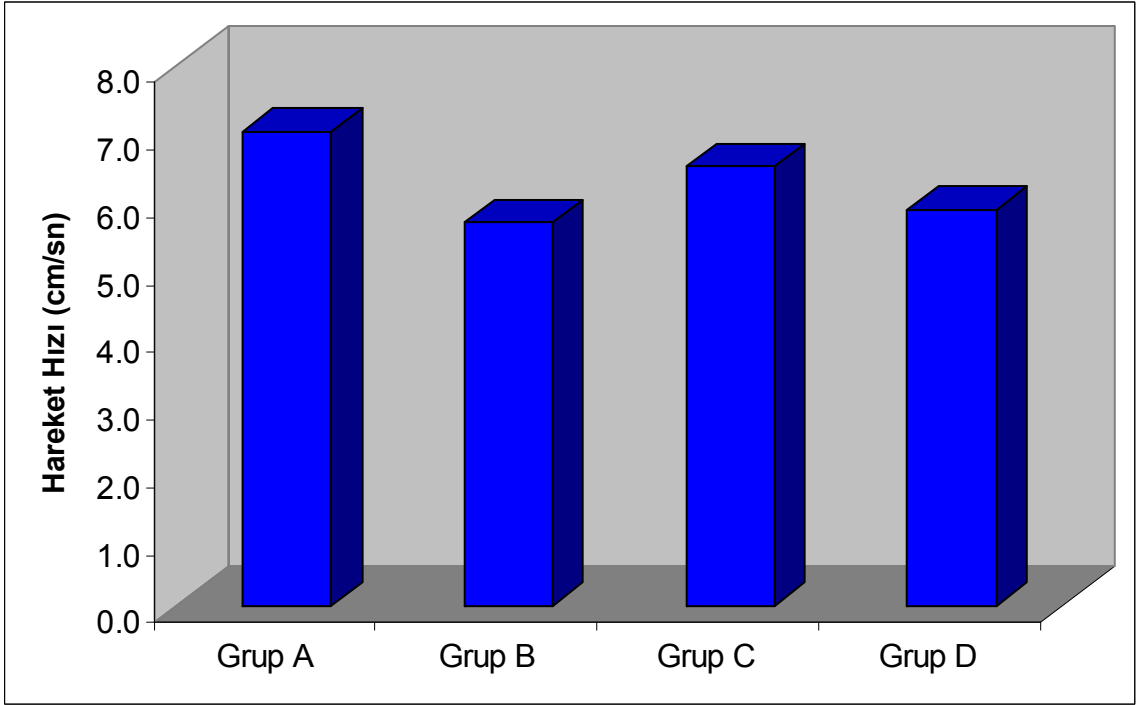
Doğumu takiben 10. haftasını tamamlamış, ortalama ağırlıkları  $209 \pm 21,6$  gr olan sıçanlara uygulandı. Açık alan deneyinde her grubun birim zamanda ortalama kat ettiği mesafe ve hareket hızları Tablo 8’ de gösterilmiştir. Ortalama katedilen mesafe ve hareket hızlarının gruplara göre karşılaştırmasında her iki test için de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla p:0,486 ve p:0,113) (Şekil 14 ve 15). Her iki test için grup B’ de en düşük, grup A’ da ise en yüksek değer saptandı.

**Tablo 8: Gruplara Göre Ortalama Katedilen Mesafe ve Hareket Hızı (Açık Alan Deneyi)**

	<b>Katedilen mesafe (cm)</b>	<b>Hareket Hızı (cm/sn)</b>
<b>Grup A</b>	<b>2158.1 ± 585.7</b>	<b>7.0 ± 1.6</b>
<b>Grup B</b>	<b>1834.0 ± 626.0</b>	<b>5.6 ± 1.0</b>
<b>Grup C</b>	<b>1947.6 ± 421.5</b>	<b>6.4 ± 1.4</b>
<b>Grup D</b>	<b>1878.2 ± 680.8</b>	<b>5.8 ± 2.1</b>
<b>p</b>	<b>0.486</b>	<b>0.113</b>



**Şekil 14: Sıçanların Katettikleri Mesafenin Gruplara Göre Dağılımı (Açık Alan Deneyi) ( $p>0,05$ )**



**Şekil 15: Sıçanların Hareket Hızlarının Gruplara Göre Dağılımı (Açık Alan Deneyi) ( $p>0,05$ )**

## TARTIŞMA

HİBH yenidoğan bakımında, tanı ve tedavideki tüm gelişmelere rağmen gelişmiş ülkelerde bile yenidoğanların en önemli mortalite ve morbitide nedenlerindendir<sup>27</sup>. Ülkemizde HİBH ve komplikasyonları ile ilgili kesin değerler bulunmamakla birlikte ülkemiz için çok daha önemli bir sorundur.

HİBH gelişen vakaların erken dönemde tanısının kesinleştirilmesi ve prognozun doğru tahmin edilmesi büyük önem taşımaktadır. HİBH geliştikten sonra geç dönemde uygulanacak tedavilerin yeterince etkili olmadığı bilinmektedir. Bu yüzden HİBH'yi önlemeye yönelik ve erken dönemde hasarı azaltıcı tedavilerin önemi artmaktadır. HİBH'yi ve olumsuz etkilerini önlemeye yönelik tedavilerin sonuçlarını sıçanlarda biyokimyasal ve histopatolojik yöntemler ile, bilişsel ve lökomotor yetilerin değerlendirilmesiyle göstermek mümkündür.

Perinatal dönemde beynin hipoksi ve iskemisi sonucunda nöbetler, zeka geriliği, işitme ve görme sorunları, öğrenme sorunları gibi bir çok istenmeyen durum ortaya çıkmaktadır<sup>36</sup>. Yenidoğanlar özellikle de zamanından önce doğanlar serbest radikal hasarına ve HİBH'ye karşı oldukça duyarlıdır<sup>5,36,37</sup>. HİBH'yi hücresel düzeyde nekroz ve apoptozu azaltarak tedavi etmek mümkündür.

HİBH' de hücre ölümü apoptotik ve nekrotik olmak üzere iki şekilde karşımıza çıkar<sup>6,7</sup>. HİBH' de geç dönemdeki nöronal ölüm saatler ve günler içerisinde gelişen apoptozisle olmaktadır. Deneysel hayvan modellerinde sıçanlara uygulanan hipoksi-iskemiden sonra beyindeki apoptotik hücre sayısında artış gözlenmektedir<sup>140</sup>. Hipoksi ve iskemi sonrası ölen bebeklerin beyin dokularında da belirgin apoptozis gösterilmiştir<sup>7</sup>. Yenidoğan döneminde gelişen hipoksik iskemik beyin hasarında apoptozisin nekrozdan daha önemli olduğu bilinmektedir<sup>31</sup>. Apoptotik nöron sayısı ne kadar fazla ise hasar da o derece fazla olmaktadır. Bu nedenle apoptozu azaltmaya yönelik pek çok ilaç denenmektedir.

HİBH'yi anlayabilmek için değişik deneysel hayvan modelleri kullanılmıştır. Bu modellerde beynin kan akımı ve oksijen yoğunluğu azaltılarak beynin belirli bölgelerinin nasıl etkilendiği incelenmiştir<sup>141-143</sup>. Bu çalışmalarda karotid arter veya orta serebral arterin tıkanmasıyla beyinde iskemi

oluşturulmuştur<sup>144</sup>. Günümüzde yenidoğan HİBH' nin değerlendirildiği deneysel çalışmalarda en çok kullanılan model Rice ve Vannucci tarafından tarif edilen yöntemdir<sup>145</sup>. Bu modelde tek taraflı karotid arter bağlanmasına ek olarak deney hayvanları hipoksi odacıklarına konulmaktadır. Hipoksi modellerinde %5-10 oksijen ve %90-95 azot kullanılmaktadır. Çalışmamızda yedi günlük sıçanların sağ karotid arterleri bağlandıktan sonra derlenme sürecini takiben iki saat süreyle %8 oksijen ve %92 azot karışımıyla hipoksi oluşturulmuştur.

HİBH' nin insanlarda ortaya çıkardığı klinik ve histopatolojik bulguları taklit edebilecek en uygun hayvanın ne olduğu tartışmalıdır. HİBH' nin histopatolojik ve biyokimyasal sonuçlarını, uzun dönem nörolojik etkilerini anlamada sıçanlar ile yapılan hipoksi iskemi modelleri daha uygun olmaktadır<sup>146</sup>. Bizim çalışmamızda da yedi günlük sıçanlar kullanılmıştır. Özellikle insanların beyin gelişimi göz önüne alındığında, yedi günlük yavru sıçan beyinlerinin insanlardaki perinatal dönem için uygun olduğu düşünülmektedir<sup>6</sup>.

