

T.C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
HAYDARPAŞA EĞİTİM HASTANESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI SERVİS ŞEFLİĞİ

HİPOKSİK-İSKEMİK YENİDOĞAN SIÇANLARDA BEYİN HASARI GELİŞİMİ
VE GH, IGF1 VE IGFBP3 İLE OLAN İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖMER KARTAL

DZ. TBP. YZB

Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Servisinin
Tıpta Uzmanlık Eğitimi İçin Öngürdüğü

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıőtır.

TEZ DANIŐMANI

Seçil AYDINÖZ

Doç.Hv.Tbp.Alb.

İSTANBUL

2012

Gülhane Askeri Tıp Fakültesi Dekanlığına;

“HİPOKSİK-İSKEMİK YENİDOĞAN SIÇANLARDA BEYİN HASARI GELİŞİMİ
VE GH, IGF1 VE IGFBP3 İLE OLAN İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ” konulu bu
Çalışma jürimiz tarafından  ocuk Sağlığı ve Hastalıkları Servisi’nde Uzmanlık Tezi
olarak kabul edilmiştir.

Tez Danıőmanı : Doç.Hv.Tbp.Alb. Seçil AYDINÖZ

 ye : Prof. Hv.Tbp.Alb. Faysal GÖK ()

 ye : Prof.Svl.Tbp. Ferhan KARADEMİR ()

 ye : Doç.Dz.Tbp.Alb. Selami SüLEYMANOğLU ()

 ye : ()

 ye : ()

ONAY:

Dz. Tbp. Yzb. Ömer KARTAL ‘in 02.07.2012 tarihinde savunduğu bu tez Akademi
kurulu’nca belirlenen yukarıdaki jüri  yeleri tarafından uygun görülmüő ve kabul
edilmiştir.

Sadettin ÇETİNER

Prof. Tbp. Tümgeneral

GATA Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi (HEH) Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Servis Şefliği'nde Haziran 2011 ve Haziran 2012 arasında yapıldı.

Asistanlık eğitimim boyunca bilgi, görgü ve tecrübeleri ile bana önderlik ederek bu çalışmayı gerçekleştirebilecek düzeye gelmemi sağlayan ve her konuda desteklerini sürekli yanımda hissettiğim hocalarım; YBK üyesi Sayın Prof.Hv.Tbp.Kd.Alb. İsmail GÖÇMEN ve Servis Şefimiz Sayın Doç.Dz.Tbp.Alb. Selami SÜLEYMANOĞLU başta olmak üzere tez danışmanım Doç.Hv.Tbp.Alb. Seçil AYDINÖZ ve Doç.Svl.Tbp. Ferhan KARADEMİR' e minnet ve şükranlarımı sunarım.

Asistanlığım süresince çalışma imkanı bulduğum ve bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Doç.Tbp.Alb. Mustafa KUL, Doç.J.Tbp.Alb. Cihan MERAL' e, Yrd.Doç.Dz.Tbp.Bnb. Gökhan AYDEMİR 'e ve Uzm. Tbp.Bbn. İlhan Asya TANJU' ya saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın deneysel kısmının her aşamasında desteklerini esirgemeyen Yeditepe Üniversitesi, Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ'a ve Fizyoloji Anabilim Dalı, Beyin Araştırmaları Laboratuvarının tüm değerli çalışanlarına, GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Patoloji Bölümünden Uzm. Tbp.Bnb. Ufuk BERBER' e ve istatistiksel analizlerdeki katkılarından dolayı sayın Murat MUTLU' ya şükranlarımı sunarım.

Asistanlığım süresince her zaman beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Servisi'ndeki hemşire ve yardımcı sağlık personeline teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca bilgi ve desteğini gördüğüm canım eşim Dr. A. Tuğba KARTAL' a ve bu günlere gelmemi sağlayan, eğitim sürem boyunca sevgi ve fedakarlığını esirgemeyen annem, babam ve kardeşime sonsuz şükranlarımı sunarım.

Ömer KARTAL
Dz.Tbp.Yzb.

ÖZET

Hipoksik-İskemik yenidoğan sıçanlarda beyin hasarı gelişimi ve GH, IGF-1 ve IGFBP-3 ile olan ilişkisinin değerlendirilmesi.

Hipoksik- iskemik ensefalopati (HİE) prenatal bakımın iyi olmadığı gelişmekte olan ülkelerin hala en önemli sorunlarından biridir. Son yıllarda neonatolojide ki gelişmelere rağmen HİE kalıcı nörolojik sekellerin en sık nedeni olma özelliğini korumaktadır. Hipoksi ve iskemi sonrası ortaya çıkan hücresel enerji yetmezliği, asidoz, glutamat ve NO nörotoksitesi, serbest radikal oluşumu, hücre içinde kalsiyum birikimi ve lipid peroksidasyonu hücrenin yapısal komponentlerinin bozulmasına ve hücre ölümüne yol açan bir dizi olaylar zinciri sonucunda HİE oluşur. Beyin dokusunda meydana gelen hücresel ölümlere bağlı olarak sensorimotor fonksiyon bozukluklarının yanında beyin endokrin sistemle olan ilişkisi nedeni ile hormonal bozukluklar da meydana gelebilmektedir.

Büyüme hormonu (GH), insüline benzer büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve insüline benzer büyüme faktörü bağlayıcı protein 3 (IGFBP-3) vücutta birçok organ ve metabolizma üzerine etkileri olan başlıca büyüme faktörleridirler. Büyüme hormonu, IGF-1 ve IGFBP-3 büyümenin düzenlenmesi, protein sentezi, kan şekerinin düzenlenmesi ve lipoliz gibi birçok işlevde görev almaktadırlar. Bunların eksikliğine bağlı olarak hipoglisemi, büyüme geriliği, mental-motor ve kognitif fonksiyonlarda gerilik gibi erken ve geç dönem bulgular ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamızda doğum sonrası 7. günde 16 tane Sprague-Dawley sıçan yavrusu Hipoksik-iskemik (n=8) ve kontrol (n=8) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Levine-Rice prosedürüne göre sağ ana karotid arteri kalıcı olarak bağlandı. Postiskemik 15. günde sıçanlar yüksek doz %4'lük isofluorane anestezisi ile uyutularak dekapite edilip çalışma sonlandırıldı. Dekapitasyon sonrası GH, IGF-1, IGFBP-3 büyüme faktörlerini çalışmak amacıyla serum örnekleri alınarak -80°C de saklandı. Beyin dokuları ise çıkarılarak histomorfolojik değerlendirme amacıyla hemotoksilen eosin, yaşayan nöronların belirlenmesi amacıyla kresil violet ve apoptozun belirlenmesi amacıyla TUNEL boyamalarında kullanıldı.

Hipoksik-iskemik grupta kontrol grubu ile karşılaştırıldığında büyüme hormonu ve IGF-1 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.05$). IGFBP-3 ise kontrol grubuna göre daha düşük bulunmasına rağmen, sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$).

Hipoksik iskemik ensefalopatide serum büyüme faktörlerinin seviyesinin belirlenmesi yaşamın ileri döneminde gelişebilecek kognitif fonksiyon bozukluğu, büyüme ve gelişme geriliği gibi problemlerin erken tanınmasını sağlayabilir.

Anahtar kelimeler : Hipoksik- iskemik ensefalopati, Büyüme hormonu, İnsüline benzer büyüme faktörü bağlayıcı protein 3 (IGFBP3), İnsüline benzer büyüme faktörü 1 (IGF-1), Yenidoğan

Destekleyen Kurum : Yok

Yazar Adı : Dz. Tbp. Yzb. Ömer KARTAL

Danışman : Doç.Hv.Tbp.Alb. Seçil AYDINÖZ

SUMMARY

Hypoxic- ischemic brain injury and its correlation with GH, IGF–1, and IGFBP-3: An experimental study

Hypoxic-ischemic encephalopathy is still the most important problem in the developing countries that prenatal care is not good. Despite the fact that the improvements in neonatology in recent years continues, hypoxic-ischemic brain injury is still being the most common cause of permanent neurologic sequelae. The cellular energy failure, acidosis, glutamate and NO neurotoxicity, free radical formation, accumulation of Ca in the cell, and lipid peroxidation emerged after the hypoxic-ischemic brain injury are the reasons for the deterioration of the structural components of cell leading to death of it. The sensorimotor dysfunction and hormonal disorders due to the relationship of endocrine system of brain may also occur depending on the cellular death in the brain tissue.

Growth hormone, IGF–1 and IGFBP–3 are growth factors which have effects on many organs and metabolism in the body. GH, IGF–1 and IGFBP–3 are involved in many functions, such as regulation of growth, protein synthesis, regulation of blood sugar, and lipolysis. The lack of these hormones may cause early and late findings such as hypoglycemia, growth retardation, mental-motor retardation, and cognitive functions.

In our study, 16 baby-Sprague-Dawley rats were divided into two groups as hypoxic-ischemic (n = 8) and control (n = 8). According to Levine-Rice procedure, the right common carotid artery is permanently connected. The rats, exposed to high-dose 4% isoflurane anesthesia at the postischemic 15th day. After decapitation, GH, IGF–1 and IGFBP–3 serum samples were collected for studying and stored at -80 ° C. Brain tissue samples were removed for the histomorphological evaluation by using hematoxylin and eosin. Cresyl violet was used to identify the living neurons, and TUNEL staining for the apoptosis.

When hypoxic-ischemic group was compared with the control group, growth hormone and IGF–1 levels were significantly lower and it was a statistically significant ($p < 0.05$). Although the IGFBP–3 levels were significantly lower, the result was not statistically significant ($p > 0.05$).

Detecting serum levels of growth factors in patients exposed to the hypoxic-ischemic brain injury may have a predictive value on forthcoming cognitive functions and growth and development.

Keywords : Hypoxic-ischemic encephalopathy, Growth hormone (GH), insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3), insulin-like growth factor 1 (IGF-1), newborn

Supported by : None

Author : Md. Capt. Ömer KARTAL

Counselor : Md. Assoc.Prof.Col. Seçil AYDINÖZ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
SUMMARY	vi
İÇİNDEKİLER.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLO DİZİNİ	xiii
GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1.Hipoksik İskemik Ensefalopati.....	3
2.1.1.Tanım	3
2.1.2.Tarihçe	3
2.1.3.İnsidans	3
2.1.4.Etyoloji	3
2.1.5. İntrapartum hipoksemi tanı kriterleri.....	5
2.1.6.Fizyopatoloji.....	6
2.1.7.Klinik	8
2.2. Büyüme Faktörleri.....	11
2.2.1.Büyüme hormonu.....	11
2.2.2.İnsüline benzer büyüme faktörü -1	11
2.2.3.İnsüline benzer büyüme faktörü bağlayıcı protein-3.....	12
Gereç ve Yöntem	13
3.1.Yenidoğan sıçanda hipoksik-iskemik model	13
3.2.Çalışma dizaynı ve hipoksik iskemik beyin modeli	13
3.3. Büyüme hormonu ve faktörlerinin belirlenmesi.....	17
3.4.Histomorfolojik değerlendirme.....	17
3.5.In situ hücre ölümlerinin tespiti.....	18

3.6.Yaşayan nöronların belirlenmesi.....	18
3.7.Beyin volümü ölçümü.....	18
3.8.İstatistik	19
Bulgular	20
TARTIŞMA.....	35
SONUÇ ve ÖNERİLER.....	38
KAYNAKLAR	40

SİMGELER ve KISALTMALAR

>	: Büyüktür
<	: Küçüktür
≥	: Büyük Eşittir
≤	: Küçük Eşittir
%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
gr	: Gram
H ₂ O	: Su Molekülü
ml	: Mililitre
ng	: Nanogram
p	: Probability (Olasılık)
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
µm	: Mikrometre
AMPA	: α-amino-3-Hydroxyl-5-Methyl-4-Isoxazole-Propionate
APGAR	: Activity (Aktivite), Pulse (Nabız), Grimace (Refleks Yanıt), Appearance (Görünüm), Respiration (Solunum)
ATP	: Adenozin Trifosfat
CA1	: Hipokampus CA1 bölgesi
CA2	: Hipokampus CA2 bölgesi
CA3	: Hipokampus CA3 bölgesi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FADH	: Flavın Adenin Dinükleotid (Redükte)
DG	: Dentat Girus
ELİSA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ER	: Endoplasmik Retikulum
GH	: Büyüme Hormonu
GHRH	: Büyüme Hormonu Salgılatıcı Hormon
GHS	: Büyüme Hormonu Sekretegoları
Gr	: Gram

