

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

HİPOKSİK İSKEMİK ENSEFALOPATİLİ
YENİDOĞANLARDA miRNA EKSPRESYONU VE
BİYOMARKER İLE İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Zehra Nur AĞ

Danışman

Prof. Dr. Erdal TAŞKIN

Elazığ, 2023

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Metin Kaya GÜRGÖZE

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Erdal Yılmaz

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafızdan okunmuş, kapsam ve kalite olarak Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Erdal TAŞKIN _____Danışman

Uzmanlık Sınav Jüri Üyeleri

_____

_____

_____

.....

.....

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında emeği geçen, bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, her konuda desteklerini esirgemeyen, sabrıyla her daim destek olan hocam Prof. Dr. Erdal TAŞKIN' a, uzmanlık eğitimim boyunca yardımlarından dolayı Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Erdal YILMAZ'a ve bölüm hocalarıma sonsuz teşekkür ederim ve saygılarımı sunarım. Örneklerimin toplanmasında katkı sağlayan yenidoğan yoğun bakım hemşirelerine, örneklerin çalışmasındaki katkılarından dolayı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ebru Önalın'a ve Arş. Gör. Mustafa Bulan'a, tez istatistiklerinin yapılmasında yardımcı olan Uzm. Dr. Osman KURT'a, uzmanlık eğitimim boyunca omuz omuza çalıştığım değerli asistan ve intern arkadaşlarıma, tüm servislerimizde çalışmakta olan yardımcı sağlık personellerine ve yaşamımın her anında yanımda olan ve her türlü desteği sağlayan aileme, her anımda yanımda olan eşim Onur'a ve varlığıyla hayatımı anlamlandıran oğlum Ali Kenan'a teşekkür ediyorum.

ÖZET

HİPOKSİK İSKEMİK ENSEFALOPATİLİ YENİDOĞANLARDA miRNA EKSPRESYONU VE BIYOMARKER İLE İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu çalışmada HİE'nin varlığını , şiddetini, başlama zamanını, prognozunu gösterebilen ve klinik kullanımda olan bir biyokimyasal test günümüz için bulunmamasından ve mevcut literatürde miRNA'ların beyin gelişimi ve HİE patogeneğinde merkezi bir rol oynadığını gösteren araştırmalardan dolayı HİE'li yeni doğanlarda miRNA ekspresyon profilini ve bu miRNA'ların biyomarker olarak kullanılma potansiyelini değerlendirmeyi amaçladık.

HİE için nöronal hasarın erken belirteçleri olarak kullanılması amacıyla biyomarkerlar üzerinde yapılan çalışmaları sistematik bir şekilde incelemiştir. Bu tezde, miR-210, miR-374'a-5p ve miR-21 gibi miRNA'ların HİE'li yenidoğanlarda potansiyel biyomarkerler olarak değerlendirilmesi hedeflenmiştir

Çalışmaya 23 Hipoksik iskemik ensefalopati tanı 23 hasta ve 23 sağlıklı kontrol grubu olmak üzere 46 yenidoğan dahil edildi. Neonatal ensefalopatiyi araştırdığımız yenidoğanlardan mir210,mir 374-a,mir 21,TNF-alfa,İL-10,İL-6,İL-1-alfa,HİF-1-alfa düzeyleri yenidoğanların kan örneklerinde tanı aldıkları 0. , 24. ve 48-72.saatte çalışılmıştır.

Örnekler ve hastanın kliniği ile birlikte değerlendirildiğinde, çalışmaya dahil edilen hastalar kontrol, evre 1, evre 2 ve evre 3 olmak üzere sınıflandırılmıştır. Aynı zamanda hastaların demografik özellikleri de ele alınmıştır.

Çalışmamız, hipoksik iskemik ensefalopati (HİE) hastalarının iskemi süresine göre farklı biyomarker değerleri incelenmiştir. Buna göre, İL-10 (0. saat, 24. saat ve 24-48. saat), TNF-alfa (0. saat, 24. saat ve 48-72. saat), HIF-1'a (0. saat, 24. saat ve 48-72. saat), İL-6 (0. saat, 24. saat ve 48-72. saat) ve İL-1'a (0. saat, 24. saat ve 48-72. saat) biyomarker değerleri artış göstermiştir

Çalışmamızda, hasta grubunun miRNA ekspresyonu ve biyomarkerları kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. İncelenen miRNA ve biyomarkerlar arasında, mir210, mir374-a-5p, mir21-5p, İL-10, HIF-1-a, İL-6 ve İL-1-a seviyelerinin hasta grubunda anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, TNF-alfa

seviyeleri hasta gruplarında kontrol grubuna göre artış göstermiş ancak iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmemiştir(p=0.46).

Çalışmamızda, hipoksik iskemik ensefalopati (HIE) hastalarında belirli miRNA ekspresyon değerleri ve inflamatuvar biyomarkerların hastalık evreleri ile olan ilişkisini değerlendirmiştir. Hem miRNA ekspresyonları (mir210, mir374-a-5p, mir21-5p) hem de belirli inflamatuvar biyomarkerlar (İL-10, TNF-alfa, HIF-1'a, İL-6, İL-1'a) açısından hastalık evreleri arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Özellikle mir210 (p<0.04)ve mir374-a-(p<0.001)'nin ekspresyon düzeyleri, kontrol grubuna kıyasla evre 1, 2 ve 3 gruplarında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ancak, mir21-5p'nin ekspresyon düzeyi kontrol grubuna göre artmış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir(p=0.06).

Çalışmamızda, hipoksik iskemik ensefalopati (HIE) hastalarının iskemi süresine göre miRNA ekspresyonu değerleri karşılaştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, mir210 (0. saat, 24. saat ve 48-72. saat), mir374-a-5p (0. saat, 24. saat ve 48-72. saat) ve mir21-5p (0. saat, 24. saat ve 24-72. saat) miRNA ekspresyonu artmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada serum miRNA 'ların hipoksiye duyarlı şekilde ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Bu serum miRNA 'lar gelecek dönemlerde potansiyel biyomarker olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: HİE, miRNA, Sitokin, Yenidoğan

ABSTRACT

EVALUATION OF miRNA EXPRESSION AND ITS RELATIONSHIP WITH BIOMARKERS IN NEWBORN WITH HYPOXIC ISCHEMIC ENCEPHALOPATHY

In this study, due to the absence of a biochemical test in clinical use that can show the presence, severity, time of onset, and prognosis of HIE, and due to studies in the current literature showing that miRNAs play a central role in brain development and pathogenesis of HIE, the miRNA expression profile in newborns with HIE has been investigated. and we aimed to evaluate the potential of using these miRNAs as biomarkers.

They systematically reviewed studies on biomarkers for use as early markers of neuronal damage for HIE. In this thesis, it is aimed to evaluate miRNAs such as miR-210, miR-374'a-5p and miR-21 as potential biomarkers in neonates with HIE.

A total of 46 newborns, 23 of whom were diagnosed with hypoxic ischemic encephalopathy, and 23 of whom were healthy controls, were included in the study. Among the newborns whose neonatal encephalopathy we investigated, mir210, mir 374-a, mir 21, TNF-alpha, IL-10, IL-6, IL-1-alpha, HIF-1-alpha levels were diagnosed in the blood samples of newborns 0, 24, and 48. -Worked in the 72nd hour.

When evaluated together with the samples and the patient's clinic, the patients included in the study were classified as control, stage 1, stage 2 and stage 3. At the same time, the demographic characteristics of the patients were also discussed.

In our study, different biomarker values of hypoxic ischemic encephalopathy (HIE) patients were investigated according to ischemia duration. Accordingly, IL-10 (0. hour, 24. hour and 24-48. hour), TNF-alpha (0. hour, 24. hour and 48-72. hour), HIF-1 (0. hour). , 24th hour and 48-72nd hour), IL-6 (0th hour, 24th hour and 48-72nd hour) and IL-1 (0th hour, 24th hour and 48-72th hour)) biomarker values have increased

In our study, miRNA expression and biomarkers of the patient group were compared with the control group. Among the miRNA and biomarkers examined, mir210, mir374-a-5p, mir21-5p, IL-10, HIF-1-a, IL-6 and IL-1-a levels were found to be significantly higher in the patient group. However, TNF-alpha levels increased in the patient groups compared to the control group, but there was no statistically significant difference between the two groups (p=0.46).

In our study, we evaluated the relationship of certain miRNA expression values and inflammatory biomarkers with disease stages in patients with hypoxic ischemic encephalopathy (HIE). Between disease stages in terms of both miRNA expressions (mir210, mir374-a-5p, mir21-5p) and certain inflammatory biomarkers (IL-10, TNF-alpha, HIF-1a, IL-6, IL-1a) significant differences were found. In particular, the expression levels of mir210 (p<0.04) and mir374-a-(p<0.001) were found to be significantly higher in stage 1, 2 and 3 groups compared to the control group. However, although the expression level of mir21-5p was increased compared to the control group, it did not show a statistically significant difference (p=0.06).

In our study, miRNA expression values of hypoxic ischemic encephalopathy (HIE) patients were compared according to ischemia duration. According to our results, mir210 (0. hour, 24. hour and 48-72. hour), mir374-a-5p (0. hour, 24. hour and 48-72. hour) and mir21-5p (0. hour) , 24th hour and 24-72nd hour) miRNA expression increased.

As a result, in this study, it was observed that the expression of serum miRNAs was increased in a hypoxia-sensitive manner. These serum miRNAs were evaluated as potential biomarkers in the future.

Key words: HIE, miRNA, Cytokine, Newborn

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLO LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xiv
KISALTMALAR LİSTESİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	2
1.1.1. Neonatal Ensefalopatiler	2
1.1.2. Epidemiyoloji	3
1.1.3. Etiyoloji.....	3
1.1.4. Patofizyoloji	3
1.1.5. Nöropatoloji ve İlişkili Klinik Durumlar	5
1.1.6. Klinik Bulgular	6
1.1.7. Tanı	7
1.1.7.1. Laboratuvar Tetkikleri	8
1.1.7.2. Radyolojik Görüntüleme Yöntemleri	9
1.1.7.3. Nörofizyolojik Yöntemler	9
1.1.8. Terapotik Hipotermi.....	10
1.1.9. Prognoz	12
1.2. Hipoksik İskemik Ensefalopati Hastalarında Nörogelişimsel Sorunlar .	12
1.2.1. Motor Fonksiyon Bozuklukları	12
1.2.2. Bilişsel Bozukluklar	14
1.2.3. Davranışsal Sorunlar	14
1.2.4. Duyusal Sorunlar ve Duyu Bütünleme (İşleme) Bozuklukları .	15
1.3. Epigenetik.....	17
1.3.1. MikroRNA Sentezi	18
1.3.2. MikroRNA'ların fonksiyonu.....	20

2. TEDAVİ	24
2.1. Solunum Sağlanması	25
2.2. Beyin Dolaşımının Sağlanması	25
2.3. Kan Şekerinin Düzenlenmesi	25
2.4. Nöbetlerin Kontrolü	26
2.5. Beyin Ödemi Tedavisi	26
2.6. Ek Tedavi Yöntemleri	26
2.6.1. Terapötik Hipotermi	26
2.6.1.1. Hipotermi Tedavisinin Yan Etkileri	27
2.6.2. Eritropoetin (EPO)	28
2.6.3. Askorbik Asit (C vitamini)	28
2.6.4. Magnezyum Sülfat	28
2.6.5. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR) Oluşumunun Engellenmesi	29
2.6.5.1. Fosfolipaz A2 İnhibitörleri, Lipooksijenaz (LO) İnhibitörleri ve Siklooksijenaz (SO) İnhibitörleri	29
2.6.5.2. Allopurinol	29
2.6.6. Melatonin	29
2.6.7. Kök Hücreler	30
2.6.8. N-Asetil-Sistein (NAC)	30
2.6.9. Soy Gazlar	30
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	31
3.1. Materyal Toplama	31
3.2. Moleküler Genetik Çalışmalar	32
3.2.1. Real Time PCR ile MiRNA İfadelerinin Değerlendirilmesi	32
3.2.2. Örneğin Homojenize Edilmesi	32
3.2.3. RNA Eldesi	32
3.2.4. RNA'nın Çöktürülmesi	32
3.2.5. RNA Ölçümü	33
3.2.6. Komplementer DNA Sentezi	33
3.2.7. RT-PCR	34
3.2.7.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile cDNA Amplifikasyonu	34

3.3.	Biyokimyasal Analizler	35
3.3.1.	Rutin Analizler	35
3.3.1.1.	ELISA Analizleri	35
3.4.	İstatistiksel Değerlendirme	37
4.	BULGULAR	38
5.	TARTIŞMA	50
6.	SONUÇLAR	66
7.	KAYNAKLAR	68
8.	EKLER Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
	EK 1 .Hasta Kayıt Formu	83
	EK 2.Hasta Takip Formu	84
9.	ÖZGEÇMİŞ	88

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	Nöropatolojik Bulgular ve İlişkili Olduğu Klinik Durumlar	5
Tablo 2.	Thompson sınıflaması	6
Tablo 3.	Modifiye Sarnat Sınıflaması.....	7
Tablo 4.	Asfiksinin Sistemik Etkileri	7
Tablo 5.	Duyusal Problemlerin Davranışsal ve Motor Yansımaları	17
Tablo 6.	HİE terapötik hipotermi uygulama kriterleri,.....	27
Tablo 7.	qRT-PCR’de Kullanılmış Olan Primer Dizileri	33
Tablo 8.	Komplementer DNA Karışım Miktarı (5 µl’lik Reaksiyon).....	34
Tablo 9.	Komplementer DNA Sentezi PCR Programı (2 Adımlı)	34
Tablo 10.	qRT-PCR Programı	34
Tablo 11.	RT-PCR’da Kullanılan Primerler.....	35
Tablo 12.	RT-PCR İçin Kullanılan Bileşikler	35
Tablo 13.	Çalışmada Kullanılan ELISA Kitlerine Ait Bilgiler	36
Tablo 14.	Grupların Cinsiyet, Ağırlık ve Doğum Özelliklerinin Karşılaştırılması	38
Tablo 15.	Hasta Grubunda Bulunanların Evreye Göre Cinsiyet, Ağırlık ve Doğum Özelliklerinin Karşılaştırılması	39
Tablo 16.	Hastaların Doğum Öyküsü ve Oranları	39
Tablo 17.	Hasta Grubunda Bulunanların Evreye Göre Doğum Öyküsünün Karşılaştırılması	40
Tablo 18.	Hastaların Kan Gazı Değerleri	40
Tablo 19.	Hasta Grubunda Bulunanların Tedavi Öncesi ile 24. Saat CK Değerinin Karşılaştırılması	40
Tablo 20.	Hasta Grubunda Bulunanların Evreye Göre Kan Gazı Değerlerinin Karşılaştırılması	41

Tablo 21. Hasta Grubunda Bulunanların Evreye Göre CK Değerlerinin Karşılaştırılması	41
Tablo 22. Hastaların Klinik ve Radyolojik Özellikleri.....	41
Tablo 23. Hasta Grubunda Bulunanların Evreye Göre Klinik ve Radyolojik Özelliklerinin Karşılaştırılması	42
Tablo 24. Hasta Grubunun 0. Saat ile Kontrol Grubunun Biyomarkerlarının Karşılaştırılması	43
Tablo 25. Tüm Grupların 0. Saat ile Kontrol Grubunun Biyomarkerlarının Karşılaştırılması	43
Tablo 26. Hasta Grubunda Bulunanların Zamana Göre Biyomarkerlarının Karşılaştırılması	44
Tablo 27. Hasta Grubunda Bulunanların Evreye ve Zamana Göre Biyomarkerlarının Karşılaştırılması.....	44
Tablo 28. Hasta Grubunda Evre 1 Olanların Zamana Göre Biyomarkerlarının Karşılaştırılması	45
Tablo 29. Hasta Grubunda Evre 2 Olanların Zamana Göre Biyomarkerlarının Karşılaştırılması	45
Tablo 30. Hasta Grubunda Evre 3 Olanların Zamana Göre Biyomarkerlarının Karşılaştırılması	45
Tablo 31. Hasta Grubunun 0. Saat ile Kontrol Grubunun miRNA Ekspresyonu ve Karşılaştırılması	46
Tablo 32. Tüm Grupların 0. Saat ile Kontrol Grubunun MiRNA Ekspresyonu ve Karşılaştırılması	46
Tablo 33. MiRNA 'ların Ölçüm Saatlerine Göre Karşılaştırılması.....	46
Tablo 34. Hasta Grubunda Bulunanların Evreye Göre MiRNA Ekspresyonu Değerlerinin Karşılaştırılması	47
Tablo 35. Hasta Grubunda Evre 1 Olanların Zaman Göre MiRNA Ekspresyonu ve Karşılaştırılması.....	47

Tablo 36. Hasta Grubunda Evre 2 Olanların Zaman Göre MiRNA Ekspresyonu ve Karşılaştırılması.....	47
Tablo 37. Hasta Grubunda Evre 3 Olanların Zaman Göre MiRNA Ekspresyonu ve Karşılaştırılması.....	48
Tablo 38. Hasta Grubunda Bulunanların 0. Saat MiRNA Ekspresyonu ve Korelasyonu	48
Tablo 39. Hasta Grubunda Bulunanların 24. Saat MiRNA Ekspresyonu ve Korelasyonu	49
Tablo 40. Hasta Grubunda Bulunanların 48-72. Saat MiRNA Ekspresyonu ve Biyomarkerlarının Korelasyonu.....	49

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. MiRNA Biyogenez	20
Şekil 2.Hastaların Evrelere Göre İncelemesi	39



KISALTMALAR LİSTESİ

NE	: Neonatal Ensefalopati
HİE	: Hipoksik İskemik Ensefalopati
HİBH	: Hipoksik İskemik Beyin Hasarı
miRNA	: Mikro RNA
HİF-1	: Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör
İL	: İnterlökin
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
PA	: Perinatal Asfiksi
ATP	: Adenozin Trifosfat
APGAR	: Activity - Pulse - Grimace - Appearance – Respiration
ADH	: Antidiüretik Hormon
DİK	: Dissemine İntravasküler Koagülasyon
MRG	: Manyatik Rezonans Görüntüleme
SP	: Nörolojik Sekel
BE	: Baz Açığı
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
CK	: Kreatin Kinaz
BUN	: Kan Üre Nitrojeni
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
TFUSG	: Transfontanel Ultrasonografi
Ceeg	: Konvansiyonel Elektroensefalogram
aEEG	: Amplitüd Elektroensefalografi
TH	: Terapötik Hipotermi
HİNE	: Hammersmith Bebek Nörolojik Muayenesi
GMs	: Prechtl's Assesment of General Movements
AIM	: Alberta Infant Motor Scale
BBGÖ	: Bayley Bebeklik ve Erken Çocukluk Gelişim Ölçeği
DEHB	: Dikkat Eksikliği ve Hiperaktivite Bozukluğu
ROP	: Yenideoğan Retinopatisi
BPD	: Bronkopulmoner Displazi
NEC	: Nekrotizan Enterokolit

NSE	: Nöron Spesifik Enolaz
TBH	: Travmatik Beyin Hasarı
EPO	: Eritropoietin
ROS	: Serbest Oksijen Radikalleri
AA	: Askorbik Asit
NAC	: N-Asetil-Sistein
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
$\Delta\Delta CT$: Delta Treshold Cycles



1. GİRİŞ

Yenidoğan ensefalopatisi (NE) annenin gebelik yaşına bakılmaksızın, yaşamın ilk birkaç günü içerisinde merkezi sinir sisteminde herhangi bir rahatsızlık yaşanması durumudur. Apne, apne benzeri ataklar, nöbetler, hipotoni ve neonatal reflekslerde azalma en sık görülen klinik bulgulardır. Hipoksik iskemik ensefalopati (HİE), perinatal asfiksi ve/veya iskemik beyin hasarının neden olduğu neonatal ensefalopatiler olarak tanımlanır. Yenidoğan ensefalopatisinin en yaygın türüdür (1, 2).

İyi veya orta gelişmişlik düzeyine sahip ülkelerde HİE insidansı 1000 canlı doğumda 1.3-1.9 iken az gelişmiş ülkelerde 1000 canlı doğumda 8.5'e kadar yükselmektedir (2). 2008 yılı Türk Neonatoloji Derneği verilerine göre, Türkiye'de HİE insidansı 1000 canlı doğumda 2.6; yoğun bakımdaki hastalarda %1.2 idi (3).

Neonatal HİE'nin mortalite oranı ve morbidite oranı yüksektir. Tüm yenidoğan ölümlerinin %6-9'undan sorumlu olan bu hastalık nedeniyle dünya çapında her yıl yaklaşık 1 milyon bebek ölümü gerçekleşmektedir (4). Hafif, orta ve şiddetli HİE'li hastalar nöromotor hasar, yaygın gelişimsel bozukluk, işitme sorunları, görme sorunları gibi kalıcı hasar riski altındadır (5). Riskler, hastalık şiddeti ile doğru orantılıdır. Bir hastalığın evresi arttıkça kalıcı hasarın riski ve şiddeti artar. Hafif HİE'de, hastalar iyi bir uzun vadeli prognoz ve hayatta kalma oranlarına sahiptir (6).

MikroRNA(miRNA)'lar, yüksek seviyede korunan DNA bölgelerinden kodlanan fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen, yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda, küçük RNA molekülleridir. Bu protein kodlamayan RNA molekülleri kendi nükleotid dizilerinin tamamlayıcısı olan hedef mRNA'lara bağlanıp translasyonel baskılama veya mRNA yıkımı ile transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunun düzenlenmesini gerçekleştirirler. MikroRNA'lar bu yolağı kullanarak hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve hücre ölümü gibi homeostatik süreçlerde önemli roller oynamaktadır (7). MikroRNA'ların çoğu gelişmekte olan beyinde bir çok fonksiyona sahiptir, bu da nöral gelişimdeki rollerini göstermektedir(8). Sonuç olarak, perinatal dönemde miRNA'ların bozulmasının uzun vadeli sonuçları olması muhtemeldir (9, 10).

Hipoksamirler olarak adlandırılan birkaç miRNA'nın hipoksi tarafından indüklendiği ve HIF'ler aracılığıyla hipoksiye hücrel yanıtı kontrol ettiği gösterilmiştir. Bunlar, HIF 1-alfa sinyalinin düzenleyen miRNA'ları içerir. HIF 1-alfa aktivasyonuna yanıt olarak kopyalanan ve HIF'lerin akış aşamasında hareket eden hipoksiye duyarlı elementler içeren miRNA'lar mevcuttur (11-13).

MiRNA ekspresyonu dokuya ve hastalığa oldukça özgüdür, bu da dolaşımdaki dikkate değer stabiliteleriyle birlikte onları potansiyel tanısal biyomarker adayları yapabilir (14). Bir çalışmada miR-210 ekspresyonunun yenidoğan HİE'sinden sonra aktive edilmiş mikroglia'da önemli ölçüde yukarı regüle edildiğini ve bir miR-210 inhibitörünün in vivo uygulamasının gelişmekte olan beyinde mikroglia aracılı nöroinflamasyonu kontrol ederek HİE'yi etkili bir şekilde bastırıldığını göstermektedir (15).

HİE'nin varlığını, şiddetini, başlama zamanını, prognozunu gösterebilen ve klinik kullanımda olan bir biyokimyasal test günümüz için bulunmamaktadır. Günümüzde bu amaçla kan, idrar veya beyin omurilik sıvısında bakılabilecek biyokimyasal belirteçlerle ilgili araştırmalar devam etmektedir. Bunlar arasında idrarda protein S-100B, laktat, kreatinin; serumda İL-1beta, İL-6, İL-8, İL-9, İL-12, İL-13, TNF- α , nöron spesifik enolaz (NSE), laktat, beyine özgü kreatin kinaz (CK-BB), proteine bağlı olmayan demir, glial fibriler asidik protein (GFAP), iyonize kalsiyum; beyin omurilik sıvısında (BOS) GFAP, NSE, miyelin bazik protein (MBP), protein S-100B, İL-1 β , İL-6, İL-8, İL-10, TNF- α , bulunmaktadır (16).

Yapmış olduğumuz bu çalışmada; sitokinlerin ve mir210, mir374-a, mir21 ekspresyonunun biyomarker ile ilişkisini hipoksik iskemik yenidoğanlarda araştırılması planlanmıştır.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Neonatal Ensefalopatiler

Yenidoğan ensefalopatisi (NE), yaşamın ilk günlerinde herhangi bir nedenle merkezi sinir sisteminde bozulmaya neden olabilecek gebelik yaşı 35 hafta ve üzerindeki bebeklerde görülür. Bilinç değişiklikleri (huzursuzluk, azalmış yanıt, koma), nöbetler, hipotoni, azalmış yenidoğan refleksleri, apne ve beslenme

bozuklukları bu heterojen klinik durumun tipik semptomlarıdır. NE'nin geri döndürülebilir ve geçici olması veya bir beyin hasarının, merkezi sinir sistemi enfeksiyonunun veya yaşam boyu etkileri olabilecek bir beyin malformasyonunun ilk belirtisi olması mümkündür (17).

NE'nin en yaygın nedeni, perinatal asfiksi veya iskemik beyin hasarından sonra ortaya çıkan hipoksik iskemik ensefalopatidir (HİE) (2).

1.1.2. Epidemiyoloji

NE prevalansı 1000 canlı doğumda 4-6'dır (17); NE'nin en yaygın nedeni olan HİE prevalansı, iyi ve orta gelişmişlik düzeyine sahip ülkelerde 1000 doğumda 1.3-1.9'dur; düşük gelişmişlik düzeyine sahip ülkelerde 1000 doğumda 8.5'tir (2). Türk Neonatoloji Derneği'nin 2008 yılı verilerine göre Hipoksik İskemik Ensefalopati insidansı binde 2.6; yoğun bakımdaki hastalarda ise %1.2 olarak bulunmuştur (3).

1.1.3. Etiyoloji

HİE'nin en yaygın nedeni perinatal asfiksidir (PA). Kan oksijenasyonundaki azalmaya hipoksemi denir. Oksijen ve karbondioksit gazlarının değişimi bozulduğunda boğulma meydana gelir. Asfiksi durumunda, hipoksemi ile birlikte karbondioksit seviyeleri artar, bu da asidoz ve serebral kan akışında artış ile sonuçlanır (18).

Çeşitli faktörler PA'ya yol açabilir. PA'yı önlemek ve tedavi etmek için bu nedenleri anlamak önemlidir. PA, HİE'nin en yaygın nedeni olan antepartum, intrapartum veya postpartum gelişebilir. Birçok çalışmaya göre antepartum ve intrapartum nedenler daha sık görülmektedir. Bir vaka kontrol çalışması, nedenlerin yalnızca %7'sinin antepartum, %20'sinin intrapartum ve %70'inin her ikisinin birden olduğunu bulmuştur (19). Rahim içi gelişme geriliğinin yaygın bir nedeni çoğul gebeliklerdir, bunu intrauterin gelişme geriliği takip eder (18).

1.1.4. Patofizyoloji

HİE, hipoksi ve iskemi kombinasyonundan kaynaklanır. Kombine hipoksi, hiperkapni ve asidoz yenidoğanlarda ve fetüslerde klinik kötüleşmeye yol açar.

Anneler, plasentalar ve fetüsler gebelik sırasında veya doğumdan sonra pulmoner düzeyde havalanmanın bozulması nedeniyle bu sorunu yaşayabilirler (20).

Yenidoğanlarda boğulmaya neden olan beş temel mekanizma vardır (21).

1. Göbek kordonundan kan akışının engellenmesi (kordon sıkışması vb.).
2. Placenta gaz değişimi bozuklukları (placenta previa, dekolman, yetmezlik).
3. Maternal hipotansiyon, hipertansiyon ve plasentanın hipoperfüzyonunun neden olduğu anormal uterus kasılmaları.
4. Annede oksijenasyon bozukluğu (ağır anne anemisi, kardiyopulmoner kollaps).
5. Yenidoğanın akciğerleri yeterli havalandırma almaz veya fetal dolaşımdan neonatal dolaşıma geçemez.

PA oluşur oluşmaz periferik vasküler direnci düşürmeye, kalp debisini düzenlemeye ve serebral kan akışını artırmaya çalışır. Beyin kendini böyle düzenler. Aksine, hipoksi ve hiperkarbi, otoregülasyon mekanizmasını bozar. Böylece birincil ve ikincil enerji yetersizlikleri ortaya çıkar (21).

Hücrelerdeki yüksek enerjili fosfat bileşiklerinde ani bir azalma, serebral iskemiyeye neden olan boğulma olayından kaynaklanır. Birincil enerji eksikliği bunun nedenidir. Fazla glutamat daha sonra salınır. N-metil D-aspartat reseptörlerinin glutamat tarafından uyarılması, artan hücre içi kalsiyum seviyeleri nedeniyle nekrotik hücre ölümüne neden olur. Anaerobik metabolizma ATP degradasyonu, laktik asit birikimi ve metabolik asidoz ile sonuçlanacaktır (3, 22, 23).