Yenidoğan sıçanlarda, iskemi ve 1-3 saatlik hipoksiden sonra beyinde apoptotik nöron sayısının, karotid arter bağlaması yapılan tarafta daha fazla olmak üzere, her iki beyin yarısında arttığı pek çok çalışmada gösterilmiş olup, apoptozu azaltan çeşitli ajanlarla HİBH' nin akut etkilerinin tedavi edilebileceği ileri sürülmüştür<sup>92,147</sup>. Bizim çalışmamızda da iki saatlik hipoksi uygulaması sonrasında, sağ beyin yarısında daha fazla olmak üzere her iki tarafta apoptozisin arttığı gösterildi.

Subtalamik nükleuslar, hipokampus ve paryatal korteks bölgelerindeki nöronların hipoksik-iskemik hasara daha çok duyarlı olduğu gösterilmiş ve apoptozisin histopatolojik değerlendirilmesi için bu bölgelerin incelenmesi önerilmiştir<sup>5,37,39</sup>. Bizim çalışmamızda da özellikle beyinin bu bölgeler incelenmiştir.

Çalışmamızda, HİBH ve bu hasarın L-NAME ve etanersept kullanımı ile ne ölçüde önlenildiği erken dönemde beyin dokularında apoptotik nöronlar sayılarak ve kan örneklerinde MDA düzeylerine bakılarak değerlendirilmiştir.

TUNEL ve Kaspaz-3 yöntemleriyle istatistiksel olarak en fazla apoptotik hücre sayısı, sırasıyla hipoksi-iskemi sonrası SF uygulanan grup, L-NAME uygulanan grup, etanersept uygulanan grup ve sham grubunda tespit edilmiştir.

Etanersept veya L-NAME uygulaması apoptotik nöron sayısını önemli ölçüde azaltmıştır.

Ülkemizde olduğu gibi doğum öncesi bakımın düzenli yapılmadığı ülkelerde yenidoğan bebeklerde önemli bir mortalite ve morbitide nedeni olan HİBH' de destek tedavilerin yanında yeni tedavi yöntemlerinin de geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. HİBH' de tedavi için verilen maddelerin deney hayvanı üzerindeki metabolik etkilerinin de insanla uyumlu olması gerekmektedir. Özellikle apoptozisin baskılandığı tedaviler beyin dokusunun hipoksik-iskemik hasara karşı korunmasında gelecek vaad etmektedir.

Yeniden kanlanma döneminde, nöronal hücre hasarına sitokinler, NO, oksijen radikalleri, eksitatör nörotransmitterler neden olmaktadır. Bu olayların sonucunda genellikle apoptozis uyarılması ve hücre ölümü gerçekleşir. Bu olaylar birkaç saat içerisinde gerçekleştiğinden, bu süreci geri çevirecek veya önleyecek girişimlerin tedavi edici özelliği de olabileceği düşünülmektedir.

Apoptozun baskılanması ile nöronların yaşam sürelerinin uzadığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalar NO' nun HİBH patogenezinde önemli bir mediatör olarak rol oynadığını göstermektedir<sup>11</sup>. NO vasodilatasyon yapıcı, trombosit kümeleşmesini önleyici ve süper oksitleri temizleyici işlevleri ile ilk bakışta koruyucu gibi görünmektedir. Ancak kuvvetli oksidanlara dönüşerek süper oksitlerin toksisitesini artırır. O<sub>2</sub><sup>-</sup> ile NO' nun birleşmesiyle peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) oluşmakta, bu da OH<sup>-</sup>'ne dönüşmektedir<sup>11</sup>. NO sentezini engelleyen tedavilerin HİBH' yi azaltabileceği ileri sürülmektedir. Tavşan rektus femoris kasında oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarı modelinde NO' nun etkisini anlamak amacıyla NOS baskılayıcısı olan nitro-iminoetil-L-ornitin (L-NIO) verilmiştir. L-NIO' nun oluşan hasarı geri çevirdiği, nötrofil infiltrasyonunun bir göstergesi olan doku myeloperoksidaz düzeylerini azalttığı ve ödemi önlediği gösterilmiş ve NO' nun iskemi-reperfüzyon hasarında zararlı etkilerinin olabileceği belirtilmiştir<sup>12</sup>. Yapılan başka bir çalışmada fare gastrocnemius kasında iskemi-reperfüzyona bağlı olarak oluşan doku hasarı ve myeloperoksidaz aktivitesi L-NAME tarafından önlenmiş ve NO' nun zararlı olduğu sonucuna varılmıştır<sup>105</sup>. Sıçanlarda oluşturulan başka bir iskemi-reperfüzyon hasarı modelinde, kas dokusunda NOS aktivitesinin reperfüzyonun ikinci saatinden itibaren artmaya başladığı gösterilirken, NO' nun ve serbest

radikallerle oluşturduğu türevlerinin iskemi-reperfüzyon hasarına katkıda bulunabileceği ileri sürülmüştür<sup>148</sup>.

Son yıllarda NOS baskılayıcı tedaviler ile ilgili araştırmalarda artış gözlenmektedir. Jing Chen ve arkadaşları sodyum nitroprusid vererek febril konvulsiyon oluşturdukları sıçan modelinde, plazma NO ve hipokampal nöronlarda kaspaz-12 seviyesinin arttığı ve buna bağlı olarak apoptozisin arttığını, L-NAME uygulanmasıyla kaspaz 12 seviyesinin azaldığı ve nöronal apoptozisin baskılandığını göstermişlerdir<sup>14</sup>. L-NAME' nin germ hücre apoptozisini baskıladığını gösteren başka bir çalışmada, spermatik damarların bağlanmasından 30 dakika önce bir grup sıçana L-NAME bir grup sıçana SF i.p olarak verilmiş, L-NAME verilen sıçanlarda testiküler NO düzeyinin önemli derecede azaldığı ve apoptozisin baskılandığı gösterilmiştir<sup>15</sup>. L-NAME' in apoptozisi önlediği bir diğer deneysel sıçan çalışmasında, abdominal aortanın bağlanmasından 30 dakika önce bir grup sıçana L-NAME, bir grup sıçana SF i.p verilerek mesane kasılması değerlendirilmiştir. L-NAME verilen sıçanların mesane kasının kasılmasının verilmeyenlere göre önemli oranda arttığı ve bu sıçanların mesanesinde apoptozisin baskılandığı gösterilmiştir<sup>149</sup>.

NOS baskılayıcısı olan N-nitro-L-arjinin (L-NNA) uygulamasının fetal büyüme üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, doğum öncesi bir grup sıçana gebeliğin 17, 18 ve 19. günlerinde L-NNA uygulanmıştır. Doğan yavru sıçanlara üç saat süresince %8 yoğunlukta oksijen uygulanarak genel hipoksi sağlanmış ve sıçanlar aynı gün öldürülmüştür. Bu sıçanlarda kalp, beyin, akciğer, böbrekler ve bağırsaklarda lipid peroksidasyonu incelenmiştir. L-NNA uygulamasının fetal büyüme geriliğine neden olmadığı; kalp, akciğer, böbrekler ve beyinde lipid peroksidasyonunu azalttığı ancak bağırsak dokusunda ise lipid peroksidasyonunda artmaya neden olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, NOS inhibisyonu hipoksik yenidoğan sıçanlarda bazı dokular için koruyucu bazıları için ise zararlı etkileri olabileceği bildirilmiştir<sup>150</sup>.

Hipoksi ve %100 oksijen ile tekrar oksijenlenme dönemlerinde beyin dolaşımı üzerinde L-NAME 'in etkilerinin araştırıldığı bir diğer deneysel hayvan çalışmasında, hayvanlar hipoksik grup (%8 O<sub>2</sub>, 20 dakika) ve yeniden oksijenlenme grubu (%100 O<sub>2</sub>, 60 dakika) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. L-NAME her iki gruba da i.p olarak verilmiştir. Serebral hemodinami doppler akım ve beyin içi basınç monitörizasyonu ile değerlendirilmiştir. Hipoksi grubunda L-

NAME uygulanması ciddi hipotansiyon yaparak beyin dolaşımını bozarken, %100 O<sub>2</sub> verilen grupta beyin perfüzyon basıncını ve beyin kan akım hızını azaltmamıştır. Hipoksemi döneminde L-NAME uygulaması beyin dolaşımını azaltıp tansiyon düşüklüğü yaptığı, %100 O<sub>2</sub> ile yeniden oksijenlenme döneminde ise beyin dolaşımı üzerine olumsuz etki yapmadığı gösterilmiştir. Bu olumsuz etkiden dolayı hipoksemi döneminde L-NAME kullanılmasının sınırlandırılabilceği bildirilmektedir<sup>151</sup>.

nNOS ve iNOS baskılanması ile perinatal hipoksi-iskeminin uyardığı yangısal cevabın ve nöronal hasarın azaldığının gösterildiği bir başka çalışmada, on iki günlük sıçanların öncelikle sağ karotid arterleri bağlanıp, ardından %8 O<sub>2</sub> uygulanarak hipoksi-iskemi sağlanmıştır. Sıçanların bir kısmına NOS inhibitörü, bir kısmına ise plasebo uygulanmıştır. NOS inhibitörü uygulanan sıçanların beyinlerinde plasebo grubuna göre daha az hasarın meydana geldiği gösterilmiştir. Hipoksi-iskemi ile beyin dokusunda İL1-beta, TNF-alfa ve TNF-beta düzeylerinde artış gösterilirken, her iki beyin yarısı arasında sitokin düzeyi bakımından fark saptanmamıştır. nNOS ve iNOS baskılayıcılarının kullanılması sitokin düzeylerinde herhangi bir değişiklik yapmadığı gösterilmiştir<sup>152</sup>.