HI	: Hipoksik İskemik
HIIE	: Hipoksik İskemik Ensefalopati
IGF-1	: İnsüline Benzer Büyüme Faktörü 1
IGFBP-3	: İnsüline Benzer Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein 3
mGlu	: Metabotropik Glutamat
NADH	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Redükte)
NMDA	: N-methyl-D-aspartik asit
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
PDA	: Patent Duktus Arteriosus
SST	: Somatostatin
TUNEL	: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP Nick End Labeling
VDCC	: Voltage-Dependent Calcium Channel (Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanalları)
YÜDETAM	: Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deneysel Araştırma Merkezi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Hipoksik-iskemik ensefalopati patogenezi.	7
Şekil 3.1. Hipoksik –İskemik ensefalopati oluşturulan yenidoğan sıçanların basamak basamak uygulama için hazırlanması ve modelin oluşturulması.	14
Şekil 4.2. Normoksi ve HİE gruplarının ortalama serum IGF-1 düzeyleri	22
Şekil 4.4. Normoksi ve HİE gruplarının postnatal 22. gündeki ortalama.....	23
vücut ağırlıkları (gr).	23
Şekil 4.5. Normoksi ve HİE gruplarının postnatal 22. gündeki ortalama.....	24
beyin ağırlıkları (gr).	24
Şekil 4.6. TUNEL çalışması, beyin sağ hemisfer alanları. A: (X 20) büyütme	25
hipokampus. B:(X 40) büyütme korteks. C, D: (X40) büyütme hipokampus.	25
Şekil 4.7. Postnatal 22. günde normoksi ve HİE gruplarının.....	26
Şekil 4.8. Postnatal 22. günde normoksi ve HİE gruplarının.....	27
hipokampus ortalama TUNEL pozitif hücre dağılımları.....	27
Şekil 4.9. Postnatal 22. günde HİE grubun korteks ve.....	27
hipokampus ortalama TUNEL pozitif hücre dağılımları.....	27
Şekil 4.10. Kresil violet boyaması, (x40)'lık büyütme.....	28
Şekil 4.11. Postnatal 22. günde normoksi ve HİE gruplarının kresil violet yöntemi	31
kullanılarak yapılmış kortikal kesitlerinde yaşayan nöron sayıları.....	31
Şekil 4.12. Postnatal 22. günde normoksi ve HİE gruplarının kresil violet yöntemi kullanılarak yapılmış CA1 kesitlerinde yaşayan nöron sayıları.....	31
Şekil 4.13. Postnatal 22. günde normoksi ve HİE gruplarının kresil violet yöntemi	32
kullanılarak yapılmış CA2 kesitlerinde yaşayan nöron sayıları.	32
Şekil 4.14. Postnatal 22. günde normoksi ve HİE gruplarının kresil violet	32
yöntemi kullanılarak yapılmış CA3 kesitlerinde yaşayan nöron sayıları.....	32
Şekil 4.15. Postnatal 22. günde normoksi ve HİE gruplarının kresil violet yöntemi kullanılarak yapılmış DG kesitlerinde yaşayan nöron sayıları.	33
Şekil 4.16. Postnatal 22. günde normoksi ve HİE gruplarının ortalama beyin volüm oranları.	34

TABLO DİZİNİ

Tablo 2.1. Perinatal asfiksida multiorgan yetmezliği .	10
Tablo 4.1. Normoksi ve HİE grupların postnatal 7. gündeki ortalama vücut ağırlıkları.	20
Tablo 4.2. Normoksi ve HİE grupların ortalama serum GH, IGF-1	21
IGFB-3 değerleri.	21
Tablo 4.3. Normoksi ve HİE grupların postnatal 22. gündeki ortalama vücut ve beyin.	23
ağırlıkları.	23
Tablo 4.5. Postnatal 22. günde normoksi ve HİE grupların ortalama beyin volümleri.	34

GİRİŞ ve AMAÇ

Yenidoğanın önemli sorunlarından biri olan perinatal asfiksi ve buna bağlı olarak gelişen hipoksik iskemik ensefalopati intrauterin dönemde, doğum sırasında veya postnatal dönemde bebeğin hipoksi ve iskemide kalmasına bağlı olarak gelişmektedir. Hipoksik iskemik ensefalopati bebeklerin çoğunda hafif olmakla birlikte bazı vakalarda ağır seyretmekte ve sekeller bırakabilmektedir (1).

Patofizyolojik olarak akut dönemde selektif nöronal nekroz veya infarkt şeklinde gözlenen doku hasarını nöron, glia ve endotel hücre yapısının bozulması izlemektedir. İskemik hasarın merkezi bölgesinde özellikle nekrotik hücre ölümü gözlemlenirken penubra bölgesinde ise hücre ölümü özellikle apoptoz süreci üzerinden gerçekleşmektedir (2).

Hipoksik iskemik ensefalopati oksidatif metabolizmanın anaerobik metabolizmaya kayması ile başlar. Glikozun anaerobik yoldan yıkımı sonucunda hücrede NADH, FADH gibi redükte ajanlar ile laktik asit ve H^+ iyonları birikmeye başlar (3). Anaerobik glikoliz hücrenin enerji gereksinimini karşılayamadığı için ATP gibi yüksek enerjili fosfat rezervleri tüketilmeye başlar. Bunun sonucunda hücreler arasında iyon geçişini sağlayan ATP'ye bağımlı pompa fonksiyonları bozulur (4). Hücre içersinde Na^+ , Ca^{+2} , Cl^- ve su birikerek sitotoksik ödem meydana gelir. Hipoksi ve iskemi sonrasında membran potansiyelini koruyamayan nöronların depolarize olmaları sonucunda aşırı glutamat gibi eksitotoksik aminoasitlerin akson terminallerinden salınımı meydana gelir (5). Glutamat salınımı glutamat hücre reseptörlerini aktive ederek Na^+ ve Ca^{+2} iyonlarının hücre içersine girmesine neden olur (6). Membran fosfolipidlerinin dönüşümünün artması sonucu sitosol içersinde serbest yağ asitleri birikir. Mitokondri içersinde devam eden indirgenme reaksiyonlarının sonucunda serbest oksijen radikalleri oluşur ve sonuç olarak membran fosfolipidlerinin peroksidasyonu gelişir (5).

Reaksiyonun ürünü olarak açığa çıkan prostaglandin, ksantin, ürik asit ve Ca^{+2} sitozol içersinde birikmeye başlar. İntrasellüler depolardan (mitokondri ve endoplazmik retikulum) kalsiyumun serbest hale geçmesi ve plazma membranı boyunca geçişinin artması sonucunda Ca^{+2} miktarı sitoplazmada yüksek seviyelere ulaşır (7). Nitrik oksit sentaz hücre içersinde artan kalsiyum iyonları ile aktive olur ve sentezlenen nitrik oksit serbest radikal gaz olması nedeni ile difüzyon yolu ile diğer

hücrelere de rahatlıkla geçerek hücresel toksisiteye neden olmasının yanında nitrojen temelli serbest radikallerin oluşmasına da neden olarak hücre ölüm süreçlerini tetikler (2,8).

Beyin dokusunda meydana gelen bu hücresel ölümlere bağlı olarakta sensorimotor fonksiyon bozukluklarının yanında beynin endokrin sistemle olan ilişkisi nedeni ile hormonal bozukluklar da meydana gelebilmektedir (2). Büyüme hormonu, IGF-1 ve IGFBP-3 vücutta birçok organ ve metabolizma üzerine etkileri olan büyüme faktörleridir (9). Büyüme hormonu, IGF-1 ve IGFBP-3 büyümenin düzenlenmesi, protein sentezi, kan şekerinin düzenlenmesi ve lipoliz gibi birçok işlevde görev almaktadırlar (10). Bunların eksikliğine bağlı olarak hipoglisemi, büyüme geriliği, mental-motor ve kognitif fonksiyonlarda gerilik gibi erken ve geç dönem bulgular ortaya çıkmaktadır.

Biz bu çalışmada hipoksik iskemik ensefalopatili yenidoğan sıçanlarda hipoksiye en duyarlı alanlar olan korteks ve hipokampus beyin alanlarında hipoksik iskemik hasarı ve bunun büyüme faktörleri üzerine etkilerini araştırdık.

GENEL BİLGİLER

2.1.Hipoksik İskemik Ensefalopati

2.1.1.Tanım

Hipoksik iskemik ensefalopati fetus ve yenidoğan bebekte plasental ve pulmoner gaz değişiminin bozulması ile oluşan sistemik hipoksi ve serebral kan akımının azalması sonucu ortaya çıkan beyin zedelenmesidir (11, 12).

2.1.2.Tarihçe

İlk kez 1862 yılında J.W.Little tarafından yapılan çalışmalarda anormal perinatal olaylarla bunu izleyen nörolojik bozukluklar ve serebral hasar arasında ilişki olduğuna dikkat çekilmiştir (13,14).

Sarnat&Sarnat'ın 1970'li yıllarda yaptıkları çalışmalar sonucunda perinatal asfiksi tanımlamaları ve evrelemeleri çok önemli bir dönüm noktası olmuştur. 1980'li yıllarda özellikle Hill ve Volpe'nin fizyopatoloji ve nöropatoloji üzerinde yaptığı çalışmalar ışığında günümüzdeki yeni tedavi denemelerine kadar gelinmiştir.

2.1.3.İnsidans

Dünya Sağlık Örgütü tahminlerine göre gelişmekte olan ülkelerde tüm bebeklerin %3 kadarı (3.6 milyon) asfiksiden zarar görmektedir. Yenidoğanların %23'ü (840,000) asfiksi nedeni ölürken yaklaşık aynı sayıda bebekte de ciddi sekel gelişmektedir. Gelişmiş ülkelerde hipoksik iskemik ensefalopati sıklığı 1–2/1000 term yenidoğan olarak bildirilmektedir. Bu sıklığın çok daha yüksek olması beklenen gelişmekte olan ülkelere ait yeterli veri mevcut değildir. Hipoksik iskemik ensefalopati %20 antepartum, %35 intrapartum, %35 antepartum ve intrapartum ve %10 postpartum nedenlere bağlı gelişir (15,16).

2.1.4.Etyoloji

Hipoksik iskemik ensefalopati hipoksemi veya iskekiye bağlı nöronal dokuya giden oksijen ve glukozun yetersizliği sonucu gelişmektedir (17,18).

Perinatal periodda en önemli hipoksemi nedenleri (19):

1. İntrauterin plasental gaz değişimindeki bozukluğa bağlı asfiksi
2. Postnatal RDS veya tekrarlayan apneik periodlara bağlı gelişen respiratuar yetmezlik

3. Ciddi sağ-sol şanta bağlı persistan fetal dolaşım veya kalp hastalığı

Perinatal periodda en önemli iskemi nedenleri:

1. Natal ya da prenatal kardiyak yetmezlik, serebrovasküler otoregülasyon bozukluğuna bağlı asfiksi (hipoksemi, hiperkarbi ve asidoz)
2. Ciddi apne atakları, geniş PDA veya ciddi konjenital kalp hastalığına sekonder postnatal ciddi kardiyak yetmezlik
3. Patent duktus arteriozus veya vasküler kollapsa (sepsis v.b.) sekonder postnatal dolaşım yetmezliği

Hipoksik iskemik ensefalopatik hasarın antepartum, intrapartum ve/veya postnatal patogenezi rölatif olarak öneme sahiptir ve bunların oranlarına ilişkin net değerler vermek zordur (19,20). Geniş toplumsal gözleme dayalı bir çalışmada orta-ağır ensefalopati prevalansı her 1000 canlı term doğumda 1.64; tüm yenidoğan ensefalopatilerinin ise %56'sı intrapartum olaylara bağlı olarak gelişmiştir (19,20).