Reperfüzyondan sonra beyin kan akışı düzelir ve hücresel enerji seviyeleri 2-3 saat içinde normale döner. Sonuç olarak, gizli faz oluşur. 6-15 saat süren bu fazda apoptoz ve sekonder inflamasyon meydana gelir. Bu süre içerisinde herhangi bir müdahale yapılmadığı takdirde ikincil enerji kesintisi riski bulunmaktadır. Bu 72 saatlik süreçte hücresel eksitotoksisite ve oksidatif hasar nöronal ölüme neden olur (22).

1.1.5. Nöropatoloji ve İlişkili Klinik Durumlar

Yenidoğanın gebelik yaşı, asfiksi sonrası ortaya çıkabilecek klinik durumları etkileyebilir. 36 haftalık gebelik yaşı ile bir yenidoğan doğduğunda, serebral korteks ve subkortikal gri cevherin etkilenmesi beklenir; periventriküler beyaz cevher yapıları etkilenir (18). Tablo 1'e göre (1, 22-24), nöropatolojik lezyonlar beynin farklı bölgelerinde yer almaktadır.

Yeni doğan beynindeki bazal gangliyonlarda olduğu gibi, hipokampus hipoksi hasarına karşı hassastır. Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu (DEHB), otizm ve şizofreni semptomları, hipokampus ve striatumda ki eklem hasarından kaynaklanabilir. Striatum hasar görürse serebral palsi, motor defisit ve postür bozuklukları ortaya çıkabilir (25).

Tablo 1. Nöropatolojik Bulgular ve İlişkili Olduğu Klinik Durumlar

Hasar Şekli	Hasarın Meydana Geldiği Bölge	Klinik Yansımaları	Uzun Dönem Sonuçları
Selektif Nöronal Nekroz	Serebral korteks	Stupor, koma	Bilişsel gecikme
	Bazal Ganglia	Konvülsiyon	Spastik kuadriparezi
Parasagittal Serebral Hasar	Talamus	Hipotoni	Konvülsiyon
	Retiküler Formasyon	Hipertoni-	Koreatetoz
	Beyin Sapı Çekirdekleri	Distoni	Bulber-psödobulber palsi
		Okülomotor bozukluklar	Hiperaktivite
Status Marmaratus	Serebral korteks	Emme-yutma bozukluğu	Dikkat bozukluğu
	Subkortikal beyaz cevher Superomedial (parasagittal) konveksiteler	Üst ekstremitelerin proksimalinde tonus azalması	Atonik kuadriparezi
	Putamen		Spastik kuadriparezi
Fokal ve Multifokal İskemik Hasar	Globus pallidus	Bilinmiyor	Bilişsel gecikme
	Talamus	Konvülsiyon (genellikle fokal)	Spastik kuadriparezi
Periventriküler Lökomalazi	Serebral korteks	Hemiparezi (bilateralse kuadriparezi)	Spastik hemiparezi veya kuadriparezi
	Subkortikal beyaz cevher (genellikle tek taraflı ve vasküler dağılım boyunca)	Alt ekstremitelerde güç kaybı	Bilişsel gecikme
	Periventriküler beyaz cevher	Alt ekstremitelerde güç kaybı	Spastik dipleji
			Bilişsel gecikme
			Görme kaybı

1.1.6. Klinik Bulgular

PA en sık ensefalopati ile ilişkilidir. Ensefalopatili yenidoğanlarda bilinç bozukluğu, konvülsiyonlar, solunum depresyonu, hipotoni gibi belirtiler görülür. Doğum sırasında bu bebekler kendiliğinden nefes alamazlar ve depresyona girebilirler. HİE semptomları arasında solgunluk, siyanoz, apne, bradikardi ve stimülasyona karşı duyarsızlık yer alır. Düşük APGAR skorları bu hastalar arasında yaygındır. Doğumdan hemen sonra bu bebeklerin tonusu normal veya hipotonik olabilir (24).HİE'li term yenidoğanlarda görülebilen klinik durumlar şunlardır (26):

- Normal, artmış veya azalmış ton görülebilir.
- Tepkisizlik, koma ve aşırı uyanık bilinç durumları mümkündür.
- Konvülsiyonlar: Ensefalopati ilerledikçe konvülsiyonlar daha sık meydana gelebilir.
- Duruş fleksiyonda veya deserebrasyonda olabilir.
- Yenidoğanın refleksleri normal veya azalmış olabilir.
- Apne mevcut olabilir ve ventilasyon gerekebilir.
- Fontanel bombeliği ciddi şekilde etkilenen yenidoğanlarda görülebilir.

Sarnat ve Sarnat sınıflaması en yaygın kullanılan HİE evreleme skorlamasıdır. Modifiye Sarnat sınıflandırması, 1976'da Sarnat kardeşler (24, 27) tarafından tanıtıldı. Aynı zamanda Thopson sınıflaması da oldukça yaygın kullanılmaktadır. Sınıflandırmalar Tablo 2 ve Tablo 3 'te gösterilmiştir.

Tablo 2. Thompson sınıflaması

Bulgu	0	1	2	3
Tonus	Normal	Hipertonik	Hipotonik	Flask
Bilinç	Normal	Hiperalert	Letarjik	Komatöz
Nöbet	Yok	<3 günde	>2 günde	
Postür	Normal	Fisting, çevirme	Distal fleksiyon	Deserebre
Moro	Normal	Parsiyel	Yok	
Yakalama	Normal	Az	Yok	
Emme	Normal	Az	Yok	
Solunum	Normal	Hiperventilasyon	Apne	Solunum desteği
Fontanel	Normal	Gergin	Bombe	

Tablo 3. Modifiye Sarnat Sınıflaması

Belirtiler	Evre 1	Evre 2	Evre 3
Bilinç durumu	Hiperalert	Letarjik	Stupor, koma
Kas Tonusu	Normal	Hipotonik	Flask
Postür	Normal	Fleksiyon	Deserebre
Tendon refleksleri/klonus	Hiperaktif	Hiperaktif	Yok
Myoklonus	Var	Var	Yok
Moro Refleksi	Güçlü	Zayıf	Yok
Pupiller	Midriyazis	Miyozis	Anizokori, ışık refleksi azalmış
Konvülsiyon	Yok	Sık	Deserebrasyon
Elektroensefalogram Bulguları	Normal	Düşük voltaj ile nöbet aktivitesi arasında değişken	Burst süpresyonu, İzoelektrik aktivite
Süre	<24 saat	24 saat - 14 gün	Birkaç gün - hafta
Sonuç	İyi	Değişken	Ağır sekel, Ölüm

PA nörolojik etkilerinin yanı sıra iskemi, asidoz ve hipoksiye neden olarak diğer sistemleri de olumsuz etkiler. Böyle bir durum sonucunda kalp problemleri, böbrek yetmezliği, karaciğer problemleri, gastrointestinal problemler ve pıhtılaşma bozuklukları meydana gelebilir (28). Tablo 3 (21) bu olası durumları özetlemektedir.

Tablo 4. Asfiksinin Sistemik Etkileri

Sistem	Etkiler
Merkezi Sinir Sistemi	HİE, infarkt, intrakranial kanama, konvülsiyon, beyin ödemi, hipotoni, hipertoni
Kardiyovasküler Sistem	Miyokard iskemisi, kontraktilitenin azalması, triküspit yetmezlik, hipotansiyon
Pulmoner Sistem	Pulmoner hipertansiyon, pulmoner kanama, respiratuar distres sendromu
Böbrekler	Akut tübüler veya kortikal nekroz
Adrenal Bez	Adrenal kanama
Gastrointestinal Sistem	Perforasyon, kanamayla seyreden ülserasyon, nekroz
Metabolik	Uyumsuz ADH sendromu, hiponatremi, hipoglisemi, hipokalsemi, miyoglobinüri
Deri	Cilt altı yağ nekrozu
Hematolojik Sistem	DİK

1.1.7. Tanı

HİE; öykü, fizik muayene ve laboratuvar bulguları ile teşhis edilebilir. Anne öyküsü alınırken perinatal asfiksinin antenatal nedenlerinin sorgulanması önemlidir. Tromboembolizm, düşük yapma öyküsü, gebelikte ilaç kullanımı,

madde kötüye kullanımı, detaylı ultrason sonuçları, gebelik takibinde yaşanan sorunlar; fetal kalp izleme; doğum sırasında herhangi bir komplikasyon olup olmadığı; öykü ile plasenta patolojisi gibi durumlar sorgulanarak doğum öncesi asfiksi olasılığını değerlendirmek mümkündür. Yenidoğanı klinik olarak değerlendirirken yenidoğan ensefalopatisinin ve konvülsiyonlarının başlangıcını ve ilerlemesini dikkate almak önemlidir. Çoklu sistem tutulumunun belirtileri oligüri, hipotansiyon ve koagülopatiyi içerir (17).

American Society of Obstetrics and Gynecology'e göre (29), HİE aşağıdaki tanı kriterlerini karşılamaktadır.

- APGAR beş ve on dakikada puan alır.
- Kordon kan gazında pH 7.00 veya Baz Açığı(BE) -12 mmol/L kaydedilmelidir.
- HİE ile uyumlu beyin hasarını gösteren bir MR.
- Birden fazla organın tutulumu veya başarısızlığı.

HİE tanısı konur konmaz hastalığın evrelendirilmesi prognoz için çok önemlidir. Evreleme için en yaygın olarak Sarnat ve Sarnat evrelemesi (Tablo 2) kullanılmaktadır. Bu evreleme sistemi kullanılarak hastalığın şiddeti belirlenebilir. Genel olarak, hafif HİE vakaları iyi bir prognoza sahiptir. Orta vakalarda %10, ağır vakalarda %30 ölüm oranı vardır ve geri kalanların %90'ında ciddi nörolojik sekel (SP) gelişir (30).

Tanıyı desteklemek ve yönlendirmek için laboratuvar testleri, nörofizyolojik çalışmalar ve görüntüleme yöntemleri kullanılarak prognoz hakkında fikir sahibi olunur.

1.1.7.1. Laboratuvar Tetkikleri

Laboratuvar incelemesi tanıyı destekler ve diğer organların tutulumu hakkında bilgi verir. Hastalığı teşhis etmenin yanı sıra pH, BE, laktat ve elektrolitleri izlemek için kan gazı analizi gereklidir (31). Yenidoğanlarda çoklu organ disfonksiyonu genellikle HİE'den kaynaklanır. Organa özgü testler kullanılarak bu süreçte hastalar izlenebilir (28). Bu hastalarda yapılması gereken testler arasında tam kan sayımı, laktat dehidrogenaz (LDH), kreatin kinaz (CK), kreatinin, kan üre nitrojeni (BUN), karaciğer enzimleri, kardiyak enzimler, pıhtılaşma parametreleri ve seri takipler yer alır (22, 31).

1.1.7.2.Radyolojik Görüntüleme Yöntemleri

Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG): Bir beyin MRG'si, hastalığın uzun vadeli sonucu hakkında değerli, invazif olmayan bilgiler sağlar. HİE ile ilişkili beyin hasarının en iyi görselleştirilmesini sağlayarak klinik sonuçların en doğru şekilde tahmin edilmesini sağlar (32). Bazal ganglionlar ve talamus ile internal kapsülün arka bacağındaki hasar nedeniyle hastada yan etki beklenme olasılığı vardır (33). Konvansiyonel MRG, difüzyon ağırlıklı MRG kadar duyarlı değildir (24). Bununla birlikte beyin hücre ödemi yani sitotoksik ödem gösterilebilir. Ayrıca bebeklik döneminde talamus ve bazal gangliyonlardaki hasarın anlaşılmasını sağlar. Konvansiyonel bir MRG bu hasarı birkaç gün sonra tespit edebilir (33, 34).

Bilgisayarlı Tomografi (BT): BT görüntüleme kafa içi kanamaları göstermede iyi olmasına rağmen iskemik beyin hasarı gösterilememektedir (34). Laboratuvar testlerinde koagülopati ve düşük hematokrit saptanırsa zor doğum yapmış hastalarda intrakraniyal kanama olasılığını dışlamak için tercih edilebilir. BT, talamus ve bazal gangliyonlarda MRG' ye benzer hasar gösterdi, ancak beyin sapı ve serebellumu görüntülemeye MR BT'den üstündür (35).

Kranial- Transfontanel Ultrasonografi (TFUSG): Fontaneli açık olan bebeklerin beyinleri ultrasonografik olarak incelenebilir. Bir ultrason görüntüleme yönteminin taşınabilir olması, uygulanabilir olması, istenildiği zaman tekrarlanabilir olması ve radyasyon riski taşımaması gibi birçok avantajı vardır. Term yenidoğanlarda ideal görüntüleme için yeterli olmayabilir. Vasıfsız kişiler, deneyimleriyle yakından bağlantılı olduğundan, ultrasonografi sırasında silik bulguları gözden kaçırabilirler (34).

Transkranial Doppler USG yöntemi ile beyin kan akımı görüntülenebilmektedir.

1.1.7.3. Nörofizyolojik Yöntemler

Konvansiyonel Elektroensefalogram (cEEG): Yenidoğan nöbetleri cEEG kullanılarak teşhis edilir. Ancak uygulaması teknik ekip ve yorumlaması uzman nörolog görüşü gerektirdiği için pratik değildir (36).

Amplitüd Entegre Elektroensefalografi (aEEG): Term ve erken doğmuş yenidoğanlarda kortikal aktiviteyi izlemek için bir EEG kullanılabilir. Hasta başı

uygulanması yapılabilir. HİE hastaları uzun süreli izlemeden fayda görür. Hastalığın başlangıcından tedaviye kadar ve tedaviden sonra beyin kortikal aktivitesi izlenebilir. Subklinik nöbetlerin erken saptanması tedavi edilebilmelerini sağlar (36, 37).

1.1.8. Terapotik Hipotermi

Yenidoğanlarda hipoksik iskemik ensefalopati, antenatal olarak yüksek asfiksi riski taşıyan bebekleri belirleyerek ve doğum odasında uygun resüsitasyon sağlayarak en iyi şekilde yönetilir. Uygun doğumhane yönetimi ile her zaman öngörülemeyen veya önlenemeyen perinatal asfiksi durumunda yenidoğanın beyin hasarını mümkün olduğunca önlemek mümkün olmalıdır. Bebeklerde yeterli perfüzyon ve ventilasyon olmalıdır; Bu süreçte hiperoksi (serbest oksijen radikallerini artıracığı için) ve hipohiperkapniden (beyin otheregülasyonunu bozabileceği için) kaçınılmalıdır. Resüsitasyon ve stabilizasyonu takiben asfiksi uygun şekilde tedavi edilebileceği bir merkezde izlenmelidir (3, 22).

HİE için kanıtlanmış bir nöroprotektif tedavi, terapötik hipotermidir (TH). Doğumdan sonraki 6 saat içinde başlanan hipotermi tedavisinin özellikle orta ve ağır HİE olgularında ve 18 aylıkken mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir (38). Hipoksik iskemik olayların şiddeti ve süresi, yaralanmanın süresi ve ciddiyeti ile doğrudan ilişkilidir. TH, bu hasar sürecine müdahale ederek harekete geçer. 6-15. saatler arasında sekonder enerji yetersizliği, sitotoksik ödem, bozulmuş mitokondriyal oksidatif aktivite, eksitatör aminoasit birikimi ve konvülsiyonlar sonucu tedaviye bu döneme girmeden başlanması önemlidir (39).

Tedavi 6 saat içinde başlamalı, 72 saat sürmeli ve 4 saat içinde yeniden ısıtılmalıdır. Yeniden ısıtma sırasındaki nöbetler, nöbet geçiren bebeklerde 96 saat tedavi edilmelidir. Hipotermi sırasında sağlıklı bir vücut ısısı 33-34 santigrat derece olmalıdır. Vücut sıcaklığındaki her 1C'lik düşüş beyin metabolizmasında %6-10 oranında azalma gösterir (40).

Çok sayıda randomize kontrollü çalışma, TH için tedavi kriterlerini belirlemiştir. Bir dizi kriter karşılanmalıdır:

- Gebelik yaşı ≥ 36 ve ≤ 6 saatten küçük bebekler,

- Kord kan gazında veya doğumdan sonraki ilk bir saat içerisinde bakılan $pH \leq 7.00$ veya $BE \leq -16$ mmol/L olması,
- 10. dakika APGAR skoru < 5 veya devam eden resusitasyon ihtiyacı,
- Klinik değerlendirmede orta veya şiddetli ensefalopati bulgularının olması,
- Bazı çalışmalar aEEG bulgularını da eklemektedir. Hipotermi tedavisi uygulayan bir merkez aEEG kullanmalıdır, çünkü hem tanısal anlamda hem de takipte gereklidir.
- pH veya BE değeri uygun olmayan bebeklere ek iki bulgusu (APGAR skorunun düşük olması ve ensefalopati bulgusunun olması) pozitif olduğunda tedavi başlanması uygundur.
- Maternal enflamasyon, koryoamniyonit gibi öyküleri olan yenidoğanlara hipotermi uygulanmasının mortaliteyi arttırabileceğine dair veriler mevcuttur, bu durum çok net olmamakla birlikte dikkat edilmesi gereken bir durumdur. Yani tanı kriterleri uyan ancak tedavi uygulanması uygun olmayan hastalar da olabilir.

Silveria ve arkadaşlarının çalışmasında hem seçici baş soğutmanın hem de tüm vücut soğutmanın etkili hipotermi yöntemleri olduğunu göstermiştir. Her iki yöntem de 72 saatlik soğutma ve ardından yavaş yeniden ısıtma gerektirdiği görüldü (39). Geniş serilerde ve meta-analizlerde iki yöntem arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (41). Shankaran ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma sonucunda, tüm vücut soğutması kullanılarak tüm beyin dokuları homojen bir şekilde soğutularak bütüncül pozitif bir sonuç elde edilebilmiş; seçici kafa soğutması ise beynin orta kısmındaki beyin dokularını (bazal gangliyonlar ve talamus) yeterince soğutamadığı anlaşıldı (30).

Joy ve arkadaşları tarafından yapılan randomize, kontrollü bir çalışma lipid peroksidasyonunda biyolojik bir belirteç olan malondialdehit miktarını ve toplam antioksidan seviyesini ölçerek TH uygulanan yenidoğanlarda serbest radikal hasarındaki azalmayı göstermişti (42). Gane ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada 8 hidroksi 2-deoksiguanozini ölçerek TH'nin DNA hasarı ve oksidatif stres üzerindeki etkisini araştırılmıştır (13). 72 saat ardından, hipotermi grubu,

normotermi alan HİE bebeklerine kıyasla önemli ölçüde daha düşük oksidatif stres ve DNA hasarı tespit edilmiştir ($p < 0.001$). Her iki çalışma da TH'nin olası nöroprotektif mekanizmalarını göstermiştir (42, 43).

Thoresen ve Whitelaw, TH'nin kalp atış hızı ve kan basıncındaki değişiklikleri iyi yönde etkilediğini bildirdi, ama eğer aşırı soğutma ve uygunsuz hızlı yeniden ısıtma ile birlikte sedasyon varsa, hipotansiyona neden olabileceğini tespit ettiler. (44).

1.1.9. Prognoz

Yenidoğanlar HİE nedeniyle ölüm ve ciddi hastalık riski altındadır. Hafif, orta ve şiddetli HİE, Sarnat evreleme sisteminde kullanılan en yaygın sınıflandırmalardır. Bir hastanın uzun vadeli prognozu doğrudan hastalığının evresi ile ilişkilidir. Hafif HİE'li hastalarda uzun dönemde iyi bir prognoz vardır. Uzun dönemde orta ve şiddetli HİE'li hastalarda SP, yaygın gelişimsel bozukluk, epilepsi, görme ve işitme sorunları gibi birçok hastalık gelişebilir (2, 5, 6).

TH prevalansı, orta ve şiddetli HİE hastalarına rutin olarak uygulanan bu tedavinin SP ve ciddi nörolojik problemler geliştirme riskini önemli ölçüde azalttığı birçok çalışma ile gösterilmiştir. Hafif bir HİE hastasının prognozu iyidir, bu nedenle rutin olarak hipotermi uygulanmaz (42).

Son zamanlarda hafif HİE hastalarının uzun vadeli prognozunu incelemek için çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar daha yüksek hayatta kalma oranları ve daha düşük ciddi nörolojik sekel oranları göstermiş olsa da hafif HİE hastalarının bilişsel, davranışsal ve duyuşsal problemler geliştirebileceği de gösterilmiştir (2, 6, 45).

1.2. Hipoksik İskemik Ensefalopati Hastalarında Nörogelişimsel Sorunlar

1.2.1. Motor Fonksiyon Bozuklukları

Gelecekte, HİE morbiditeye neden olan durumlarda önemli bir rol oynayacaktır. TH uygulamaları ciddi nöromotor bozuklukları önemli ölçüde önlemesine rağmen birçok çocukta SP gelişmektedir (46). Romeo ve ark yaptığı

çalışmada Hammersmith Bebek Nörolojik Muayenesi'nin (HINE) bu bebek popülasyonunda doğumdan sonraki 2. yılda ve sonraki nörogelişimsel sonuçları tahmin etmek için iyi bir araç olup olmadığını değerlendirmektir. HINE skorları <67 olan bebekler motor fonksiyon bozukluklarıyla ilişkilendirilmiştir. Sonuç olarak, HINE, hipotermi ile tedavi edilen HİE'li bebeklerde bile yüksek riskli bebeklerin tanısında erken nörolojik muayene araçlarından biri olarak rolünü doğrulamaktadır. Bu sonuçlar, motor yetersizliklerin erken teşhisi ve uygun müdahalenin planlanması için bu bebeklerin takibinde yer alan klinisyenler için yararlı olabilir (46).

Erken müdahale için SP ve diğer motor disfonksiyonları mümkün olan en kısa sürede tespit etmek çok önemlidir. Bir neonatal MRG, lezyonun konumuna bağlı olarak meydana gelebilecek motor eksiklikleri ortaya çıkarabilir. Tablo 1 lezyon bölgesi ile olası motor eksiklikler arasındaki ilişkiyi özetlemektedir. Nöromotor bozuklukların gelişimi bebeklik döneminden itibaren bazı testlerle de tahmin edilebilmektedir (47). Bu testler şunları içerir:

Prechtl's Assessment of General Movements (GMs): Postnatal 20. haftada fetal dönemdeki spontan hareketler değerlendirilir. Her yaş grubu farklı hareket türlerini dikkate alır. 0-3 aylık bebeklerde ilerideki motor defisitleri öngörmede yüksek sensitivite ve spesifiteye sahiptir (47).

Hammersmith Infant Neurological Examination (HINE): 2-24 ay arası bebek ve çocuklarda standardize nörolojik muayene yöntemidir. Sinir fonksiyonunu, hareketleri, refleksleri ve reaksiyonları, postürü ve tonu değerlendirmenin yanı sıra serebral palsiyi de değerlendirir. 5 aydan büyük bebekler için gelecekteki motor işlev bozukluklarını tahmin etmede en güvenilir yöntemdir (48).

Alberta Infant Motor Scale (AIMS): Bebeklerin doğumdan yürümeye başlamalarına kadar (0-18 ay) kaba motor fonksiyonlarını değerlendirir. Motor gecikmelerin saptanmasında, riskli bebeklerin takibinde ve uygulanan yöntemlerin faydalarının değerlendirilmesinde güvenilir bir yöntemdir (49).

Bayley Bebeklik ve Erken Çocukluk Gelişim Ölçeği (BBGÖ): Bu tarama yöntemi ile 16 gün-42 ay arası hastalarda motor, kognitif ve linguistik gelişim değerlendirmesi yapılabilmektedir (50).

1.2.2. Bilişsel Bozukluklar

Orta derecede HİE vakalarında, hastalar ciddi nöromotor eksiklikler yerine SP gibi değişken problemler yaşayabilir. Bilişsel bozukluklar bu problemler arasındadır. Uzun süreli izlem çalışmalarında nörolojik sekelsiz HİE hastaları kognitif bozukluk açısından incelenmiş ve hafif hastaların da bundan muzdarip olabileceği gösterilmiştir (2, 6).

HİE hastalarının kontrol gruplarına göre daha fazla özel eğitim ihtiyacı vardır; öğrenme, okuma ve hecelemede güçlük yaşarlar. Bunlara ek olarak, konsantre olma ve düşünceleri takip etme problemleri bulunmuştur. Bu hastalarda özellikle yürütücü işlev bozukluklarının yaygın olduğu ve günlük yaşamlarının bu bozukluktan olumsuz etkilendiği görülmüştür (2).

Bazı hastalar erken dönemlerde bu sorunları yaşamayabilir ancak 2 yaşından sonra belirgin hale gelebilir. Bazı araştırmalarda 2 yaşında bu sorunları yaşayan hastaların yüzde 25'inde, 5 yaşında ise yüzde 35'inde bu sorunları yaşadığı tespit ediliyor. Okul çağındaki çocuklarda görülebilen bir takım bilişsel sorunlar vardır (6).

Bu sorunların daha erken tanınması ve erken müdahale fırsatı elde edilmesi hastaların uzun vadeli sonuçlarını iyileştirmek için çok önemlidir. Yaşamın erken dönemlerinde bilişsel sorunları tespit etmek için altın standart bir yöntem olarak, BDI değerlendirmesi yaygın olarak kullanılmaktadır. Düşük bilişsel puanlar, BBDI ile erken dönemde tedavi edilebilir (51).

1.2.3. Davranışsal Sorunlar

Davranış sorunları, HİE hastaları arasında uzun vadeli bir sorundur. Araştırmalara göre, HİE hastalarında kontrol gruplarına göre davranış sorunları daha sık görülüyor. HİE'nin evresi arttıkça bu problemlerin görülme olasılığı daha yüksektir (2).

Davranış sorunları ile ilgili araştırma sayısı sınırlıdır. Kontrol gruplarına göre otizm spektrum bozukluğu (ASD), DEHB, dışa yönelim bozuklukları, depresyon ve anksiyete daha sık görülmektedir. Ayrıca, sosyalleşme ve arkadaş edinme yeteneklerinin zayıf olduğu gösterilmiştir. HİE hastalarında görülen

davranış sorunlarından biri olarak uyku problemlerini tanımlayan birçok çalışma vardır (2, 5).

1.2.4. Duyusal Sorunlar ve Duyu Bütünleme (İşleme) Bozuklukları

Görme, duyma, dokunma, tat alma ve koku alma duyularına ek olarak, vücut pozisyonu algısı (proprioseptif duyu) ve denge (vestibüler duyu) da dikkate alınmalıdır. HİE hastalarında işitme ve görme sorunları değerlendirildiğinde sıklıkla birincil duyu bozuklukları gelişmektedir. Yaşamlarının ilk yılında bu hastaların %17'sinde işitme, %41'inde ise görme bozukluğu olduğu bildirilmiştir (52).

Duyusal bütünleme, çevreden gelen duyu girdileri ile duyu organlarının aldığı girdileri merkezi sinir sistemine ulaştırarak bütünleştirerek, bu girdilere yönelik davranış oluşturur (53). Farklı duyu organları, beynin farklı bölgelerinden uyarılar alır ve bu bölgeler duyu işleme için birbirleriyle etkileşime girer. Birey çevreye uyum sağlayarak gelişebilir (54). Duyusal bütünleme sonucunda duyguları düzenlemek, sosyal etkileşimde bulunmak, hareketleri planlamak ve öğrenmek mümkündür (55).

Duyu bütünleme bozukluklarında duyu doğru işlenmez veya tepkiler verilmez. SP ve DEHB bununla ilişkili hastalıklardan birkaçıdır (53). Bilgiyi işlemede güçlük çeken duyu sonucunda yandaş hastalıklar gelişebilir (56). Duyu bütünleme bozukluğu sonucunda bireylerde şu sorunlar yaşanabilmektedir (55):

- Işığa, dokunmaya, bazı yiyeceklere vb. karşı hassasiyet)
- Motor beceri gecikmeleri
- Kendini sakinleştirememesi
- Öğrenme güçlükleri, dikkat sorunları ve diğer davranış sorunları

Dokunsal, vestibüler ve proprioseptif duyu organlarının doğru şekilde işlenmesi, uygun motor planlama için esastır. Duyu bütünleme bozukluğu olan bireylerde motor planlama yapılamadığı için motor gecikmelere ek olarak dikkat ve davranış, sosyal beceriler, oyun becerileri gibi etkinliklerde beslenme, giyinme, uyuma ve yemek yeme gibi etkinliklerde güçlük yaşarlar (55).

DEHB olan kişilerde görsel, işitsel, koku alma, dokunma ve vestibüler duyu bozulur. Duyusal tepkilerini ayarlamak zordur ve bu onların günlük

yaşamlarını olumsuz etkiler. Araştırmalar, DEHB ve duyuşsal sorunları olan kişilerin kaygılı olduklarını, öğrenmede güçlük çektiklerini ve öfkeyle baş etmekte zorlandıklarını göstermiştir (55).