Bizim çalışmamızda da hipoksi iskemi uygulamasından sonra nöronal apoptozun önlenmesi amacıyla NOS inhibitörü olan L-NAME kullanılmıştır. Literatür taramamızın sonuçlarına göre, HİBH oluşturulan hayvan modellerinde L-NAME kullanımı ve beyin üzerine etkileriyle ilgili yayımlanmış çok az sayıda makale dikkati çekmiştir. Hipoksi sonrası L-NAME uyguladığımız grup serum fizyolojik verilen grup ile karşılaştırıldığında beynin her iki yarısında da apoptotik hücre sayılarında anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Bulgularımıza göre, hipoksi sonrası L-NAME verilmesi, HİBH oluşturulan yenidoğan sıçanlardaki apoptozisi azaltmaktadır.

HİBH' de sitokin ilişkili beyin zedelenmesi konusu giderek önem kazanmaktadır. TNF- alfanın sitozolde sifingomyelinazı uyarıp seramid artışını sağlayarak apoptozisi uyardığı bilinmektedir. Deneysel olarak kolit oluşturulduktan sonra TNF-alfa blokörü olan etanersept uygulanan bir hayvan çalışmasında, etanersept uygulanmasının enterositlerde apoptozisi azalttığı gösterilmiştir<sup>22</sup>. Bu etkisini TNFR-1 (Tümör Nekrozis Faktör Reseptör-1)' i baskılayıp antiapoptotik protein olan bcl-2' nin artışını sağlayarak yaptığı

gösterilmiştir<sup>22</sup>. Deneysel retinal doku hasarlanması modelinde, bir grup sıçanın göz içi basıncı arttırıldıktan 12 ila 24 saat sonra TNF-alfanın önemli oranda arttığı ve bunun da apoptozise neden olduğu gösterilmiştir. Retinal hasarlanma yapılmasından 30 dakika önce TNF-alfa antikorunun uygulamasının ise retinada apoptozisi önemli oranda azalttığı gösterilmiştir<sup>153</sup>. TNF-alfanın iskemik hasarda önemini belirten diğer bir çalışmada, orta serebral arter tıkanıklığı yapılması TNF-alfanın önemli oranda artışına ve beyin dokusunda infarkta neden olduğu gösterilmiştir. İskemiden önce anti-TNF-alfa monoklonal antikorların ventrikül içine verilmesi ile bölgesel iskemik beyin hasarlanması %20.2 oranında azaldığı gösterilmiştir<sup>20</sup>. Bir diğer orta serebral arter tıkanıklığı yapılarak oluşturulan beyin hasarı modelinde, iskemiden 15 dakika önce TNF-alfa dönüştürücü enzim baskılayıcısının verilmesi ile beyindeki infarkt alanının %43 ila %58, nörolojik defisit ise %23 ila %36 oranında azaldığı gösterilmiştir<sup>21</sup>. Deneysel olarak omurilik hasarlanması yapılan farelerin beyin omurilik sıvısında TNF-alfa seviyesi önemli oranda yüksek bulunduğu, TNF-alfanın etkisini reseptör düzeyinde baskılayan infliximab ile nötrofil infiltrasyonunu, inflamasyonu, apoptozisi ve sitokin uyarılmasını azaltarak doku hasarını azalttığı gösterilmiştir<sup>154</sup>.

Oygür ve arkadaşlarının zamanında doğan ve HİBH öyküsü olan bebeklerin plazma ve BOS IL-6 ve TNF- alfa düzeyi ile nörolojik bulgu arasındaki ilişkiyi değerlendirdikleri çalışmaya otuz bebek dahil edilmiş ve bu bebeklerin ilk 24 saat içinde kan ve BOS örnekleri alınmıştır. Nörolojik muayenenin değerlendirilmesinde Denver gelişim testi kullanılmıştır. Bebekler normal nörolojik bulgusu (grup 1) olan ve olmayan (grup 2) diye iki gruba ayrılmıştır. Grup 2' de BOS İL-1 beta ve TNF-alfa seviyesi grup 1' e oranla önemli derecede yüksek saptanırken, serum seviyeleri bakımından iki grup arasında fark saptamamışlardır. Bunun nedenini hipoksik hasarın bir sonucu olarak MSS' de IL-1 beta ve TNF-alfa' nın bölgesel olarak üretildiğini belirterek açıklamışlardır. TNF-alfa' nın hipoksiye bağlı gelişen beyin hasarına katkıda bulunabileceğini göstermişlerdir<sup>114</sup>.

Ashdown ve arkadaşları sıçanlarda doğum esnasında yaygın hipoksi oluşturduktan sonra beyin dokusunda sitokin düzeylerini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada üç grup oluşturulmuştur. Grup 1: Vajinal yolla doğumu takiben hipoksi-iskemi uygulanmayan sıçanlar. Grup 2: Sezaryen ile doğumu takiben

hipoksi-iskemi uygulanmayan sıçanlar. Grup 3: Uterus ile birlikte çıkarılıp 37°C sıcaklığındaki SF içerisinde 15 ila 20 dakika bekletilerek hipoksi ve iskemisi sağlanan sonrasında sezaryen ile doğan sıçanlar. Sıçan beyinleri doğumdan iki saat sonra çıkartılarak sitokin düzeyleri değerlendirilmiştir. Sağ karotid arterin bağlandığı ve hemen arkasından hipoksinin yapıldığı çalışmaların aksine, bu çalışmada beyin dokusunda IL-1 beta, IL-6 ve TNF-alfa düzeylerinin hipoksik grupta hipoksik olmayan gruplara göre daha düşük saptanmıştır<sup>155</sup>. Bu farklılığın, perinatal dönemde hipoksi ve iskemiye karşı beyin sitokin yanıtının beklenenden çok daha karmaşık olmasından kaynaklandığı belirtilmiştir<sup>155</sup>. Zamanında doğan ve zamanından önce doğan hayvan beyinlerinin hipoksi ve iskemiye karşı vereceği sitokin yanıtını anlayabilmek için daha çok çalışmalara ihtiyacın olduğu belirtilmiştir.

Bu çalışmada, hipoksi iskemiye bağlı oluşan doku hasarında önemli bir mediatör olan TNF-alfayı reseptör düzeyinde baskılayarak, TNF-alfanın hipoksi ve iskemi oluşturulmuş sıçan beyinlerinde yaptığı etkileri ne ölçüde değiştirebileceğimizi amaçladık.

Bizim çalışmamızda HİBH oluşturulduktan sonra TNF- alfa reseptör antagonisti olan etanersept kullanılmıştır. Bilgilerimize göre, HİBH oluşturulan hayvan modellerinde etanersept kullanımı ve apoptozis üzerine etkileriyle ilgili yayımlanmış bir makale bulunmamaktadır. HİBH sonrası etanersept uyguladığımız grup, SF verilen grup ile karşılaştırıldığında apoptotik hücre sayılarında anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Bu çalışmamız, HİBH oluşturulan yenidoğan sıçanlarda TNF- alfa reseptör antagonisti olan etanersept' in apoptozis üzerine olumlu etkilerini gösteren ilk çalışmadır.

Lipid peroksidasyonunun en iyi bilinen ürünü olan MDA' nın plazma düzeyi oksidatif stresin bir göstergesidir. Plazma MDA düzeyi artışı ile HİBH' nin ağırlığı arasında paralel bir ilişki vardır. Plazma MDA düzeyi ne kadar fazla ise HİBH' de oluşan hasar o derece ağır olduğu gösterilmiştir<sup>56</sup>. Çalışmamızda en yüksek ortalama MDA düzeyi hipoksi sonrası SF uygulanan gruptaki sıçanların plazmalarında saptandı. Ancak plazma MDA düzeylerinin gruplar arası karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Kumar ve arkadaşları hipoksik iskemik ensefalopati öyküsü olan ancak HİBH kliniği gelişmeyen yenidoğan bebeklerin plazma MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğunu saptamışlardır. Ancak HİBH kliniği hafifledikçe kontrol ile

hipoksi grupları arasında plazma MDA düzeyleri karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptamamışlardır<sup>56</sup>.