Primer olarak intrapartum HİE gelişimine yol açan faktörler (19,21):

- Akut plasental veya umbilikal kord yetmezliği (ablasyo placentae, kord prolapsusu v.b.)
- Uzamış doğum eylemi
- Anormal prezentasyon
- Müdahaleli doğum (Sezaryan, forseps ve vakum uygulaması)
- Uzamış doğum
- Prematüre doğum
- Mekonyum ile boyalı amniyotik sıvı
- Kötü kokulu amniyotik sıvı

Primer olarak postpartum HİE gelişimine yol açan faktörler:

- Ciddi persistan fetal dolaşım
- Ciddi tekrarlayan apneik ataklar
- Geniş PDA veya diğer konjenital kalp hastalıklarına bağlı kardiyak yetmezlik
- Ciddi pulmoner hastalık

Primer olarak antepartum HİE gelişimine yol açan faktörler:

- Maternal travma
- Maternal hipotansiyon
- Uterin kanama
- Maternal diyabet

- Preeklampsi
- Plasental vaskülopati
- İntrauterin büyüme geriliği
- İkiz gebelik

İntrapartum asfiksilerin 1/3' ünde yukarıdaki risk faktörleri tespit edilmiştir (19). Diyabetik anne bebeklerinin ise %27' sinde perinatal asfiksiye rastlanmış ve bu durumun nedeni olarak ise diyabetik vaskülopati düşünülmüştür (19,22).

Bozulmuş plasental fonksiyon ve artmış perinatal asfiksi riski infantta intrauterin büyüme ve gelişme geriliğine ve sonraki dönemde nörolojik disfonksiyona neden olabilmektedir (23,24,25). Yapılan fetal ve neonatal hayvan çalışmaları intrauterin büyüme geriliği olan fetustaki hipoksik stres için artmış duyarlılığın sadece plasental yetmezlikle değil aynı zamanda kalp, karaciğer ve beyindeki bozulmuş glukoz kullanımı ile de ilişkili olduğunu göstermektedir (24,25).

2.1.5. İntrapartum hipoksemi tanı kriterleri:

Temel kriterler (26,27):

1. Doğum anında alınmış fetal/neonatal umbilikal arter kanında pH<7 ve baz açığı ≥ 12 mmol/L
2. Erken başlangıçlı orta veya ciddi ensefalopati
3. İnfantın gestasyonel yaşı ≥ 34 hafta
4. Serebral palsy gelişimi: spastik kuadripleji veya diskinetik tip
5. Ensefalopatiji açıklayacak başka bir etyolojik faktör bulunmaması

Spesifik olmayan diğer kriterler:

1. Doğum ağrısı sırasında ya da öncesinde meydana gelen sentinel hipoksik durum
2. Hipoksik bir durumu takiben fetal kalp hızı paterninde değişiklik (ani, devamlı bradikardi veya değişken deselerasyonlar)
3. 5. Dakikada APGAR skorunun ≤ 3 olması
4. Erken gelişen multiple organ disfonksiyonu
5. Erken dönemde görüntüleme yöntemleri ile tespit edilmiş akut serebral ödem

2.1.6.Fizyopatoloji

Hipoksik iskemik olay sonrası beyin hasarı akut ve reperfüzyon hasarlanması olmak üzere iki aşamada olmaktadır. Hipoksik iskemik ensefalopatiadaki nörolojik hasarlanmanın altında yatan temel patogenetik mekanizma hipoksi ve/veya iskemi sonucu dokular için gerekli olan oksijen ve glukozun karşılanamamasıdır. Sonuç olarak primer enerji yetmezliği oluşmakta buna bağlı birtakım biyokimyasal kaskadlar aktiflenerek hücre disfonksiyonundan ölümüne kadar olan süreç başlamaktadır (19,28).

Reperfüzyon hasarı sonrası ortaya çıkan oksidatif stres zedelenmesi sonucu sıklıkla beyin metabolizması bozulmaktadır. Hipoksik iskemik ensefalopati sonrası glukoz ve enerji metabolizmasındaki değişiklikler primer ve sekonder enerji yetmezliği olarak iki faza ayrılır (29,30,31). Hipoksik iskemik ensefalopatiden hemen sonra (primer enerji yetmezliği fazı) oksijen yetmezliğine bağlı oksidatif fosforilasyon azalır ve sonuç olarak anaerobik metabolizmaya kayma olur. Fosfokreatin ve ATP gibi yüksek enerjili fosforile bileşikler azalır (32). Dokularda laktat ve H^+ iyonu birikimi olur.

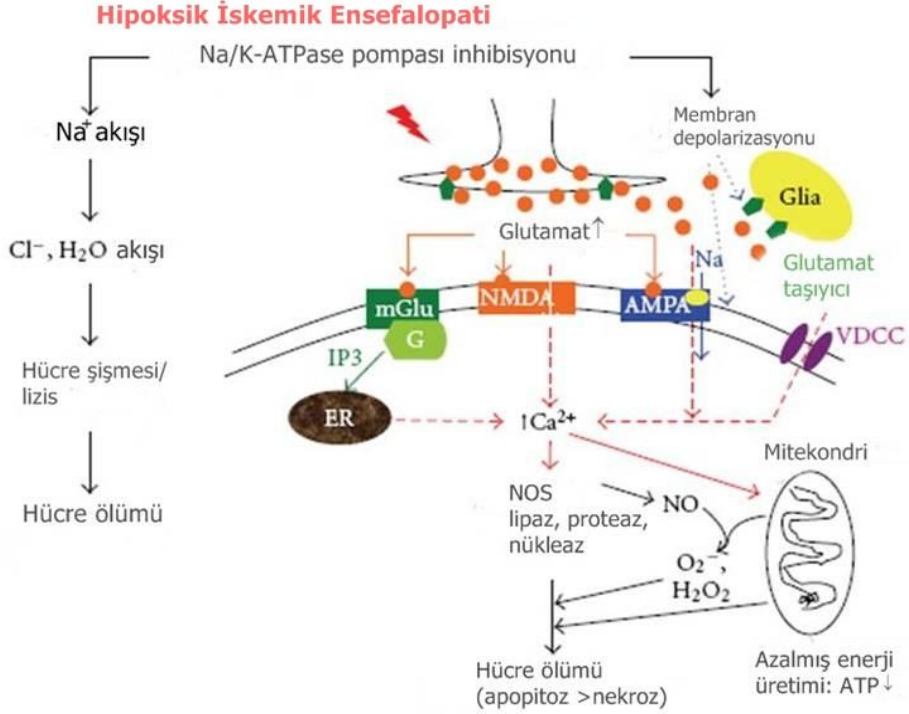
Laktat ve H^+ birikimi başlangıçta oksijenin azalmasına adaptasyon sağlar. Ancak laktat birikiminin artması ile beraber zararlı etkileri görülmeye başlar:

1. Vasküler otoregülasyon bozulur, iskemik hasarın artmasına yol açar
2. Düşük pH fosfofruktokinaz aktivitesinin düşmesine neden olur
3. Hücrel hasara neden olan biyokimyasal kaskad aktiflenir (33)

Sekonder enerji yetmezliğinin başlangıcı hasarın şiddetine bağlı olarak yaklaşık 8–16 saat sonra ortaya çıkmakta bu süre nadiren 24–48 saate uzayabilmektedir. Yüksek enerjili fosfat seviyeleri reperfüzyon ve reoksijenasyon sonrası iki-üç saat gibi kısa süreliğine yükselmekte sonraki 48 saatte ise ikinci azalma olmaktadır (34, 35,36).

Hücrede enerji depolarının boşalması ile hücre zarında bulunan Na/K-ATPase pompası inhibe olur. Hücre içinde sodyum ve kalsiyum iyon konsantrasyonları ve H_2O artar (37) (Şekil 2.1). Sonuçta membran depolarizasyonu, glutamat gibi eksitator nörotransmitterin aşırı salınımı, artmış sitozolik kalsiyum, fosfolipaz aktivasyonu ve serbest radikal artışı meydana gelir (38). Son iki dekadaki

HİE üzerine yapılmış çalışmalar hücre ölümü üzerine glutamatın çok önemli rolü olduğunu göstermektedir (39,40). Glutamat beyindeki predominant eksitator



Şekil 2.1. Hipoksik-iskemik ensefalopati patogenezi. AMPA: α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate; ER: Endoplasmik retikulum; mGlu: metabotropik glutamat; NMDA: N-methyl-D-aspartik asit; NOS: Nitrik oksit sentaz; VDCC: Voltaj bağımlı kalsiyum kanalları.

aminoasit nörotransmitterdir. Üç tip inotropik reseptörü vardır: NMDA, AMPA ve G protein bağımlı metabotropik glutamat reseptör. Hipoksik iskemik ensefalopati ekstrasellüler glutamat konsantrasyonunun artmasına ve glutamat reseptörlerinin aktiflenmesine yol açarak eksitotoksik kaskadı başlatır (41). Voltaj bağımlı kalsiyum kanalları, NMDA ve AMPA' nın uyarılması ile hücre içi kalsiyum depoları salınır ve serbest kalsiyum hızlı bir şekilde artar. Hücre içi kalsiyumun artması ile birlikte nöronal NO sentetaz (NOS) NO yapımına yol açar. NO moleküler oksijen ile reaksiyona girerek DNA hasarı ve membran lipid oksidasyonuna yol açan süperoksit, peroksit ve peroksinitrit serbest radikallerini oluşturur (42). Ayrıca hücre içi kalsiyumun artması ile sellüler lipid hasarına neden olan fosfolipazlar ve DNA hasarına neden olan nükleazlar aktiflenir. Bunlar apoptozun potansiyel indükleyicisidirler (43,44,45,46).

İlk görülebilir değişiklik nöronda sitoplazmik vakuolizasyondur. Hipoksinin başlangıcından itibaren 5–30 dakika içinde oluşur. Matür ve immatür beyinde hücrelerin hipoksik-iskemik hasara duyarlılığı nöron > oligodentrogia > astrosit > mikrogia şeklindedir (47). Yue ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada apoptotik hücrel ölüm immatür beyinde baskınken, nekrotik ölüm ise matür beyinde daha baskın bulunmuştur (48,49). Neonatal HİE nöronal nekrozun bölgesel özelliğine göre üç tipe ayrılır:

(1) Diffüz tip

(2) Baskın olarak serebral neokorteks, hippocampus ve serebral-derin çekirdeğin etkilendiği tip

(3) Baskın olarak bazal ganglion-talamus, derin çekirdek-beyin kökünün etkilendiği tip

Dolayısıyla HİE sonucu beyindeki etkilenen alanın yeri ve hasarın şiddetine göre klinik ve nöroendokrin sonuçlar ortaya çıkmaktadır (50).

2.1.7.Klinik

Perinatal asfiksi sonrasında klinik bulgular asfiksini şiddeti, süresi, nörolojik tutulumun yeri, diğer sistemlerin etkilenme dereceleri ve yerleri, infantın gestasyon yaşı ile ilişkilidir.

Hafif derecede asfiksi yaşamış bir infantın fizik muayenesinde genellikle sempatik hiperaktiviteye bağlı hiperirritabilite, derin tendon reflekslerinde artma ve abartılı moro refleksi tespit edilir. Bu semptomlar genellikle 24 saatten uzun sürmez.

Orta derecede asfiksi yaşamış bir infant genellikle letarjik görünümündedir, hipotoniktir ve derin tendon refleksleri azalmıştır (51). Genellikle konvülziyon da görülür. Volpe doğum sonrası asfiksi sürecini, 12'şer saatlik dilimler şeklinde 72 saat ve sonrası bölümler olarak inceler (52).

Ağır derecede asfiksi yaşamış infantın bulguları, birbirini izleyen dönemler halinde değişir. Bu sınıflamaya göre doğumdan sonraki ilk 12 saatte infant stupor veya koma halindedir; periyodik solunum veya irregüler soluma hareketleri vardır (46,47). Işığa pupil yanıtı normaldir ve spontan diskonjuge göz hareketleri mevcuttur. Diffüz bir hipotonisite ile birlikte yenidoğan refleksleri baskılanmıştır. Ağır asfiksi yaşamış infantların %50-60'ında ilk 6–12 saat içinde konvülziyon görülür (53,54).