Duyu bütünleme bozukluğu olan bir kişi bazı duyuşlarına uygunsuz tepkiler verdiğinde, uyarandan kaçınabilir, saldırgan davranabilir veya tam tersi uyararı isteyebilir. Ayrıca uyarana davranışsal olarak yanıt verilmez (57). Duyu bütünleme bozukluğu olan bir çocuğun tepkileri şu şekilde özetlenebilir (55):

Duyuşsal uyarılara aşırı tepki verme: Bu tür hastalar, düşük duyuşsal eşiklere sahip olduklarında duyuşsal uyarılara aşırı tepki verirler. Gösterdikleri çekingen davranışlar ve saldırgan davranışlar olabilir. Duyuların neden olduğu kaygı, tekrarlayan davranış kalıplarına yol açabilir.

Duyuşsal eşik değeri yüksek olan hastalar, duyuşsal uyarıları olması gerekenden daha az yoğun algırlar, bu da gecikmeli yanıtla veya hiç yanıt olmamasına yol açar. Semptomlar dalgınlık, yorgunluk, ilgisizlik, uyku hali ve çevreye olan ilginin azalmasını içerir.

Bir duyuşsal arayıcı olarak, duyuşsal uyarım için doyumsuzsunuz. Duyuşsal arayış, yüksek seslerden hoşlanma, baskın tatlar ve her zaman dokunulma arzusu şeklinde olabilir.

Duyuşsal entegrasyon, davranış bozuklukları ve bazı motor işlev bozukluklarının birbiriyle ilişkili olduğu yukarıdan açıktır. Tablo 5'te gösterildiği gibi (55), duyuşsal problemler diğer problemlerle ilişkilidir.

Tablo 5. Duyusal Problemlerin Davranışsal ve Motor Yansımaları

Duyusal Problemler	Davranış/Motor Yansımaları
Dokunma, ses, hareket veya görmeye aşırı tepkili olma	Dikkatin kolay dağılması Dokunulunca kendini çekme Bazı yiyeceklerin ve giysilerin dokularından kaçınma Bilindik hareketli aktivitelerden korkma Yüksek seslere hassasiyet Beklenmedik bir duyuşal girdi ile agresif tavırlar gösterme Yoğun duyuşal girdi arama (kendini döndürme, nesnelere, insanların üzerine atlama vb.)
Duyusal girdiye yetersiz tepki verme	Vücut pozisyonu ve ağrının farkında olmama Aşırı ve az tepkisellik arasında geçişler yapma Zayıf denge Spor becerilerde veya topla oynamada zorlanma
Koordinasyon sorunları	Motor koordinasyon gerektiren yeni görevlerde zorlanma Sarsaklık, sakarlık Zekanın normal sınırdan olmasına rağmen akademik sorunlar
Akademik başarı ya da günlük yaşam becerilerinde gecikmeler	El yazısı, makas kullanma, ayakkabı bağlama, düğme ilikleme, fermuar çekmede problemler Dürtüsellik Dikkat dağınıklığı Görevleri planlamada güçlük Hareketlerin sonuçlarını öngörememe Yeni durumlara adapte olmada zorluk
Davranışın zayıf organizasyonu	Başarısızlıkla karşılaşma halinde hayal kırıklığı, agresif davranışlar ve kaçınma Tembel, sıkın, demotive görünüm Görevlerden kaçınma, inatçılık, karşı gelen davranışlar sergileme
Benlik Gücü	

1.3. Epigenetik

1942'de Conrad Waddington tarafından tanımlandığı gibi epigenetik, "genlerin fenotipleri üretmek için ürünleriyle nasıl etkileşime girdiğinin incelenmesidir" (58). Gen ekspresyonu, kalıtsal değişikliklerle DNA dizisini değiştirmeden değiştirilebilir. Genetik değişikliklerin aksine, bu değişiklikler geri dönüşümlüdür. Normal gelişimin birçok yönü, hastalık patofizyolojisi ve kanser ve diğer klinik durumlar için tedaviler bundan etkilenir. Büyük bir epigenetik değişiklik, DNA metillendiğinde, histonlar değiştirildiğinde, kromatin değiştirildiğinde ve kodlayıcı olmayan RNA'lar mevcut olduğunda meydana gelir (58). İnsan genomu 20.000 ila 25.000 arasında protein kodlayan gen içerir ve

mRNA, bir hücredeki tüm RNA'nın yaklaşık %1'ini oluşturur. Tipik olarak, mRNA'nın 5' ucuna bir metil-guanozin başlığı (5'kapağı) eklenir ve 3' ucuna Poli-A kuyrukları ve intronlar eklenir. Çeviri, mRNA çekirdekten taşındıktan sonra sitoplazmada gerçekleşir. DNA ve protein arasındaki geçici bir ara madde olan mRNA, sitoplazmada dakikalar ila saatler içinde bozulur. Proteinleri kodlamayan RNA'ların vücutta başka işlevleri vardır. Başlıca kodlamayan RNA'lar transfer RNA'lar (tRNA), ribozomal RNA'lar (rRNA'lar), küçük nükleer RNA'lar (snRNA) ve küçük nükleolar RNA'lar (snoRNA'lar), mikroRNA'lar (miRNA'lar), piwi etkileşimli RNA'lar (piRNA'lar) ve uzun kodlamayan RNA'lardır. (lncRNA'lar) (59).

İnsan genomundaki DNA'nın sadece %1.5'i fonksiyonel proteinleri kodlarken geri kalanının çoğu RNA'yı kodlar. Küçük RNA moleküllerinin keşfine kadar genomun geri kalanının çok az önemli olduğuna inanılıyordu. Bu gruptaki kodlayıcı olmayan RNA'lar, uzunlukları 18 ila 24 nükleotit arasında olan tek sarmallı, kısa RNA molekülleridir. İnsan genomunda, miRNA'lar çok sayıda gen bölgesini hedefler. MiRNA veri tabanı şu anda 38.589 mikroRNA içermektedir (7).

İlk kez Lee ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. 1993'ten itibaren mikroRNA olarak anılmaktadır. Lee ve arkadaşlarına göre 1993 yılında *Caenorhabditis elegans*'ın gen içeriğini taradılar ve lin-4'ün bir proteini değil, 22 nükleotitlik bir RNA'yı kodladığını keşfettiler (60). RNA miRNA'ları hedef genler üzerinde etki gösterir ve bu genlerin mRNA'sına karşılık gelen bir gen dizisine sahiptir (61). MikroRNA'lar, hedef genlerin 3'-çevrilmemiş bölgesi (3'-UTR) ile etkileşime girerek, hedef mRNA'nın bozulmasına neden olarak veya protein translasyonunu inhibe ederek gen ekspresyonunu baskılayabilir (59, 62). Hücre çoğalması, farklılaşması, hücre göçü, hastalık başlangıcı ve ilerlemesi dahil olmak üzere çok sayıda biyolojik aktiviteye miRNA'lar aracılık eder (63).

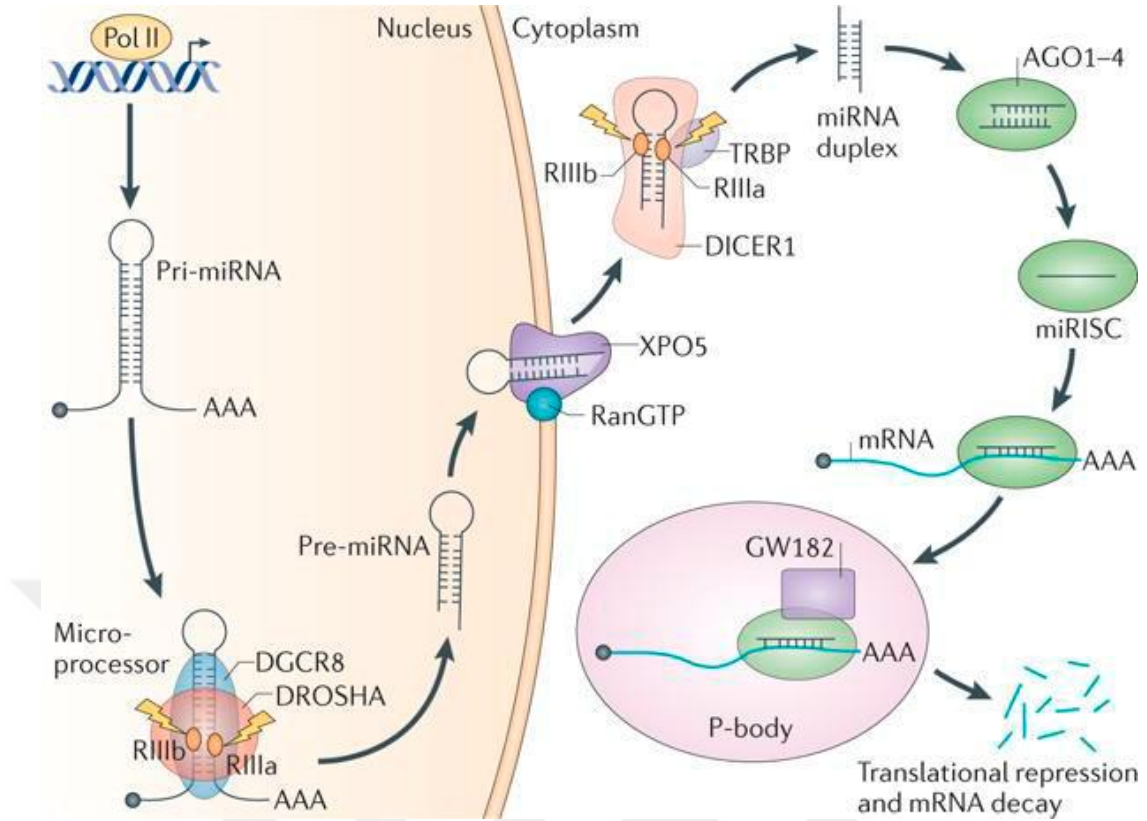
1.3.1. MikroRNA Sentezi

Birbirini takip eden adımlar sonucunda olgun miRNA sentezlenir:

1. Genomdan Pri-miRNA transkripsiyonu,
- 2.Çekirdekteki Pri-miRNA'lar öncül miRNA'lara (pre-miRNA'lar) dönüştürülür,

3. Pre-miRNA'nın genomdan taşınması çekirdekte sitoplazmaya,
4. Olgun bir miRNA 18-25 nükleotidden oluşur (64).

Çekirdek ve sitoplazmada miRNA'lar tip III "DROSHA" ve "DICER" RNAazları tarafından sentezlenir (65). Birincil transkriptler olarak miRNA'lar genomik DNA'dan RNA polimeraz II tarafından sentezlenir. Birincil miRNA'lar, poli A kuyrukları ve bir başlığı olan kök halka yapılarıdır. Bu pri-miRNA, çift sarmallı RNA'ya özgü ribonükleaz ailesi "RNAase III" ve onun kofaktörü "Pasha"dan (DGCR 8) bir endonükleazdır. Kritik bölge proteini 8 (DiGeorge sendromu). Mikroşlemci kompleksi (64, 65), onu 70-100 nükleotit uzunluğundaki pre-miRNA'ya dönüştürür. Pre-miRNA, nükleustan sitoplazmaya exportin 5 ve RAN-GTP ile taşınır. "Dicer" olarak adlandırılan bir RNaz III nükleaz, sitoplazmada pre-miRNA'ları 21-23 nükleotitli (64-67) çift sarmallı miRNA-miRNA duplekslerine ayırır. Olgun bir miRNA iki sarmaldan biridir, diğeri ise analog bir miRNA'dır. Partner proteini ile çift sarmallı miRNA molekülünü keserek açar ve olgun miRNA sentezlenir (66). Esas olarak Argonaute (AGO) proteinlerinden oluşan RISC komplekslerinde, mikroRNA'nın iki sarmalından sadece biri, olgun sarmal olarak adlandırılır. Baz eşleşmesi ile, tek sarmallı miRNA içeren aktif RISC kompleksi, mRNA translasyonunu inhibe eder veya yok eder (68, 69). MiRNA biyogenezi Şekil 1'de gösterilmiştir.(70)



Şekil 1. MiRNA Biyogenezisi (70)

1.3.2. MikroRNA'ların fonksiyonu

MikroRNA'lar, mRNA'ya müdahale ederek ve hedef genleri hedefleyerek protein sentezini inhibe eder. Bir mikroRNA, nükleotit dizisine dayalı olarak bir hedef geni tanır. MikroRNA'lar, hedef mRNA'ya nasıl bağlandıklarına bağlı olarak mRNA'yı bozabilir veya protein translasyonunu engelleyebilir. MiRNA 3. uçta çevrilmemiş bölgeye bağlanırsa, hedef mRNA'nın çevirisi baskılanır. Bir mikroRNA, hedef mRNA'nın "açık okuma çerçevesi" bölgesine bağlanır ve eğer tam bir tamamlama varsa, mRNA yok edilir ve bu da mRNA seviyelerinde bir azalmaya neden olur. Bir hedef genin miRNA aktivitesi, mRNA seviyeleri ölçülerek belirlenebilir (64). Bir mikroRNA, birden fazla mRNA'nın ifadesini düzenleyebilir ve bir miRNA, birden fazla mRNA'yı hedefleyebilir (7).

MikroRNA'larla ilişkili patolojiler şunları içerir:

miRNA ve Kanser: Moleküler yollarda, hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi birçok biyolojik süreçte etkili olan miRNA'lar, hedef mRNA'larına bağlı olarak

onkojenik veya tümör baskılayıcı özellikler kazanabilirler. Calin ve arkadaşları (71) tarafından yapılan bir moleküler çalışma, kronik lenfositik lösemili (KLL) hastalarda miRNA'ların kanserleşmede rol oynadığını göstermiştir. KLL hastalarının yaklaşık %50'sinde 13q14'ün silme bölgesinde miR-15-a ve miR-16-1 ifadeleri yoktu. Birkaç yıl sonra kolon ve rektal adenokarsinomlar, meme kanseri, Burkitt lenfoması, malign beyin tümörleri, tiroid, akciğer, prostat kanseri ve hepatosellüler karsinomda miRNA ekspresyon düzeylerinin normal dokulara göre değişmiş olduğu keşfedilmiştir (7).

miRNA ve Sepsis: Enflamasyon, enfeksiyon ve sepsis gibi patolojik durumlar dolaşımdaki miRNA spektrumunu değiştirir; miR-25, miR-133a, miR-146, miR-150 ve miR-223 gibi miRNA'ların sepsis ile ilişkili olduğu gösterilmiştir; miRNA'lar sepsisi kan kültürlerinden daha erken saptamak için yeni bir biyobelirteç olarak önerilmiştir (72). Sepsis, TNF, TLR'ler ve NF-B sinyal yollarını hedefleyen çeşitli miRNA'lar tarafından kontrol edilir. MiR-511 korumalı farelerin enjeksiyonu, TNF kaynaklı endotoksik şok sendromuna karşı; miR-15a/16 eksikliği, fagositozla sonuçlanan TLR4 ekspresyonunu uyarır (73). miR-23b'nin NF-κB, TNF-α, İL-6, ICAM-1, E-selektin ve VCAM-1 üzerindeki inhibitör etkisi yoluyla sepsis kolaylaştırılır (74).

miRNA ve Otoimmün Hastalıklar: Osteoartrit, romatoid artrit, ankilozan spondilit, diyabet, ailesel akdeniz ateşi ve sistemik lupus eritematozus gibi çeşitli otoimmün hastalıklar mikroRNA'lardan etkilenir (75). Enflamasyon, bağışıklık tepkisi ve hematopoez, mikroRNA'lardan etkilenir. Bu süreçler, otoimmün hastalıklara neden olan mikroRNA düzensizliği ile bozular. MicroRNA-146 ve miR-155, İL-1 ve TNF-α gibi proinflamatuvar sitokinler tarafından indüklenir ve inflamasyonda önemli rollere sahiptir. MikroRNA'ların ayrıca T hücre farklılaşmasını ve aktivasyonunu, dendritik hücreleri, monositleri, nötrofilleri, plazma hücrelerini ve mast hücrelerini düzenlemede etkili olduğu bildirilmektedir (76).

miRNA ve Prematüre Retinopatisi: ROP, retinal iskemi ve neovaskülarizasyon ile karakterizedir ve proliferatif bir vitreoretinopatidir. MikroRNA'lar, metabolik süreçleri, hafıza ve sinaptik gelişimi, anjiyogenezi, gen

ekspresyonunu, tümörijenезi ve büyümeyi kontrol etmenin yanı sıra, ROP patofizyolojisinde de rol oynayabilir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada evre 3 ROP'lu erken doğmuş bebeklerde miR-23a ve miR-200b-3p ekspresyon düzeylerinin ROP'u olmayan kontrol bebeklere göre anlamlı olarak arttığı saptanmış; miR-27b-3p ve miR-214-3p ifade seviyeleri önemli ölçüde azalmıştır (77).

miRNA ve Bronkopulmoner Displazi: Pulmoner morfogenez ve akciğer hasarı miRNA'larla ilişkilidir. Çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerin hava yollarındaki miR876-3p ekspresyonunun, bir çalışmada şiddetli BPD'yi öngörmede duyarlı olduğu bulunmuştur (78). Bir çalışma ayrıca miR-34a seviyelerinin hiperoksiye maruz kalan yenidoğan farelerde önemli ölçüde daha yüksek olduğunu ve miR-34a'nın silinmesi veya inhibisyonunun BPD ile ilişkili pulmoner hipertansiyonu hafiflettiğini buldu; tersine, miR-34a aşırı ekspresyonu pulmoner hipertansiyonu kötüleştirdi; miR34a düzeylerini düşüren anjiyopöietin-1 uygulaması, BPD ve pulmoner hipertansiyon fenotiplerini iyileştirmiştir (79).

miRNA ve Nekrotizan Enterokolit: Bağırsak immün veya inflamatuvar yanıt, çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde yer alan miRNA'lar tarafından modüle edilir. MiR-146a, interlökin-1 reseptörü ile ilişkili kinaz 1 (IRAK1) ekspresyonunu aşağı doğru düzenleyerek yenidoğanlarda bakteriyel kaynaklı bağırsak epitel hasarını inhibe eder; miR-23b ve miR-150, bağırsak iltihabını düzenler; miR-141-3p'nin NEC'de inflamasyonu ve oksidatif hasarı azalttığı bulunmuştur (80). Sıçanlarda neonatal NEC ile indüklenen intestinal hücre apoptozu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu olan dokularda aşırı eksprese edilen miR-124; miR-124'ün inhibisyonu, bağırsak hücresi apoptozunu baskıladı. Sistemik bir meta-analizde miRNA-429/200a/b ve miRNA-141/200c kümelerinin neonatal NEK tanısı için biyobelirteçler olduğu bildirilmiştir (81).

miRNA ve Hipoksik İskemik Ensefalopati: Perinatal beyin hasarında anahtar faktör, mikrogliya aktivasyonu ile karakterize edilen nöroinflamasyondur (82). Sağlıklı beyindeki mikrogliya'nın, hipoksi ve iskemiye takiben M1 fenotipine aktive edildiğinde proinflamatuvar sitokinler salgıladığı bilinmektedir; bununla birlikte, M1 fenotipindeki mikrogliya'nın moleküler kontrolü belirsizliğini koruyor. Neonatal HİE patojenik etkilerinin önlenmesi, mikrogliya'nın nasıl aktive olduğunu

anlamakla mümkün olabilir (15). MikroRNA'nın makrofajlar üzerindeki etkisinde inflamatuvar ve anti inflamatuvar etkiler görülebilir (83). Chen ve arkadaşları(82) miR-374-a'nın yenidoğan HİE'sinde ekspresyonunu önemli ölçüde azaltarak mikroglia aracılı nöroinflamasyonu inhibe ettiğini bildirdi . İntraserebroventriküler miRNA-210 antagomir uygulamasının hiperoksik-iskemik hasarlı yenidoğan sıçanlarda nöro inflamasyonu baskılayarak beyin hasarını azalttığı gösterilmiştir (15). MiR-124'ün aşırı ekspresyonu, hipoksi-iskemi, oksijen-glikoz yoksunluğu olan sıçanlarda nöron sağkalımını ve nörolojik bozuklukları iyileştirdi (84). HİE şiddeti, NSE ve S100B düzeylerindeki artışla ilişkilidir; miR-210 ve miR-374a seviyeleri negatif ilişkilidir (85).

miRNA ve Travmatik Beyin Hasarı (TBH): MiRNA'ların TBH'deki rolü son yıllarda artmaktadır (86). MicroRNA-144'ün TBH sonrası amiloid birikimine bağlı kognitif bozukluğu arttırdığı gösterilmiştir (87). TBI kaynaklı hücre ölümü, microRNA-711'i aşağı doğru düzenleyerek önlenabilir (88). MiRNA agomiri, TBH'lı sıçanlarda miR-9-5p seviyelerini artırarak apoptozu, nöroinflamasyonu ve KBB hasarını azaltır (86). MiR-22 seviyesi, sıçanlarda TBH'dan sonra kortikal nöronlarda aşağı regüle edildi; miR-22 yukarı regülasyonu, nöroproteksiyon sağlamak için hücre apoptozunu baskılar (89).

miRNA ve İskemik İnme: Proinflamatuvar M1 fenotiplerinin, iskemik felçten sonra ikincil beyin hasarını şiddetlendirdiği gösterilmiştir. Bu şekilde mikroglia ve makrofajların anti inflamatuvar M2 fenotipine kaydırılmasının nöroprotektif olduğu düşünülmektedir (90).

2. TEDAVİ

Tedavide ana amaç hipoksik hasar oluşmadan önlenmesine olmalıdır çünkü hipoksik iskemik hasar oluştuktan sonra yapılan uygulamalardan yeterli sonuçlar elde edilememiştir. Doğum öncesi yapılan sıkı takipler ile yüksek riskli gebeliklerin belirlenmesi, doğum sonrası bakımın kalitesinin artırılması, pediatriğin bulunması, gerektiğinde optimal canlandırma uygulaması ve en uygun doğum zamanının belirlenmesi HİBH gelişiminin önlenmesinde önemli rol oynayacaktır. Solunumun sağlanması, beyin dolaşımının sağlanması, normal kan şekeri düzeyinin sağlanması, nöbetlerin kontrolü, beyin ödeminin kontrolü ve ek tedaviler uygulanması yararlı olabilir.

Tedavinin ana amaçlarından biri merkezi sinir sistemi fonksiyonlarının iyileştirilmesinin yanı sıra sistemik fizyolojik ve biyokimyasal dengenin korunması (91).Diğer bir amaçta HİE'nin neden olabileceği uzun dönemdeki sorunların önlenmesidir ve bunun içinde öncelikle yenidoğanın uygun bakımı gerekmektedir. Çoğu HİE olgusu akut peripartum olaylardan kaynaklı değildir ve akut peripartum olay kaynaklı olsa da etiyolojik nedenin önüne geçilmesi mümkün olmayabilir (92).

Öncelikle yeterli ventilasyon ve oksijenizasyon ile dolaşım sağlanmalıdır. Laboratuvar testleri (kan gazı, metabolik parametreler, koagülasyon çalışmaları, tam kan sayımı, karaciğer fonksiyon testleri) yakın bir şekilde kontrol edilmeli; hipokalsemi, hipoglisemi, hiperglisemi gibi metabolik bozukluklar varsa düzeltilmeli, klinik veya elektrofizyolojik yöntemlerle nöbet aktivitesi izlenmelidir. Endikasyon var ise terapötik hipotermi başlanmalı ve diğer nöroprotektif tedaviler değerlendirilmelidir .

Hipoksik iskemik olay, süregelen bir hasarlanma sürecinden sonra meydana gelmektedir ve HİE derecesi bu hasarlanmanın süresi ve ciddiyeti ile doğrudan ilişkilidir. Terapotik hipotermi bu hasarlanma sürecini kesintiye uğratarak etki göstermektedir. Sekonder enerji yetmezliğinin meydana geldiği, ortalama 6. saat ile 15. saat arasında, sitotoksik ödem, mitokondriyal oksidatif aktivitenin bozukluğu, eksituar aminoasitlerin birikimi ve konvülsiyonlarla seyreden bu döneme girilmeden tedavinin başlanması, ciddi hasarın önüne geçilebilmesi açısından büyük önem taşımaktadır (93).

2.1. Solunum Sağlanması

Oksijen ve karbondioksit normal sınırlarda tutulmalıdır. Hipoksi kontrol edilmediğinde serebral hasar derinleşmektedir. Hipoksemi pulmoner vasküler direnci artırarak pulmoner kan akımının azalmasına yol açar. Şiddetli hipoksi ise apne ve bradikardiye yol açarak spontan solunumun başlatılmasını engeller (94). Ayrıca hiperoksidende kaçınmak gerekir.Çünkü hiperoksi serebral damarlarda vazokonstrüksiyon yaparak kan akımının azalmasına neden olur ve oksidatif stresi artırarak serbest oksijen radikallerinin artışıyla hipoksik iskemik hasarı artırabilir. Ayrıca BOS'ta azalmaya neden olarak nöronal hasara katkıda bulunabilir (95).

2.2. Beyin Dolaşımının Sağlanması

HİBH' da beyin yapıları bozulacağından dolaşım yeterli olarak sağlanamayacaktır. Beynin dolaşımı, kan basıncı ile kontrol altında tutulmaktadır. Kan basıncı düştüğünde beynin dolaşımı azalır ve hasar derinleşir. Bu nedenle sistemik basınç normal sınırlarda tutulmalıdır (96).

2.3. Kan Şekerinin Düzenlenmesi

Hipoksik iske mi ile birlikte artan anaerobik glikoliz sonucunda hepatic glikojen depoları azalır.Bu durumda beynin ihtiyacı olan glukoz seviyelerini sağlanamamasına neden olur. Hipoglisemi, hipoksik iskemik hasarın yanı sıra nöron hasarının şiddetini de artırabileceğinden kaçınılması gereken bir durumdur .Ayrıca yapılan diğer çalışmalarda hipogliseminin kötü prognozla ilişkili olduğu da görülmüştür (97).Hiperglisemi ise laktik asidozu artırabilir veya serebral hemorajiyi provoke edebilir. Bu nedenle yenidoğanların glukoz seviyeleri dikkatli izlenmeli verilen sıvı tedavilerinde glukoz konsantrasyonları kan glukoz düzeyi ölçümlerine göre ayarlanmalıdır. Bu yüzden güncel yaklaşım yenidoğanda HİBH'da normoglisemi sağlamaktır.

2.4. Nöbetlerin Kontrolü

Hipoksik iskemi süresi ne kadar uzun süreli veya şiddetli ise o kadar fazla nöbet aktivitesi görülmektedir. Nöbet aktivitesi beyinde olumsuz etkilere yol açabilir, bu nedenle subklinik de olsa nöbet varlığında tedavi başlanmalıdır (98).

Nöbetlerin tedavisinde öncelikle nöbetin etyolojisine yönelik araştırma yapılması gerekir ,bu yüzden varsa hipokalsemi, hipoglisemi ve diğer elektrolit dengesizliklerinin düzeltilmesi gerekmektedir. Nöbet tedavisinde ilk sırada fenobarbital ve ikinci sırada ise fenitoin önerilmektedir (99). Diğer yandan yenidoğan döneminde başlanan antiepileptik tedavinin, nörolojik bulguların normale dönmesi halinde erken dönemde kesilmesi önerilmektedir. EEG’ sinde anormal bulguları yenidoğanlarda nöbet devam etmese EEG normal olana dek tedavinin devam ettirilmesi gerekir (100).

2.5. Beyin Ödemi Tedavisi

HİBH nedeniyle gelişen beyin ödemi ciddi problemlerden biridir. Bugüne kadar beyin ödeminin tedavisinde diüretikler, mannitol, steroid, gibi ilaçlar ve baş yükseltme gibi fiziksel uygulamalar kullanılmıştır. Marchal ve arkadaşları(101) yaptığı bir çalışmada hipoksiden hemen sonra verilen 1gr/kg/doz’ da mannitol 130 hipoksik bebekte, hipoksiden 2 saat sonra mannitol verilen 95 bebeğe göre mortalite ve morbidite oranlarının daha az olduğu gösterilmiştir .Deksametazonun kan basıncını artırıcı şekilde etkilemesi uzun dönemde ortaya çıktığı için HİBH’ nin erken döneminde beyin ödemi azaltıcı etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Başın yükseltilmesi, diüretik ilaçlar ve hiperventilasyonun beyin damarlarındaki direnci artırdığı ve beyin ödemi tedavisinde etkili olabileceği gösterilmiştir (102).