Sıçanların bilişsel ve nöromotor yetilerini değerlendirmede kullanılan davranış deneylerinin, sıçanların nöromotor gelişiminin tamamlandığı 80-85. günlerden sonra ve/veya ortalama 180-400 gr ağırlığındaki erişkin erkek sıçanlara uygulanması önerilmektedir<sup>121,122</sup>. Çalışmamızda kullanılan sıçanlar erişkin düzeye geldikten sonra açık alan deneyi uygulanmıştır.

Sıçanlar cinsiyetlerine göre de farklı davranışlar sergilemektedirler<sup>124</sup>. Bu farklılık hormonal farklılık ve hipokampus gelişimindeki farktan kaynaklanmaktadır. Özellikle uzaysal öğrenmenin değerlendirilmesinde erkek cinsiyet daha uygundur<sup>125,126</sup>. Bu nedenle pek çok hayvan davranış deneyi çalışmasında ve bizim çalışmamızda da erkek sıçanlar kullanılmıştır.

Bu çalışmada bir NOS inhibitörü olan L-NAME' in ve TNF-alfa baskılayıcısı olan etanersept' in HİBH modelinde oluşan apoptozu azalttığını göstermekle birlikte bu ajanların uzun dönemde ortaya çıkan nörolojik bulguları nasıl etkilediği davranış deneyleri ile gösterilmek istenmiştir. Bu amaçla erken dönemde dekapite ettiklerimiz dışındaki sıçanlar 10 haftalık olana dek yaşatıldı ve lokomotor aktiviteleri değerlendirmek için açık alan deneyi uygulandı.

Hayvan davranış deneylerinde, sıçanlar stres ve anksiyeteye maruz kaldıklarında beklenenden farklı davranışlar sergilemektedirler. Bu durumu en aza indirmek için düzeneklerin siyaha boyanması, deneyin yapıldığı odanın loş olacak şekilde aydınlatılması, tekrarların yapıldığı deneylerde sıçanların yorulmasını önlemek için atışlar arasında yeterince süre bırakılması ve sıçanların vücut sıcaklıklarının korunması için önlem alınması önerilmektedir<sup>156</sup>.

Açık alan, sıçanların lokomotor aktivitesini ölçmede en sık kullanılan düzenektir. Locomotor aktivite katedilen mesafe veya hareket hızının ölçümüyle değerlendirilmektedir<sup>133</sup>. Çalışmamızda 10. haftasını tamamlamış sıçanlara, pleksiglastan yapılmış, siyaha boyanmış, 100x100x40 cm boyutlu bir düzenekte, açık alan deneyi beş dakika süreyle yapıldı. Bu süre içinde sıçanların hareket hızları ve katettikleri mesafeler kaydedildi. Hipoksi sonrası SF uygulanan gruptaki sıçanların hızları ve katettikleri mesafeler, sham grubundaki sıçanların hızlarına göre %25, katettikleri mesafeye göre %17 daha az bulundu. Hipoksi sonrası SF uygulanan gruptaki sıçanların hızları ve katettikleri mesafeler, hipoksi sonrası Etanersept uygulanan gruptaki sıçanların hızlarına

göre %14, katettikleri mesafeye göre %6 daha az bulundu. Hipoksi sonrası SF uygulanan gruptaki sıçanların hızları ve katettikleri mesafeler, hipoksi sonrası L-NAME uygulanan gruptaki sıçanların hızları ve katettikleri mesafeler birbirine eşit denecek kadar yakın düzeyde bulundu. Hipoksi sonrası L-NAME uygulanan gruptaki sıçanların hızları ve katettikleri mesafeler, hipoksi sonrası etanersept uygulanan gruptaki sıçanların hızlarına göre %10, katettikleri mesafeye göre %4 daha az bulundu. Ancak bu farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi. Daha önce yapılmış çalışmalarda, lokomotor etkilenmesi olan sıçanların açık alan deneyinde kontrol grubuna göre daha yavaş hareket ettikleri ve daha az mesafe katettikleri gösterilmiştir. Açık alana bırakılan hayvanın kendi ortamından alınıp tek başına bilmediği bir ortama bırakılması sıçanlarda anksiyete yarattığı, strese giren sıçanların köşelerde donup kaldığı gibi aşırı hareketli olmasına neden olabileceği iddia edilebilmektedir<sup>133,134</sup>. Ancak çalışmamızın bu aşaması, tüm sıçanlar için eşit koşulların oluşturulduğu bir odada yapıldı. Uygulamalar aynı kişi tarafından yapıldığından, anksiyete-stres gibi sorunların tüm sıçanları eşit düzeyde etkilemesi sağlanmıştır.

Sonuç olarak çalışmamız; sıçanlarda HİBH oluşturulduktan kısa süre sonra 10 mg/kg dozunda etanersept ve 50 mg/kg dozunda L-NAME kullanımının nöronal apoptozu azaltarak hipoksi-iskeminin akut dönem etkilerini azalttığını ancak belirtilen dozlarda sıçanların lokomotor aktivitelerinde belirgin bir düzelme olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte lokomotor aktivitenin etanersept verilen grupta SF verilen gruba göre daha iyi olması etanersept ile ilgili olumlu düşüncelerimizin devam etmesine yol açmıştır. Benzer deneylerin farklı dozlarda ilaç uygulanarak tekrarlanmasıyla, L-NAME ve etanerseptin beyinde oluşturulan hipoksi-iskemi üzerine muhtemel etkilerinin erken ve geç dönemde değerlendirilmesinin gerekli olduğu kanısına varılmıştır.

## SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda; hipoksi ve iskemi oluşturulan yenidoğan sıçanların beyinlerindeki apoptotik hücre sayıları, hipoksi ve iskemi yapılmayan yenidoğan sıçanlardan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p < 0,001$ ).

Hipoksi-İskemi (Hİ) sonrası etanersept verilen yenidoğan sıçanların her iki beyin yarısındaki apoptotik hücre sayılarının, Hİ sonrası serum fizyolojik verilen yenidoğan sıçanlardakine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir ( $p < 0,001$ ).

Hİ sonrası L-NAME verilen yenidoğan sıçanların her iki beyin yarısındaki apoptotik hücre sayılarının, Hİ sonrası serum fizyolojik verilen yenidoğan sıçanlardakine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir ( $p < 0,001$ ).

Hİ sonrası etanersept uygulanan sıçanların beyinlerinin her iki yarısında saptanan ortalama apoptotik hücre sayılarının Hİ sonrası L-NAME verilen gruptakinden istatistiksel olarak farklı olmadığı saptanmıştır.

Beynin her iki yarısında saptanan apoptotik hücre sayıları her bir grup kendi içinde karşılaştırıldığında; Sham grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmaz iken ( $p:0,189$ ), diğer gruplardaki sıçanlarda beynin sağ yarısındaki apoptotik hücre sayıları istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur.

HİBH' den sonra ilaç uygulamalarını takiben kalp içi girişimle alınan kan örneklerinde en yüksek ortalama MDA düzeyi Hİ sonrası SF verilen sıçanların plazmalarında saptanırken, en düşük MDA düzeyi ise Hİ sonrası etanersept uygulanan sıçanların plazmalarında saptanmıştır. Plazma MDA düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p: 0,083$ ).

Açık alan deneyinde sıçanların katettikleri mesafe ve hareket hızlarının gruplara göre incelenmesiyle her iki değer için, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla  $p:0,486$  ve  $p:0,113$ ).

Sonuç olarak çalışmamız; sıçanlarda HİBH oluşturulduktan kısa süre sonra 10 mg/kg dozunda etanersept ve 50 mg/kg dozunda L-NAME kullanımının nöronal apoptozu azaltarak hipoksi-iskeminin akut dönem etkilerini azalttığını ancak belirtilen dozlarda sıçanların lokomotor aktivitelerinde belirgin