Bunu izleyen 12–24 saatte bilinç düzeyi bir miktar gelişme gösterebilir ancak şuur açılmaz. İnfantta genel bir hiperirritabilite mevcuttur. İnfantların %15–20’ sinde konvülsiyonlar bu dönemde başlar ve status epileptikus gelişebilir (53,54). Beyin sapı bozukluğuna bağlı olarak apneik nöbetler gelişebilir ve infant solunum desteğine ihtiyaç duyabilir. Motor güçsüzlük beklenmekle birlikte, bu dönemde değerlendirilmesi zordur.

Beyin ve beyin sapı fonksiyonları 24’üncü saatten sonra giderek bozulur; infant derin komaya girebilir ve beraberinde solunum arresti de izlenebilir. Pupil refleksi ve okülosefalik refleks alınamaz. Ölüm 24–72 saatlik bu dönemde sıktır (55).

Eğer infant 72 saat boyunca hayatta kaldıysa, izleyen gün ve haftalar içinde olumlu gelişmeler göstermesine rağmen şuuru tam açılmaz ve hafif bir stupor hali devam eder. Ekstremiteler genellikle hipotoniktir (nadiren hipertonsite görülebilir); emme yutma hareketleri zayıf ve koordinasyon bozuk olduğundan sıklıkla beslenme problemleri ile karşılaşılır (56). Kafa çiftlerinin kaslarla ilgili olanlara (N. trigeminus, N. vestibulocohlearis, N. glossopharyngeus, N. vagus, N. hypoglossus) ait belirtiler saptanabilir (57). Bu hastaların klinik seyri değişkendir. İyileşme miktarını ve süresini tahmin etmek son derece zordur. Bu yüzden en az bir yıl yakın takipleri önerilmektedir (58,59).

Hipoksik iskemik ensefalopati ile sonuçlanacak kadar intrapartum hipoksi de olan bebekte multiorgan sistem disfonksiyonuna ait diğer bulgular da saptanabilir (Tablo 2.1). Çoklu organ disfonksiyonu kalpten pompalanan kan miktarının cilt, kas, böbrek, akciğer, karaciğer ve gastrointestinal sistemde azaltılarak kalp, beyin ve adrenal bezlere yönlendirilmesinden kaynaklanır (60, 61).

Sarnat ve Sarnat 1976 yılında nörolojik bulguları skorlayarak ensefalopatiyi derecelendirmişlerdir. Günümüzde de kullanılmakta olan bu skora ile ensefalopati hafif (evre I), orta (evre II), şiddetli (evre III) olarak derecelendirilmekte ve prognoz konusunda fikir verici olmaktadır. Evre I ensefalopati tamamen düzelir, evre II de iyileşen grupta bulguların normale dönmesi 7–10 günde olur, sekel oranı %25’ dir, evre III’ün neredeyse tümünde sekel ya da mortalite vardır.

Tablo 2.1. Perinatal asfikside multiorgan yetmezliği (62).

Sistem/organlar	Komplikasyonlar
Kardiyovasküler	miyokard hasarı, kardiyojenik şok, kalp yetmezliği, disritmiler, hipotansiyon
Pulmoner	pulmoner hipertansiyon, respiratuvar distres, şok akciğeri, pulmoner ödem, hemoraji
Renal	renal yetmezlik, asfiktik mesane sendromu, uygunsuz ADH
Gastrointestinal	hepatik hasara bağlı kolestaz, hipoalbuminemi, pıhtılaşma disfonksiyonu, NEK
Hematolojik	trombositopeni, DIC, polisitemi
Metabolik	hipoglisemi, hipokalsemi, termoregulasyon bozukluğu, laktik asidoz
SSS	konvülziyonlar, serebral ödem, nekroz, hemoraji, hipotoni, hipertoni

2.2. Büyüme Faktörleri

2.2.1.Büyüme hormonu

Postnatal büyümeyi düzenleyen en önemli hormon büyüme hormonudur. Büyüme hormonu büyüme ve metabolizma üzerine önemli etkileri olan bir polipeptid hormondur (63). Ön hipofizin somatotrop hücrelerinden sentez edilir. Sadece iskelet ve organ büyümesini uyarmaz ayrıca hücre içi aminoasitlerin protein sentezine girmelerini hızlandırır, yağ dokusundan mobilizasyonu artırır ve insülinin yağ dokusu ve iskelet kası üzerine olan etkisini antagonize eder (64,65). Salınımı hipotalamus kontrolündedir. Büyüme hormonunun temel düzenleyicileri büyüme hormonu salgılatıcı hormon (GHRH) , büyüme hormonu sekretegogları (GHS), somatostatin (SST) dir (64,65). Büyüme hormonu salgılatıcı hormon salgılayan nörosekretuar hücreler ventromedial çekirdekte bulunurlar (66,67).

Büyüme hormonu anabolik, lipolitik ve diyabetojeniktir. Büyüme hormonu karbonhidrat yerine enerji substratı olarak yağ kullanımını artırmaktadır (68).

2.2.2.İnsüline benzer büyüme faktörü 1

İnsüline benzer büyüme faktörlerinin çoğu IGFBP-3' e bağlanırlar. İnsüline benzer büyüme faktörleri ve bağlayıcı proteinleri büyüme hormonu eksikliğinde azalır ve fazlalığında artarlar (64). İnsüline benzer büyüme faktörleri büyüme ve metabolizma için gerekli, önemli metabolik ve mitojenik faktörlerdir. İnsüline benzer büyüme faktörleri hücre çoğalmasında etkilidirler. Ayrıca otokrin ve parakrin etkilerinin olduğu düşünülmektedir. Kemik, beyin, prostat, kas, meme gibi dokularda büyüme ve farklılaşmadan sorumlu olduğu düşünülmektedir (69). İnsüline benzer büyüme faktörü-1 geni yok edilmiş fareler doğumda küçüktür (normalin %40'ı kadar). Bunlar doğum sonrasında da ağır büyüme duraklaması gösterirler. Büyüme hormonu eksik olan fareler ise in utero normal büyür ve postnatal büyüme geriliği gösterirler (64,70).

İnsüline benzer büyüme faktörü-1 nöron yaşamını, nöron büyümesini ve sempatik, sensöral, kortikal ve motor nöronlar için in vitro protein sentezini artırır. Nöronlar ve oligodendrositlerin mitozunu, farklılaşmasını ve maturasyonunu artırdığı da görülmüştür (71).

Büyüme hormonu ve IGF–1 apoptotik hücre ölümünü engeller (72). İnsüline benzer büyüme faktörlerin nörotropik oldukları ve aksonal büyümeyi geliştirdikleri gösterilmiştir. İnsüline benzer büyüme faktörü–1 antiapoptotik gen bcl-x' i indükleyerek, interlökin dönüştürücü enzimi deaktif ederek ve inositoltrifosfat intrasellüler uyarı kaskadını aktive ederek nöronal apoptozisi güçlü bir şekilde inhibe eder. Ayrıca IGF beyin gelişiminin düzenlenmesinde ve matür beynin normal hücre fonksiyonunun devamında önemli rol alır (71).

2.2.3.İnsüline benzer büyüme faktörü bağlayıcı protein-3

İnsüline benzer büyüme faktörü bağlayıcı proteinler IGF lerin hücre üzerindeki proliferatif ve mitojenik etkilerinin modülasyonunu sağlarlar (73).

IGFBP–3 en önemli IGF bağlayıcı proteindir.

Türk neonatoloji derneğinin yaptığı bir çalışmada HİE sonrası takip edilen hastaların %31' inde hipoglisemi, %65,6' sında nörolojik disfonksiyon ve büyüme geriliği tespit edilmiştir (59).

Hipoksik iskemik ensefalopatili yenidoğanların uzun dönem takiplerinde etkilenmenin derecesine bağlı olarak hipoglisemi, büyüme geriliği, mental-motor ve kognitif fonksiyonlarda gerilik gibi komplikasyonlar görülebilmektedir (61,74).

Biz bu çalışmada hipoksik iskemik ensefalopatili yenidoğan sıçanlarda hipoksiye en duyarlı alanlar olan korteks ve hipokampus beyin alanlarında hipoksik iskemik hasarı ve bunun büyüme faktörleri üzerine etkilerini araştırdık.

Gereç ve Yöntem

3.1.Yenidoğan sıçanda hipoksik-iskemik model;

Çalışma için Yeditepe Üniversitesi Etik Kurul'undan izin alındı. Deney hayvanları Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deneysel Araştırma Merkezinden (YÜDETAM) temin edildi. Çalışma Yeditepe Üniversitesi Fiziyojji Anabilim Dalı, Beyin araştırmaları Laboratuvarında yapıldı. Perinatal hipoksi ile oluşturulan beyin hasarı patogenezinin ve vücutta meydana getirdiği değişikliklerin anlaşılması amacıyla çalışmada 16 adet yedi günlük 11,9-18,4 gram ağırlığında Sprague-Dawley sıçan yavrusu kullanıldı. Sıçanların beslenme ve bakımında "The National Institutes of Health Guidelines" kuralları dikkate alınmış olup sıçanlar 12 saat gece /12 saat gündüz olan 21°C ısı ve % 65 nemli oda koşullarında barındırıldı. Üretime alınan anne sıçanlar standart yem ve su ile beslendi. Aynı anneden doğan yenidoğan sıçanlar aynı kafes içinde hipoksi sonrasında da anneleri ile beraber tutuldu. Deney hayvanlarının gruplandırılmasında aynı annenin yavrularının, anne sütü miktarı ve yavru sayısının çalışmayı en az düzeyde etkilemesi amacıyla çalışmada kullanılan gruplara eşit olarak bölünmesi dikkate alındı.

3.2.Çalışma dizaynı ve hipoksik iskemik beyin modeli;

Yavru sıçanlar (n=16) Sham operasyonu yapılmış kontrol grubu (n=8) ve Hipoksik-iskemi grubu (n=8) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Hipoksik-iskemik ensefalopati oluşturma amacıyla yedi günlük sıçanlara isofluorane (%30 O₂, %69 N₂O ve %1 isofluorane) ile anestezi uygulandı. Anestezi sırasında sıçanların vücut ısılarının düşmemesi amacıyla rektal probe kullanılarak homeotermik battaniye ile vücut ısıları 37,0 ± 0,5 °C'de sabit tutuldu. Levine-Rice prosedürüne göre boyun orta hattında longitudinal planda 0,5 cm lik bir deri kesisi yapıldı. Trakeanın üzerindeki orta hattan parotis bezlerinin kenara diseksiyonu sonrasında sağ ana karotid arteri kenar doku ve vagus sinirinden izole edilerek kalıcı olarak bağlandı. Açılmış olan deri kesisi 5-0'lık ipek ile dikildikten sonra model gereği hipoksi uygulanmasına kadar 60 dakika 37,0 ± 0,5 °C'lik battaniye üzerinde rektal prob kullanılmaksızın bekletildi (Şekil 3.1). Karotid arter bağlanmasını takip eden 60 dakika beklenme aşaması sonrası, hipoksik-iskeminin oluşturulması amacıyla, sıçan yavruları 120 dakika için kendi hazırladığımız ve iç ortam ısısu banyosu ile 37,0 °C sabit tutulan hipoksi kavanozlarına alındı. Hipoksinin uygulanması amacıyla sıçanlara 120 dakika

boyunca %8 O₂ ve %92 N₂O verildi. Bu süreç sonrası tüm yavrular annelerinin yanına tekrar konuldu.

Postiskemik 15. günde sıçanlar yüksek doz %4'lük isofluorane anestezisi ile uyutularak dekapite edilip çalışma sonlandırıldı. Dekapitasyon sonrası GH, IGF-1, IGFBP-3 büyüme faktörleri çalışmak amacıyla serum örnekleri alınarak -80°C de saklandı. Beyin dokuları ise çıkarılarak ağırlıkları tartılıp hızlı bir şekilde %10 tamponlu formalin içine konularak fikse edildi. Daha sonra beyin dokuları histomorfolojik değerlendirme amacıyla hemotoksilen eosin, yaşayan nöronların belirlenmesi amacıyla kresil violet ve apoptozun belirlenmesi amacıyla TUNEL boyamalarında kullanıldı.