2.6. Ek Tedavi Yöntemleri

2.6.1. Terapötik Hipotermi

Terapötik hipotermi orta ve ağır HİE tanılı yenidoğanların tedavisinde etkinliği kanıtlanmış tek nöroprotektif tedavi yöntemidir. Hipotermi uygulamasının başarısı, tedavinin başlama zamanına, hipotermi uygulama süresine ve yeniden ısıtma süresine bağlıdır. İki farklı hipotermi yöntemi vardır. Bunlar Tüm vücut

soğutma ve baş soğutma şeklinde uygulanır. Birbirlerine üstünlükleri gösterilmemiş olsa da tüm vücut soğutma daha yaygın kullanılan pratik bir yöntemdir. Tedavi amaçlı bir cihaz yardımı ile bu soğutulma işlemi yapılmasına ise 'aktif soğutma' ya da 'terapötik hipotermi' denir. Pasif hipotermi ise , hastanın soğuk jel pedleri, soğutulmuş dondurulmuş kalıp ve buz aküleri gibi bazı yardımcı aletlerin yardımı ile yapılmasıdır .

Hipotermi uygulamaları ile birlikte vücut sıcaklığında 1°C'lık azalmayla birlikte serebral metabolizmada %5 azalma sağlanır. Serebral metabolizmada azalma ile birlikte enerji tüketimi azalır. Hücre dışı aspartat, glutamat gibi eksitator aminoasitlerin ve hücre içi Ca²⁺ akışının azalmasıyla birlikte hücre depolarizasyonunda gecikme ile nörotoksisite önlenmiş olur (103).

İnflamatuvar mekanizmaların ve nöronal apoptoza neden olan kaskatların inhibisyonu ile de nöronal hasarın azalması sağlanır. Mitokondriyal disfonksiyon ve hücre hasarıyla birlikte artan reaktif oksijen ve nitrojen ürünlerinin endojen antioksidan mekanizmalarla azaltılması sağlanır (93). HİE terapötik hipotermi uygulama kriterleri Tablo 6 'da belirtilmiştir.

Tablo 6. HİE terapötik hipotermi uygulama kriterleri,

1. Gebelik yaşı ≥ 36 hafta ve ≤ 6 saatten küçük bebekler
2. Kord kan gazında veya doğumdan sonraki ilk bir saat içerisinde bakılan kan gazında pH ≤ 7.00 ya da BE ≤ -16 mmol/L olması
3. 10. dakika APGAR skoru < 5 veya devam eden resusitasyon gereksinimi
4. Klinik değerlendirmede orta ya da ağır ensefalopati bulgularının olması
5. pH veya BE değeri uygun olmayan bebeklere ek iki bulgu varlığı (APGAR skorunun düşük olması ve ensefalopati bulgusunun olması)

Hipotermi tedavisine uygun görülecek hastalar için 2014 yılında Amerikan Pediatri Akademisi tarafından belirlenen kriterler şunlardır (104)

2.6.1.1.Hipotermi Tedavisinin Yan Etkileri

Hipotermi tedavisinin hastalarda en sık yan etkisi trombositopenidir. Hastaların bazılarında soğuğa bağlı bradikardi görülebilir. Yapılan çalışmalarda vücudun soğutulmasına bağlı olarak kan viskozitesinde artma, koagülasyon bozukluğu, kalp kasılmasında azalma, doku dolaşımında azalma ve sepsis riskinde artma olabileceği bildirilmiştir (105).

2.6.2. Eritropoetin (EPO)

Eritropoetin (EPO), hipoksiye yanıt olarak böbrekler tarafından salgılanan bir glikoproteindir ve eritropoezden sorumlu birincil hematopoetik büyüme faktörüdür (106). EPO hipoksinin indüklediği transkripsiyon faktör-1 (HIF-1) aracılığıyla beyinde astrositler, mikroglia, oligodendrositler tarafından da üretilmektedir(106). EPO'nun ayrıca nöronları koruyabilen antioksidan, antioksidotoksik, antiapoptotik ve antiinflamatuvar özellikleri de mevcuttur.

2.6.3. Askorbik Asit (C vitamini)

Hipoksik-iskemik beyin hasarı sonucunda oluşan nöronal hücre hasar, kısmen serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) sentezlenmesi sonucu oluşur. Beynin reperfüzyonu ve reoksijenizasyonu sırasında salınan serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri, hücre nekrozunu ve apoptozisini indükleyebilir. Askorbik asit (AA), çeşitli ROS tiplerini temizleyen güçlü bir antioksidandır. Askorbik asit (AA) suda çözünür bir indirgeyici madde ve kollojen ve katekolamin biyosentezi ve hematopoezi gibi çeşitli fizyolojik rol oynayan antioksidandır (107).

C vitamini, düşük konsantrasyonlarda reaktif oksijen türevlerini ortadan kaldırır ve nötralize ederek a-tokoheroksil, urat ve β -karoten gibi antioksidanların yeniden sentezini sağlar. Sonuç olarak hipoksik iskemik ensefalopatiye (HİE) karşı önemli bir nöroproteksiyon sağlamış olur (108).

Yapısal olarak tüm hücrelerde sentezlenip , oksijen varlığında hemen parçalanan HIF-1 alfa , hipoksi koşulları altında, hücrelerin içinde birikir ve hedef genlerinin transkripsiyonunu indükler. C vitamini, prolil hidroksilaz aracılı HIF-1 alfa' nın parçalanmasını kolaylaştırarak hipoksinin neden olduğu apoptozisi azaltabildiğini gösteren çalışmalarda mevcuttur (109).

2.6.4. Magnezyum Sülfat

Magnezyum NMDA iyon kanallarını baskıladığı, hipoksik iskemiye takiben sistemik uygulandığında nöronal hasarı azalttığı deneysel olarak gösterilmiştir (110).

2.6.5. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR) Oluşumunun Engellenmesi

Hücre içi Ca²⁺ artışı fosfolipaz A2 oluşumuna neden olur. Bundan sonra SOR oluşumuna neden olan bir grup enzimi aktifleştirir .Ayrıca ATP yıkım yolunda ve arjinin-üre dönüşümü sırasında da SOR üretilir. Bu sistemlerdeki enzimlerin uyarılmalarının engellenmesi ile HİBH' nin tedavi edilebileceği ileri sürülmüştür (110).

2.6.5.1.Fosfolipaz A2 İnhibitörleri, Lipooksijenaz (LO) İnhibitörleri ve Siklooksijenaz (SO) İnhibitörleri

Yapılan bir hayvan deneyinde siklooksijenaz inhibitörü olan indometazin'in deneysel hipoksik iskemik rat beyninde hipoksik iskemiden 30 dakika sonrası 0,2 mg/kg (12 saat arayla 3 doz) indometazin tedavisinin kontrol grubuna göre rat beyninde infarkt alanının küçüldüğünü bildirmişlerdir (111).

Yapılan başka bir çalışmada ise hipoksik iskemik rat modelinde hipoksi ve iskemiden 30 dakika önce tek doz 2 mg/kg indometazin tedavisiyle apoptotik hücre sayısını kontrol grubuna göre düşük olduğunu tespit etmişlerdir (112).

2.6.5.2. Allopurinol

HİE yönetiminde allopurinol kullanılmasının nedeni, oksidatif strese dahil olan bir enzim olan ksantin oksidaz üzerindeki inhibe edici etkisidir. Ek olarak, bu ilaç serbest demir şelatlayıcı görevi görür ve hidroksil radikallerini baskılamaktadır(113).

Yapılan bir rat çalışmasında hipoksik hasardan sonra allopürinol verilen grupta enfarkt alanın azaldığını göstermişlerdir (114.)

2.6.6. Melatonin

Melatonin (N-asetİL-5-metoksitriptamina), salgılanması gece gündüz döngüsünü izleyen ve asıl rolü sirkadiyen ritmi düzenlemede olan pineal bez tarafından sentezlenen bir nöro hormondur. HİE yönetiminde kullanılmasına izin veren kilit unsurlar, güçlü antioksidan ve anti-inflamatuar aktivitesi ve kan-beyin bariyerini geçmesi ve merkezi sinir sistemine ulaşabilmesidir (115).

2.6.7. Kök Hücreler

HİE de dahil olmak üzere her türlü hastalığın tedavisi için kök hücre kullanımı çok ciddi bir şekilde araştırılmaya devam etmektedir. Bu terapötik yaklaşım, hipoksik-iskemik, kök hücrelerin, dalak gibi beyinden uzak organlardaki immün hücrelerle etkileşime girmesi sonucu hasar gören beyin dokusunun onarılmasına ve yenilenmesine yardımcı olabileceği, böylece immün / inflamatuvar yanıtı değiştirebileceği düşünülmektedir (116).

2.6.8. N-Asetil-Sistein (NAC)

N-asetilsistein (NAC) serbest radikalleri temizleyen ve glutatyon oluşumuna katılan böylece oksidatif stresi düzenleyen bir sistein öncüsüdür (117). Jatana ve arkadaşları (119) yaptığı bir hayvan çalışmasında ,hayvan modellerinden elde edilen kanıtlar NAC ve hipotermi kombinasyonu ile birlikte tedavi edilen hayvanlarda serebral enfarktüs hacminde ciddi bir azalma olduğunu göstermektedir (118).Gebelikte teratojenik etkisi olmadığı için ve plasentayı geçebileceği için NAC, yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde gelecekteki kullanım için en umut verici terapötik ajanlardan biri olarak kabul edilmektedir(119) .

2.6.9. Soy Gazlar

Ksenon plasentayı ve kan beyin bariyerini geçebilen bir soygazdır. Ksenon NMDA glutamat reseptörlerine bağlanarak bunların fonksiyonunu inhibe ettiği ve Hİ sonrasındaki eksitotoksisiteyi azaltabildiği ve sonuç olarak ksenonun terapötik bir ajan olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir (120).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Materyal Toplama

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Yenidoğan Yoğun Bakım ünitesinde Aralık 2021 ile Aralık 2022 tarihleri arasında yürütüldü. Çalışmamız prospektif olarak planlanmış ve uygulanmıştır. 35 hafta üstünde doğan 46 yenidoğan arasında 23 hasta ve 23 kontrol grubu olarak iki gruba ayrıldı. Hipoksik iskemik ensefalopati gelişiminde rol alan prenatal-natal öykü, hastaların demografik bilgileri, kan gazı parametreleri, klinik nöbetler, mekanik ventilatör ihtiyacı, laboratuvar bulguları, sitokinler ve miRNA ışığında değerlendirildi. Ağır renal hastalıklar, hipertansif hastalıklar, konjenital maligniteler, immün yetmezlik durumları, metabolik hastalıklar, sendromik hastalar, ağır nörolojik hastalar gibi multisistemik etki gösteren durumlar gelişen hastalar çalışmadan çıkarıldı. Çalışmaya alınmadan önce tüm hastaların anne ve babaları bilgilendirildi, aydınlatılmış onam formu okutuldu ve bebeklerin çalışmaya katılmasını kabul eden anne ve babalardan yazılı izin alındı.

Hastalardan HİE tanısı aldığı andan itibaren 0.saat, 24.saat ve 48-72.saatlerde alınan 2 cc kan örneği EDTA'lı tüplerde santrifüj edildikten sonra serum kısmı ayrılarak -80 derecede saklanmıştır. Kontrol grubunda yer alan çocuklardan rutin alınan kanlardan EDTA'lı tüpe alınan 2 cc kan örneği santrifüj edildikten sonra serum kısmı ayrılarak -80 derecede saklanmıştır.

Hastaların kimlik ve iletişim bilgileri kaydedildi. Erken membran rüptürü, koryoamniyonit varlığı gibi gebeliğe ait faktörler sorgulandı ve kayıt altına alındı. Gebelik sayısı ve haftası, intrauterin büyüme geriliği varlığı, doğum kilosu ve şekli, APGAR skoru (Activity-Pulse-Grimace-ApparenceRespiration), doğum sonrası ağlama ve morarma varlığı, doğum salonunda oksijen ihtiyacı varlığı ve seviyesi gibi doğum ile birlikte ortaya çıkan özellikler belirlendi.

3.2. Moleküler Genetik Çalışmalar

3.2.1. Real Time PCR ile MiRNA İfadelerinin Değerlendirilmesi

Çalışmada belirtilen toplam hasta sayısına ulaşıldıktan sonra gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real time-Polymerase Chain Reaction; Real time-PCR) çalışmaları için kan örnekleri kuru buz içerisinde Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim dalına ulaştırılmıştır. RNA izolasyonu, cDNA (Complementary DNA) sentezi, Real time PCR çalışmaları Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji laboratuvarlarında yapılmıştır. MiRNA-210, miRNA-374-a, miRNA-21 'in ifade analizleri için Real Time PCR uygulanmıştır. Hasta ve sağlıklı yenidoğanlardan alınan ve -80°C'de saklanan örnekler sırasıyla RNA izolasyonu yapıldıktan sonra RNA konsantrasyonu spektrofotometri ile 260 nm'de belirlenmiştir. RNA izolasyonu kısaca aşağıdaki gibidir.

3.2.2. Örneğin Homojenize Edilmesi

1. Total kan, 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
2. Süpernatant uzaklaştırıldı. Aradaki faz yeni ependorfa toplandı ve toplanan fazın üstüne 800 µl Trizol eklendi (Bu aşamada RNA'ya bağlı proteinler uzaklaştırılır).
3. 1-2 dk elde hızlıca çalkalandı. 5 dk oda sıcaklığında bekletildi (5 dk' dan fazla beklerse RNA zarar görebilir).

3.2.3. RNA Eldesi

1. 160 µl kloroform eklendi ve 1-2 dk elde hızlıca çalkalandı (Bu aşamada yoğun kıvamda olacak. 2-3 dk bekletildi).
2. 13.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi (+4°C).
3. Üst faz yeni tüpe aktarıldı.

3.2.4. RNA'nın Çöktürülmesi

1. 400 µl, 2-propanol eklendi. 3-5 defa alt üst edildi (Bulanıklık gözlemlendi).
2. 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.
3. 13.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. (+4°C) ve 1 ml %70 etanol eklenildi.

4. 7.500 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. (+4°C) (pellet görünmeli).
5. Pellet 20 µl nuclease-free dH₂O ile çözüldü.

3.2.5. RNA Ölçümü

RNA ölçümüne başlamadan önce distile suyun kör olarak okutulmasıyla cihaz kalibre edildi. BioSpec-Nano (Shimadzu) cihazının ölçüm alanına 2 µl RNA konularak RNA miktarı ng/µl olarak ölçüldü. Her örnek okumasının ardından cihaz temizlenerek 2 dakika bekletildi.

Komplementer DNA (cDNA) sentezinde eşit RNA miktarlarında çalışılabilmesi için okunan en düşük RNA değeri standart olarak alındı. Tablo 7’de kullanılan primer dizilimleri verilmiştir (95).

Tablo 7. qRT-PCR’de Kullanılmış Olan Primer Dizileri

	RT primer foward	Rt primer revers
Mir-270	CTGTGCGTGTGACAGC	GTGCAGGGTCCGAGG (121)
Mir374- a	CGGCGGTTATAATAACAACCTG	AGCTCGAGTGGAAAGTCTGTGCA (122)
Mir-21	ACGTTGTGTAGCTTATCAGACTG	AATGGTTGTTCTCCACACTCTC(123)
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT (124)

3.2.6. Komplementer DNA Sentezi

RT-PCR’ı için kullanılacak cDNA’ların hazırlanmasın da RNA örnekleri kullanıldı. Bunun için her örnekten 5 µl RNA alındı. cDNA sentezi toplam 10 µl hacimde gerçekleştirildi. Sentez için A.B.T Laboratory Industry cDNA synthesis Kit / CatalogueNo: C03-01-05 kullanıldı. Örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi. İlk etapta 65°C’de 5 dk ve buzlu blokta 5 dk bekletildi. Son olarak 25°C’de 10 dk, 37°C’de 120 dk, 85°C’de 5 dk ve en son sıcaklık 4°C olacak şekilde cihazda bekletildi. Oluşan cDNA örnekleri -20°C’de saklandı. Tablo 8, Tablo 9 ve Tablo 10 ‘da komplementer DNA sentezindeki karışım miktarı gösterilmektedir.

Tablo 8. Komplementer DNA Karışım Miktarı (5 µl'lik Reaksiyon)

Bileşik	Hacim (µl)
10X RT tamponu	1
25X dNTP karışımı (100mM)	0.5
Revers Transkriptaz (50U/µl)	0.5
10X RT Random Primer	2
Nükleaz içermeyen H ₂ O	Sulandırma miktarına göre
RNA örneği	5
Reaksiyon toplamı	10

Tablo 9. Komplementer DNA Sentezi PCR Programı (2 Adımlı)

PCR	1. Adım	2. Adım
Sıcaklık	65°C	4°C
Zaman	5 dk	∞

Tablo 10. qRT-PCR Programı

PCR	1. Adım	2. Adım	3. Adım	4. Adım
Sıcaklık	25°C	37°C	120 dk	4°C
Zaman	30 dk	120 dk	5 dk	∞

3.2.7. RT-PCR

3.2.7.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile cDNA Amplifikasyonu

Revers transkripsiyon ile elde edilen cDNA'lar dizi spesifik primerlerin varlığında qRT-PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Bebek kan sıvısında belirtilen genlerin miRNA ifade düzeyleri incelendi. RT-PCR analizleri sonucunda gen ifadelerindeki farklılıkların hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanıldı. RT-PCR 'da kullanılan primerler Tablo 11'de belirtilmiştir.

Tablo 11. RT-PCR’da Kullanılan Primerler

Primerler	Katalog Numarası
U6	220808-1-56 (F) 220810-1-2 (R)
Hsa-mir-21	230109-1-4 (F) 230109-1-5 (R)
Hsa-mir-374a	230109-1-6 (F) 230109-1-7 (R)
Hsa-mir-210	230109-1-8 (F) 230109-1-9 (R)

RT-PCR yapılırken pleytin kuyucuklarına cDNA örneklerinden 0,5 µl koyuldu. Her bir örnek için 2,5 µl SYBR Green Master (A.B.T Laboratory Industry qPCR SYBR-Green Master Mix synthesis kit / CatalogueNo: C03-02-01) 1,5 µl nükleaz içermeyen su ve 0,25 µl primer hibridizasyon probu örnek sayısına göre bileşen miktarları hesaplanarak ependorflara bırakıldı ve vortekslendi. Pleytte ki cDNA örneklerinin üzerine hazırlanan karışımdan 4,5 µl pipet ile bırakılarak pleytin üzeri optik filmle kapatıldı. Pleyt örneklerin tamamen dibe çökmesi ve oluşan kabarcıkların yok edilmesi amacıyla mini pleyt santrifüj cihazında 1 dakika santrifüj işlemine tabi tutuldu. RT-PCR için kullanılan bileşikler Tablo 12 ‘ de belirtilmiştir.

Tablo 12. RT-PCR İçin Kullanılan Bileşikler

Bileşikler	Hacim (µl)
cDNA	0.5
Primer	0.25
SYBR Green Master Mix	2.5
Nükleaz içermeyen H ₂ O	1.5
Toplam	5

3.3. Biyokimyasal Analizler

3.3.1. Rutin Analizler

3.3.1.1. ELISA Analizleri

İnterlökin-6, İL-10, İL-1-alfa, TNF-alfa ve HİF-1-alfa sitokinleri serum örneklerinden analiz edildi. Aprotininli tüplere alınan 1,5 ml kan 5000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek serum örnekleri ayrıldı. Ayrılan serumlar ve altta kalan

hücre pelleri kullanılıncaya kadar - 80°C’de saklandı. ELISA analizleri serum örneklerinde insan spesifik ELISA kitleri kullanılarak gerçekleştirildi. Serum sıvısında ELISA analizleri yapıldı.

Solüsyonların Hazırlanması

Yıkama Tamponu: Kitin içinde bulunan konsantre yıkama solüsyonundan 30 ml alınıp üzerine 750 ml deiyonize distile su koyuldu.

Standart Solüsyonu: Her kitin protokolüne bağlı kalınarak beş farklı konsantrasyonda standart hazırlandı.

Yöntem: (İL-6, İL-10,İL-1-alfa,TNF-alfa ve HİF-1-alfa)

1. Tüm reaktifleri, örnekleri ve standartları hazırlandı.
 2. Standartlar ve ELISA solüsyonu hazırlanmış örneklerin üzerine eklendi. 37°C 'da 60 dakika süresince tepkime vermeleri için beklendi.
 3. Beş defa yıkama işlemi uygulandı. Kromojen A ve B solüsyonları eklendi. 37 °C de on dakika inkübe edildi (renk değişimi için).
 4. Stop solüsyonu eklendi.
 5. On dakika içinde optimum değeri okundu.
- Çalışmada kullanılan ELISA kitlerine ait bilgiler Tablo 13 ‘te belirtilmiştir.

Tablo 13.Çalışmada Kullanılan ELISA Kitlerine Ait Bilgiler

KİT ADI	REAKTİVİTE	HASSASİYET	ÖLÇÜM ARALIĞI	MARKA/MENŞEİ	KATALOG NUMARASI
BostonChem-IL10	İnsan	3 pg/mL	7.82-500 pg/ml	USA	BLS-1142Hu
BostonChem-TNF ALFA	İnsan	6.5 pg/mL	15.63-1000 pg/ml	USA	BLS-1190Hu
BostonChem-IL6	İnsan	3.2 pg/mL	7.82-500 pg/ml	USA	BLS-1156Hu
BostonChem-HIF1 ALFA	İnsan	0.057 ng/mL	0.16-10 ng/mL	USA	BLS-1603Hu
BostonChem-IL1 ALFA	İnsan	2.7 pg/mL	7.82-500 pg/ml	USA	BLS-2273Hu

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Analizler SPSS (Statistical Package for Social Sciences; SPSS Inc., Chicago, IL) 22 paket programında değerlendirilmiştir. Çalışmada tanımlayıcı veriler kategorik verilerde n, % değerleri, sürekli verilerde ise ortalama±standart sapma (Ort±SS) değerleri ile gösterilmiştir. Gruplar arası kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında ki-kare analizi (Pearson Chi-kare) uygulanmıştır. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirilmiştir. İkili grupların karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren değişkenlerde student t testi, normal dağılım göstermeyen değişkenlerde Mann Whitney U-testi kullanılmıştır. İki'den fazla değişkenlerin karşılaştırılmasında normal dağılıma uyanlara One Way ANOVA analizi, normal dağılım göstermeyenlere ise Kruskal Wallis testi yapılmıştır. Sürekli değişkenlerin birbiriyle ilişkisinin incelenmesinde normal dağılım gösterenlerde Pearson, normal dağılım göstermeyenlerde ise Spearman korelasyon testinden yararlanılmıştır. Ölçümsel verilerin zamana göre karşılaştırılması için ikili ölçümde Wilcoxon analizi, ikiden fazla ölçüm için Friedman analizi uygulanmıştır. Analizlerde istatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

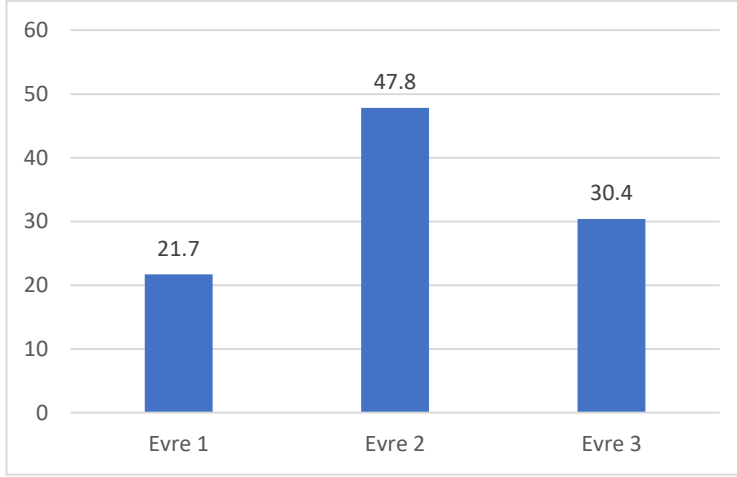
4. BULGULAR

Çalışmaya 23 hasta ve 23 kontrol olmak üzere toplam 46 katılımcı dahil edilmiştir. Hasta grubunda bulunanların %39.1'i kız ve %60.9'u erkek olup kontrol grubunda bulunanların %56.5'i kız ve %43.5'si erkektir. Gruplar arasında cinsiyet açısından anlamlı farklılık görülmemiştir (p=0.238). Hasta grubunda bulunanların ağırlık ortalaması 3067.7±375.5 olarak kontrol grubunda bulunanların ağırlık ortalaması ise 3182.6±235.3 olarak bulunmuş olup gruplar arasında ağırlık açısından anlamlı farklılık görülmemiştir (p=0.220). Hasta grubunda bulunanların doğum haftası ortalaması 38.1±1.5 olarak kontrol grubunda bulunanların doğum haftası ortalaması ise 38.2±1.6 olarak bulunmuş olup gruplar arasında doğum haftası açısından anlamlı farklılık görülmemiştir (p=0.669). Hasta grubunda bulunanların %82.6'sı, kontrol grubunda bulunanların ise %60.9'u normal doğum iken gruplar arasında doğum şekli açısından anlamlı farklılık görülmemiştir (p=0.102). Hasta grubunda bulunanların ilk gebelik olma oranı (%73.9) kontrol grubunda bulunanların oranından (%43.5) anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p=0.036)(Tablo 14).

Tablo 14. Grupların Cinsiyet, Ağırlık ve Doğum Özelliklerinin Karşılaştırılması

		Hasta		Kontrol		P
		Sayı	%	Sayı	%	
Cinsiyet	Kız	9	39.1	13	56.5	0.238*
	Erkek	14	60.9	10	43.5	
Ağırlık, Ort±SS		3067.7±375.5		3182.6±235.3		0.220**
Doğum haftası, Ort±SS		38.1±1.5		38.2±1.6		0.669***
Doğum şekli	Normal	19	82.6	14	60.9	0.102*
	Sezaryen	4	17.4	9	39.1	
İlk gebelik	Evet	17	73.9	10	43.5	0.036*
	Hayır	6	26.1	13	56.5	

Hastaların evreleri incelendiğinde 5'i (%21.7) Evre 1, 11'i (%47.8) Evre 2 ve 7'si (%30.4) Evre 3 şeklindedir (Şekil 2).



Şekil 2.Hastaların Evrelere Göre İncelemesi

Hasta grubunda bulunanların evreler arasında cinsiyet ($p=0.962$), ağırlık ($p=0.677$), doğum haftası ($p=0.505$), doğum şekli ($p=0.963$) ve ilk gebelik olma durumu ($p=0.264$) açısından anlamlı farklılık görülmemiştir (Tablo 15).

Tablo 15. Hasta Grubunda Bulunanların Evreye Göre Cinsiyet, Ağırlık ve Doğum Özelliklerinin Karşılaştırılması

		Evre 1		Evre 2		Evre 3		p
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
Cinsiyet	Kız	2	40.0	4	36.4	3	42.9	0.962*
	Erkek	3	60.0	7	63.6	4	57.1	
Ağırlık, Ort±SS		3204.0±262.8		3030.9±376.3		3028.1±463.9		0.677**
Doğum haftası, Ort±SS		38.2±,8		38.4±1.7		37.6±1.6		0.505***
Doğum şekli	Normal	4	80.0	9	81.8	6	85.7	0.963*
	Sezaryen	1	20.0	2	18.2	1	14.3	
İlk gebelik	Evet	3	60.0	10	90.9	4	57.1	0.264*
	Hayır	2	40.0	1	9.1	3	42.9	

Hastaların 17'sinde (%73.9) uzamış doğum eylemi, 5'inde (%21.7) mekonyum bulaşı ve 1'inde (%4.3) plasenta dekolmanı görülmüştür (Tablo 16).

Tablo 16. Hastaların Doğum Öyküsü ve Oranları

		Sayı	%
Doğum öyküsü	Uzamış doğum eylemi	17	73.9
	Mekonyum bulaşı	5	21.7
	Plasenta dekolmanı	1	4.3

Evre 1’de bulunanların %80’inde. Evre 2’de olanların %63.6’sında ve Evre 3’te olanların ise %85.7’sinde uzamış doğum eylemi görülmüş olup evreler arasında doğum öyküsü açısından anlamlı farklılık görülmemiştir (p=0.289)(Tablo 17).

Tablo 17. Hasta Grubunda Bulunanların Evreye Göre Doğum Öyküsünün Karşılaştırılması

		Evre 1		Evre 2		Evre 3		p*
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
Doğum öyküsü	Uzamış doğum eylemi	4	80.0	7	63.6	6	85.7	0.289
	Mekonyum bulaşı	1	20.0	4	36.4	0	.0	
	Plasenta dekolmanı	0	.0	0	.0	1	14.3	

Hastaların kan gazı değerleri incelendiğinde; Ph ortalaması 7.0±.1 olarak. pCO₂ ortalaması 60.5±16.1 olarak. HCO₃ ortalaması 13.3±1.9 olarak. laktat ortalaması 10.8±2.9 olarak ve baz açığı ortalaması ise -13.2±3.2 olarak bulunmuştur (Tablo 18).