bir düzelme olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte lokomotor aktivitenin etanersept verilen grupta SF verilen gruba göre daha iyi olması etanersept ile ilgili olumlu düşüncelerimizin devam etmesine yol açmıştır. Benzer deneylerin farklı dozlarda ilaç uygulanarak tekrarlanmasıyla, L-NAME ve etanerseptin beyinde oluşturulan hipoksi-iskemi üzerine muhtemel etkilerinin erken ve geç dönemde değerlendirilmesinin gerekli olduğu kanısına varılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Hill A, Volpe JJ. Hypoxic-ischemic Cerebral Injury in the Newborn, In Swaimann KF (Eds), Pediatric Neurology, second ed. St.Louis: Mosby Year Book; 1994:489-508.
2. Vannucci RC. Hypoxic-ischemic encephalopathy. Am J Perinatol 2000;17:113-20.
3. Johnston MV, Hoon Jr AH. Possible mechanisms in infants for selective basal ganglia damage from asphyxia, kernicterus, or mitochondrial encephalopathies. J Child Neurol 2000;15:588-91.
4. Wiliam LS, Garg BP, Cohen M, et. Al. Subtypes of ischemic stroke in children and young adult. Neurology 1997; 49: 1541-45.
5. Vannucci SJ, Hagberg H. Hypoxia–ischemia in the immature brain. J Exp Biol 2004; 207:3149-54.
6. Northington JF, Graham EM, Martin LJ. Apoptosis in perinatal hypoxic–ischemic brain injury: how important is it and should it be inhibited? Brain Res Rev 2005;50:44 –57.
7. Sastry PS, Rao KS. Apoptosis and the nervous system. J Neurochem 2000;74:1–20.
8. Hossan MA. Molecular mediators of hypoxic-ischemic injury and implications for epilepsy in the developing brain. Epilepsy Behav 2005;7:204-13.
9. Y. Hamada, T. Hayakawa, H. Hattori and H. Mikawa, Inhibitor of nitric oxide synthesis reduces hypoxic–ischemic brain damage in the neonatal rat. Pediatr Res 1994;35:10–14.
10. Y. Higuchi, H. Hattori, T. Kume, M. Tsuji, A. Akaike and K. Furusho, Increase in nitric oxide in the hypoxic–ischemic neonatal rat brain and suppression by 7-nitroindazole and aminoguanidine. Eur J Pharmacol 342 (1998),47–49.
11. Beckman JS, Beckman TW, Chen J et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial cell injury from nitric oxide and superoxide. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:1620-1624.

12. Phan LH, Hickey MJ, Niazi ZB et al. Nitric oxide synthase inhibitor, nitro-iminoethyl-L-ornithine, reduces ischemia-reperfusion injury in rabbit skeletal muscle. *Microsurgery* 1994; 15: 703-707.
13. Zhang L, Looney CG, Qi W-N et al. Reperfusion injury is reduced in skeletal muscle by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Appl Physiol* 2003;94: 1473-1478.
14. Chen J, Qin J, Liu X, Han Y, Yang Z, et al. Nitric oxide-mediated neuronal apoptosis in rats with recurrent febrile seizures through endoplasmic reticulum stress pathway. *Neuroscience Letters* 2008;443 134-139.
15. Taneli F, Vatansever S, Ulman C, et al. Pre-Ischemic Administration of Nitric Oxide Synthase Inhibitors Reduced Germ Cell Apoptosis after Spermatic Vessel Ligation in the Rat Testis. *Urol Int* 2005;75:70-74.
16. Kilpatrick L, Haris MC. Cytokines and the inflammatory response In: Polin RA, Fox WW. *Fetal and Neonatal Physiology*. Philadelphia: WB Saunders 1998:1967-1979.
17. Saliba H, Henrot A. Inflammatory mediators and neonatal brain damage. *Biol Neonate* 2001;79:224-227.
18. Ancel AM, Alix-AG, Salcedo DP, Cabanas F, et al. Interleukin-6 in the cerebral fluid after perinatal asphyxia is related to early and late manifestations. *Pediatrics* 1997;100:789-794.
19. Yoon BH, Romero R, Kim CJ, et al. High expression of TNF-alpha and IL-6 in periventricular leucomalacia. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:406-411.
20. Barone F.C, Arvin B, White R.F, Miller A, et al. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Mediator of Focal Ischemic Brain Injury. *Stroke*. 1997;28:1233-1244.
21. Wang X, Feuerstein G.Z, Xu L, et al, Inhibition of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Converting Enzyme by a Selective Antagonist Protects Brain from Focal Ischemic Injury in Rats. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. Mol Pharmacol* 2004; 65;890-896,2004.
22. Walter F, Carmelo M, Carmela C, et al. Infliximab and Etanercept are Equally Effective in Reducing Enterocyte Apoptosis in Experimental Colitis. *Int. J. Med.Sci* 2008,5.

23. Volpe JJ. Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatr Res* 2001;50:553-62.
24. Costello AM, Manandar DS. Perinatal asphyxia in less developed countries. *Arch Dis Child* 1994;71:F1-F3.
25. Can G. Neonatal asfiksi. *Pediatrici I*. Neyzi O, Ertuğrul T. 2. baskı. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul 1993; 235-241.
26. Menkes JH, Sanrat HB. Perinatal Asphyxia and Trauma. *Child Neurology* 2000: 401-455.
27. Volpe JJ. *Neurology of Newborn*. 3th ed. WB Saunders Company, 1995; 211- 360.
28. Wiliam LS, Garg BP, Cohen M, et. al. Subtypes of ischemic stroke in children and young adult. *Neurology* 1997;49:1541-5.
29. Koelfen W, Freund M, Varnholt V. Neonatal stroke involving the middle cerebral artery in term infants: clinical presentation, EEG and imaging studies, and outcome. *Dev Med Child Neurol* 1995;37:204-12.
30. Delivoria-Papadopoulos M, Mishra P. Mechanisms of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategies for prevention. *J Pediatr* 1998;132:30-4.
31. Northington JF, Graham EM, Martin LJ. Apoptosis in perinatal hypoxic–ischemic brain injury: how important is it and should it be inhibited? *Brain Res Rev* 2005;50:244-57.
32. Vries LS, Larocche JC, Levene MI. Cerebral ischaemic lesions, in *Fetal and Neonatal Neurology and Neurosurgery*. (Eds, Levene MI, Bennett MJ, Punt J). Edinburg, Churchill Livingstone, 1988; 326-338.
33. Kjellmer I. Prenatal and intrapartum asphyxia, in Levene MI, Bennett MJ, Punt J (Eds), *Fetal and Neonatal Neurology and Neurosurgery*. Edinburg: Churchill Livingstone; 1988:357-392.
34. Johnston MV. Excitotoxicity in neonatal hypoxia. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2001;7:229-34.
35. Choi DW, Rothman SW. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 1990;13:171-82.
36. Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, Nakaji W. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatr Res* 2001;49: 735–41.

37. Hossain MA. Molecular mediators of hypoxic–ischemic injury and implications for epilepsy in the developing brain. *Epilepsy Behav* 2005;7:204–13.
38. Amar AP, Levy ML: Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery* 1999; 44:1027-1039.
39. Berksoy İ, Ac-DMQD-CHO Nöroprotektif etkilerinin deneysel spinal kord travması modelinde incelenmesi. Taksim Eğit. Araş. Hast. Nöroşirürji Yayınlanmış Uzmanlık Tezi, 2004.
40. Rodrigo J, Fernandez AP, Serrano J, Peinado M A, Martinez A. The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. *Free Radic Biol Med* 2005;39:26-50.
41. Dawson DA. Nitric oxide and focal cerebral ischemia: multiplicity of actions and diverse outcome. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1994;6:299-324.
42. Budihardjo I, Oliver HLM. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 1999;15:269-90.
43. Schwarz A, Futerman AH. Distinct role for ceramide and glucosylceramide at different stages of neuronal growth. *J Neurosci* 1997; 17: 2929-38.
44. Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *The Oncologist* 1999; 4:332-9.
45. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual Review of Immunology* 1998; 16:395-419.
46. Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *British Medical Journal/(Clinical Research Ed.) (BMJ)* 2001; 322:1536-8.
47. Hampton MB, Orrenius S. Redox regulation of apoptotic cell death. *Biofactors* 1998; 8:1-5.
48. Büyükgebiz O, Caferler JS. Apoptoz. *Sendrom* 2001; 13:102-7.
49. Küçüködük Ş. Hipoksik-iskemik ensefalopatide klinik, laboratuvar yaklaşım ve tedavi yöntemleri. *J.Neonatology* 1997; 4(2): 70-75.
50. Dağoğlu T, Ovalı F, Samancı N. Hipoksik İskemik Ensefalopati, *Neonataloji*. 2000;557-570. Nobel Tıp Kitapevi.