Şekil 3.1. Hipoksik-iskemik ensefalopati oluşturulan yenidoğan sıçanların basamak basamak uygulama için hazırlanması ve modelin oluşturulması. A. 7 günlük Sprague-Dawley sıçan yavruları B. Operasyon mikroskobu altındaki cilt görüntüsü C. Cilt kesisi görüntüsü D. Cilt altı alandaki yağ dokusu temizlenip sağ A. Ana karotid arterin ortaya çıkarılması E-F. Sağ ana karotid arterin ligate edilmesi G. Sağ ana karotid arterin izolasyonu H. Mikrocerrahi sonrası cildin kapatılması I. Hipoksi kavanozları J. Homeothermik battaniye K-L. Oksimetre

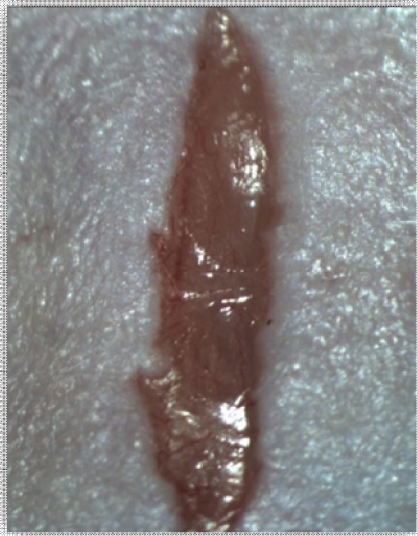
A.



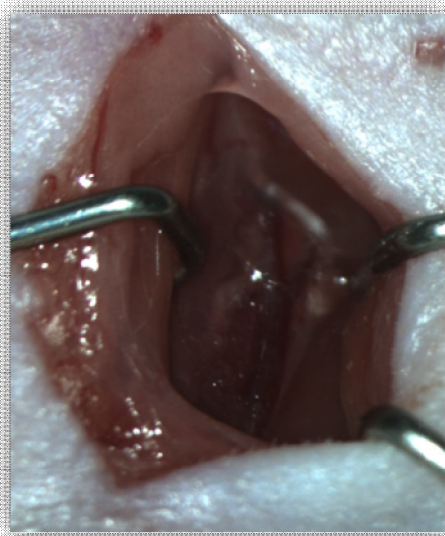
B.



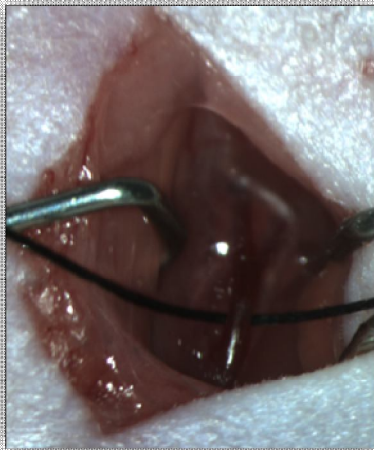
C.



D.



E.



F.



G.



H.



I.



J.



K.



L.



3.3. Büyüme hormonu ve faktörlerinin belirlenmesi:

Dekapitasyon sonrası alınan serum örneklerinde ELİSA yöntemi ile GH (Invitrogen, *Rat Growth Hormone*, KRC5311), IGF-1 (Bio Vendor, *Rat IGF-1*, RMEE25R) ve IGFBP-3 (Bio Vendor, *Rat IGFBP-3*, RMEE031R) düzeylerine bakıldı.

3.4.Histomorfolojik değerlendirme:

Beyin dokuları çıkarılarak ağırlıkları tartılıp hızlı bir şekilde % 10 tamponlu formalin içine konularak fikse edildi. Fiksasyon sonrası beynin frontal ucundan itibaren iki mm'lik aralıklar ile belirlenen dört bölgesinin örneklenmesi amacıyla matriks içersine konarak koronal kesitler alındı. Doku takibi sonrası parafin bloklar hazırlandı. Korteks, hipokampus alanlarını içeren kesit elde edilmesi için mikrotom (Leica RM 2255, Leica Instrument, Nussloch, Germany) ve tek kullanımlık metal mikrotom bıçağı (Type R 35, Feather Company, Osaka, Japan) kullanılarak dört µm'lik kesitler alındı. Kesitler histomorfolojik değerlendirme amacıyla hemotoksilen eosin, yaşayan nöronların belirlenmesi amacıyla kresil violet ve apoptozun belirlenmesi amacıyla TUNEL boyamalarında kullanıldı.

3.5.In situ hücre ölümlerinin tespiti:

Deoksiribonükleik asit kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar. Apoptozisin belirlenmesi amacı ile TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) tekniğinden yararlanılmış ve TUNEL çalışması için ApopTag Peroxidase ISOL Apoptosis Detection Kit kullanılmıştır.

TUNEL Tekniği: Lamlar, 12 saat 37°C'lik etüvde bekletildikten sonra deparafinizasyona alındı. Deoksiribonükleik asit etrafındaki proteinlerin yıkımı amacıyla 20 µg/ml proteinaz K ile 15 dakika oda ısısında lamlar bekletildi. Açığa çıkan DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) aracılığı ile biotin ile işaretlenmiş ve işaretlenmemiş deoksinükleotidler eklendi. Daha sonra biotin ile işaretlenmiş nükleotidler, streptavidin-horseradish peroksidaz konjugatı ile tespit edildi. Diaminobenzidine (DAB)' la kahverengi boyanan TUNEL pozitif hücreler işaretlendi. Metil yeşili ile ters boyama yapılarak işlem sonlandırıldı. TUNEL pozitif hücreler bu modelde hipoksik koşullara en duyarlı olan CA1, CA2, CA3, girus dentatus ve korteks alanlarında ışık mikroskobu (olypus BX53 DP 71) 200x kullanılarak sayıldı.

3.6.Yaşayan nöronların belirlenmesi:

Sinir hücrelerinde nissl cisimciklerinin gösterilmesi amacıyla koronal kesitlere 15 dk. 0.1% kresil violet (sc-214775, Santa Cruz) boyası uygulandı. Daha sonra sırayla her biri bir dakika olmak üzere %50, %70, %90, %95 ve %100 lük alkol ile yıkandıktan sonra Xylen ile muamele edilip lamlar lamel ile kapatıldı. Yaşayan nöronlar hipoksik koşullara en duyarlı olan CA1, CA2, CA3, girus dentatus ve korteks alanlarında her bir bölgeden 250 µm'lik aralıklar ile üçer bölgede sayma karesi (62,500 µm²) kullanılarak ışık mikroskobu (Nikon E 200) altında 40x objektif kullanılarak sayıldı.

3.7.Beyin volümü ölçümü:

Hematoksilen eozin ile boyalı lamlar tarayıcı (HP Scanjet Professional 3000 L2723A) ile bilgisayar ortamına aktarıldı. Image J 1.45s programı kullanılarak hipoksik iskemik beyinde meydana gelen volüm değişimi ölçüldü.

3.8.İstatistik

Çalışmada iki grup kullanılması nedeni ile **Independent-Samples T Test** standart programı (SPSS 18 for Windows; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanılmıştır. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak hesaplanmış olup $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

Bulgular

Çalışma dört farklı anneden ortalama ağırlıkları HİE: $14,83 \pm 1,99$ gr; normoksik: $15,21 \pm 1,53$ gr, yedisi dişi olan yedi günlük 16 yenidoğan sıçan kullanıldı (Tablo 4.1). Her anneye ait yavruların gruplara eşit olarak dağıtılmasına dikkat edilerek, çalışmayı oluşturan normoksi ve hipoksik-İskemik gruplarında sekizer sıçan yavrusu kullanıldı. Gruplar arasında cinsiyet ve ağırlık açısından istatistiksel bir farklılık tespit edilmedi ($p > 0.05$).

Doğumu takiben yedinci günde uygulanan hipoksi ve iskemi sonrası postiskemik 15. günde sıçanların dekapitasyonu sonrası elde edilen kan ve takiben santrifüj sonrası elde edilen serumlarından GH, IGF-1, IGFBP-3 düzeyleri belirlendi. Normoksi ve HİE grupları arasında GH ve IGF-1 düzeyleri karşılaştırıldığında her iki grup arasında istatistiksel olarak belirgin fark bulundu ($p < 0.05$) (Tablo 4.2), (Şekil 4.1;4.2). Serum IGFBP-3 düzeyleri ise HİE grubunda daha düşük bulunmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunamadı ($p > 0.05$) (Şekil 4.3).

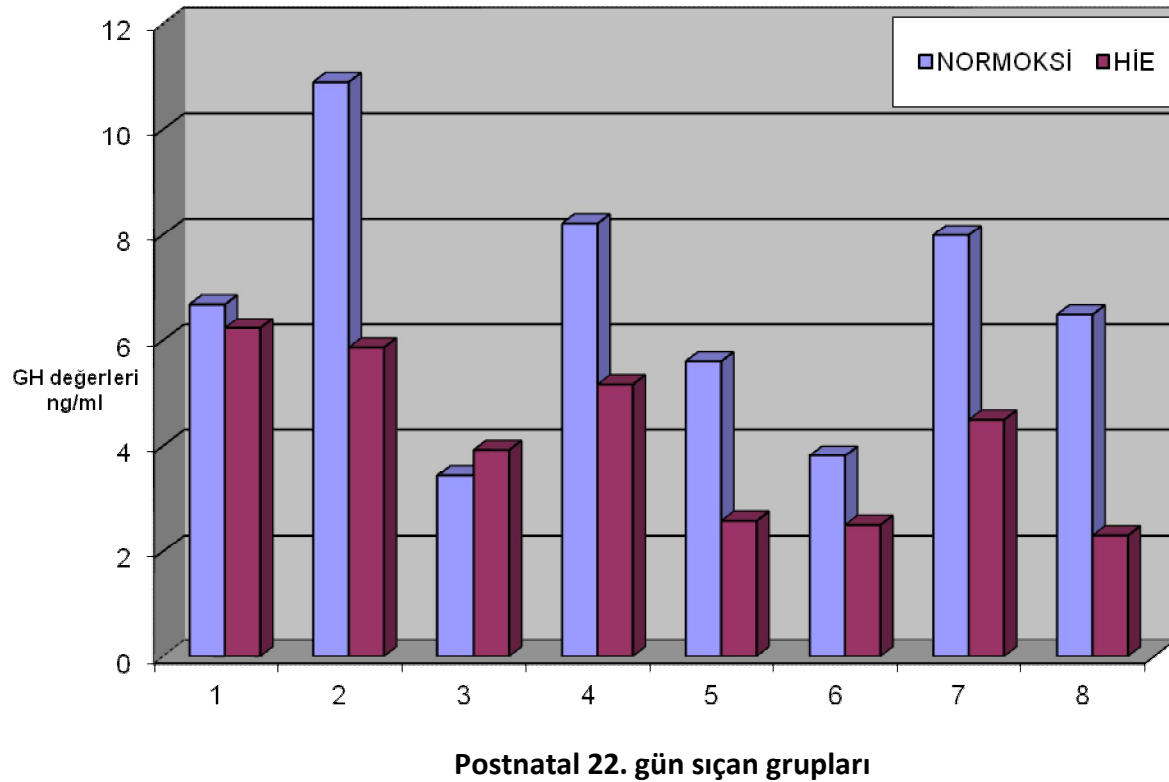
Tablo 4.1. Normoksi ve HİE grupların postnatal 7. gündeki ortalama vücut ağırlıkları.