Tablo 18. Hastaların Kan Gazı Değerleri

	Ort±SS
Ph	7.0±.1
pCO ₂	60.5±16.1
HCO ₃	13.3±1.9
Laktat	10.8±2.9
Baz açığı	-13.2±3.2

Tablo 19. Hasta Grubunda Bulunanların Tedavi Öncesi ile 24. Saat CK Değerinin Karşılaştırılması

	Tedavi öncesi	24. saat	p*
	Ort±SS	Ort±SS	
CK	1656.4±1093.8	2755.5±1925.3	0.003

Evreler arasında Ph (p=0.449). PCO₂ (p=0.129). HCO₃ (p=0.637). laktat (p=0.199) ve baz açığı (p=0.148) değeri açısından anlamlı farklılık görülmemiştir (Tablo 20).

Tablo 20. Hasta Grubunda Bulunanların Evreye Göre Kan Gazı Değerlerinin Karşılaştırılması

	Evre 1	Evre 2	Evre 3	p
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	
Ph	7.0±1	7.0±1	7.0±0	0.449*
PCO2	64.4±13.8	55.2±16.5	66.0±16.5	0.129**
HCO3	13.5±2.0	13.6±2.3	12.7±1.5	0.637*
Laktat	8.8±3.6	11.5±3.0	11.1±1.7	0.199*
Baz açığı	-10.7±3.0	-13.9±3.4	-14.0±2.2	0.148**

Tablo 21. Hasta Grubunda Bulunanların Evreye Göre CK Değerlerinin Karşılaştırılması

	Evre 1	Evre 2	Evre 3	p*
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	
Tedavi öncesi CK	1768.8±771.5	1694.6±1116.6	1516.1±1369.8	0.504
24. saat CK	1550.0±943.8	3613.6±2092.9	2268.1±1691.0	0.092

Hastaların MV ihtiyacı incelendiğinde; 4'ü (%17.4) spontan solunum. 12'si (%52.2) nazal CBAP ve 7'si (%30.4) entübe şeklindedir. Hastaların 18'inde (%78.3) aktif, 5'inde (%21.7) pasif soğutma görülmüş iken 6'sında (%26.1) klinik nöbet vardır. Hastaların AEEG /EEG sonuçlarına göre 17'sinde (%73.9) uyku uyanıklık siklusu ve 6'sında (%26.1) orta diskontinyu görülmüştür. Hastaların 20'si (%87) antikonvülzan tedavi almaktadır. Hastaların 14'ünün (%60.9) beyin MR sonucu. 22'sinin (%95.7) transfontanel USG sonucu normal gelmiştir (Tablo 22).

Tablo 22. Hastaların Klinik ve Radyolojik Özellikleri

		Sayı	%
MV ihtiyacı	Spontan	4	17.4
	Nazal CBAP	12	52.2
	Entübe	7	30.4
Soğutma	Aktif	18	78.3
	Pasif	5	21.7
Klinik nöbet	Var	6	26.1
	Yok	17	73.9
AEEG /EEG	Uyku uyanıklık siklusu	17	73.9
	Orta diskontinyu	6	26.1
Antikonvülzan kullanımı	Var	20	87.0
	Yok	3	13.0
Beyin MR	Normal	14	60.9
	Patolojik	9	39.1
Trans fontanel USG	Normal	22	95.7
	Grade 1 periventriküler kanama	1	4.3

Evre 1’de olanların %40’ı spontan , %60’ı nazal CBAP solunumu yaparken Evre 2’de olanların %18.2’si spontan, %81.8’i nazal CBAP ve Evre 3’te olanların ise tamamı entübedir. Evreler arasında MV ihtiyacı açısından anlamlı farklılık görülmüştür (p<0.001). Evre 1’de olanların tamamı pasif soğutma iken Evre 2 ve Evre 3’te olanların tamamı aktif soğutma şeklindedir ve evreler arasında soğutma açısından anlamlı farklılık görülmüştür (p<0.001). Evre 1’de olanların %40’ı, Evre 2’de ve Evre 3’te olanların ise tamamı antikonvülzan kullanmaktadır. Evreler arasında antikonvülzan kullanımı açısından anlamlı farklılık görülmüştür (p=0.006). Evre 1’de olanların %20’sinin, Evre 2’de olanların %18.2’sinin ve Evre 3’te olanların ise %85.7’sinin beyin MR sonucu patolojiktir. Evreler arasında beyin MR sonucu açısından anlamlı farklılık görülmüştür (p=0.014). Evreler arasında klinik nöbet varlığı (p=0.390). AEEG/EEG sonucu (p=0.390) ve Transfontanel USG (p=0.565) sonucu açısından anlamlı farklılık görülmemiştir (Tablo 23).

Tablo 23. Hasta Grubunda Bulunanların Evreye Göre Klinik ve Radyolojik Özelliklerinin Karşılaştırılması

		Evre 1		Evre 2		Evre 3		p*
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	
MV ihtiyacı	Spontan	2	40.0	2	18.2	0	.0	<0.001
	Nazal CBAP	3	60.0	9	81.8	0	.0	
	Entübe	0	.0	0	.0	7	100.0	
Soğutma	Aktif	0	.0	11	100.0	7	100.0	<0.001
	Pasif	5	100.0	0	.0	0	.0	
Klinik nöbet	Var	0	.0	4	36.4	2	28.6	0.390
	Yok	5	100.0	7	63.6	5	71.4	
AEEG /EEG	Uyku uyanıklık siklüsü	5	100.0	7	63.6	5	71.4	0.390
	Orta diskontinyu	0	.0	4	36.4	2	28.6	
Antikonvülzan kullanımı	Var	2	40.0	11	100.0	7	100.0	0.006
	Yok	3	60.0	0	.0	0	.0	
Beyin MR	Normal	4	80.0	9	81.8	1	14.3	0.014
	Patolojik	1	20.0	2	18.2	6	85.7	
Trans fontanel USG	Normal	5	100.0	10	90.9	7	100.0	0.565
	Grade 1 periventriküler kanama	0	.0	1	9.1	0	.0	

İL-10 (p=0.047), HIF-1-alfa (p<0.001), İL-6 (p<0.001) ve İL-1-alfa (p=0.011) değeri kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksek; mir374-a (p<0.001) değeri ise anlamlı şekilde düşük görülmüştür. Gruplar arasında TNF-alfa değeri açısından anlamlı farklılık görülmemiştir (p=0.464)(Tablo 24) .

Tablo 24. Hasta Grubunun 0. Saat ile Kontrol Grubunun Biyomarkerlerinin Karşılaştırılması

	Hasta	Kontrol	p
İL-10	46.9±26.2	33.1±19.3	0.047**
TNF-alfa	49.5±27.1	44.5±18.6	0.464**
HİF-1-alfa	4.8±.9	3.1±1.3	<0.001*
İL-6	20.1±5.8	13.6±2.7	<0.001*
İL-1-alfa	58.8±28.2	38.7±14.8	0.011*

Gruplar arasında İL-10 açısından anlamlı farklılık görülmüştür (p=0.036) ve bu farklılık kontrol grubu ile evre 3 arasında görülmüş olup kontrol grubunun değeri daha düşüktür. Gruplar arasında HİF-1-alfa açısından anlamlı farklılık görülmüştür (p<0.001) ve bu farklılık kontrol grubu ile evre 2 ve evre 3 arasında görülmüş olup kontrol grubunun değeri daha düşüktür. Gruplar arasında İL-6 açısından anlamlı farklılık görülmüştür (p<0.001) ve bu farklılık kontrol grubu ile diğer gruplar arasında görülmüş olup kontrol grubunun değeri daha düşüktür. Gruplar arasında İL-1-alfa açısından anlamlı farklılık görülmüştür (p=0.04) ve bu farklılık kontrol grubu ile evre 1 ve evre 3 arasında görülmüş olup kontrol grubunun değeri daha düşüktür (Tablo 25).

Tablo 25. Tüm Grupların 0. Saat ile Kontrol Grubunun Biyomarkerlerinin Karşılaştırılması

	Evre 1 Ort±SS	Evre 2 Ort±SS	Evre 3 Ort±SS	Kontrol Ort±SS	p
İL-10	30.4±23.3 ^{a,b}	46.6±18.0 ^{a,b}	59.2±34.7 ^a	33.1±19.3 ^b	0.036**
TNF-alfa	50.5±21.5	45.1±33.3	40.0±19.1	44.5±18.6	0.510**
HİF-1-alfa	4.4±1.2 ^{a,b}	4.8±.8 ^a	5.1±.6 ^a	3.1±1.3 ^b	<0.001*
İL-6	17.3±2.5 ^a	21.6±7.5 ^a	19.6±3.7 ^a	13.6±2.7 ^b	<0.001*
İL-1-alfa	71.8±36.6 ^a	50.3±26.5 ^{a,b}	62.7±23.8 ^a	38.7±14.8 ^b	0.04*

Ölçüm zamanları arasında TNF-alfa açısından anlamlı farklılık görülmüştür (p=0.019). Bu farklılık 48-72. Saat ile diğer iki zaman arasındaki farktan kaynaklanmıştır ve 48-72. Saat ölçümü en yüksek görülmüştür. Ölçüm zamanları arasında İL-1-alfa açısından anlamlı farklılık görülmüştür (p=0.032). Bu farklılık 0. Saat ile 24. saat arasındaki farktan kaynaklanmıştır ve 0. Saat ölçümü 24. Saatteki ölçümden daha yüksek görülmüştür. Zamanlar arasında İL-10 (p=0.499), HİF-1-

alfa (p=0.260) ve İL-6 (p=0.438) değeri açısından anlamlı farklılık görülmemiştir (Tablo 26).

Tablo 26. Hasta Grubunda Bulunanların Zamana Göre Biyomarkerlerinin Karşılaştırılması

	0.saat Ort±SS	24. saat Ort±SS	48-72.saat Ort±SS	P
İL-10	46.9±26.2	53.7±46.7	53.3±29.5	0.499
TNF-alfa	49.5±27.1 ^a	50.3±17.8 ^a	70.0±38.2 ^b	0.019
HİF-1-alfa	4.8±.9	4.9±.8	4.9±.7	0.260
İL-6	20.1±5.8	22.2±9.9	27.3±43.0	0.438
İL-1-alfa	58.8±28.2 ^a	43.3±20.4 ^b	57.0±34.6 ^{a,b}	0.032

Evreler arasında biyomarker değerleri açısından anlamlı farklılık görülmemiştir (p>0.05)(Tablo 27).

Tablo 27. Hasta Grubunda Bulunanların Evreye ve Zamana Göre Biyomarkerlerinin Karşılaştırılması

	Evre 1 Ort±SS	Evre 2 Ort±SS	Evre 3 Ort±SS	P
İL-10 0. saat	30.4±23.3	46.6±18.0	59.2±34.7	0.172*
İL-10 24. saat	38.2±19.8	51.7±56.1	67.8±45.1	0.151**
İL-10 24-48. saat	52.9±34.2	44.2±29.5	68.0±23.4	0.312**
TNF-alfa 0. saat	50.5±21.5	55.1±33.3	40.0±19.1	0.535*
TNF-alfa 24. saat	28.9±6.6	44.1±18.1	42.7±21.1	0.260**
TNF-alfa 48-72. saat	56.9±29.4	73.1±34.9	74.5±50.8	0.706*
HİF-1 alfa 0. saat	4.4±1.2	4.8±.8	5.1±.6	0.390**
HİF-1 alfa 24. saat	4.8±.5	5.2±.9	4.6±.6	0.172*
HİF-1 alfa 48-72. saat	5.1±.6	5.2±.6	4.4±.8	0.055*
İL-6 0. saat	17.3±2.5	21.6±7.5	19.6±3.7	0.524**
İL-6 24. saat	18.5±6.5	23.0±10.2	23.7±12.0	0.705**
İL-6 48-72. saat	19.7±4.3	37.7±61.7	16.3±4.6	0.307**
İL-1-alfa 0. saat	71.8±36.6	50.3±26.5	62.7±23.8	0.487**
İL-1-alfa 24. saat	39.8±9.5	36.6±20.7	56.4±21.2	0.117*
İL-1-alfa 48-72. saat	43.3±27.0	41.1±21.4	104.8±126.2	0.247**

Evre 1 olan hastalarda ölçüm saatlerinde anlamlı sonuçlanmamıştır (Tablo28).

Tablo 28.Hasta Grubunda Evre 1 Olanların Zamana Göre Biyomarkerlarının Karşılaştırılması

	0.saat Ort±SS	24.saat Ort±SS	48-72.saat Ort±SS	p
İL-10	30.4±23.3	38.2±19.8	52.9±34.2	0.819
TNF-alfa	50.5±21.5	28.9±6.6	56.9±29.4	0.165
HİF-1-alfa	4.4±1.2	4.8±.5	5.1±.6	0.247
İL-6	17.3±2.5	18.5±6.5	19.7±4.3	0.247
İL-1-alfa	71.8±36.6	39.8±9.5	43.3±27.0	0.091

Evre 2 olan hastalarda ölçüm saatlerinde anlamlı sonuçlanmamıştır (Tablo29).

Tablo 29.Hasta Grubunda Evre 2 Olanların Zamana Göre Biyomarkerlerinin Karşılaştırılması

	0.saat Ort±SS	24.saat Ort±SS	48-72.saat Ort±SS	p
İL-10	46.6±18.0	51.7±56.1	44.2±29.5	0.695
TNF-alfa	55.1±33.3	44.1±18.1	73.1±34.9	0.234
HİF-1-alfa	4.8±.8	5.2±.9	5.2±.6	0.148
İL-6	21.6±7.5	23.0±10.2	37.7±61.7	0.336
İL-1-alfa	50.3±26.5	36.6±20.7	41.1±21.4	0.178

Evre 3 hasta gruplarında TNF-alfa değerleri anlamlı ölçülmüştür (p=0.048)(Tablo 30).

Tablo 30. Hasta Grubunda Evre 3 Olanların Zamana Göre Biyomarkerlerinin Karşılaştırılması

	0.saat Ort±SS	24.saat Ort±SS	48-72.saat Ort±SS	p
İL-10	59.2±34.7	67.8±45.1	68.0±23.4	0.368
TNF-alfa	40.0±19.1 ^a	42.7±21.1 ^{a,b}	74.5±50.8 ^b	0.048
HİF-1-alfa	5.1±.6	4.6±.6	4.4±.8	0.651
İL-6	19.6±3.7	23.7±12.0	16.3±4.6	0.368
İL-1-alfa	62.7±23.8	56.4±21.2	104.8±126.2	0.651

Hasta grubunda bulunanların mir210 (p=0.006), mir-374-a (p<0.001) ve mir21 (p=0.008) hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı sonuçlanmıştır (Tablo 31).

Tablo 31. Hasta Grubunun 0. Saat ile Kontrol Grubunun miRNA Ekspresyonu ve Karşılaştırılması

	Hasta	Kontrol	p
	Ort±SS	Ort±SS	
mir210	3.9±3.1	1.3±1.0	0.006*
mir374-a	.1±.2	1.8±1.5	<0.001*
mir21	1.4±1.2	1.6±.5	0.008*

Gruplar arasında mir210 açısından anlamlı farklılık görülmüştür (p=0.04) ve bu farklılık kontrol grubu ile evre 1 ve evre 3 arasında görülmüş olup kontrol grubunun değeri daha düşüktür. Gruplar arasında mir374-a açısından anlamlı farklılık görülmüştür (p<0.001) ve bu farklılık kontrol grubu ile diğer gruplar arasında görülmüş olup kontrol grubunun değeri daha yüksektir (Tablo 32).

Tablo 32. Tüm Grupların 0. Saat ile Kontrol Grubunun MiRNA Ekspresyonu ve Karşılaştırılması

	Evre 1	Evre 2	Evre 3	Kontrol	p
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	
mir210	4.4±2.8 ^a	4.3±3.3 ^{a,b}	4.2±3.1 ^a	1.3±1.0 ^b	0.04*
mir374-a	.2±.4 ^a	.1±.1 ^a	.1±.1 ^a	1.8±1.5 ^b	<0.001*
mir21	1.2±.8	1.4±1.1	1.7±1.7	.6±.5	0.067*

Ölçüm zamanları arasında mir210 açısından anlamlı farklılık görülmüştür (p=0.004). Bu farklılık 0. Saat ile diğer iki zaman arasındaki farktan kaynaklanmıştır ve 0. Saat ölçümü en yüksek görülmüştür. Ölçüm zamanları arasında mir374-a açısından anlamlı farklılık görülmüştür (p<0.001). Bu farklılık 0. Saat ile diğer iki zaman arasındaki farktan kaynaklanmıştır ve 0. Saat ölçümü en düşük görülmüştür. Ölçüm zamanları arasında mir21 açısından anlamlı farklılık görülmüştür (p<0.001). Bu farklılık tüm zamanlardaki ölçümler arasındaki farktan kaynaklanmıştır ve zamanla değeri artmıştır görülmüştür (Tablo 23).

Tablo 33. MiRNA 'ların Ölçüm Saatlerine Göre Karşılaştırılması

	0. saat	24. saat	48-72. saat	p*
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	
mir210	3.9±3.1 ^a	4.1±.5 ^b	4.3±.6 ^b	0.004
mir374-a	0.1±.2 ^a	0.7±.8 ^b	1.5±.9 ^b	<0.001
mir21	1.4±1.2 ^a	10.8±6.7 ^b	48.1±16.1 ^c	<0.001

Evreler arasında miRNA Ekspresyonu değerleri açısından anlamlı farklılık görülmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 34).

Tablo 34. Hasta Grubunda Bulunanların Evreye Göre MiRNA Ekspresyonu Değerlerinin Karşılaştırılması

	Evre 1	Evre 2	Evre 3	p
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	
mir210 0. saat	4.4±2.8	3.5±3.3	4.2±3.1	0.885*
mir 210 24. saat	1.0±.6	1.9±.5	1.2±.6	0.448**
mir210 48-72. saat	1.0±.5	1.0±.7	1.1±.7	0.954**
mir374-a 0. saat	0.2±.4	0.1±.1	0.1±.1	0.911*
mir374-a 24. saat	0.8±1.0	0.7±.8	0.8±.6	0.956*
mir374-a 48-72. saat	1.6±.6	1.2±.9	1.8±1.1	0.387**
mir21 0. saat	1.2±.8	1.4±1.1	1.7±1.7	0.985*
mir21 24. saat	9.6±4.8	11.7±8.1	10.4±6.2	0.913*
mir21 24-72. saat	50.7±5.5	40.8±19.9	57.7±7.6	0.145*

Evre 1 olan hastalar arasında ölçüm zamanları arasında mir21 açısından anlamlı farklılık görülmüştür ($p=0.007$). Bu farklılık 0. Saat ile 48-72. Saat arasındaki farktan kaynaklanmıştır ve 48-72. Saatteki değeri daha yüksektir (Tablo 35).

Tablo 35. Hasta Grubunda Evre 1 Olanların Zaman Göre MiRNA Ekspresyonu ve Karşılaştırılması

	0. saat	24. saat	48-72. saat	p*
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	
mir210	4.4±2.8	1.0±.6	1.0±.5	0.247
mir374-a	0.2±.4	0.8±1.0	1.6±.6	0.074
mir21	1.2±.8 ^a	9.6±4.8 ^{a,b}	50.7±5.5 ^b	0.007

Evre 2 olan hastalarda ölçüm zamanları arasında mir374-a ($p=0.001$) ve mir21($p<0.001$) açısından anlamlı farklılık görülmüştür. Bu farklılık 0. Saat ile diğer iki zaman arasındaki farktan kaynaklanmıştır ve 0. Saat ölçümü en düşük görülmüştür (Tablo 36).

Tablo 36. Hasta Grubunda Evre 2 Olanların Zaman Göre MiRNA Ekspresyonu ve Karşılaştırılması

	0. saat	24. saat	48-72. saat	p*
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	
mir210	3.5±3.3	1.9±.5	1.0±.7	0.178
mir374-a	0.1±.1 ^a	0.7±.8 ^b	1.2±.9 ^b	0.001
mir21	1.4±1.1 ^a	11.7±8.1 ^b	40.8±19.9 ^b	<0.001

Ölçüm zamanları arasında mir210 (p=0.048), mir374-a (p=0.002), mir21 (p=0.001) ve TNF-alfa (p=0.048) açısından anlamlı farklılık görülmüştür. Bu farklılık 0. Saat ile 48-72. Saat arasındaki farktan kaynaklanmıştır ve mir210 için 0. Saat en yüksek diğer değerler için ise en düşük görülmüştür (Tablo37).

Tablo 37. Hasta Grubunda Evre 3 Olanların Zaman Göre MiRNA Ekspresyonu ve Karşılaştırılması

	0. saat	24. saat	48-72. saat	p*
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	
mir210	4.2±3.1 ^a	1.2±.6 ^{a,b}	1.1±.7 ^b	0.048
mir374-a	0.1±.1 ^a	0.8±.6 ^{a,b}	1.8±1.1 ^b	0.002
mir21	1.7±1.7 ^a	10.4±6.2 ^{a,b}	57.7±7.6 ^b	0.001

Hasta grubunda bulunanlarda 0. Saat değerleri arasındaki korelasyona bakıldığında mir210 ile mir21 arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon görülmüştür. HİF-1 alfa ile İL-1-alfa arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon görülmüştür (Tablo 38).

Tablo 38. Hasta Grubunda Bulunanların 0. Saat MiRNA Ekspresyonu ve Korelasyonu

		mir210	mir374-a	mir21	İL-10	TNF-alfa	HİF-1 a	İL-6
mir374-a	r	.237						
	p	.277						
mir21	r	.836	.377					
	p	.000	.076					
İL-10	r	-.120	.282	-.030				
	p	.587	.193	.893				
TNF-alfa	r	.198	.090	.015	.108			
	p	.366	.681	.946	.625			
HİF-1 alfa	r	.129	-.194	.191	.230	.030		
	p	.556	.376	.383	.291	.893		
İL-6	r	.105	-.078	-.121	.271	.262	.063	
	p	.634	.723	.584	.211	.227	.774	
İL-1-alfa	r	.165	.004	.100	.096	.155	.505	-.069
	p	.452	.984	.650	.664	.480	.014	.754

Hasta grubunda bulunanlarda 24. Saat değerleri arasındaki korelasyona bakıldığında mir210 ile İL-10 arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon görülmüştür. İL-10 ile İL-1 alfa arasında pozitif yönde anlamlı bir ilişki belirlenmiştir. HİF-1alfa ile İL-6 arasında negatif yönde anlamlı bir korelasyon görülmüştür (Tablo 39).

Tablo 39. Hasta Grubunda Bulunanların 24. Saat MiRNA Ekspresyonu ve Korelasyonu

		mir210	mir374-a	mir21	İL-10	TNF-alfa	HİF-1 a	İL-6
mir374-a	r	.366						
	p	.086						
mir21	r	-.090	.000					
	p	.683	1.000					
İL-10	r	.461	-.062	-.223				
	p	.027	.778	.306				
TNF-alfa	r	.199	-.102	-.231	.281			
	p	.364	.644	.288	.195			
HİF-1 alfa	r	.109	-.042	.088	-.262	-.056		
	p	.622	.851	.690	.227	.799		
İL-6	r	.042	.137	-.091	.021	.034	-.504	
	p	.851	.533	.678	.923	.879	.014	
İL-1-alfa	r	.086	.063	-.263	.483	.077	-.204	-.009
	p	.697	.774	.226	.020	.727	.352	.968

Hasta grubunda bulunanlarda 48-72. Saat değerleri arasındaki korelasyona bakıldığında mir210 ile İL-6 arasında negatif yönde anlamlı bir korelasyon görülmüştür. Mir21 ile İL-10 arasında pozitif yönde anlamlı bir ilişki belirlenmiştir. İL-10 ile İL-1 alfa arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon görülmüştür (Tablo 40).

Tablo 40. Hasta Grubunda Bulunanların 48-72. Saat MiRNA Ekspresyonu ve Biyomarkerlerinin Korelasyonu

		mir210	mir374-a	mir21	İL-10	TNF-alfa	HİF-1 a	İL-6
mir374-a	r	.238						
	p	.274						
mir21-	r	.023	.260					
	p	.918	.231					
İL-10	r	.006	.289	.433				
	p	.979	.182	.039				
TNF-alfa	r	.244	.069	-.074	.261			
	p	.262	.754	.737	.229			
HİF-1 a	r	.028	-.263	-.199	-.163	.152		
	p	.900	.226	.364	.457	.488		
İL-6	r	-.474	-.264	-.364	.262	-.166	.007	
	p	.022	.224	.088	.227	.449	.975	
İL-1-alfa	r	.070	.260	.287	.642	.233	-.042	.173
	p	.750	.231	.185	.001	.284	.847	.430

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada HİE'nin varlığını , şiddetini, başlama zamanını, prognozunu gösterebilen ve klinik kullanımda olan bir biyokimyasal test günümüz için bulunmamasından ve mevcut literatürde miRNA'ların beyin gelişimi ve HİE patogeneğinde merkezi bir rol oynadığını gösteren araştırmalardan dolayı HİE'li yeni doğanlarda miRNA ekspresyon profilini ve bu miRNA'ların biyomarker olarak kullanılma potansiyelini değerlendirmeyi amaçladık.

Yenidoğan ensefalopatisi(NE) , gebelik yaşı 35 hafta ve üzerindeki bebeklerde görülen yaşamın ilk günlerinde herhangi bir nedenle merkezi sinir sisteminde bozulmaya neden olan bir durum olup NE'nin geri döndürülebilir ve geçici olması veya bir beyin hasarının, merkezi sinir sistemine yaşam boyu etkileri olabilecek çok önemli bir halk sağlığı sorunudur (125).NE'nin en yaygın nedeni, perinatal asfiksi veya iskemik beyin hasarından sonra ortaya çıkan hipoksik iskemik ensefalopatidir (126).

HİE prevalansı, iyi ve orta gelişmişlik düzeyine sahip ülkelerde 1000 doğumda 1.3-1.9'dur; düşük gelişmişlik düzeyine sahip ülkelerde 1000 doğumda 8.5'tir (126).

Özel ve arkadaşlarının (127) yaptıkları retrospektif çalışmada ,yenidoğanların % 52 'sinin erkek ve % 48 'inin kız olduğunu ve istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0.05$).Yenidoğanların ortalama doğum haftası 38.6 ± 2.1 , doğum ağırlığı $3464,5\pm 528,4$ idi ve istatistiksel olarak anlamlı görülmedi ($p>0.05$). Ayrıca yenidoğanların doğum yöntemlerine bakıldığında bebeklerin 54'ünün (% 52,9) vajinal yol, 48'inin (% 47,1) primer sezaryen ile doğduğunu saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı görülmedi ($p>0.05$).

Çalışmaya 23 hasta ve 23 kontrol olmak üzere toplam 46 katılımcı dahil edilmiştir. Hasta grubunda bulunanların %39.1'i kız ve %60.9'u erkek olup kontrol grubunda bulunanların %56.5'i kız ve %43.5'si erkektir. Gruplar arasında cinsiyet açısından anlamlı farklılık görülmemiştir ($p=0,238$). Hasta grubunda bulunanların ağırlık ortalaması 3067.7 ± 375.5 olarak kontrol grubunda bulunanların ağırlık ortalaması ise 3182.6 ± 235.3 olarak bulunmuş olup gruplar arasında ağırlık açısından anlamlı farklılık görülmemiştir ($p=0.220$). Hasta grubunda bulunanların doğum haftası ortalaması 38.1 ± 1.5 olarak kontrol grubunda bulunanların doğum

haftası ortalaması ise 38.2 ± 1.6 olarak bulunmuş olup gruplar arasında doğum haftası açısından anlamlı farklılık görülmemiştir ($p=0.669$). Hasta grubunda bulunanların %82.6'sı, kontrol grubunda bulunanların ise %60.9'u normal doğum iken gruplar arasında doğum şekli açısından anlamlı farklılık görülmemiştir ($p=0.102$). Bu veriler eşliğinde literatür ile benzer sonuçlar görülmüştür.

Martinello ve arkadaşları(128) tarafından yenidoğan ensefalopatisinin yönetiminin ve tedavi modellerinin yeniden araştırıldığı ve incelendiği çalışma da , ağırlık ve gestasyonel yaşın HİE riski üzerinde önemli bir etkisi olmadığı gösterilmişti. Çalışmamızda ele alınan 46 yenidoğanın demografik ve klinik özellikleri, HİE hastaları ve kontrol grubu arasında cinsiyet, ağırlık ve doğum haftası açısından anlamlı farklılıklar bulunmamıştır ($p>0.05$).

Kurinczuk ve arkadaşları(18) neonatal ensefalopati ve hipoksik iskemik ensefalopati epidemiyolojisini incelemiş , ilk gebeliklerde HİE riskinin daha önce doğum yapmış hasta gruplarına göre daha yüksek olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda da ilk gebelik durumunun hasta grubuna ve kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek olduğu görülmektedir ($p=0.036$) . Bu bulgu, özellikle ilk gebeliklerde HİE riskinin daha yüksek olabileceğine işaret etmektedir.