51. Hill A, Volpe JJ. Hypoxic-ischemic brain injury in the newborn. *Seminary in Neurology*. Eds: Swaiman KF. The C.V. Mosby Company, St. Louis 1996; 489-504.
52. Riviello P et al: Lack of cell loss following recurrent neonatal seizures. *Brain Res* 2002 135:101.
53. Volpe JJ. Hypoxic-ischemic encephalopathy. In: Volpe JJ eds. *Neuropathology and Pathogenesis. Neurology of the Newborn*. 3rd ed. Philadelphia, 1995:279-313.
54. Yurdakök M. Perinatal asfiksi. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi* 1997; 3: 192-196.
55. Kumar A, Ramakrishna SV, Basu S, Rao GR. Oxidative stress in perinatal asphyxia. *Pediatr Neurol* 2008;38:181-5.
56. Voorthies TM, Lipper EG, Lee BC. Oclusive vascular disease in asphyxiated newborn infants. *J Pediatr* 1984; 105:92-96.
57. Sarnat HB, Sarnat MS. Neonatal encephalopathy following fetal distress. A clinical and electroencephalographic study. *Arch Neurol* 1976; 33:696-705.
58. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 2001;53:135-59.
59. Busto R, Mordecai Y-T, Globus, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I and Ginsberg MD. Effect of Mild Hypothermia on ischemia-Induced Release of Neurotransmitters and Free Fatty Acids in Rat Brain. *Stroke* 1989;20:904-10.
60. Abbot R. Laptook, Ron J.T. Corbett , Dennis Burns, Rick Steret. Neonatal ischemic neuroprotection by modest hypotermia is associated with attenuated brain acidosis. *Stroke* 1995;26:1240-6.
61. Gunn AJ, Gluckman PD, Gunn TR. Selective head cooling in newborn infants after perinatal asphyxia: a safety study. *Pediatrics* 1998;102:885-92.
62. Azzopardi D et al: Pilot study of treatment with whole body hypothermia for neonatal encephalopathy. *Pediatrics* 106;684,2000.
63. Batin MR, Dezoete JA, Gunn TR, Gluckman PD, Gunn AJ. Neurodevelopmental outcome of infants treated with head cooling and

mild hypothermia after perinatal asphyxia. *Pediatrics* 2001;107(3):480-4.

64. Bernard SA, Grag TW, Buist MA et al. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N Engl J Med* 2002 346:557.
65. Edwards AD, Yue X, Squier MV et al. Specific inhibition of apoptosis after cerebral hypoxia-ischemia by moderate post-insult hypothermia. *Biochem Biophys Res Comm* 1995 217:1193.
66. Zhu C, Wang X, Chen X, et al. Post ischemic hypothermia-induced tissue protection and diminished apoptosis after neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Brain Res* 2004; 996: 67-75.
67. Busto R, Dietrich WD, Globus MY, et al. Small differences in intraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 1987;7:729-38.
68. Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, et al. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *N Engl J Med* 2005;353:1574-84.
69. Schulzke SM, Rao S, Patole SK. A systematic review of cooling for neuroprotection in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy are we there yet? *BMC Pediatr* 2007;7:30.
70. Ray AM, Owen DE, Evans ML, Davis JB, Benham CD. Caspase inhibitors are functionally neuroprotective against oxygen glucose deprivation induced CA1 death in rat organotypic hippocampal slices. *Brain Res* 2000;9: 62-69.
71. Mukae N, Enari M, Sakahira H, Fukuda Y, Inazawa J, Toh H, Nagata S. Molecular cloning and characterization of human caspase-activated DNase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95: 9123-9128.
72. Himi T, Ishizaki Y, Murota SA. Caspase inhibitor blocks ischaemia induced delayed neuronal death in the gerbil. *Eur J Neurosci.* 1998;10: 777-781.
73. Rudel T. Caspase inhibitors in prevention of apoptosis. *Herz* 1999; 24:236-241.
74. Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, Simon RP. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed

neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *Journal of Neuroscience* 1998; 18:4914-4928.

75. Hayashi Y, Jikihara I, Yagi T, Fukumura M, Ohashi Y, Ohta Y, Takagi H, Maeda M: Immunohistochemical investigation of caspase-1 and effect of caspase-1 inhibitor in delayed neuronal death after transient cerebral ischemia. *Brain Res* 2001; 893: 113-120.
76. Chu K, Park KI, Lee ST, et. al. Combined treatment of vascular endothelial growth factor and human neural stem cells in experimental focal cerebral ischemia. *Neurosci Res* 2005;53:384-90.
77. Manegold G, Meyer-Monard S, Tichelli A, Pauli D, Holzgreve W, Troeger C. Cesarean section due to fetal distress increases the number of stem cells in umbilical cord blood. *Transfusion* 2008;48:871-6.
78. Yanqing Z, Yu-Min L, Jian Q, Bao-Guo X, Chuan-Zhen L. Fibronectin and neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor in focal cerebral ischemia. *Brain Res* 2006;1098:161-9.
79. Zheng, T., Steindler, DA., Laywell, ED., 2002. *Cloning Stem Cells* 4, 3-8.
80. Sizonenko, S.V., Mayall, Y, et al. Selective cortical alteration after hypoxic-ischemic injury in the very immature rat brain. *Pediatr. Res.* 2003;54:263-269.
81. Zheng T, Laywell ED, Steindler DA. Transplantation of an indigenous neural stem cell population leading to hyperplasia and atypical integration. *Cloning Stem Cells* 2002;4:3-8
82. Park KI, Teng YD, Snyder EY. The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstitute lost tissue. *Nat Biotechnol* 2002;20:1111-7.
83. Hayashi T, Iwai M, Ikeda T, Jin G, Nagano I, Abe K. Neural precursor cells division and migration in neonatal rat brain after ischemic/hypoxic injury. *Brain Res* 2005;1038:41-49.
84. Ikeda T, Iwai M, Hayashi T, Nagano I, Shogi M. Limited differentiation to neurons and astroglia from neural stem cells in the cortex and striatum after ischemia/hypoxia in the neonatal rat brain. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193:849-856.

85. K.Chu, M Kim, S.W.Jeong, S.U.Kim, B.W.Yoon. Human neural stem cells can migrate, differentiate, and integrate after intravenous transplantation in adult rats with transient forebrain ischemia. *Neurosci.Lett* 2001 343 (2) 129-133.
86. Bazan NG. Synaptic lipid signaling: significance of polyunsaturated fatty acids and platelet-activating factor. *J Lipid Res* 2003;44:2221-33.
87. Uhl E, Pickelmann S, Baethmann A, Schurer L. Influence of platelet-activating factor on cerebral microcirculation in rats: part 1. Sytemic application. *Stroke* 1999; 30: 873-9.
88. Uhl E, Pickelmann S, Rohric F, Baethmann A, Schurer L. Influence of platelet-activating factor on cerebral microcirculation in rats: part 2. Local application. *Stroke* 1999; 30: 880-6.
89. Viswanath M, Palmer C, Roberts R L. Reduction of hypoxic-ischemic brain swelling in the neonatal rat with PAF antagonist WEB 2170: lack of long-term protection. *Pediatr Res* 2000; 48: 109–13.
90. Liu XH, Eun BL, Barks JD. Platelet-activating factor antagonist BN 50730 attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Pediatr Res* 2001; 49: 804–11.
91. Büyükdereli Z, Atıcı A. Hipoksik İskemik Beyin Hasarı Oluşturulmuş Yenidoğan Sıçanlarda Trombosit Uyarıcı Faktör Antagonisti Uygulamasının Bilişsel ve Motor Yetiler Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri AD Uzmanlık Tezi, 2008.
92. Atıcı A, Bozlu G, Turhan AH, et al. The role of trapidil on neuronal apoptosis in neonatal rat model of hypoxic ischemic brain injury. *Early Hum Dev* 2008;84 (4):243-7.
93. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987;2:1057-1058.
94. Garg U, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibits mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1989; 83:1774-1777.

95. Dusting GJ. Nitric oxide in coronary artery disease, roles in atherosclerosis, myocardial infarction and heart failure. *EXS* 1996; 76: 33-35.
96. Dusting GJ: Nitric oxide in cardiovascular disorders. *J Vasc Res.* 1995; 32: 141-143.
97. Nakamura K, Yokoyama K, Nakamura K et al. Changes in nitric oxide, superoxide, and blood circulation in muscles over time after warm ischaemic reperfusion in rabbit rectus femoris muscle. *Scan J Plast Reconstr Hand Surg* 2001; 35: 13-18.
98. Joneschild ES, Chen L-E, Seaber AV et al. Effect of a NOS inhibitor, L-NMMA, on the contractile function of reperfused skeletal muscle. *J Recons Microsurg* 1999; 15:55-60.
99. Moncada S: The L-arginine-nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 1992; 145: 201-27.
100. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW: Structure and chromosomal localization of human constitutive endothelial nitric oxide synthases gene. *J Biol Chem* 1993; 15:268: 17478-88.
101. Palmer C, Vanucci RC. Potential therapies of perinatal asphyxia. In *Clinics in Perinatology*. Eds: Shankaran S. WB Saunders Company, Philadelphia 1993;411-32.
102. Huk I, Nanobashvili J, Neumayer C et al. L-Arginine treatment alters the kinetic of nitric oxide and superoxide release and reduces ischaemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *Circulation* 1997;96:667-675.
103. Ozaki M, Kawashima S, Hirase T, et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells is protective against ischaemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle. *Am J Pathol* 2002; 160:1335-1344.
104. Knight KR, Zhang B, Morrison WA, et al. Ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle is reduced by N-nitro-L-arginine methyl ester and dexamethasone. *Eur J Pharmacol* 1997;332:273-278.
105. Johnston MV, Trescher WH, Ishida A and Nakajima W. Novel treatments after experimental brain injury. *Semin Neonatol* 2000;5:75-86.