	Gruplar	N	Ortalama	p
Vücut Ağırlığı 7.Gün	HİE	8	$14,83 \pm 1,99$	> 0,05
	NORMOKSI	8	$15,21 \pm 1,53$	

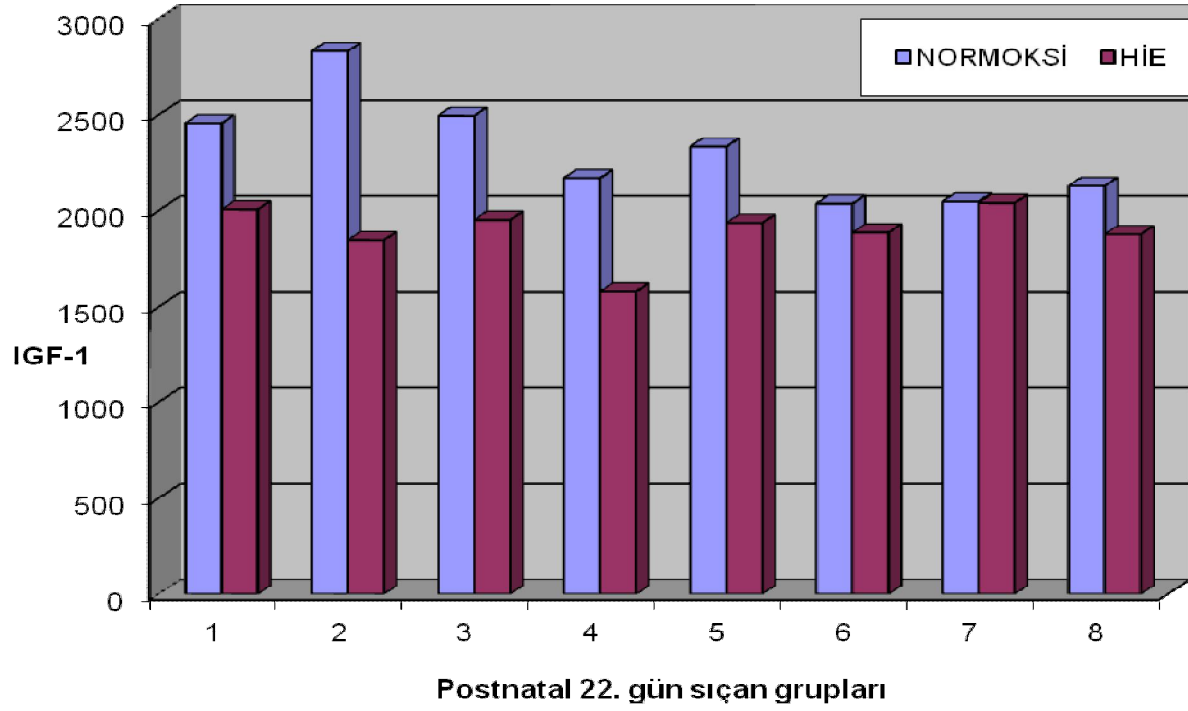
Tablo 4.2. Normoksi ve HİE grupların ortalama serum GH, IGF1, IGFB3 değerleri.

		N	Ortalama(ng/ml)	p
GH	Normoksi	8	6,64 ± 2,46	0,036
	HİE	8	4,13 ± 1,56	
IGF1	Normoksi	8	2311,59 ± 274,55	0,001
	HİE	8	1889,43 ± 141,83	
IGFB3	Normoksi	8	180,28 ± 35,59	0,082
	HİE	8	137,35 ± 35,49	

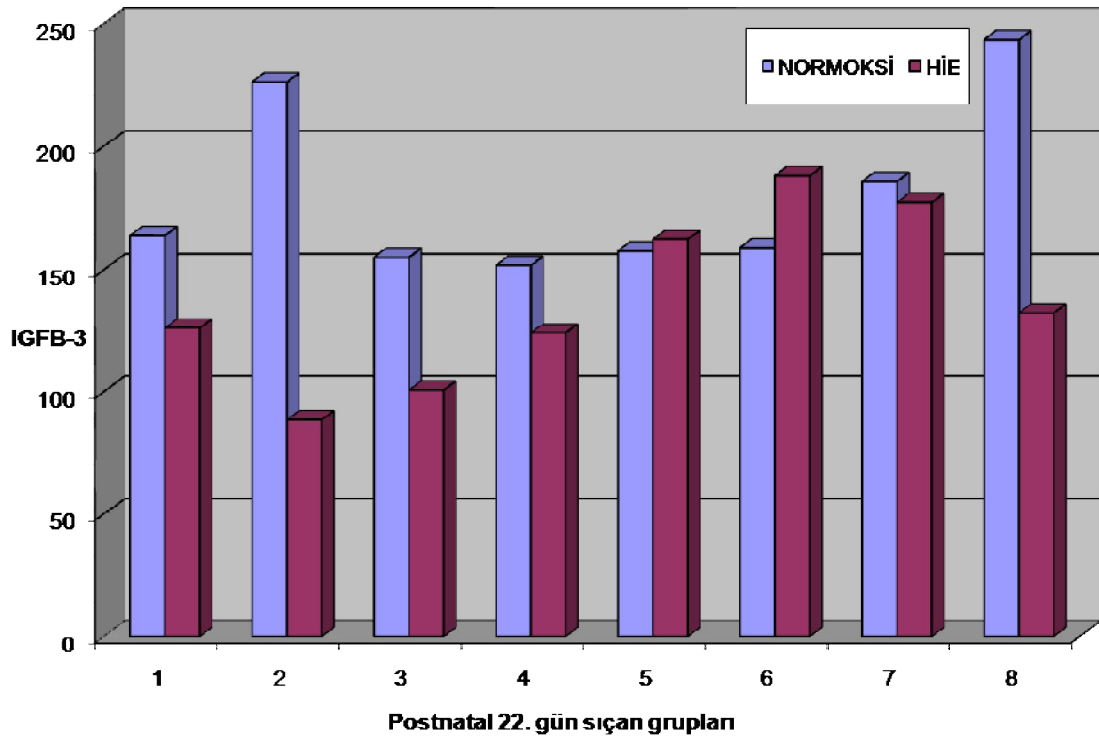
Şekil 4.1. Normoksi ve HİE gruplarının ortalama serum GH düzeyleri (ng/ml).



Şekil 4.2. Normoksi ve HİE gruplarının ortalama serum IGF-1 düzeyleri (ng/ml).



Şekil 4.3. Normoksi ve HİE gruplarının ortalama serum IGFB-3 düzeyleri (ng/ml)

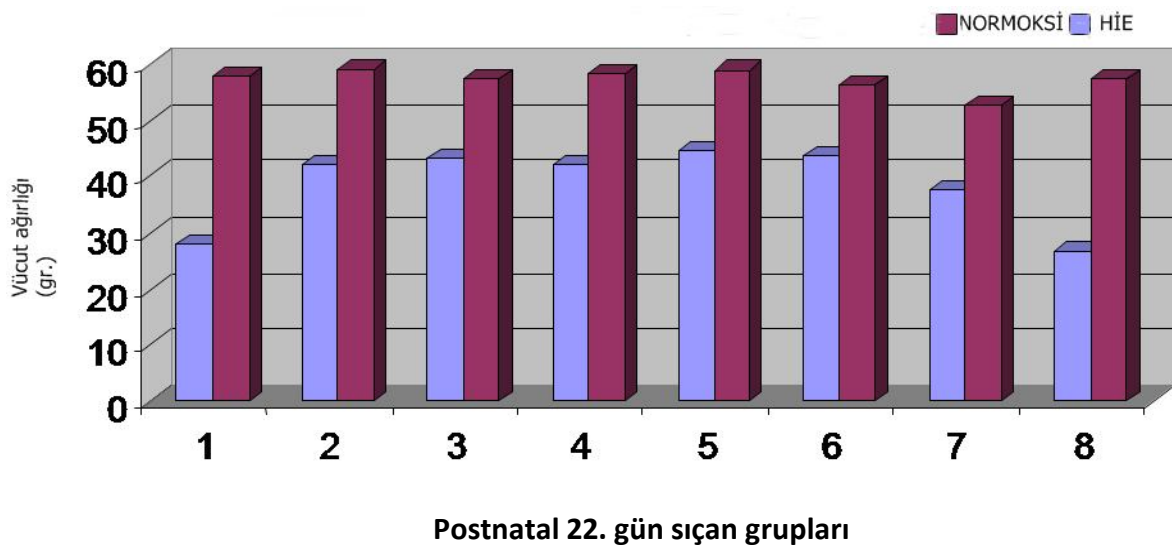


Yaşamlarının 22. Gününde dekapitasyon öncesi HİE ve normoksik grupların vücut ağırlıkları ölçüldü. Ortalama vücut ağırlıkları sırayla $38,56 \text{ gr} \pm 7,14$; $57,31 \text{ gr} \pm 2,06$ bulundu. Ortalama vücut ağırlığı HİE grupta normoksik gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük bulundu ($p < 0.05$) (Tablo 4.3) (Şekil 4.4).

Tablo 4.3. Normoksi ve HİE grupların postnatal 22. gündeki ortalama vücut ve beyin ağırlıkları.

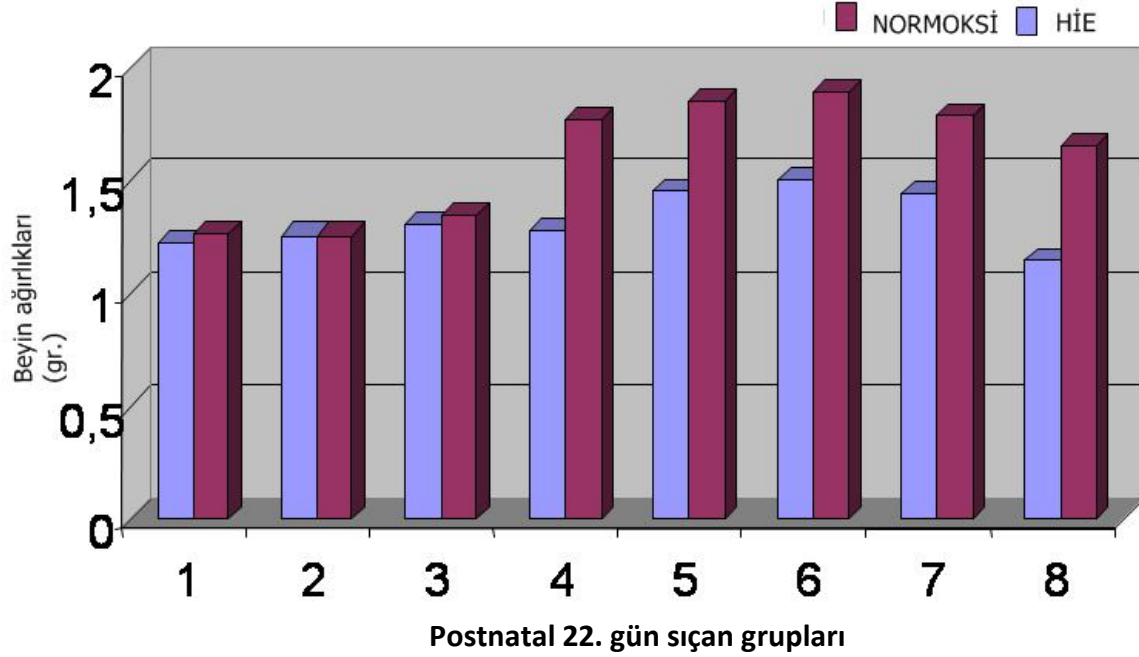
	Gruplar	N	Ortalama	p
Vücut Ağırlığı 22.Gün	HİE	8	$38,56 \pm 7,14$	< 0,05
	NORMOKSİ	8	$57,31 \pm 2,06$	
Beyin Ağırlığı 22.Gün	HİE	8	$1,33 \pm 0,13$	< 0,05
	NORMOKSI	8	$1,61 \pm 0,27$	

Şekil 4.4. Normoksi ve HİE gruplarının postnatal 22. gündeki ortalama vücut ağırlıkları (gr).



Normoksik ve HİE gruptan postiskemik 15. günde dekapitasyon sonrası bütünlüğü bozulmadan alınan beyin dokuları tartılarak %10 tamponlu formalin içinde fikse edildi. Sırasıyla ortalama beyin ağırlıkları $1,33 \text{ gr} \pm 0,13$; $1,61 \text{ gr} \pm 0,27$ olarak bulundu. Ortalama beyin ağırlığı HİE grupta normoksik gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük bulundu ($p < 0.05$) (Tablo 4.3) (Şekil 4.5).