Eken ve arkadaşları(129) Sarnat kriterleri , Doppler USG ve Kranial USG kullanılarak 34 HİE tanılı bebekte uzamış doğum eyleminin ve mekonyum aspirasyonunun, oksijen ve kan akışının azalması nedeniyle bebekte beyin hasarına yol açabileceğini belirtmiştir. Çalışmamızdaki hastaların %73.9'unda uzamış doğum eylemi, %21.7'sinde mekonyum bulaşı ve %4.3'ünde plasenta dekolmanı olduğu görülmüştür. Bu bulgular, literatürdeki çalışma verileri ile uyumlu olup doğum sürecinde meydana gelen komplikasyonların HİE'nin gelişimine katkıda bulunan veya ilişkili faktörler olduğunu desteklemektedir.

Martinez ve arkadaşları (19) hipoksik iskemik ensefalopatinin antepartum ve intrapartum etkenlerini araştırdıkları, 405 hastayı retrospektif olarak inceledikleri çalışmada, uzamış doğum eyleminin hipoksik yenidoğanlar üzerindeki etkisini ve evreler arasındaki ilişkisini ele almış ve anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir . Çalışmamızda incelediğimiz doğum öyküsünün evrelere etkisi olup olmadığını incelediğimiz de Evre 1'de bulunan yenidoğanların %80'inde, Evre 2'de olanların %63.6'sında ve Evre 3'te olanların %85.7'sinde uzamış doğum eylemi

tespit edilmiştir. Ancak, bu evreler arasında doğum öyküsü açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p=0.289$).

Monen ve arkadaşlarının (8) yaptığı çalışmada HİE evrelerinin mekonyum bulaşı ile ilişkisi tespit edilememiştir . Yine Poggi ve arkadaşları (130) da yaptığı çalışmada mekonyum bulaşının neonatal ensefalopatinin evreleri arasında ilişki kurulamamıştır. Çalışmamızda mekonyum bulaşının evreler ile ilişkisi incelendiğinde, Evre 1'de %20, Evre 2'de %36.4 ve Evre 3'te %0 olduğu görülmüştür. Ancak çalışmamızın kapsamında yapılan istatistiksel analizlerle mekonyum bulaşı ve evreler arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir ($p=0.289$).

Wang ve arkadaşları (131) tarafından HİE tanılı yenidoğan üzerinde miRNA'ların HİE üzerindeki düzenleyici mekanizmaları ve HİE şiddeti ve prognozuyla ilişkisi inceleyen çalışmasında, HİE'nin evrelerine göre dağılım açısından Evre 2 en sık görülen evre olmuştur. Wang ve arkadaşları çalışmalarında, HİE'li hastaların %37.5'i Evre 1, %45.8'i Evre 2 ve %16.7'si Evre 3 olarak rapor edilmiştir . Çalışmamızda ki hastaların evre dağılımına baktığımızda ise, literatüre benzer şekilde %21.7'sinin ($n=5$) Evre 1, %47.8'inin ($n=11$) Evre 2 ve %30.4'ünün ($n=7$) Evre 3 olduğu görülmektedir. Bizim çalışmamızda Evre 1, 2 ve 3 hastaların oranları sırasıyla %21.7, %47.8 ve %30.4'tür .

Mastrangelo ve arkadaşları (132) neonatal ensefalopatili yenidoğanlarda nöbetlerin tanımlanması için 28 yenidoğandan alınan konvansiyonel cEEG/aEEG uzun süreli kaydı gözden geçirdi. Amplitüde EEG ve konvansiyonel EEG' yi karşılaştırmalı olarak değerlendirdi. Hastaların % 22.6 'sında status epilepticus(SE) ,%38.6 'sında tekrarlayan nöbetler ve % 38.8 'inde uyku uyanıklık siklusu görüldü. SE görülen yenidoğanların tamamında aEEG sonuçlarını patolojik saptadılar ve HİE'nin AEEG/EEG bulgularında anormalliklere ve klinik nöbetlere yol açabileceği bildirdiler. Çalışmamızda AEEG/EEG sonuçlarına göre hastaların %73.9'unda uyku-uyanıklık siklusu ve %26.1'inde orta diskontinyu görülmüştür. Çalışmamızda SE tanımlanmamış olmasına rağmen nöbet geçiren yenidoğan ortalaması literatür ile benzer sonuçlanmıştır.

Tanı için kullanılan görüntüleme yöntemlerinden Beyin MR ve transfontanel USG, HİE'nin derecesini ve etkilenen beyin bölgelerini belirlemek için kullanılan önemli görüntüleme yöntemleridir (133). Rutherford ve arkadaşları (134) hipoksik-iskemik ensefalopatili yenidoğanlarda soğutma tedavisi sonrasında beyin dokusunda ki hasarı değerlendirdi ve HİE'nin şiddetine bağlı olarak beyin MR ve USG bulgularında patolojik değişikliklerin görülebileceğini ve evre ilerledikçe beyin MR görüntülerinin patolojik sonuçlar ile korele ilişkisi olduğunu bildirdi(134,135).

Srinivasakuma ve arkadaşları(136) orta ve ağır HİE tanılı yenidoğanı prospektif olarak değerlendirdi. Bu hastaların MR görüntüleri kantitatif olarak puanlandı. Ağır HİE' li hastaların MRG ile değerlendirilmesi sonucunda, hasarın ve orta derece HİE'lere göre patolojik alanların daha fazla olduğu ve bebeklerde nöbet yoğunluğunun arttığını gözlemlediler($p<0.01$). Ayrıca ağır HİE ' li olgularda elektrografik nöbet yükünü orta HİE ' li olgulara göre daha anlamlı olduğu görüldü ($p<0.004$).

Çalışmamızda beyin MR sonuçlarına göre hastaların %60.9'u normal iken %39.1'inde patolojik bulgular tespit edilmiştir. Transfontanel USG sonuçları ise %95.7'sinde normal ve %4.3'ünde grade 1 periventriküler kanama olarak belirlenmiştir. Çalışmamızdaki bu sonuçlar, HİE'nin beyin dokusunda yapısal değişikliklere ve hasara yol açabileceğini göstermektedir ve bu hasarların değerlendirilmesinde ve tespitinde beyin MR ' ın önemli bir yeri olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca Beyin MR sonuçlarına göre, Evre 1'de olan hastaların %20'sinin, Evre 2'de olanların %18.2'sinin ve Evre 3'te olanların %85.7'sinin beyin MR sonucu patolojiktir. Evreler arasında beyin MR sonucu açısından anlamlı farklılık görülmüştür ($p=0.014$).

Beyin MR sonuçlarının evreler arasında anlamlı farklılık göstermesi, hastalığın ilerlemesi ile beyin hasarı ve patolojik bulguların artabileceğine işaret etmektedir. Çalışmamızda evrenin ilerledikçe patolojik MR görüntü oranında ve nöbet sıklığında litaretür ile benzer şekilde artış görüldüğü tespit edilmiştir.

Döven ve arkadaşlarının(137) yaptığı 62 yenidoğan bebeğin araştırıldığı çalışmada bebeklerin % 87' sinin oksijen desteğine ihtiyaç duyduğu ve bu hastaların % 79'unun mekanik ventilatör desteğine ihtiyaç duyduğunu belirlemiştir.

Akçura ve arkadaşları(138) 2014 -2018 yılları arasında yaptıkları araştırmada ventilasyon desteği ihtiyacının hastaların % 82.5 oranında görüldüğünü ve evre ilerledikçe, solunum ihtiyacının kompleksleştiğini, ventilatör desteği alan hasta sayısının daha fazla olduğunu, ventilatörde kalış süresinin uzadığını ve yaşayan hastalarda hastanede yatış süresinin daha uzun görülmüştür. Çalışmamızda daha önceden klinik ve radyolojik özellikleri evrelere göre kıyaslama yaptığımız elde edilen verilere göre, farklı evrelerdeki hastalar arasında bazı önemli farklılıklar gözlemlenmiştir. Evre 1'de olan hastaların %40'ı spontan, %60'ı nazal CBAP solunumu yaparken; Evre 2'de olan hastaların %18.2'si spontan, %81.8'i nazal CBAP ve Evre 3'te olan hastaların tamamı entübedir. Evreler arasında mekanik ventilasyon (MV) ihtiyacı açısından anlamlı farklılık görülmüştür ($p<0.001$).Literatür ile benzer şekilde HİE 'de oksijen ihtiyacının olduğu ve HİE için tedavinin temel parçası olduğu gösterilmiştir.Ayrıca MV ihtiyacı açısından, artan evrelerle birlikte mekanik ventilasyon ihtiyacının arttığı ve evreler arasında anlamlı farklılık gösterdiği görülmüştür.

Jakops ve arkadaşları (139) 1505 HİE tanılı bebeği inceledikleri çalışmada, terapötik hipoterminin ,hipoksik iskemik ensefalopatisi olan term ve preterm yenidoğanlarda sekel bırakmadan mortaliteyi azalttığını ve soğutma tedavisinin hayatta kalma ve nöro gelişim üzerindeki faydalarının, yan etkilerden daha ağır bastığını ve mortalite veya majör nöro gelişimsel problemlerin birleşik sonucunda istatistiksel olarak anlamlı ve klinik olarak önemli bir düşüşle sonuçlandığını tespit ettiler ($p<0.01$). Garfinkle ve arkadaşları(140) hipotermi tedavisi planlanan 30 HİE 'li yenidoğanı terapotik hipotermi tedavisi öncesi klinik olarak gözlemladiler. Otuz bebek terapötik hipotermi aldı ve tedavi sonrası takip edildi. Bu yenidoğanlarda klinik nöbetler tedavi sonrasında daha az sıklıkla görüldü. Hipotermi alan HİE'li yenidoğanlarda gözlenen nörolojik morbiditesini büyük ölçüde azaldığı görüldü.Çalışmamızda soğutma yöntemi açısından, Evre 1'de olan hastaların tamamı pasif soğutma ile tedavi edilirken, Evre 2 ve Evre 3'te olan hastaların tamamı aktif soğutma yöntemi ile tedavi edilmiştir. Bu durum, evreler arasında soğutma yöntemi açısından anlamlı farklılık olduğunu göstermektedir ($p<0.001$). Aktif ve pasif soğutma yöntemleri arasındaki anlamlı fark, hastaların terapötik soğutma ihtiyaçlarının evrelere göre değiştiğini göstermektedir.

Atıcı ve arkadaşları (141) perinatal asfiksi ve hipoksik iskemik ensefalopati evre 2-3 tanılı yenidoğan bebekleri inceledi ve bu bebekleri 2 gruba ayırdı. Bu yenidoğan bebekler ilk altı saatteki amplitüt entegre elektroensefalografi (aEEG) bulgularına göre iki gruba ayrıldı. Birinci grupta aEEG bulguları anormal olan veya klinik nöbet gözlenen ve hipotermi tedavisi uygulananlar, ikinci grupta ise aEEG bulguları normal olan ve hipotermi tedavisi uygulanmayanlar olarak ikiye ayrıldı. Sonrasında yaşayan bebeklerde tüm vücut soğutma yöntemi ile hipotermi uyguladıkları yenidoğanlarda bu tedavinin nöronal hasarı azalttığını görüldü. Shah ve arkadaşları(142) tarafından, geçmiş literatür taranarak, hipotermi tedavisinin uygulandığı çalışmalar incelenmiş ve meta analiz verileri yayınlanmıştır Bu çalışmalarda toplam 1440 olgu randomize olarak değerlendirilmiştir. Ortalama 56 olgu, hafif HİE olarak rapor edilmiştir. İncelenen yedi çalışmada sistemik hipotermi ,altı çalışmada ise selektif baş soğutması uygulanmıştır .Tüm çalışmalarda, hipotermi doğumdan itibaren ilk altı saat içinde uygulanmıştır. Hasta grupları incelendiği zaman hipotermi uygulanan olgularda mortalite riski ve orta-ciddi nöro gelişimsel kayıp gelişme riski, serebral palsy, ciddi görme kaybı, kognitif fonksiyonlar da gecikme, psikomotor gerilik riskinde belirgin azalma saptanmıştır . Ayrıca hastaların %78.3'ünde aktif ve %21.7'sinde pasif soğutma uygulanmıştır.

Awal ve arkadaşları (143) Ocak 1960'tan Nisan 2014'e kadar yaptığı literatür taramasında antikonvülzan ilaç kullanımının HİE 'nin evreleriyle korele olduğunu gösterdi ve daha ileri evrelerdeki hastaların antikonvülzan ilaç kullanımının daha yaygın olduğu bildirdi.Çalışmamızda hastaların %87'si antikonvülzan tedavi almıştır. Bu, klinik nöbetlerin HİE hastalarında yaygın olduğunu ve antikonvülzan tedavinin bu hastalarda önemli olduğunu göstermektedir. Yine çalışmamızda antikonvülzan ilaç kullanımına bakıldığında, Evre 1'de olan hastaların %40'ı, Evre 2 ve Evre 3'te olan hastaların ise tamamı antikonvülzan ilaç kullanmaktadır. Evreler arasında antikonvülzan ilaç kullanımı açısından anlamlı farklılık görülmüştür (p=0.006). Antikonvülzan ilaç kullanımı açısından da daha ileri evrelerdeki hastaların daha yüksek oranda antikonvülzan ilaç kullandığı görülmektedir.

CK, hücre hasarı ve enerji üretimi süreçlerinde rol oynayan bir enzimdir ve HİE hastalarında sıklıkla yükselir . Wan ve arkadaşları (144) 24 saatten kısa süren erken membran rüptürü nedeniyle doğum yapan ve kord serumundan örnek aldıkları 40 yenidoğanda, doğumdan 1-2 dakika sonra göbek kordonu kesildikten sonra göbek kordonu kanından CK örnekleri aldılar ve 15 dakika içinde ölçüme gönderdiler. Sonuçlarda CK düzeyleri kontrol grubuna göre bariz yüksek ölçüldü ve HİE hastalarında CK düzeylerinin hastalığın şiddeti ile ilişkili olduğu buldular. Ancak, bu çalışmada evreler arasında CK değerlerinin doğrudan karşılaştırılması yapılmadı. Ayrıca, Kitzenberg ve arkadaşları(145) tarafından yapılan bir çalışmada hipoksik kalan perinatal bebeklerde mitokondrial disfonksiyon ve apoptozise maruz kalma sonucunda CK düzeyinin arttığı bu nedenle de HİE hastalarında yüksek CK düzeylerinin artan hipoksi ile ilişkili olduğu , kötü nörogelişimsel sonuçlar ve mortalite ile ilişkili olduğu buldular .Ancak, bu çalışmada evreler arasında CK değerlerinin doğrudan karşılaştırılması yapılmadı. Çalışmamızda daha önceden değerlendirmesi yapılan CK değerinin evrelere göre karşılaştırılması yapıldığında elde edilen sonuçlara göre, tedavi öncesi CK değerlerinin, evreler arasında anlamlı bir sonuç göstermediği görülmüştür(p=0.504). Yine aynı şekilde 24. saat CK değerleri açısından da evreler arasında anlamlı olmayan bir farklılık eğilimi görülmüştür (p=0.092). Bu durum, CK'nın HİE hastalarının evrelerini belirlemede etkin bir rol oynamadığı ileri sürülebilir.

CK, hücre hasarı ve enerji metabolizması düşüklüğü sırasında serbestleşen bir enzim olup, özellikle beyin ve kas dokularında bulunmaktadır. Bu nedenle, CK seviyelerindeki artış, HİE hastalarında tedavi sürecinde nöromusküler stresin ve enerji metabolizmasındaki azalmanın bir göstergesi olarak değerlendirilebilir (146,147). Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre, hastaların tedavi öncesi CK değerleri 1656.4 ± 1093.8 iken, 24. saatte bu değerler 2755.5 ± 1925.3 'e yükselmiştir (p=0.003). Sonuç olarak bu anlamlı artış, hastaların tedavi sürecindeki nöromusküler stres ve enerji metabolizması düşüklüğü ile ilişkilendirilebilir ve tedavi sürecindeki başarıyı ölçmede potansiyel bir biyomarker olarak değerlendirilebilir.

Henrot ve arkadaşları (148)merkezi sinir sisteminde çeşitli travmalar sonrasında sitokinlerin çok önemli rolleri olduğunu gösterdiler ve inflamatuvar mediatörleri incelediler. Elde edilen sonuçlar sonrasında İL-1-alfa, TNF-alfa ve İL-6'nın en iyi karakterize edilmiş erken yanıt sitokinleri arasında yer aldığını gördüler. Beyindeki hasarın ilerlemesini sonucunda bu sitokinlerin biyolojik etkileri, nitrik oksit sentaz gibi nöronal hasar araçlarının sentezini uyarmayı, lökosit infiltrasyonunu ve adezyon moleküllerinin ekspresyonunu indüklemeyi, glial gen ekspresyonunu etkilemeyi ve oligodendrositlere zarar vermeyi indüklediği görüldü. Bu sitokinlerin prenatal intrauterin enfeksiyon sırasında beyaz cevher hasarına yol açabileceği ve serebral hipoksi ve iskeminin neden olduğu akut beyin hasarında ilerleyici nöronal hasara neden olabileceği görüldü. İL-6, TNF-alfa ve İL-1-alfa'nın inflamasyon ve nöronal hasarla ilişkisi olduğunu tespit ettiler. Aynı şekilde Morkos ve arkadaşları(149) 30 term yenidoğanda 18 aylık retrospektif çalışmada asfiksik term yenidoğanlarda ölçüm zamanları arasında mediatörlerin asfiksi ile ilişkisini inceledi ve hasar ile korele artış gösterdiğini buldular.

Massaro ve arkadaşlar (150) 50 HİE tanılı term neonatal'de TNF -alfa ve İL-6'nın beyin MR da ki hasar ile korele şekilde artış gösterdiğini istatistiksel olarak tespit ettiler (p=0.05).Ancak bu çalışmada inflamatuvar sitokin yanıtının gecikmiş olgularda etkinliklerinin sınırlı olduğu görüldü (p=0.4).

Ding ve arkadaşları (151)yaptıkları fare deneyinde fareler üç hafta boyunca her gün bir koşu bandında 30 dakika egzersize tabi tutuldu. Daha sonra, lümen içi bir filaman kullanılarak 2 saatlik bir orta serebral arter (MCA) oklüzyonu ile iskemi indüklendi. Beyindeki TNF-alfa düzeyleri ELİSA kullanılarak ölçüldü ve sonuç olarak TNF-alfa artışının nöronal hasar ile doğru orantılı olduğunu gözlemlediler. Ancak bu hayvan deneylerinde de evreler arasında değerlendirme yapılmamıştır.

Li ve arkadaşları (152) 80 rat üzerinde yaptığı çalışmada ratlardan rastgele seçim yaparak ratları karotis arter ligasyonu ile hipoksik hasarlı ve sağlıklı kontrol grubu olarak iki gruba ayırdı. Serum ve beyin dokularındaki TNF-alfa, İL-6, İL-10 konsantrasyonu, ELISA ile ölçüldü. Hipoksik-iskemik beyin hasarı olan ratlarda nöronal apoptoz oranı ile TNF- α ve İL-6 düzeylerinin hipoksiye kıyasla 6 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat sonra önemli ölçüde arttığını buldular (p < 0.05). Ayrıca nöronal apoptoz oranının TNF- α ve İL-6 seviyeleri ile pozitif, İL-10 negatif

korelasyon gösterdiğini tespit ettiler . Sonuç olarak hipoksik hasarlı neonatal ratlarda beyin hasarından 24-72 saat sonra en yüksek hasar seviyelerine ulaşıldığını , TNF- α ve İL-6 gibi inflamatuvar sitokinler, HİE kaynaklı nöronal apoptozu teşvik ederken, İL-10 ‘un bunu antagonize ettiğini tespit ettiler .

Gu ve arkadaşlarının (153) yaptığı hayvan deneyinde iskemik beyin hasarında mezenkimal kök hücrelerin İL-10 salınımını azaltarak TLR2 / NF κ B yolunun inhibisyonu yoluyla apoptozisi engellediği görüldü .

Çalışmamızda incelenen biyomarkerlar arasında TNF-alfa(p=0,019) ve İL-1-alfa (p=0.032) ‘nın HİE de ölçüm saatleri arasında anlamlı farklılıklar görülmektedir. TNF-alfa 48.saatten sonra klinik şiddeti ile korele şekilde yükseldiği (p=0.019) ve İL-1-alfa’nın da 48.saatten klinik şiddeti korele şekilde yükseldiği (p=0.032) istatistiksel olarak da anlamlı sonuçlanmıştır. Diğer bir sitokin olan İL-6’ nın ise hasta ve kontrol grupları arasında da anlamlı farklılık görülmüştür (p<0.001) ve bu farklılık kontrol grubu ile Evre 1,Evre 2 ve Evre 3 arasında görülmüş olup kontrol grubunun değeri daha düşüktür. İL-10 düzeyinin ise hastalık evreleri ile kontrol grubu kıyaslamasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmuştur(p=0.036) ve bu farklılık kontrol grubu ile Evre 2 ve Evre 3 arasında görülmüş olup kontrol grubunun değeri daha düşük ölçülmüştür .Sonuç olarak çalışmamızda inflamasyon ve nöronal hasarla ilişkili olduğu bilinen inflamatuvar sitokinler olan İL-6, İL-1-alfa ,İL-10 ve TNF –alfa ‘nın perinatal asfiksidede inflamasyonun önemli bir rol oynadığına dair literatürdeki diğer çalışmalarla uyumlu sonuçlar görülmüştür(147,148,149,150,151,152) .

Ancak sitokinleri tek başına ele alındığında ve HİE hastalarının evrelerine göre değerlendirdiğimizde İL-10 (0. saat, 24. saat ve 24-48. saat), TNF-alfa (0. saat, 24. saat ve 48-72. saat), HİF-1’alfa (0. saat, 24. saat ve 48-72. saat), İL-6 (0. saat, 24. saat ve 48-72. saat) ve İL-1’alfa (0. saat, 24. saat ve 48-72. saat) ‘nın farklı saatlerde ölçümünün evreleme için tek başına biyomarker olarak kullanılması ve tek başına hastalığın şiddetini değerlendirmemizde istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05).

Hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 (HIF-1), memeli gelişimi, fizyolojisi ve hastalık patogenezinde önemli roller oynayan, oksijenle düzenlenen bir

transkripsiyonel aktivatördür. HIF-1 alfa alt birimi, von Hippel-Lindau proteininin aracılık ettiği oksijene bağımlı ubiquitinasyona ve proteazomal bozulmaya neden olur. HIF-1 alfa'nın koaktivatörlerle etkileşimi, hipoksi ile indüklenir (153).

Chen ve arkadaşları (155) bir HIF-1 alfa inhibitörü olan 2-metoksiestradiol (2ME2)'ü, farklı dozlarda (1.5, 15 ve 150 mg/kg) 3 kez uygulanarak bir terapötik pencere döneminde test ettiler. Hipoksik iskemik yaralanmadan 48 saat sonra enfarktüs boyutu ve beyin ödeminin şiddetini tespit ettiler. Kan-beyin bariyeri (KBB) geçirgenliğini de IgG boyaması ile incelediler. HIF-1 alfa'nın ekspresyonu ve dağılımını ise immünohistokimya ve Western Blot analizi ile incelediler. Bu işlemler sonrasında 2ME2'un , enfarktüs hacmini azaltarak ve beyin ödemi hafifleterek doza bağımlı nöroproteksiyon sergilediğini gözlemlediler. Bu Çalışma, HIF-1 alfa'nın akut inhibisyonunun, kan beyin bariyeri bütünlüğünü koruyarak ve beyin ödemi azaltarak yenidoğan hipoksik-iskemik hasarında nöroprotektif olduğunu göstermektedir (154).

Min ve arkadaşları(156)bir HIF-1 alfa inhibitörü olan Vitexin (5, 7, 4-trihidroksiflavon-8-glukozit)'inin hipoksik hasara karşı koruma sağlayabileceğini tespit ettiler. Bu çalışmada yenidoğan sıçan yavruları, tek taraflı karotid arter ligasyonuna ve ardından 2.5 saat hipoksiye maruz bırakıldılar. Vitexin (30, 45 veya 60 mg/kg), hipoksik iskemiden 'den 5 dakika ve 3 saat sonra intraperitoneal olarak iki kere uygulandı. Hipoksik iskemiden 'den 5 dakika sonra Vitexin verilen sıçanlar 48 saat sonra değerlendirildi .Değerlendirme sonucunda azalmış enfarktüs hacmi görüldüğü gibi., nöronal hücre ölümünün azaldığını , kan beyin bariyeri bütünlüğünün korunduğunu ve beyin ödeminin gerilediği görüldü. HIF-1 alfa seviyeleri de immünohistokimya ve Western Blot kombinasyonu kullanılarak değerlendirildi. Sonuç olarak, vitexin ile erken HIF-1 α inhibisyonunun, neonatal hipoksik hasarından sonra gelişen ,beyinde hem akut dönemde nöroprotektif etki sağladığını gösterdiler .

Başka bir çalışmada da Huang ve arkadaşları (157) iskemi sonrasında iskeminin şiddeti arttıkça HIF -1-alfa' nın ekspresyonunun arttığını gözlemledi.

Çalışmamızda hasta ve kontrol grupları arasında HIF-1-alfa açısından da anlamlı farklılık görülmüştür ($p < 0.001$) ve bu farklılık kontrol grubu ile Evre 1,

Evre 2 ve Evre 3 arasında görülmüş olup kontrol grubunun değeri daha düşüktür ölçülmüştür.

Ayrıca HIF-1-alfa değerinin 48.saatten itibaren hastalığın evresi arttıkça evreyle korele şekilde artış göstermiş ve istatistiksel olarak anlamlı ölçülmüştür ($p=0.055$). Ayrıca HIF-1 alfa ile IL-1-alfa arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon görülmüştür.

Hipoksik dokularda miR-210 artışı glikolizi arttırdığını, laktat salınımını arttırdığını ve astrositlerde bir anti-inflamatuar transkripsiyonel ve translasyonel sürece neden olur (158).

Keiran ve arkadaşları (159) hipoksiye maruz kalan insan astrositlerini inceledikleri çalışmada , astrositik miRNA ekspresyon profillerini, kantitatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) kullanılarak incelendiler ve miR-210'un oldukça spesifik olduğunu gördüler. İnsan fetal astrositlerini in vitro stres koşulları altında kültürlediler ve miR-210'un değişen seviyelerinin astrosit fonksiyonunu nasıl etkilediğini daha iyi anlamak için çalışmalar yaptılar. Hipoksik ve inflammatuar streslerin miR-210 ekspresyonunu yukarı yönde regüle ettiği gözlemlenildi. MiR-210'un hem beyaz cevher hem de gri cevher de enfarktüs alanlarındaki astrositlerde artış gösterdiğini tespit ettiler. Beyaz cevherde ki enfarktüs alanlarındaki astrositlerde , iskemiye maruz kalmamış alanlardaki astrositlere göre kronik iskemi döneminde miR-210 ekspresyonunun 1.6 kat daha fazla olduğu görüldü($p < 0,05$).Yine aynı çalışmada miR-210 ekspresyon seviyelerin kantitatif ölçümünde RT-PCR ile ölçülen değerlerin inflammatuar alanlarda 2 delta Treshold Cycles ($\Delta\Delta CT$) 'den fazla ölçülmüş olup bu değer hipoksiye maruz kalmayan alanlarda 2 $\Delta\Delta CT$ ' nin altında ölçülmüştür ($p<0.05$).

MiR-210, hipoksi ile özdeşleşmiş en bilinen miRNA'lardan biridir ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) sinyal yolunun aracılık ettiği anjiyogeneze yardım ederler (159).

Zhang ve arkadaşlarının (160) yaptıkları çalışmada, farelerde geçici orta serebral arter oklüzyonu ile iskemik bir alan oluşturdular. Sonrasında iskemik lezyon alanlarını hedeflenerek kolesterol ile modifiye edilmiş miR-210 'u intravenöz (İV) olarak uyguladılar. Bunun sonucunda iskemik bölgelerde miR-210'da artışa görüldü. Bu artışa paralel olarak vasküler endotelial büyüme faktörü

(VEGF) salınımda da artış görüldü. Bu artış iskemiden sonra 1.saatte başlamış olup 4. Saatte yaklaşık 3 kat artarak en yüksek seviyeye ulaşmıştır ve miR-210'un ortalama yoğunluğu 108 pmol olarak hesaplanmıştır($p<0.0001$).Daha sonra kolesterol ile modifi edilmiş miR-210 'un İV uygulamasından sonra lezyon bölgesindeki artmış miR-210 ve VEGF seviyeleri, miR-210'un iskemik alanlarda etkili olduğunu gösterdiler($p<0.001$).

Ayrıca VEGF' deki önemli artış anjiyogenezinde hızlanmasını sağladı(161). Sonuç olarak, kolesterol ile modifiye edilmiş miR-210 ile tedaviden sonra artan miR210 ve VEGF hayvan sağ kalımında önemli bir artışa neden olduğunu tespit ettiler.