- 106.** Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 2001;53:135-59.
- 107.** Chapel H, Haeney M, Misbah S. *Essentials of Clinical Immunology*. Oxford, Blackwell Science Ltd, 1999:1-31.
- 108.** Bellanti JA, Zeligs BJ, Pung YH: Immunology of the fetus and newborn. In: Avery GB, Fletcher MA, MacDonald MG (eds). *Pathophysiology and Management of the Newborn*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 1999:1093-1121.
- 109.** Rothwell NJ, Strijbos PJ. Cytokines in neurodegeneration and repair. *Int J Devl Neuroscience* 1995;3:179-185.
- 110.** Hitti J, Tarczy-Hornoch P, Murphy J, et al. Amniotic fluid infection, cytokines and adverse outcome among infants at 34 weeks' gestation or less. *Obstet Gynecol* 2001; 98:1080-1088.
- 111.** Levene MI. Causes and prevention of perinatal brain injury. *Biol neonate* 2002;82:271-302.
- 112.** Saliba E, Rousset C, Potin J, et al. Inflammation, cytokines and perinatal brain injury. *Biol Neonate* 2002;82:291-302.
- 113.** Oygür N, Sönmez Ö, Saka O, Yeğın O. Predictive value of plasma and cerebrospinal fluid TNF-alpha and IL-1 Beta concentrations on outcome of fullterm infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1998;79:F190-193.
- 114.** Edwards AD. Cerebral white matter damage in very preterm infants. *Biol Neonate* 2002;82:271-302.
- 115.** Nelson KB, Dambrosia JM, Grether JK, Phillips TM. Neonatal cytokines and coagulation factors in children with cerebral palsy. *Ann Neurol* 1998;44:665-675.
- 116.** Hagberg H, Jacobsen U, Wennerholm B, et al. Chorioamnionitis and brain injury. *Biol Neonate* 2002; 82:271-302.
- 117.** Szaflarsik J, Burtrum D, Silverstein FS. Cerebral hypoxia-ischemia stimulates cytokine gene expression in perinatal rats. *Stroke* 1995;26:1093-1100.
- 118.** Pereria LO, Arteni NS, Peterson RC, Padilha da Rocha A, Achaval M, Netto CA. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits

- and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory* 2007;87:101-8.
- 119.** Szyndler J, Piechal A, Blecharz-Klin K, et. al. Effect of kindled seizures on rat behavior in water Morris maze test and amino acid concentrations in brain structures. *Pharmacological Reports* 2006;58:75-82.
  - 120.** Nowakawska E, Kus K, Czubak A, et. al. Some Behavioural effects of carbamazepin-comparison with haloperidol. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2007;58:253-64.
  - 121.** Nicholas A, Munhoz CD, Ferguson D, Campbell L, Sapolsky R. Enhancing Cognition after stres with Gen Therapy. *The Journal of Neuroscience* 2006;26:11637-43.
  - 122.** Voyer D, Voyer S, Bryden MP. Magnitude of sex differences in spatial abilities: a meta-analysis and consideration of critical variables. *Psychol Bull* 1995;117:250-70.
  - 123.** Bucci DJ, Chia AA, Gallegher M. Spatial learning in male and female long-evans rats. *Behav Neurosci* 1995;109:180-3.
  - 124.** Gaulin SJC, Hoffman HA. Evolution and development of sex differences in spatial ability. In: Betzig L, Mulder M, Turke P, editors. *Human reproductive behavior a darwinian perspective*. Cambridge University Press; 1998:129-152.
  - 125.** Jonasson Z. Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: a review of behavioral an biological data. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 2005;28:811-25.
  - 126.** Pagenelli RA, Benetolli A, Miltus Lima KC, et. al. A Novel Version of The 8-Arm Radial Maze: Effects of Cerebral Ischemia on Learning and Memory. *Journal of Neuroscience Methods* 2004;132:9-18.
  - 127.** EO Koylu, L Kanit, D Taşkıran, T Bağcı, B Balkan, S Pogun. Effects of nitric oxide syntase inhibition on spatial discrimination learning and central DA2 and mACh receptors. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2005;81:32-40.
  - 128.** Itoh J, Nabeshima T, Kameyama T. Utility of an elevated plus-maze for dissociation of amnesic and behavioral effects of drugs in mice. *Eur J Pharmacol* 1991;194:71-6.

129. Ikeda T, Mishima K, Yoshikawa T, et. al. Selective and long-term learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats. *Behav Brain Res* 2001;118:17-25.
130. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm measure. *Eur J Pharmacology* 2003;463:3-33.
131. Lieben CK.J, Oorsouw KV, Deutz NEP, Blokland A. Acute tryptophan depletion induced by a gelatin-based mixture impairs object memory but not affective behavior and spatial learning in the rat. *Behav Brain Res* 004;151:53-64.
132. A Ennaceur, S Michalikova, PL Chazot. Models of anxiety: Responses of rats to novelty in an open space an enclosed space. *Behav Brain Res* 2006;171:26-49.
133. Candland DK. The open field: some comperative data. *Annals New York Academy of Sciences* 1969, 159:831-851.
134. Phillips KM. Effects of time and administration of ethanol on open field behavior in hamsters. *Physiology & Behavior* 1982;29:785-787.
135. Lieben CKJ, Oorsouw K, Deutz NEP, Blokland A. Acute tryptophan depletion induced by a gelatin-based mixture impairs object memory but not affective behavior and spatial learning in the rat. *Behavioural Brain Research* 2004, 151:53-64.
136. Soubrie P. Open field chez le rat: interrelations entre locomotion exploration et emotivite. *J. Pharmacol* 1971, 2: 457.
137. Prut I, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology* 2003,463:3-33.
138. Binder E, Droste SK, Ohl F, Reul JMHM. Regular voluntary exercise reduces anxietyrelated behavior and impulsiveness in mice. *Behavioral Brain Research* 2004, 155: 197- 206.
139. Komphuis PJGH, Gardoni F, Kamal A, et. al. Long-lasting effects of neonatal dexamethasone treatment on spatial learning and hippocampal synaptic plasticity: Involvement of the NMDA receptor complex. *FASEB Journal* 2003;17:911-13.

- 140.** Blomgren K, Zhu C, Wang X et. al. Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of “pathological apoptosis”? *J Biol Chem* 2001; 276: 10191-98.
- 141.** Llinas R, Muhlethaler M. Electrophysiology of guinea pig cerebellar nuclear cells in the in vitro, brain stem-cerebellar preparation. 1988; 186: 33-45.
- 142.** Alonso D, Serrano J, Rodriguez J et. al. Effects of oxygen and glucose deprivation on the expression and distribution of neuronal and inducible nitric oxide synthase and on protein nitration in rat cerebral cortex. *J Comp Neurol* 2002; 111: 183-200.
- 143.** Muhlethaler M, Serafin M. Talamic spindles in an isolated and perfused brain preparation in vitro. *Brain Res* 1990; 524: 17-21.
- 144.** Gümüşlü S, Serteser M, Özben T, Balkan S, Balkan E. Inhibitory role of N-omega-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a potent nitric oxide synthase inhibitor, on brain malondialdehyde and conjugated diene levels during focal cerebral ischemia in rats. *Clin Chim Acta* 1997; 267: 213-23.
- 145.** Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 1981; 9: 131-41.
- 146.** Jerome Y.Yager. Animals Models of Hypoxic-ischemic Brain Damage in the Newborn. *Seminars in Pediatric Neurology* 2004;11:31-46.
- 147.** Bozlu G, Atıcı A, Turhan AH, et al. Platelet-activating factor antagonist (ABT-491) decreases neuronal apoptosis in neonatal rat model of hypoxic ischemic brain injury. *Brain Research*.2007;1143:193-8.
- 148.** Messina A, Knight KR, Dowsing BJ, et al. Localization of inducible nitric oxide synthase to mast cells during ischaemia-reperfusion injury of skeletal muscle. *Labor invest* 2000;80:423-431.
- 149.** Saito M, Miyagawa I. N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginine methylester, a Nitric Oxide Synthase Inhibitor, Diminishes Apoptosis Induced by Ischemia-Reperfusion in the Rat Bladder. *Neurourology and Urodynamics* 2002; 21:566-571.
- 150.** Kılıç I, Güven C, Kılınç K. Effect of maternal N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine administration on fetal growth and hypoxia-induced changes in newborn rats. *Pediatrics Int* 2003;45,375-378.