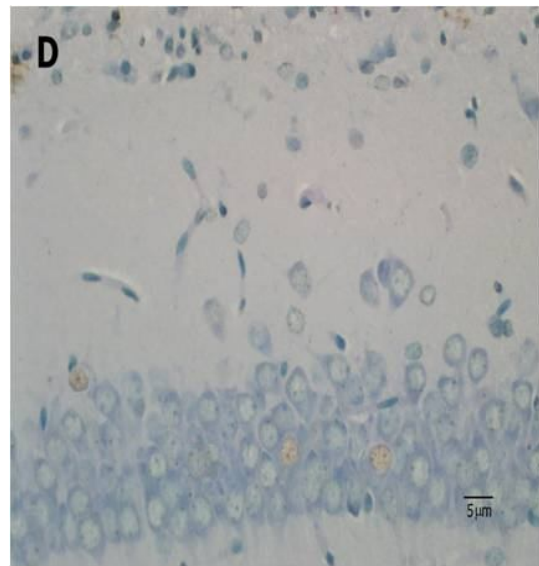
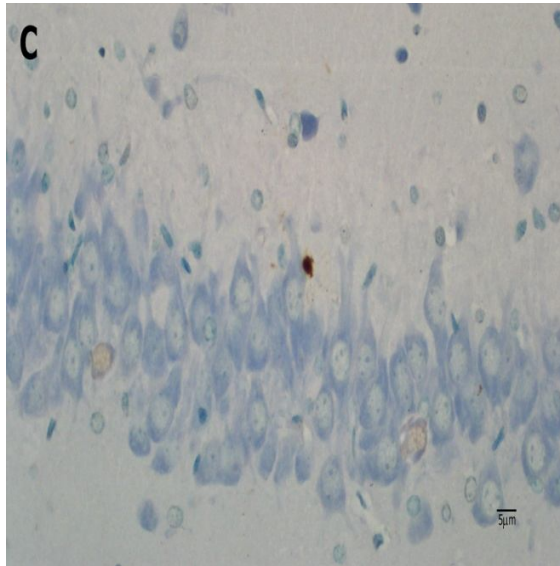
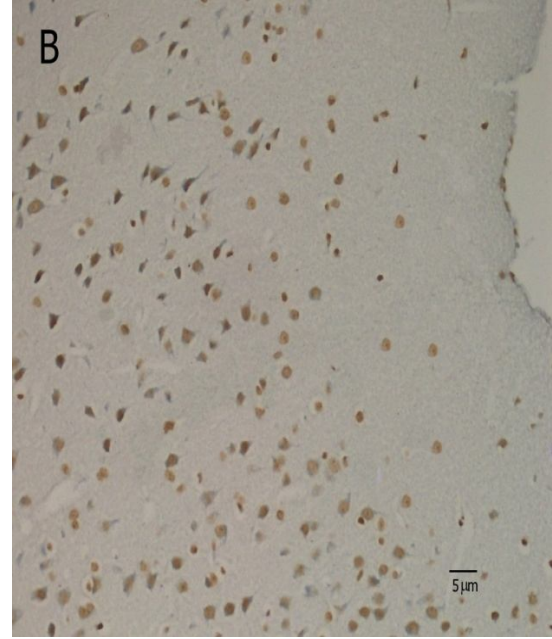
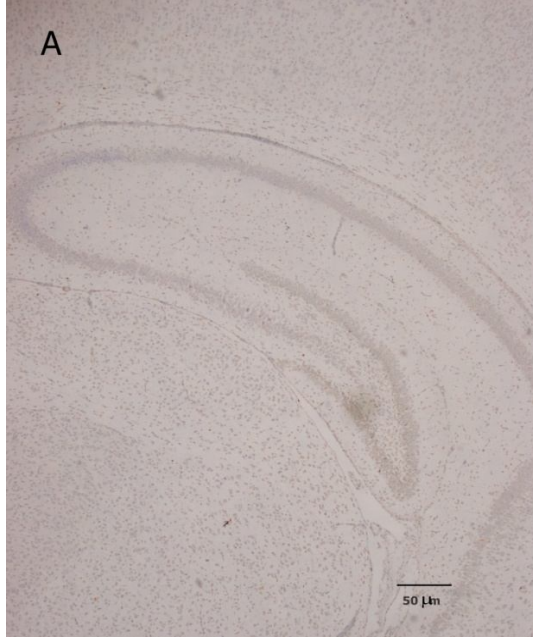
Şekil 4.5. Normoksi ve HİE gruplarının postnatal 22. günde ortalama beyin ağırlıkları (gr).



Postiskemik 15. günde dekapite edilen sıçanların beyinlerinin her iki yarısında makroskopik olarak normal görünümdeydi. Ayrıca koronal kesitler yapıldığında da normal makroskopik bulgular mevcut olup; kanama, ödem ve infarkt alanı saptanmadı. Rutin hematoksil-eozin boyamada apoptotik nöronlar normal morfoloji sergileyen nöronlara göre yuvarlak sınırlı, sitoplazmik büzüşme ve nükleer kondansasyon sergilemekteydi.

Beynin sağ yarısında TUNEL yöntemi ile yapılan apoptotik hücre sayılarının değerlendirilmesinde; uygulanan hipoksi-iskemi modeliyle beyindeki apoptotik hücre sayısında artış gözlemlendi (Şekil 4.6). Normoksi grubunun ortalama korteks ve hipokampus apoptotik hücre sayıları sırasıyla $4,00 \pm 4,31$; $1,25 \pm 1,28$; HİE grubunun ortalama apoptotik hücre sayıları sırasıyla $87,50 \pm 31,83$; $9,38 \pm 2,88$ bulundu (Tablo 4.4).

Şekil 4.6. TUNEL çalışması, beyin sağ hemisfer alanları. A: (X 20) büyütme hipokampus. B:(X 40) büyütme korteks. C, D: (X40) büyütme hipokampus.

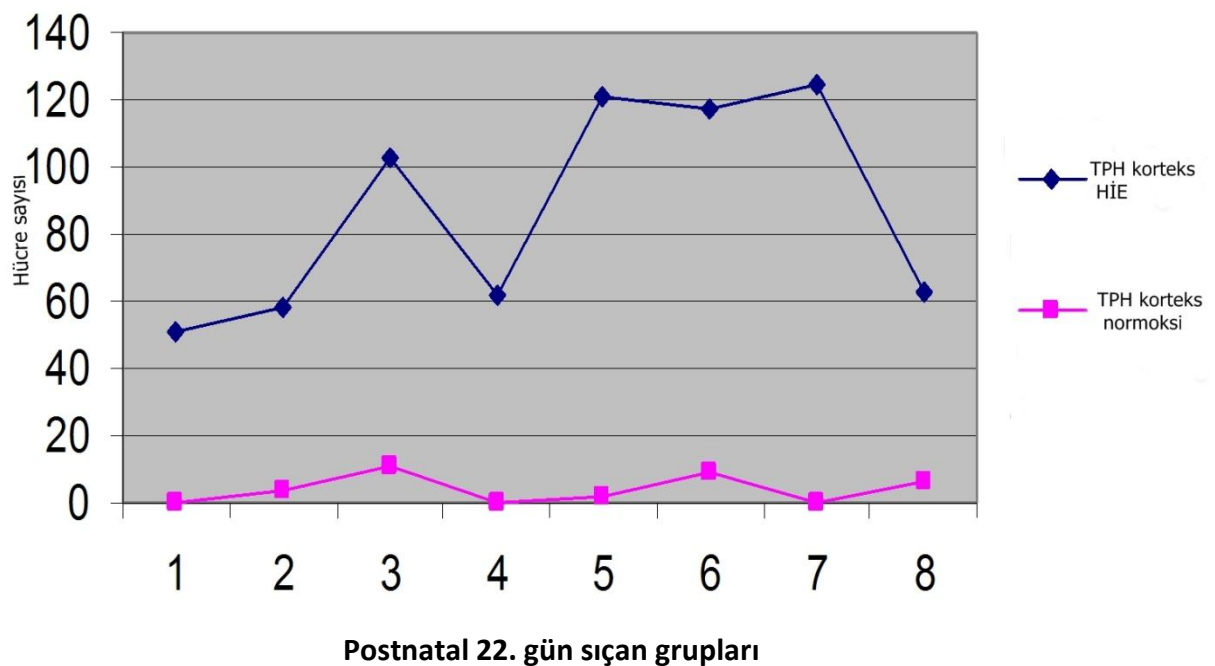


Tablo 4.4. Postnatal 22. günde normoksi ve HİE grupların korteks ve hipokampuslarında ki ortalama TUNEL pozitif hücre sayıları.

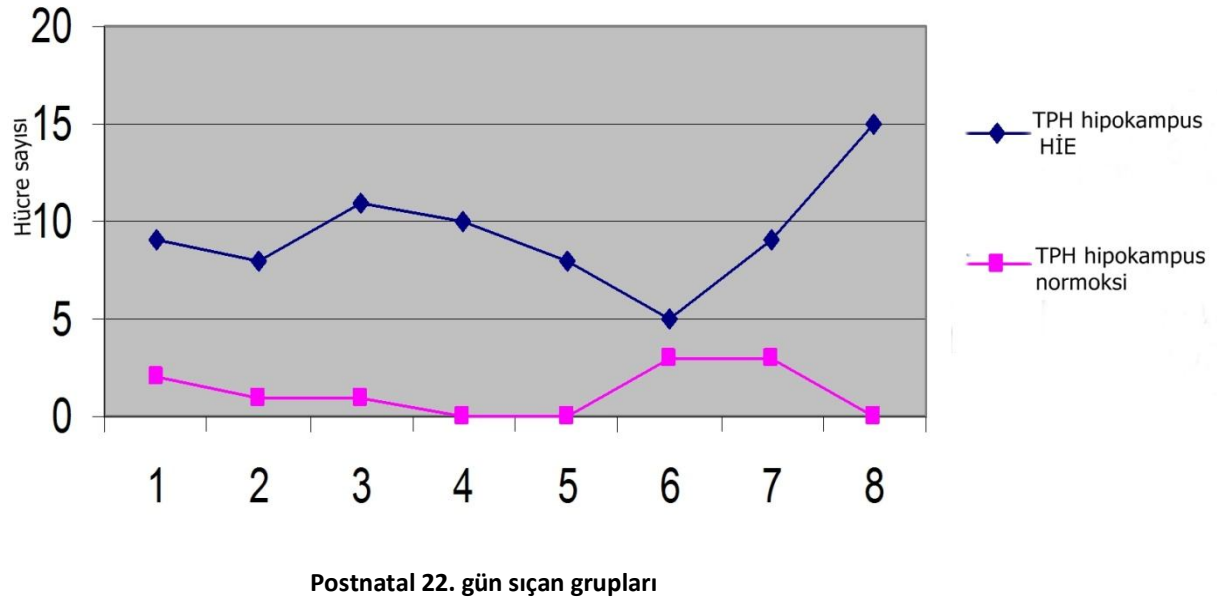
	Gruplar	N	Ortalama	p
TPH Korteks	HİE	8	87,50 ± 31,83	< 0,05
	NORMOKSI	8	4,00 ± 4,31	
TPH Hipokampus	HİE	8	9,38 ± 2,88	< 0,05
	NORMOKSI	8	1,25 ± 1,28	

HİE deki sıçanların beyinlerinin sağ yarısında korteks ve hipokampus alanlarında TUNEL yöntemiyle saptanan apoptotik hücre sayıları normoksi grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0.05$) (Şekil 4.7;4.8;4.9).