Zeng ve arkadaşlarının (163)yaptıkları çalışmada 25-30 g ağırlığındaki erkek fareleri gruplara ayırdılar. Hayvanlara 14 günlük lentiviral vektör aracılı miRNA-210(LV-miR-210) gen transferinden sonra 90 dakikalık orta serebral arter oklüzyonu ile iskemiye maruz bıraktılar. Sonrasında iskemi gelişen farelerde miRNA profilini araştırdılar. Fareler akut (<2 gün) ve subakut aşamalarda (2-30 gün) miR-210 düzeyleri ölçüldü. Yapılan çalışmalar sonucunda LV-miR-210 ile tedavi edilen farelerde MiR-210 'un ekspresyonu 28.günde en yüksek değere ulaştığını gördüler ($p<0.05$)(162).miR-210 ekspresyonunun iskemik beyinde anjiyogenezi ve nörojenezi desteklediği görüldü.(162,163,164).Çalışmamızda ölçülen miR-210 değeri hasta ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hasta gruplarında anlamlı bir şekilde yükseldiği görülmüştür ($p=0.006$).Ölçüm zamanları arasında da miR-210 tüm evrelerde en yüksek 0.saatte ölçülmüş olup diğer ölçüm saatlerinde kademeli bir şekilde azalmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmüştür ($p=0,004$).

Hasta evre grupları ve kontrol grubu arasında mir210 açısından da anlamlı farklılık görülmüştür ($p=0,04$) ve bu farklılık kontrol grubu ile Evre 1 ,Evre2 ve Evre 3 arasında görülmüş olup kontrol grubunun değeri daha düşüktür ölçülmüştür.Bu sonuçlar hipoksiye maruziyetin başlaması ile miR-210 ekspresyonun başladığını ve hipoksiye maruz kalmamış kontrol grubuna göre anlamlı bir yükseliş gösterdiği, literatür ile benzer şekilde hipoksik durumlarda artış gösterdiği görülmüştür.

Casey ve arkadaşlarının (165) yavru domuz modellerinde yaptığı çalışmada hipoksi sonrası göbek kordon kanından miRNA'nın in vitro ekspresyonu inceledi ve miR-374-a'nın hipoksiye yanıt olarak ekspresyonunun arttığını görüldü ve HİE patogenezinde temel bir rol oynadığını tespit edildi. Yapılan kantitatif ölçümlerde hipoksi sonrası 0. Saatte 0.5 $\Delta\Delta\text{CT}$ 'nin üzerinde, 1. saatte ise 1 $\Delta\Delta\text{CT}$ 'nin üzerinde ölçüm yapıldığı görüldü. Ancak hipoksinin ilerleyen saatlerinde bu değerler $<0.5 \Delta\Delta\text{CT}$ 'nin altında ölçüldüğü görüldü ($p<0.001$).

Xing ve arkadaşları (166) farelerde miR 374-a ve miR 374-a 'nın hedef geni Wnt5a 'yı incelemek için orta serebral arter oklüzyonu ile hipoksik bir modeli oluşturdu ve daha sonra serebral iskemik hasarda microRNA-374'-a'nın (miR-374) rolünü keşfetmek için farelere reperfüzyon uyguladılar. Reperfüzyondan sonra endojen miR-374 -a seviyesi azaldı ve beyin dokusunda miR-374-a hedef geni Wnt5a'nın ekspresyonu arttı. MiR-374-a'nın agomir tedavisi, nörodavranışsal eksiklikler, enfarktüs, beyin ödemi ve kan-beyin bariyeri bozulması dahil olmak üzere beyin hasarını hafifletti. Ayrıca, miR-374-a agomir ile önceden tedavi edilen farelerde apoptotik nöronlarda dikkate değer bir düşüş gösterdi. 4 saat reperfüzyondan sonra gerçek zamanlı PCR gerçekleştirildi ve miR-374-a ve Wnt5a'nın 6.saat, 24.saat ve 72.saatte ki değerleri ölçüldü. Reperfüzyondan sonra farelerin beyin dokularında endojen miR-374-a değerleri 6.saatten itibaren 72.saate doğru azalma gösterirken ($p<0.01$), Wnt5a'nın değerleri ise 6.saatten 72.saate doğru kademeli şekilde artış gösterdi ($p<0.001$).

Wang ve arkadaşlarının (85) 167 HİE tanılı ve 82 kontrol grubu kabul ettikleri yenidoğanlar ile yaptıkları çalışmada biyomarker seviyelerini belirlemek için kan örnekleri aldılar. Spesifik olarak, S100B proteini ve NSE seviyeleri, enzim bağlantılı ELISA kitlerine dayalı olarak saptanırken, miR-210 ve miR-374-a'nın kantitatif ölçümlerini ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT - PCR) ile yaptılar. Yaptıkları ölçümler sonucunda miR-210 ve miR-374 -a'nın hasta ve kontrol gruplarına göre sensitivitesinin %67 ,spesifitesinin % 86 olduğunu ve bu yenidoğanlarda kantitatif ölçümlerin $<0.9 \Delta\Delta\text{CT}$ olduğunu ve güven aralığının ise 0.8-0.9 $\Delta\Delta\text{CT}$ aralığında olduğunu buldular ($p<0.05$).

Bununla birlikte Looney ve arkadaşları (167) tarafından 2015 yılında 52 perinatal asfiksili yenidoğanda PCR ile gerçekleştirilen ve umbilikal kord

kanındaki miR-374-a düzeylerinin ölçüldüğü çalışmada asfistik yenidoğanların kontrol grubuna göre miR-374-a'nın ekspresyonunun artış gösterdiği tespit ettiler($p<0.003$).

Wang ve arkadaşları (9) miRNA'ların HİE üzerindeki düzenleyici mekanizmaları ve miR-210 ile miR-374-a'nın HİE şiddeti ve prognozu ile ilişkisi inceleyen çalışmasında HİE'nin patogenezi ve prognozunu belirlemekte önemli rolleri olduğunu ve bu miRNA'ların korele bir şekilde artış gösterdiğini belirtmişti.

Beyer ve arkadaşları (168) miRNA'ların ve sitokinlerin beyin dokusunda iskemi ve reperfüzyonda inceledikleri ölçümlerde iskemide bazı miRNA'ların ve sitokinlerin anlamlı şekilde ekspresyon düzeylerinin arttığını tespit ettiler. Çalışmamızda Özellikle mir210 ve mir374-a'nın ekspresyon düzeyleri, kontrol grubuna göre Evre 1, Evre 2 ve Evre 3 gruplarında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızda miR-374'ün hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında hastalarda artış gösterdiği görüldü ($p<0.001$). Hastalar arasında ölçüm yapılan saatler arasında miR-374 'ün 0.saatten 48-72. saate kadar düzenli şekilde arttığı görüldü ($p<0.001$).

Evre 1 hastalarında kantitatif değer ölçümleri 0.saatten 48-72.saate kadar düzenli bir artış göstermiştir($p=0.074$).Evre 2 hastalarında da kantitatif değer ölçümleri 0.saatten 48-72.saate kadar düzenli bir artış göstermiştir($p<0.001$).Evre 3 hastalarında da kantitatif değer ölçümleri 0.saatten 48-72.saate kadar düzenli bir artış göstermiştir($p=0.002$).

Yan ve arkadaşları (169) yaptıkları fare deneyinde orta serebral arter oklüzyonu ile yaptıkları fokal serabral iskeminin çok sayıda nöronal apoptozise yol açtığını ve serebral enfarktüs sonucu nöronal ölümlerin gerçekleştiğini gördüler. Bu iskemi sonucunda oluşan alanlardan RT-PCR ölçümleri miR-21 ölçümleri yapıldı ve miR-21 in hipoksiye maruz kalmamış alanlardan daha az ekspresse edildiği görüldü ve iskemide güçlü bir anti apoptoz faktör olduğu anlaşıldı. Aynı zamanda bu çalışmada hipoksik ve antihipoksik alanlardan , in vitro ve in vivo iskemiye takiben miR-21'in in vitro ve in vivo aşırı ekspresyonu , iskemiye takiben p53'ün ekspresyonunu büyük ölçüde inhibe ederken, miR-21'in in vitro ve in vivo inhibisyonu iskemiye takiben artan p53 ekspresyonu ile sonuçlandı. Ayrıca miR-

21'in in vivo aşırı ekspresyonunun, nöronal ölümü azalttığını, iskemik hasara karşı koruduğunu ve p53/Bcl-2/Bax sinyalini inhibe ederek nörolojik fonksiyonları iyileştirdiğini , miR-21'in inhibisyonunun ise p53/Bcl-2/Bax sinyalini aktive ettiğini ve in vivo olarak iskemik nöronal hasarı ağırlaştırdığını gördüler .Ölçülen kantitatif değerlerde miR-21'in normoksia şartlarında $>1 \Delta\Delta CT$,hipokside ise $<0.6 \Delta\Delta CT$ ölçülmüştür($p<0.05$).Aynı zamanda p53 ise normoksia şartlarında $<1 \Delta\Delta CT$,hipoksi de ise $> 2 \Delta\Delta CT$ ölçüldü ($p<0.01$).

İskemik inmeyi takiben tanımlanan miRNA'lar arasında, miRNA-21'in apoptozu inhibe eden ve hayatta kalmayı destekleyen güçlü bir faktör olduğu gösterildi (169,170).

Zhou ve arkadaşları (171) fare nöronlarında oksijen -glikoz yokluğu ile hipoksik bir model oluşturdular. Protein ve miRNA ekspresyon seviyelerini saptamak için Western Blot analizi ve kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu kullandılar. MiR-21, akut serebral enfarktüsü olan 68 hasta ve 21 sağlıklı farenin plazmasında analiz edildi. Bu çalışmada plazma miR-21 'ün serebral enfarktüslü farelerde kontrol grubuna kıyasla daha düşük olduğu belirlendi ($P<0.05$). Yapılan kantitatif ölçümlerde hipoksik farelerde $<1 \Delta\Delta CT$, kontrol grubunda ise $> 1 \Delta\Delta CT$ ölçüldü ($p<0.05$).

İskemiden hemen sonra, hücreler için gerekli olan enerjiye bağlı süreçler, oksijen ve glikozun tükenmesiyle engellenir ve bu nedenle bir dizi biyolojik neden olur ve sonuç olarak büyük miktarda hücre ölümü gerçekleşir (172).

Han ve arkadaşları (173) hücre ölümü promotörü olan MEG3'ün miR-21'i hedeflediğini ve dolayısıyla iskemik nöronal ölümden önemli bir rol oynayabileceğini belirtti. İskemi sonrasında , miR-21'in güçlü bir anti-apoptoz ve hayatta kalma yanlısı faktör olduğu ve apoptozla ilgili proteinlerin ekspresyonunu aşağı doğru düzenleyebileceği gösterilmiştir.

Benzer şekilde Kaucsár ve arkadaşları (174) da iskemi sonrasında reperfüzyonda özellikle, mir21'in zamanla artan değerlerinin nöronal hasar ve inflamasyonla korele ilişkisini gösterdi.Çalışmamızda da mir21 ekspresyon düzeyinin hasta ve kontrol grupları arasında hastalarda daha düşük ölçülmüştür ($p=0.008$).Ölçüm zamanları arasında 0.saatten 48-72.saate kadar anlamlı bir şekilde yükseliş gerçekleşmiş ($p<0.001$) olup bunun tedavi ile iskemik hasarın

azalmasından dolayı olduğu düşünülmüştür. Evre 1 hastalarında ($p=0.007$), Evre 2 hastalarında ($p<0.001$) ve Evre 3 hastalarında ($p<0.001$) olarak ölçülmüş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Literatür ile benzer şekilde, miR-21 antiapoptotik süreçte rol oynayan bir miRNA olduğu için daha şiddetli hipoksiye maruz kalmış Evre 3 HİE yenidoğanlarda, daha az hipoksiye maruz kalan Evre 1 ve Evre 2 HİE tanılı yenidoğanlara oranla daha fazla ekspresye edilmiştir. Çünkü iskemik nöronal ölümleri önlemek için daha fazla ekspresye edildiği ve hipoksiye maruz kalmayan kontrol gruplarında hastalara göre daha fazla ekspresye edildiği için anti apoptoziste rol alabileceği literatür ve istatistiksel verileri ışığında öngörülmüştür.

Çalışmamızda mir210 ($p=0,004$), mir374-a ($p<0,001$) ve mir21 ($p<0,001$) ekspresyon düzeyleri, ölçüm zamanları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermektedir.

Çalışmamızda miRNA ekspresyonunu evrelere göre kıyasladığımızda elde ettiğimiz sonuçlara göre, mir210 (0. saat, 24. saat ve 48-72. saat), mir374-a (0. saat, 24. saat ve 48-72. saat) ve mir21 (0. saat, 24. saat ve 24-72. saat) miRNA ekspresyon değerleri açısından evreler arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

Çalışmamızdaki, hasta grubunun miRNA ekspresyonu ve biyomarkerları kontrol grubuyla karşılaştırıldığı zaman, HİE hastalarında inflamatuvar ve hipoksik süreçlerin çok önemli bir rol oynadığını görülmektedir. İncelenen miRNA ve biyomarkerlar arasında, mir210, mir374-a, mir21, İL-10, HİF-1-alfa, İL-6 ve İL-1-alfa seviyelerinin hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda mir21, mir210, mir374-a, İL-10, TNF-alfa, HİF-1-alfa, İL-6 VE İL-1-alfa gibi ekspresyon düzeyleri artan ve HİE'nin patofizyolojisi, evrelemesini ve tedavi süreçlerine katkısı olabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR

Çalışmamıza yenidoğan yoğun bakım ünitemize bir yıl boyunca yatan HİE tanısı almış 23 yenidoğan hasta grubu olarak, 23 HİE tanısı almamış hastada kontrol grubu olarak dahil edilmiştir.

Neonatal ensefalopatiji araştırdığımız yenidoğanlardan mir210, mir 374-a, mir 21, TNF-alfa, İL-10, İL-6, İL-1-alfa, HIF-1-alfa düzeyleri yenidoğanların kan örneklerinde tanı aldıkları 0. , 24. ve 48-72. saatte çalışılmıştır.

Örnekler ve hastanın kliniği ile birlikte değerlendirildiğinde, çalışmaya dahil edilen hastalar kontrol, Evre 1 , Evre 2 ve Evre 3 olmak üzere sınıflandırılmıştır. Aynı zamanda hastaların demografik özellikleri de ele alınmıştır. Bebeğe ait faktörlerden doğum kilosuna, doğum şekli, doğum haftası, cinsiyet gibi faktörler kontrol ve HİE grupları arasında anlamlı göstermemiştir, bu bulgular literatür bilgileri ile de uyum göstermektedir. Ancak ilk gebeliğin HİE' ye etkisi istatistiksel olarak anlamlı görülmüştür ($p < 0.036$).

HİE için nöronal hasarın erken belirteçleri olarak kullanılması amacıyla biyomarkerlar üzerinde yapılan çalışmaları sistematik bir şekilde incelemiştir. Bu tezde, miR-210, miR-374'a ve miR-21 gibi miRNA'ların HİE'li yenidoğanlarda potansiyel biyomarkerler olarak değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamızda, hasta grubunun miRNA ekspresyonu ve biyomarkerları kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. İncelenen miRNA ve biyomarkerlar arasında, mir210, mir374-a, mir21, İL-10, HIF-1-alfa, İL-6 ve İL-1-alfa seviyelerinin hasta grubunda anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, TNF-alfa seviyeleri hasta gruplarında kontrol grubuna göre artış göstermiş ancak iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmemiştir ($p = 0.46$).

Çalışmamızda, hipoksik iskemik ensefalopati (HİE) hastalarında belirli miRNA ekspresyon değerleri ve inflamatuvar biyomarkerların hastalık evreleri ile olan ilişkisini değerlendirmiştir. Hem miRNA ekspresyonları (mir210, mir374-a, mir21) hem de belirli inflamatuvar biyomarkerlar (İL-10, TNF-alfa, HIF-1'alfa, İL-6, İL-1'alfa) açısından hastalık evreleri arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Özellikle mir210 ($p < 0.04$) ve mir374-a ($p < 0.001$)'nın ekspresyon düzeyleri, kontrol grubuna kıyasla evre 1, 2 ve 3 gruplarında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ancak, mir21'in ekspresyon düzeyi kontrol grubuna göre artmış

olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir($p=0.06$). Benzer şekilde, İL-10, TNF-alfa, HIF-1-alfa, İL-6 ve İL-1-alfa biyomarkerları da Evre 1, 2 ve 3 grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılıklar göstermiştir.

Çalışmamızda, hipoksik iskemik ensefalopati (HİE) hastalarının iskemi süresine göre miRNA ekspresyonu değerleri karşılaştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, mir210 (0. saat, 24. saat ve 48-72. saat), mir374-a (0. saat, 24. saat ve 48-72. saat) ve mir21 (0. saat, 24. saat ve 24-72. saat) miRNA ekspresyonu artmıştır ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).

Çalışmamız, hipoksik iskemik ensefalopati (HİE) hastalarının iskemi süresine göre farklı biyomarker değerleri incelenmiştir. Buna göre, İL-10 (0. saat, 24. saat ve 24-48. saat), TNF-alfa (0. saat, 24. saat ve 48-72. saat), HIF-1'alfa(0. saat, 24. saat ve 48-72. saat), İL-6 (0. saat, 24. saat ve 48-72. saat) ve İL-1 alfa (0. saat, 24. saat ve 48-72. saat) biyomarker değerleri artış göstermiştir ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır($p>0.05$)

Maddi yetersizlikler ,hasta sayısını az olması ve bazı hastalardan yetersiz sayıda numune toplanmış olası çalışma sonuçlarımızı olumsuz yönde etkilemiştir. Çalışmaya katılan hasta sayısının görece düşük olması, elde edilen verilerin genellemeye uygunluğunu sınırlayabilir.

Sınırlamalarına karşın bu çalışma, HİE hastalarında hem miRNA ekspresyon düzeylerini (miRNA-210, miRNA-374-a ve miRNA-21) hem de inflamatuvar biyomarkerları (İL-6, İL-1-alfa, İL-10, TNF-alfa ve HIF-1alfa) bir arada değerlendiren kapsamlı bir yaklaşım sunmaktadır. Bu, HİE patogenezi ve inflamasyon süreçleri üzerindeki etkileri anlamada daha geniş bir bakış açısı sağlamaktadır.

Ayrıca, bu çalışma, HİE hastalarında miRNA ekspresyon düzeylerinin ve inflamatuvar biyomarker düzeylerinin anlaşılmasına yönelik önemli katkılarda bulunmaktadır. Bu bulgular, HİE patogenezi, tedavisi ve prognozu için potansiyel hedeflerin belirlenmesine ve mevcut bilgi birikimine katkı sağlamaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Volpe JJ, Inder TE, Darras BT, de Vries LS, du Plessis AJ, Neil J, et al. Volpe's neurology of the newborn . Elsevier Health Sciences; 2017.
2. Schreglmann M, Ground A, Vollmer B, Johnson MJ. Systematic review: long-term cognitive and behavioural outcomes of neonatal hypoxic–ischaemic encephalopathy in children without cerebral palsy. *Acta Paediatrica* 2020;109:20-30.
3. Akisu M, Kumral A, Canpolat FE. Türk Neonatoloji Derneği yenidoğan ensefalopati rehberi. *Türk Pediatri Arşivi* 2018;53:32-44.
4. Finder M, Boylan GB, Twomey D, Ahearne C, Murray DM, Hallberg B. Two-year neurodevelopmental outcomes after mild hypoxic ischemic encephalopathy in the era of therapeutic hypothermia. *JAMA Pediatrics* 2020;174:48-55.
5. Edmonds CJ, Helps SK, Hart D, Zatorska A, Gupta N, Cianfaglione R, et al. Minor neurological signs and behavioural function at age 2 years in neonatal hypoxic ischaemic encephalopathy (HIE). *European Journal of Paediatric Neurology* 2020;27:78-85.
6. Conway J, Walsh B, Boylan G, Murray D. Mild hypoxic ischaemic encephalopathy and long term neurodevelopmental outcome a systematic review. *Early human development* 2018;120:80-87.
7. Saydam F, Değirmenci İ, Güneş HV. MikroRNA'lar ve kanser. *Dicle Tıp Dergisi* 2011 ; 38:113-120.
8. Coolen M, Cuif L. MicroRNAs in brain development and physiology. *Current Opinion in Neurobiology* . 2009 ;19:461-470.
9. Cui H, Yang L. Analysis of microRNA expression detected by microarray of the cerebral cortex after hypoxic-ischemic brain injury. *Journal of Craniofacial Surgery* 2013;24:2147-2152.
10. Ponnusamy V, Yip PK. The role of microRNAs in newborn brain development and hypoxic ischaemic encephalopathy. *Neuropharmacology* 2019;149:55-65.
11. Ma Q, Xiong F, Zhang L. Gestational hypoxia and epigenetic programming of brain development disorders. *Drug Discovery Today* 2014;19:1883-1896.
12. Nallamshetty S, Chan SY, Loscalzo J. Hypoxia: a master regulator of microRNA biogenesis and activity. *Free Radical Biology and Medicine* 2013;64:20-30.
13. Agrawal R, Pandey P, Jha P, Dwivedi V, Sarkar C, Kulshreshtha R. Hypoxic signature of microRNAs in glioblastoma: insights from small RNA deep sequencing. *BMC Genomics* 2014;15:686-702.

14. Bustelo M, Barkhuizen M, van den Hove DLA, Steinbusch HWM, Bruno MA, Loidl CF, et al. Clinical implications of epigenetic dysregulation in perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Frontiers in Neurology* 2020;11:483-498.
15. Li B, Dasgupta C, Huang L, Meng X, Zhang L. MiRNA-210 induces microglial activation and regulates microglia-mediated neuroinflammation in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Cellular Molecular Immunology* 2020;17:976-991.
16. Ramaswamy V, Horton J, Vandermeer B, Buscemi N, Miller S, Yager J. Systematic review of biomarkers of brain injury in term neonatal encephalopathy. *Pediatric Neurology* 2009;40:215-26.
17. Glass HC. Hypoxic-ischemic encephalopathy and other neonatal encephalopathies. *Lifelong Learning in Neurology* 2018;24:57-71.
18. Kurinczuk JJ, White-Koning M, Badawi N. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Human Development* 2010;86:329-338.
19. Martinez-Biarge M, Diez-Sebastian J, Wusthoff CJ, Mercuri E, Cowan FM. Antepartum and intrapartum factors preceding neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *The Journal of Pediatrics* 2013;132:952-959.
20. Fedakar A, Sakca Z. A Severe asphyxiated newborn: a case report. *Communications in Applied Sciences* 2017;5: 1-13.
21. Carter BS, Haverkamp AD, Merenstein GB. The definition of acute perinatal asphyxia. *Clinics in Perinatology* 1993;20:287-304.
22. Gomella TL, Cunningham MD, Eyal FG, Tuttle DJ, et al. *Neonatology: management, procedures, on-call problems, diseases, and drugs*. McGraw-Hill Education Medical New York, NY; 2013.
23. Greco P, Nencini G, Piva I, Scioscia M, Volta C, Spadaro S, et al. Pathophysiology of hypoxic-ischemic encephalopathy: a review of the past and a view on the future. *Acta Neurologica Belgica* 2020;120:277-288.
24. Behrman RE, Vaughan VC. *Nelson textbook of pediatrics*. WB Saunders company; 1983.
25. Morales P, Bustamante D, Espina-Marchant P, Neira-Peña T, Gutiérrez-Hernández MA, Allende-Castro C, et al. Pathophysiology of perinatal asphyxia: can we predict and improve individual outcomes? *EPMA Journal* 2011;2:211-230.
26. Thompson C, Puterman A, Linley L, Hann F, Van der Elst C, Molteni C, et al. The value of a scoring system for hypoxic ischaemic encephalopathy in predicting neurodevelopmental outcome. *Acta paediatrica* 1997;86:757-761.

- 27.Sarnat HB, Sarnat MS. Neonatal encephalopathy following fetal distress: a clinical and electroencephalographic study. *Archives of neurology* 1976;33:696-705.
- 28.Alsina M, Martín-Ancel A, Alarcon-Allen A, Arca G, Gayá F, García-Alix A. The severity of hypoxic-ischemic encephalopathy correlates with multiple organ dysfunction in the hypothermia era. *Pediatric Critical Care Medicine* 2017;18:234-40.
- 29.Ecker J, Abuhamad A, Hill W, Bailit J, Bateman BT, Berghella V, et al. Substance use disorders in pregnancy: clinical, ethical, and research imperatives of the opioid epidemic: a report of a joint workshop of the society for maternal-fetal medicine. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2019;221:5-28.
- 30.Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, Tyson JE, McDonald SA, Donovan EF, et al. Whole body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *New England Journal of Medicine* 2005;353:1574-1584.
- 31.Hayakawa M, Ito Y, Saito S, Mitsuda N, Hosono S, Yoda H, et al. Incidence and prediction of outcome in hypoxic-ischemic encephalopathy in Japan. *Pediatrics International* 2014;56:215-221.
- 32.Procianoy CA, Longo MG, Vedolin L, Silveira RC. Therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: magnetic resonance imaging findings and neurological outcomes in a Brazilian cohort. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 2019;32:27-34.
- 33.Groenendaal F, de Vries LS. Fifty years of brain imaging in neonatal encephalopathy following perinatal asphyxia. *Pediatric Research* 2017;81:150-155.
- 34.Sorokan ST, Jefferies AL, Miller SP. Imaging the term neonatal brain. *Pediatrics & Child Health* 2018;23:322-328.
- 35.Chau V, Poskitt KJ, Sargent MA, Lupton BA, Hill A, Roland E, et al. Comparison of computer tomography and magnetic resonance imaging scans on the third day of life in term newborns with neonatal encephalopathy. *Pediatrics* 2009;123:319-326.
- 36.Van Rooij LG, Toet MC, van Huffelen AC, Groenendaal F, Laan W, Zecic A, et al. Effect of treatment of subclinical neonatal seizures detected with aEEG: randomized, controlled trial. *Pediatrics* 2010;125:358-366.
- 37.Bruns N, Blumenthal S, Meyer I, Klose-Verschuur S, Felderhoff-Müser U, Müller H. Application of an amplitude-integrated EEG monitor (cerebral function monitor) to neonates. *Journal of Visualized Experiments* 2017;127:55985.
- 38.Kracer B, Hintz SR, Van Meurs KP, Lee HC. Hypothermia therapy for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy in the state of California. *The Journal of Pediatrics* 2014;165:267-273.

39. Silveira RC, Procianoy RS. Hypothermia therapy for newborns with hypoxic ischemic encephalopathy. *Journal de Pediatria* 2015;91:78-83.
40. Shankaran S, Pappas A, McDonald SA, Vohr BR, Hintz SR, Yolton K, et al. Childhood outcomes after hypothermia for neonatal encephalopathy. *New England Journal of Medicine* 2012;366:2085-2092.
41. Chiang M-C, Jong Y-J, Lin C-H. Therapeutic hypothermia for neonates with hypoxic ischemic encephalopathy. *Pediatrics & Neonatology* 2017;58:475-483.
42. Joy R, Pournami F, Bethou A, Bhat VB, Bobby Z. Effect of therapeutic hypothermia on oxidative stress and outcome in term neonates with perinatal asphyxia: a randomized controlled trial. *Journal of Tropical Pediatrics* 2013;59:17–22.
43. Gane BD, Bhat V, Rao R, Nandhakumar S, Harichandrakumar KT, Adhisivam B. Effect of therapeutic hypothermia on DNA damage and neurodevelopmental outcome among term neonates with perinatal asphyxia: a randomized controlled trial. *Journal of Tropical Pediatrics* 2014;60:134–40.
44. Thoresen M, Whitelaw A. Cardiovascular changes during mild therapeutic hypothermia and rewarming in infants with hypoxicischemic encephalopathy. *Pediatrics* 2000;106:92–99.
45. Rao R, Trivedi S, Distler A, Liao S, Vesoulis Z, Smyser C, et al. Neurodevelopmental outcomes in neonates with mild hypoxic ischemic encephalopathy treated with therapeutic hypothermia. *American Journal of Perinatology* 2019;36:1337-1343.
46. Romeo DM, Bompard S, Serrao F, Leo G, Cicala G, Velli C, et al. Early neurological assessment in infants with hypoxic ischemic encephalopathy treated with therapeutic hypothermia. *Journal of Clinical Medicine* 2019;8:1247-1255.
47. Soleimani F, Badv RS, Momayezi A, Biglarian A, Marzban A. General movements as a predictive tool of the neurological outcome in term born infants with hypoxic ischemic encephalopathy. *Early Human Development* 2015;91:479-482.
48. Romeo DM, Cowan FM, Haataja L, Ricci D, Pede E, Gallini F, et al. Hammersmith infant neurological examination for infants born preterm: predicting outcomes other than cerebral palsy. *Developmental Medicine & Child Neurology* 2021;63:939-946.
49. Piper MC, Pinnell LE, Darrah J, Maguire T, Byrne PJ. Construction and validation of the Alberta Infant Motor Scale (AIMS). *Canadian Journal of Public Health* 1992;83:46-50.