- 151.** Kutzsche S, Solas AB, Lyberg T, Saugstad OD. Nitric oxide synthesis inhibition during cerebral hypoxemia and reoxygenation with 100% oxygen in newborn pigs. *Biol Neonate* 2002;82:197-206.
- 152.** Van den Tweel ER, Peeters-Scholte CM, Van Bel F, et al. Inhibition of nNOS and iNOS following hypoxia-ischaemia improves long-term outcome but does not influence the inflammatory response in the neonatal rat brain. *Dev. Neurosci* 2002;24:389-95.
- 153.** Samuel B, Sean I.S, Sheetal N, et al. Deleterious Role of TNF- $\alpha$  in Retinal Ischemia-Reperfusion Injury. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2008;.49:3605-10.
- 154.** Genovese T, Mazzon E, Crisafulli C, et al. TNF- $\alpha$  Blockage in A Mouse Model Of SCI: Evidence For Improved Outcome. *SHOCK* 2008;29:32-41.
- 155.** Ashdown H, Joita S, Luheshi NG, Boksa P. Acute Brain Cytokine Responses After Global Birth Hypoxia in the Rat. *J Neurosci Res* 2008;86:3401-3409.
- 156.** Ehman KD, Moser VC. Evaluation of cognitive function in weanling rats: A review of methods suitable for chemical screening. *Neurotoxicol Teratol* 2006;28:144-161.

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AA</b>	Açık Alan
<b>AMPA</b>	$\alpha$ -Amino-3-Hidroksi-5-Metil-4-İzoksazol Propiyonat
<b>Apaf-1</b>	Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
<b>ATP</b>	Adenozin trifosfat
<b>BOS</b>	Beyin Omurilik Sıvısı
<b>BT</b>	Bilgisayarlı Tomografi
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	Kalsiyum
<b>CK</b>	Kreatin Kinaz
<b>Caspase</b>	Cysteine-containing Aspartate Specific Protease
<b>Dk</b>	Dakika
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>EAAT</b>	Eksitator Aspartik Asit Taşıyıcı Protein
<b>EEG</b>	Elektroensefalogram
<b>EPO</b>	Eritropoetin
<b>FGF</b>	Fibroblast Growth Factor (Fibroblast Büyüme Faktörü)
<b>GP</b>	Glutatyon Peroksidaz
<b>G-CSF</b>	Granülosit koloni uyaran faktör
<b>GM-CSF</b>	Granülosit-Makrofaj koloni uyaran faktör
<b>HDD</b>	Hayvan Davranış Deneyi
<b>HİBH</b>	Hipoksik İsemik Beyin Hasarı
<b>IGF</b>	Insulin-Like Growth Factor (İnsülin Benzeri Büyüme Hormonu)
<b>İ.P.</b>	İntraperitoneal (Periton içi)
<b>İ.V.</b>	İntravenöz (Damar içi)
<b>L-NAME</b>	N-Nitro-L-Arginin Metil Ester
<b>MDA</b>	Malondialdehid
<b>MSS</b>	Merkezi sinir sistemi
<b>MST</b>	Morris su tankı
<b>Mg<sup>+2</sup></b>	Magnezyum
<b>MRG</b>	Manyetik Rezonans Görüntüleme
<b>Naa</b>	N-Asetil Aspartat
<b>NAS</b>	N-Asetil Sistein
<b>NGF</b>	Neuronal Growth Factor (Nöronal Büyüme Hormonu)

<b>NK</b>	Natural Killer (Doğal Öldürücü)
<b>NMDA</b>	N-Metil D-Aspartat
<b>NO</b>	Nitrik Oksit
<b>NOS</b>	Nitrik Oksit Sentaz
<b>PAF</b>	Platelet Activating Factor (Trombosit Aktive Edici Faktör)
<b>PCr</b>	Fosfokreatinin
<b>PVHI</b>	Periventriküler Hemorajik İnfarkt
<b>PVL</b>	Periventriküler Lokomalazi
<b>RAS</b>	Retiküler aktive edici sistem
<b>SEP</b>	Sensorial Uyarılmış Potansiyeller
<b>SF</b>	Serum Fizyolojik
<b>Sn</b>	Saniye
<b>SO</b>	Siklooksijenaz
<b>SOD</b>	Süperoksit Dismutaz
<b>SOR</b>	Serbest Oksijen Radikalleri
<b>SP</b>	Serebral Palsi
<b>SS</b>	Standart Deviation (Standart Sapma)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumour Necrosis- $\alpha$ (Tümör Nekrozis Alfa)
<b>TUNEL</b>	Terminal-transferase Mediated dUTP Biotin Nick-End-Labeling
<b>TxA2</b>	Tromboksan A2
<b>US</b>	Ultrasonografi
<b>VİK</b>	Ventrikül içi kanama

## RESİMLER ve ŞEKİLLER DİZİNİ

Resimler	Sayfa No
Resim 1 (Açık Alan Düzenegği) .....	43
Resim 2 (Hipoksi Odacığı).....	44
Resim 3 (Açık Alanın Üstten Görünüşü) .....	45
Resim 4 (Cilt Kesisi ve Sağ Karotid Arteri Bağlama).....	46
Resim 5 (Sham Grubunda Hipokampal Nöronlarda TUNEL Yöntemiyle Apoptotik Gösterilmesi) .....	53
Resim 6 (Hipoksi-İskemi Sonrasında SF Verilen Grupta Hipokampal Nöronlarda TUNEL Yöntemiyle Apoptotik Hücrelerin Gösterilmesi) .....	54
Resim 7 (Sham Grubunda Hipokampal Nöronlarda Kaspaz-3 Yöntemiyle Apoptotik Gösterilmesi) .....	58
Resim 8 (Hipoksi-İskemi Sonrasında SF Verilen Grupta Hipokampal Nöronlarda Kaspaz-3 Yöntemiyle Apoptotik Hücrelerin Gösterilmesi) .....	59

Şekiller	Sayfa No
Şekil 1 (Glutamatın Tetiklediğı Nekroz ve Apoptoz).....	15
Şekil 2 (Reperfüzyon Reoksijenizasyon Döneminde Serbest Oksijen Radikallerinin Oluşumu) .....	17
Şekil 3 (Serbest Oksijenin Suya Dönüşümü).....	18
Şekil 4 (Apoptozis veya Nekroz ile Hücre Ölümü).....	20
Şekil 5 (Arjinin Üre Döngüsünde NO Üretimi) .....	34
Şekil 6 (L-NAME) .....	36
Şekil 7 (Beynin Sağ Yarisındaki Apoptotik Hücrelerin Gruplara Göre Dağılımı TUNEL Yöntemi).....	55
Şekil 8 (Beynin Sol Yarisındaki Apoptotik Hücrelerin Gruplara Göre Dağılımı TUNEL Yöntemi).....	56

<b>Şekil 9 (Beynin Sağ ve Sol Yarisındaki Apoptotik Hücre Sayıları TUNEL Yöntemi) .....</b>	<b>56</b>
<b>Şekil 10 (Beynin Sağ Yarisındaki Apoptotik Hücrelerin Gruplara Göre Dağılımı Kaspaz-3 Yöntemi) .....</b>	<b>60</b>
<b>Şekil 11 (Beynin Sol Yarisındaki Apoptotik Hücrelerin Gruplara Göre Dağılımı Kaspaz-3 Yöntemi) .....</b>	<b>60</b>
<b>Şekil 12 (Beynin Sağ ve Sol Yarisındaki Apoptotik Hücre Sayıları Kaspaz-3 Yöntemi).....</b>	<b>61</b>
<b>Şekil 13 (Plazma MDA Düzeylerinin Gruplara Göre Dağılımı).....</b>	<b>62</b>
<b>Şekil 14 (Sıçanların Katettikleri Mesafenin Gruplara Göre Dağılımı Açık alan).....</b>	<b>63</b>
<b>Şekil 15 (Sıçanların Hareket Hızlarının Gruplara Göre Dağılımı Açık Alan).....</b>	<b>63</b>

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablolar</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1 (Apoptozis ve Genler).....</b>	<b>19</b>
<b>Tablo 2 (Apoptozis ve Nekrozdaki Özelliklerin Karşılaştırılması) .....</b>	<b>19</b>
<b>Tablo 3 (Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Sarnat ve Sarnat Evrelemesi).....</b>	<b>21</b>
<b>Tablo 4 (HİBH'nin Sistemik Etkileri).....</b>	<b>22</b>
<b>Tablo 5 (Gruplara Göre Beynin Sağ ve Sol Yarisındaki Apoptotik Hücre Sayılarının Karşılaştırılması TUNEL Yöntemi).....</b>	<b>54</b>
<b>Tablo 6 (Gruplara Göre Beynin Sağ ve Sol Yarisındaki Apoptotik Hücre Sayılarının Karşılaştırılması Kaspaz-3 Yöntemi) .....</b>	<b>59</b>
<b>Tablo 7 (Gruplara Göre plazma MDA Düzeylerinin Karşılaştırılması) .....</b>	<b>61</b>
<b>Tablo 8 (Gruplara Göre Ortalama Katedilen Mesafe ve Hareket Hızı Açık Alan).....</b>	<b>62</b>