- 50.Yildirim C, Asalioglu A, Coşkun Y, Acar G, Akman İ. General movements assessment and Alberta Infant Motor Scale(AIMS) in neurodevelopmental outcome of preterm infants. *Pediatrics & Neonatology* 2022;63:535-541.
- 51.Anderson PJ, Burnett A. Assessing developmental delay in early childhood - concerns with the Bayley-III scales. *Clinical Neuropsychology* 2017;31:371-381.
- 52.Ahearne CE, Boylan GB, Murray DM. Short and long term prognosis in perinatal asphyxia: An update. *World Journal of Clinical Pediatrics* 2016;5:67-74.
- 53.Machado A, Oliveira SR, Magalhães LC, Miranda DM, Bouzada MCF.Sensory processing during childhood in preterm infants :a systematic review. *Revista Paulista de Pediatria* 2017;35:92-101.
- 54.Cheung PP, Siu AM. A comparison of patterns of sensory processing in children with and without developmental disabilities. *Research in Developmental Disabilities* 2009;30:1468-1480.
- 55.Toros F, Aksu G. Dikkat Eksikliği ve Hiperaktivite Bozukluğu ile İlgili Her Şey. 1.Baskı,Akademisyen Kitabevi, 2019.
- 56.Little LM, Dean E, Tomchek SD, Dunn W. Classifying sensory profiles of children in the general population. *Child Care Health Development* 2017;43:81-88.
- 57.Pavão SL, Rocha N. Sensory processing disorders in children with cerebral palsy. *Infant Behavior and Development* 2017;46:1-6.
- 58.Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 2007;128:635-638.
- 59.Faiz A, Steiling K, Roffel MP, Postma DS, Spira A, Lenburg ME,et al. Effect of long-term corticosteroid treatment on microRNA and gene-expression profiles in COPD. *European Respiratory Journal* 2019 ;53:1801202.
- 60.Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75:843-854.
- 61.Jackson RJ, Standart N. How do microRNAs regulate gene expression? *Science's STKE* 2007;2:367-380.
- 62.Zhang G, Ye M, Li M. Deregulated miR-384 serves as a biomarker in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy and alleviates microglia-mediated neuroinflammation. *Molecular Biology Reports* 2020;47:5411-5420.
- 63.Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2015;13:17-24.

64. Correia de Sousa M, Gjorgjieva M, Dolicka D, Sobolewski C, Foti M. Deciphering miRNA action through miRNA editing. *International Journal of Molecular Sciences* 2019; 20:6249-6271.
65. Michlewski G, Cáceres JF. Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *RNA Journal* 2019;25:1-16.
66. Clifford RL, Singer CA, John AE. Epigenetics and miRNA emerge as key regulators of smooth muscle cell phenotype and function. *Pulmoner Pharmacology and Therapeutics* 2013;26:75-85.
67. Lages E, Ipas H, Guttin A, Nesr H, Berger F, Issartel JP. MicroRNAs: molecular features and role in cancer. *Frontiers in Bioscience* 2012;17:2508-2540.
68. Selvaskandan H, Pawluczyk I, Barratt J. MicroRNAs: a new avenue to understand, investigate and treat immunoglobulin A nephropathy? *Clinical Kidney Journal* 2018;11:29-37.
69. Huang MJ, Kua KE, Teng HC, Tang KS, Weng HW, Huang CS. Risk factors for severe hyperbilirubinemia in neonates. *Pediatr Research* 2004;56:682-689.
70. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2015;15:321-333.
71. Berindan-Neagoe I, Monroig Pdel C, Pasculli B, Calin GA. MicroRNAome genome: a treasure for cancer diagnosis and therapy. *CA Cancer J Clin* 2014;64:311-336.
72. Dumache R, Rogobete AF, Bedreag OH, Sarandan M, Cradigati AC, Papurica M, et al. Use of miRNAs as biomarkers in sepsis. *Analytical Cellular Pathology* 2015;2015:186716.
73. Moon HG, Yang J, Zheng Y, Jin Y. miR-15a/16 regulates macrophage phagocytosis after bacterial infection. *J Immunol* 2014;193:4558-4567.
74. Benz F, Roy S, Trautwein C, Roderburg C, Luedde T. Circulating MicroRNAs as biomarkers for sepsis. *Int J Mol Sci* 2016;17:78-95.
75. Pauley KM, Cha S, Chan EK. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2009;32:189-194.
76. Sheedy FJ, O'Neill LA. Adding fuel to fire: microRNAs as a new class of mediators of inflammation. *Ann Rheum Dis* 2008;67 :50-55.
77. Metin T, Dinç E, Görür A, Erdoğan S, Ertekin S, Sarı AA, et al. Evaluation of the plasma microRNA levels in stage 3 premature retinopathy with plus disease: preliminary study. *Eye (Lond)* 2018;32:415-420.

- 78.Lal CV, Olave N, Travers C, Rezonzew G, Dolma K, Simpson A, et al. Exosomal microRNA predicts and protects against severe bronchopulmonary dysplasia in extremely premature infants. *JCI Insight* 2018;3:93994.
- 79.Syed M, Das P, Pawar A, Aghai ZH, Kaskinen A, Zhuang ZW, et al. Hyperoxia causes miR-34a-mediated injury via angiotensin-1 in neonatal lungs. *Nat Commun* 2017;8:1173-1190.
- 80.Chen H, Zeng L, Zheng W, Li X, Lin B. Increased expression of microRNA-141-3p improves necrotizing enterocolitis of neonates through targeting MNX1. *Front Pediatr* 2020;8:385-395.
- 81.Liu H, Wang YB. Systematic large-scale meta-analysis identifies miRNA-429/200a/b and miRNA-141/200c clusters as biomarkers for necrotizing enterocolitis in newborn. *Biosci Rep* 2019;39:1513-1524.
- 82.Chen Z, Hu Y, Lu R, Ge M, Zhang L. MicroRNA-374a-5p inhibits neuroinflammation in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy via regulating NLRP3 inflammasome targeted Smad6. *Life Sci* 2020;252:117664.
- 83.Ponomarev ED, Veremeyko T, Weiner HL. MicroRNAs are universal regulators of differentiation, activation, and polarization of microglia and macrophages in normal and diseased CNS. *Glia* 2013;61:91-103.
- 84.Xiong L, Zhou H, Zhao Q, Xue L, Al-Hawwas M, He J, et al. Overexpression of miR-124 protects against neurological dysfunction induced by neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Cell Mol Neurobiol* 2020;40:737-750.
- 85.Wang Z, Liu Y, Shao M, Wang D, Zhang Y. Combined prediction of miR-210 and miR-374a for severity and prognosis of hypoxic-ischemic encephalopathy. *Brain Behav* 2018;8:835-845.
- 86.Wu J, He J, Tian X, Luo Y, Zhong J, Zhang H, et al. MicroRNA-9-5p alleviates blood-brain barrier damage and neuroinflammation after traumatic brain injury. *J Neurochem* 2020;153:710-726.
- 87.Cheng C, Li W, Zhang Z, Yoshimura S, Hao Q, Zhang C, et al. MicroRNA-144 is regulated by activator protein-1 (AP-1) and decreases expression of Alzheimer disease-related a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *J Biol Chem* 2013;288:13748-13761.
- 88.Sabirzhanov B, Stoica BA, Zhao Z, Loane DJ, Wu J, Dorsey SG, et al. MiR-711 upregulation induces neuronal cell death after traumatic brain injury. *Cell Death Differ* 2016;23:654-668.
- 89.Ma J, Shui S, Han X, Guo D, Li T, Yan L. MicroRNA-22 attenuates neuronal cell apoptosis in a cell model of traumatic brain injury. *Am J Transl Res* 2016;8:1895-1902.

90. Hamzei Taj S, Kho W, Riou A, Wiedermann D, Hoehn M. MiRNA-124 induces neuroprotection and functional improvement after focal cerebral ischemia. *Biomaterials* 2016;91:151-165.
91. Vannucci R.C. Hypoxic-ischemic encephalopathy. *American Journal of Perinatology* 2000; 17: 113-120.
92. Novak CM, Ozen M, Burd I. Perinatal brain injury: mechanisms, prevention, and outcomes. *Clinics in Perinatology* 2018; 45: 357-375.
93. Silveira RC, Procianoy RS. Hypothermia therapy for newborns with hypoxic ischemic encephalopathy. *Journal de Pediatria* 2015; 91: 78-83.
94. Rainaldi MA, Perlman JM. Pathophysiology of birth asphyxia. *Clinics in Perinatology* 2016; 43: 409-422.
95. Kennedy C, Grave GD, Jehle JW. Effect of hyperoxia on the cerebral circulation of the newborn puppy. *Pediatric Research* 1971; 5: 659-667.
96. Pryds O, Greisen G, Lou H, Friis-Hansen B. Vasoparalysis associated with brain damage in asphyxiated term infants. *J Pediatr* 1990; 117:119-125.
97. Merhar L, Thomas W. *Nelson Textbook of Pediatrics. Nervous System Disorders*. 21 ed. Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. 2020: 913-925.
98. Linda S de Vries, F.G., Fanaroff. *Neonatal Perinatal Medicine*. 11 ed. Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. 2019: 989-1014.
99. Bassan H, Bental Y, Shany E, et. al. Neonatal seizures: dilemmas in workup and management. *Pediatr Neurol* 2008; 38: 415-421.
100. Volpe JJ. Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatr Res* 2001; 50: 553-562.
101. Marchal C, Leveau P, André M, Garcia-Lang M, Costagliola P. The treatment of neonatal cerebral distress, action of repeated refusions of mannitol. *Pediatrie* 1972; 27: 709-719.
102. Levene MI, Evans DH. Medical management of raised intracranial pressure after severe birth asphyxia. *Arch Dis Child* 1985; 60: 12-16.
103. Busto R, Mordecai Y-T, Globus, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD. Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. *Stroke* 1989; 20: 904-910.
104. Lu-Ann, J.E, Benitz, W, Cummings, J, Carlo, W.A, Eichenwald, et. al. Hypothermia and neonatal encephalopathy. *Pediatrics* 2014;133: 1146-1150.
105. AD Edwards, D Azzopardi. Hypothermic neural rescue treatment: from laboratory to cotside. *Imperial College School of Medicine* 1998; 25-52.

106. Perlman JM. Intrapartum hypoxic-ischemic cerebral injury and subsequent cerebral palsy. *Pediatrics* 1997; 99:851–858.
107. MacGregor DG, Higgins MJ, Jones PA, Maxwell WL, Watson MW, Graham DI, et al. Ascorbate attenuates the systemic kainate-induced neurotoxicity in the rat hippocampus. *Brain Res* 1996; 727: 133–144.
108. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 343–354.
109. Knowles HJ, Raval RR, Harris AL, Ratcliffe PJ. Effect of ascorbate on the activity of hypoxia-inducible factor in cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 1764–1768.
110. Fukamachi S, Furuta A, Ikeda T, et. all. Altered expressions of glutamate transporter subtypes in rat model of neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Brain Res* 2001; 132: 131-139.
111. Tutak E, Satar M, Zorludemir S, Erdoğan S, Yapıcıoğlu H, Narlı N. Neuroprotective effects of indomethacin and aminoguanidine in the newborn rats with hypoxic-ischemic cerebral injury. *Neurochem Res* 2005; 30: 937–942.
112. Taşkın E. Hipoksik iskemik ensefalopati oluşturulan rat modelinde indometazinin nöronal apoptoz üzerine etkisi. *Yandal Uzmanlık Tezi*, Adana:Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları Bölümü, 2010;
113. Ko KM, Godin DV. Inhibition of transition metal ion-catalysed ascorbate oxidation and lipid peroxidation by allopurinol and oxypurinol. *Biochem Pharmacol* 1990; 40: 803-809.
114. Rodriguez Fanjul J, Duran Fernandez Feijoo C, Lopez Abad M, Lopez Ramos MG, Balada Caballe R, Alcantara-Horillo S, et al. Neuroprotection with hypothermia and allopurinol in an animal model of hypoxic-ischemic injury: is it a gender question. *PLOS One* 2017; 12: 3-12.
115. Alonso-Alconada D, Alvarez A, Arteaga O, Martinez-Ibarguen A, Hilario E. Neuroprotective effect of melatonin: a novel therapy against perinatal hypoxiaischemia. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 9379-9395.
116. Bennet L, Tan S, van den Heuij L, Derrick M, Groenendaal F, van Bel F, et al. Cell therapy for neonatal hypoxia-ischemia and cerebral palsy. *Ann Neurol* 2012; 71: 589-600.
117. Bavarsad Shahripour R, Harrigan MR, Alexandrov AV. N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain Behav* 2014; 4: 108-122.

118. Jatana M, Singh I, Singh AK, Jenkins D. Combination of systemic hypothermia and N-acetylcysteine attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Pediatr Res* 2006; 59: 684-689.
119. Horowitz R, Dart R, Jarvie D, Bearer C, Gupta U. Placental transfer of N-acetylcysteine following human maternal acetaminophen toxicity. *J Toxicol Clin Toxicol* 1997; 35: 447-451.
120. Franks NP, Dickinson R, de Sousa SL, Hall AC, Lieb WR. How does xenon produce anaesthesia *Nature* 1998; 396: 324.
121. Ji J, Rong Y, Luo C, Li S, et al. Up-regulation of hsa-miR-210 promotes venous metastasis and predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Frontiers in Oncology* 2018;8: 569-580.
122. Dong Q, Yuan G, Liu M, Xie Q, Hu J, Wang M, Pan Y. Downregulation of microRNA-374a predicts poor prognosis in human glioma. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2019;17: 2077-2084.
123. Zhong Z, Dong Z, Yang L, et al. miR-21 induces cell cycle at S phase and modulates cell proliferation by down-regulating hMSH2 in lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012;138: 1781–1788 .
124. Liu X, Cai H, Sheng W, Huang H, Long Z, Wang Y. MicroRNAs expression profile related with response to preoperative radiochemotherapy in patients with locally advanced gastric cancer. *BMC Cancer* 2018; 18:1048-1056.
125. Murray DM. Biomarkers in neonatal hypoxic–ischemic encephalopathy review of the literature to date and future directions for research. *Handbook of clinical neurology* 2019;162:281-293.
126. Lv H, Wang Q, Wu S, Yang L, Ren P, Yang Y, et al. Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy-related biomarkers in serum and cerebrospinal fluid. *Clinica Chimica Acta* 2015;450:282-297.
127. Özel S, Tayman C. Analysis of hypoxic-ischemic encephalopathy cases at a tertiary care hospital and correlation between cesarean and hypoxic-ischemic encephalopathy rates. *Jinekolojik-Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi* 2019;3 :135-139.
128. Martinello K, Hart AR, Yap S, Mitra S, Robertson NJ. Management and investigation of neonatal encephalopathy: 2017 update. *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition* 2017;102:346-358.
129. Eken P, Toet M, Groenendaal F, De Vries L. Predictive value of early neuroimaging, pulsed doppler and neurophysiology in full term infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition* 1995;73:75-80.

130. Monen L, Hasaart T, Kuppens S. The aetiology of meconium-stained amniotic fluid: pathologic hypoxia or physiologic foetal ripening? *Early Human Development* 2014;90:325-328.
131. Poggi SH, Ghidini A. Pathophysiology of meconium passage into the amniotic fluid. *Early Human Development*. 2009;85:607-610.
132. Wang L, Ke J, Li Y, Ma Q, Dasgupta C, Huang X, et al. Inhibition of miRNA-210 reverses nicotine-induced brain hypoxic-ischemic injury in neonatal rats. *International Journal of Biological Sciences* 2017;13:76-85.
133. Mastrangelo M, Fiocchi I, Fontana P, Gorgone G, Lista G, Belcastro V. Acute neonatal encephalopathy and seizures recurrence: a combined aEEG/EEG study. *Seizure* 2013;22:703-707.
134. Rutherford M, Malamateniou C, McGuinness A, Allsop J, Biarge MM, Counsell S. Magnetic resonance imaging in hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Human Development* 2010;86:351-360.
135. Rutherford M, Ramenghi LA, Edwards AD, Brocklehurst P, Halliday H, Levene M, et al. Assessment of brain tissue injury after moderate hypothermia in neonates with hypoxic-ischaemic encephalopathy: a nested substudy of a randomised controlled trial. *The Lancet Neurology* 2010;9:39-45.
136. Srinivasakumar P, Zempel J, Wallendorf M, Lawrence R, Inder T, Mathur A. Therapeutic hypothermia in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: electrographic seizures and magnetic resonance imaging evidence of injury. *The Journal of Pediatrics* 2013;163: 465–470.
137. Döven SS, Atıcı A . Çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerin uzun dönem izleminin sonuçları .*Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2018 ;1:13-23.
138. Akçura YD. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi yenidoğan yoğun bakım ünitesinde 2014-2018 yılları arasında izlenen çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerde mortalite ve morbidite sonuçları ve önceki sonuçlarla karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi ,İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü, 2019.
139. Jacobs SE, Berg M, Hunt R, et al. Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013; 1:003311.
140. Garfinkle J, Santanna GM, Wintermark P, Ali N, Morneault L, Koclas L. Cooling in the real world: therapeutic hypothermia in hypoxic-ischemic encephalopathy. *European Journal of Pediatric Neurology Society* 2013;17:492-497.

141. Atıcı A, Çelik Y, Gülaşı S, Turhan AH, Okuyaz Ç, Sungur MA. Hipoksik iskemik ansefalopatili yenidoğan bebeklerde seçici baş soğutma tedavisi ile tüm beden soğutma tedavisinin karşılaştırılması: Kısa dönem sonuçları. *Türk Pediatri Arşivi*. 2015;50:27-36.
142. Shah PS. Hypothermia: a systemic review and meta-analysis of clinical trials. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010; 15:238-246.
143. Awal MA, Lai MM, Azemi G, Boashash B, Colditz PB. EEG background features that predict outcome in term neonates with hypoxic ischaemic encephalopathy: A structured review. *Clinical Neurophysiology* 2016;127:285-296.
144. Wan B, Pan X, Ma J, Luo Y, Liu J, Zhao G. Umbilical cord blood troponin I, myoglobin and CK-MB in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy and the clinical significance. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2020;19:545-550.
145. Kitzenberg D, Colgan SP, Glover LE. Creatine kinase in ischemic and inflammatory disorders. *Clinical and Translational Medicine* 2016;5:1-10.
146. Patil UP, Mally PV, Wachtel EV. Serum biyomarkers of neuronal injury in newborns evaluated for selective head cooling: a comparative pilot study. *Journal of Perinatal Medicine* 2018;46:942-947.
147. Toro-Urrego N, Vesga-Jiménez DJ, Herrera MI, Luaces JP, Capani F. Neuroprotective role of hypothermia in hypoxic-ischemic brain injury: combined therapies using estrogen. *Current Neuropharmacology* 2019;17:874-890.
148. Henrot ESA. Inflammatory mediators and neonatal brain damage. *Biol Neonate* 2001;79:224-227.
149. Morkos A, Hopper A, Deming D, Yellon S, Wycliffe N, Ashwal S, et al. Elevated total peripheral leukocyte count may identify risk for neurological disability in asphyxiated term neonates. *Journal of Perinatology* 2007;27:365-370.
150. Massaro AN, Wu YW, Bammler TK, et al. Plasma Biomarkers of brain injury in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *The Journal of Pediatrics* 2018;194: 67-75.
151. Ding Y-H, Mrizek M, Lai Q, Wu Y, Reyes R, Li J, et al. Exercise preconditioning reduces brain damage and inhibits TNF- α receptor expression after hypoxia/reoxygenation: an in vivo and in vitro study. *Current Neurovascular Research*. 2006;3:263-271.
152. Li S, Liu W, Wang J, Zhang Y, Zhao D, Wang T, et al. The role of TNF- α , IL-6, IL-10, and GDNF in neuronal apoptosis in neonatal rat with hypoxic-ischemic encephalopathy. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2014;18:905-909.

153. Gu Y, Zhang Y, Bi Y, Liu J, Tan B, Gong M, et al. Mesenchymal stem cells suppress neuronal apoptosis and decrease IL-10 release via the TLR2/NFκB pathway in rats with hypoxic-ischemic brain damage. *Molecular Brain* 2015;8:1-14.
154. Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Current Opinion Cell Biology* 2001; 13: 167–171.
155. Chen W, Jadhav V, Tang J, Zhang JH. HIF-1 alpha inhibition ameliorates neonatal brain damage after hypoxic-ischemic injury. *Acta Neurochirurgica Supplement* 2008; 102: 395–399.
156. Min JW, Hu JJ, He M, et al. Vitexin reduces hypoxia-ischemia neonatal brain injury by the inhibition of HIF-1 alpha in a rat pup model. *Neuropharmacology* 2015; 99: 38–50.
157. Huang Y, Shen XJ, Zou Q, Wang SP, Tang SM, Zhang GZ. Biological functions of microRNAs: a review. *Journal of Physiology and Biochemistry* 2011;67:129-139.
158. Chen Z, Li Y, Zhang H, Huang P, Luthra R. Hypoxia-regulated microRNA-210 modulates mitochondrial function and decreases ISCU and COX10 expression. *Oncogene* 2010; 29: 4362–4368.
159. Kieran NW, Suresh R, Dorion, MF, et al. MicroRNA-210 regulates the metabolic and inflammatory status of primary human astrocytes. *Journal of Neuroinflammation* 2022; 19: 10-27.
160. Zhang H, Wu J, Wu J, et al. Exosome-mediated targeted delivery of miR-210 for angiogenic therapy after cerebral ischemia in mice. *Journal of Nanobiotechnology* 2019; 17: 29-42.
161. Di Y, Lei Y, Yu F, et al. MicroRNAs expression and function in cerebral ischemia reperfusion injury. *J Mol Neurosci* 2014; 53: 242–250 .
162. Zeng LL, He XS, Liu JR, et al. Lentivirus-mediated overexpression of microRNA-210 improves long-term outcomes after focal cerebral Ischemia in mice. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 2016; 22: 961–969.
163. Zeng L, Liu J, Wang Y, et al. MicroRNA-210 as a novel blood biomarker in acute cerebral ischemia. *Frontiers in Bioscience* 2011; 3: 1265–1272.
164. Winkler I, Heisinger T, Hammerl M, Huber E, Urbanek M, Kiechl-Kohlendorfer U, et al. MicroRNA expression profiles as diagnostic and prognostic biomarkers of perinatal asphyxia and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Neonatology* 2022;119:204-213.

165. Casey S, Goasdoue K, Miller SM, Brennan GP, Cowin G, O'Mahony AG, et al. Temporally altered miRNA expression in a piglet model of hypoxic ischemic brain injury. *Molecular Neurobiology* 2020;57: 4322-4344.
166. Xing F, Liu Y, Dong R, Cheng Y. MiR-374 improves cerebral ischemia reperfusion injury by targeting Wnt5a. *Exp Anim* 2021 ;70:126-136.
167. Looney AM, Walsh BH, Moloney G, et al. Downregulation of umbilical cord blood levels of miR-374a in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *The Journal of Pediatrics* 2015; 167: 269–273.
168. Beyer S, Fleming J, Meng W, Singh R, Haque SJ, Chakravarti A. The role of miRNAs in angiogenesis, invasion and metabolism and their therapeutic implications in gliomas. *Cancers* 2017;9:85-106.
169. Yan H, Rao J, Yuan J, Gao L, Huang W, Zhao L, Ren J. Long non-coding RNA MEG3 functions as a competing endogenous RNA to regulate ischemic neuronal death by targeting miR-21/PDCD4 signaling pathway. *Cell Death Dis* 2017 ;8:3211-3226.
170. Buller B, Liu X, Wang X, Zhang RL, Zhang L, Hozeska-Solgot A, Chopp M, Zhang ZG. MicroRNA-21 protects neurons from ischemic death. *FEBS Jou* 2010;20:4299-4307.
171. Zhou J, Zhang J. Identification of miRNA-21 and miRNA-24 in plasma as potential early stage markers of acute cerebral infarction. *Mol Med Rep* 2014;10:971-976.
172. Carelli V, Chan DC. Mitochondrial DNA: impacting central and peripheral nervous systems. *Neuron* 2014;84:1126–1142.
173. Han Z, Chen F, Ge X, Tan J, Lei P, Zhang J. miR-21 alleviated apoptosis of cortical neurons through promoting PTEN-Akt signaling pathway in vitro after experimental traumatic brain injury. *Brain Res* 2014 ;1582:12-20.
174. Kaucsár T, Révész C, Godó M, Krenács T, Albert M, Szalay CI, et al. Activation of the miR-17 family and miR-21 during murine kidney ischemia-reperfusion injury. *Nucleic Acid Therapeutics* 2013;23:344-354.

8. EKLER

EK1.HASTA KAYIT FORMU

BEBEK İSMİ: DOSYA NUMARASI: KİMLİK NUMARASI:	İLK KAN GAZI: KORD KAN GAZI:
C/S : NSVYD:	APGAR:
DOĞUM TARİHİ: DOĞUM YERİ:	DOĞUM HAFTASI: PERSENTİL:
GRAVİDE: PARİTE: ABORTUS: DİĞER:	DOĞUM KİLOSU: PERSENTİL:
İLETİŞİM ADRESİ:	BOĞUM BOYU: PERSENTİL:
TELEFON NUMRASI:	NSVYD:

	C/S:
ANNE YAŞI: ANNE DOSYA NUMARASI: ANNE KİMLİK NUMARASI:	SOSYOEKONOMİK DÜZEY:
PERİNATAL ÖYKÜ:	ANNE-BABA EĞİTİM DÜZEYİ:
NATAL ÖYKÜ:	SOYGEÇMİŞ:

ERİTROPOETİN	0-3. SAAT	24. SAAT	48-72.SAAT
MİR21 ,MİR210 ,MİR374-a	0-3. SAAT	24. SAAT	48-72.SAAT
İL-6,İL-10,İL-1-Alfa,TNF-Alfa, HİF-1 Alfa	0-3. SAAT	24. SAAT	48-72.SAAT

EK 2 . HASTA TAKİP FORMU

THAMPSON EVRELEMESİ:

BELİRTİ	EVRE-0	EVRE-1	EVRE-2	EVRE-3
TONUS	NORMAL	HİPERTONİK	HİPOTONİK	FLASİT
BİLİNÇ	NORMAL	HİPERALERT	LATERJİK	KOMATÖZ
NÖBET	YOK	<3GÜNDE	>2 GÜNDE	
POSTÜR	NORMAL	FİSTİNG,ÇEVİRME	DİSTAL FLEKSİYON	DESEBRE
MORO	NORMAL	PARSİYEL	YOK	
YAKALAMA	NORMAL	AZ	YOK	
EMME	NORMAL	AZ	YOK	
SOLUNUM	NORMAL	HİPERVENTİLASYON	APNE	SOLUNUM DESTEĞİ
FONTANEL	NORMAL	GERGİN	BOMBE	

SARNAT EVRELEMESİ:

BULGU	EVRE-1	EVRE-2	EVRE-3
BİLİNÇ DÜZEYİ	NORMAL	HİPOTONİK	STUPOR,KOMA
KAS TONUSU	NORMAL	HİPOTONİK	FLASK
POSTÜR	NORMAL	FLEKSİYON	DESEREBRE
TENDON REFLEKSİ/KLONUS	HİPERAKTİF	HİPERAKTİF	ALINAMAZ
MYOKLONUS	VAR	VAR	YOK
MOROREFLEKSİ	CANLI	ZAYIF	ALINAMAZ
PUPİLLER	MİDRİYATİK	MİYOTİK	ANİZOKORİK
NÖBETLER	YOK	SIK	DESEREBRASYON
EEG BULGULARI	NORMAL	DÜŞÜK VOLTAJDAN NÖBET AKTİVİTESİNEDEĞİŞKEN	BURST SUPRESYONU,İZOELKTRİK AKTİVİTE
SÜRE	24 SATTTEN AZ	1-14 GÜN	BİRKAÇGÜN-HAFTA
SONUÇ	İYİ	DEĞİŞKEN	ÖLÜMVEYA AĞIR SEKEL

EEG:

0-24 .SAAT AEEG	24.48.SAAT AEEG	48.-72.SAAT AEEG	UYKU EEG [VARSA]

GÖRÜNTÜLEME :

TFUSG:	
BATIN USG:	
BEYİN MR :	
BEYİN MR DİFFÜZYON:	
ANORMAL RADYOLOJK BULGU,PAAG,ADBG:	

**SOLUNUM DESTEĞİ,MEKANİK VENTİLATÖR İHTİYACI [VARSA AYARLARI],KAN
GAZI :**

GÜN	SOLUNUM DESTEĞİ	KAN GAZI						MV KULLANIYOR İSE AYARLARI
		PH	PCO2	PO2	LAC	HCO3	BE	
1.								
2.								
3.								
4.								
5.								
6.								
7.								
8.								
9.								
10.								

9.ÖZGEÇMİŞ