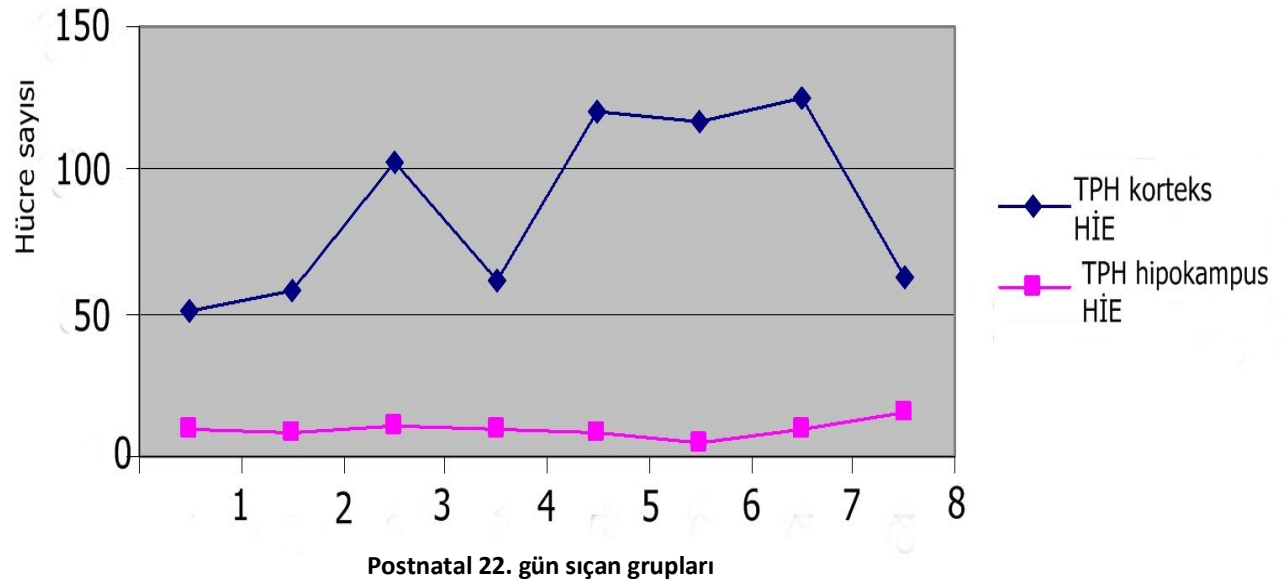
Şekil 4.7. Postnatal 22. günde normoksi ve HİE gruplarının kortikal ortalama TUNEL pozitif hücre dağılımları.



Şekil 4.8. Postnatal 22. günde normoksi ve HİE gruplarının hipokampus ortalama TUNEL pozitif hücre dağılımları.



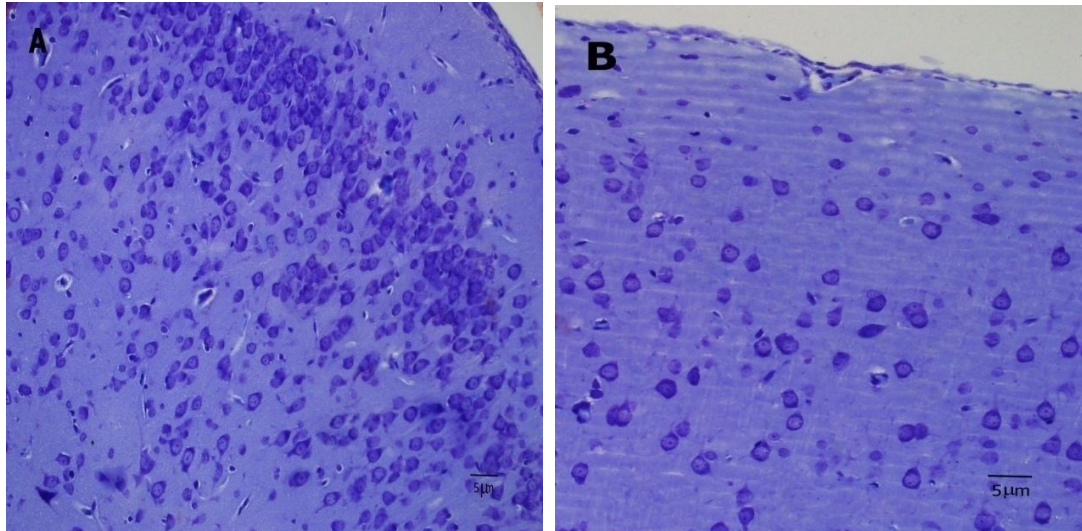
Şekil 4.9. Postnatal 22. günde HİE grubun korteks ve hipokampus ortalama TUNEL pozitif hücre dağılımları.

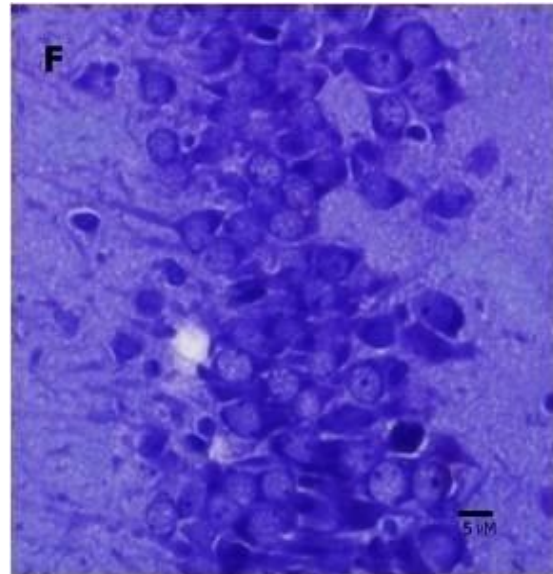
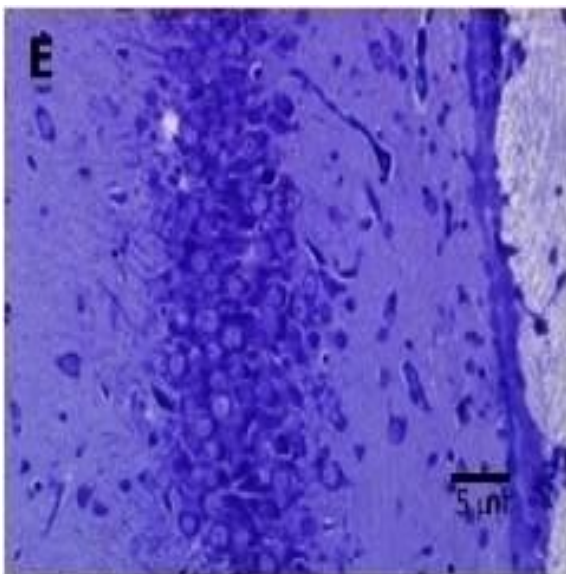
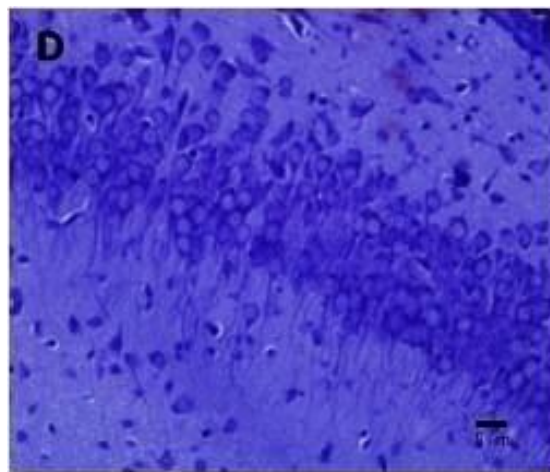
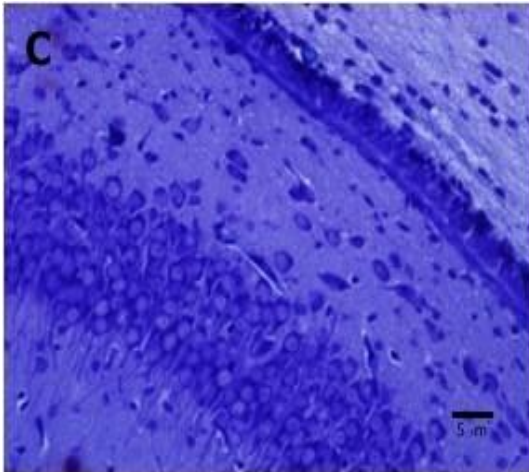


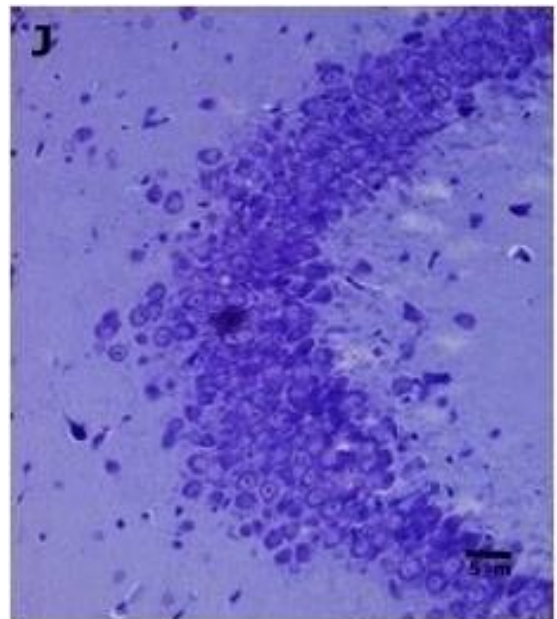
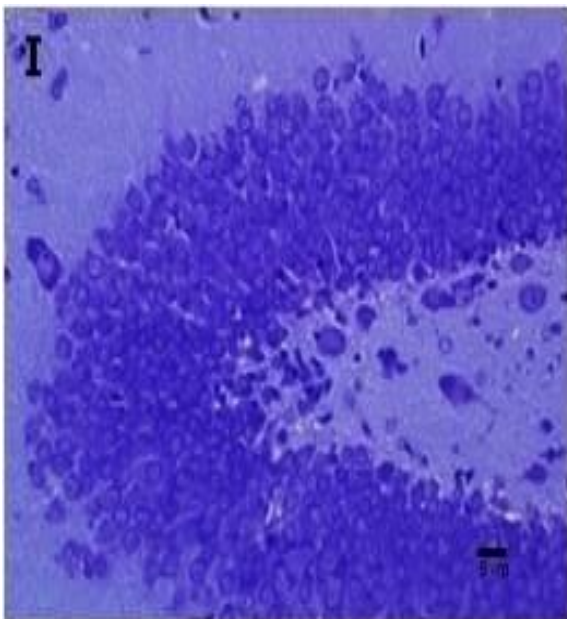
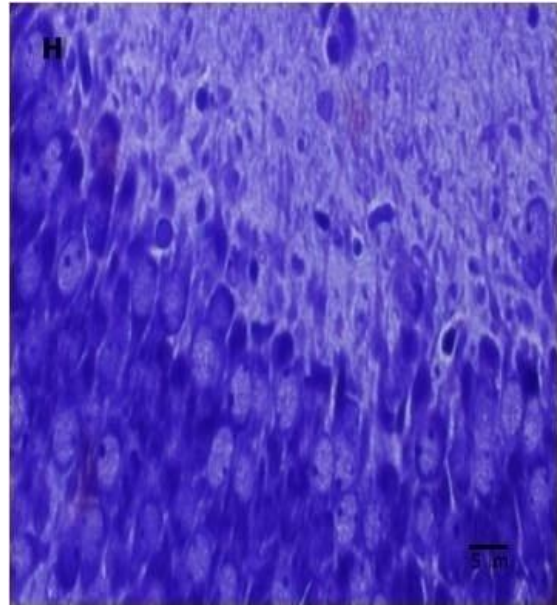
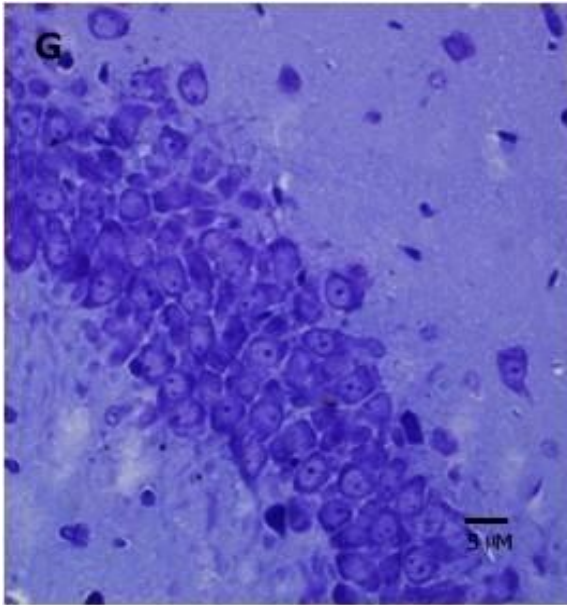
Beynin sağ yarısında hipoksiye en duyarlı korteks, CA1, CA2, CA3 ve girus dentatus alanlarında yaşıyan hücrelerin tespiti amacıyla yapılan kresil violet boyamasında TUNEL çalışmasını destekleyen sonuçlar elde edildi (Şekil 4.10). Normoksi grubunun ortalama korteks, CA1, CA2, CA3 ve girus dentatus alanlarındaki yaşıyan hücre sayıları sırasıyla $78,3333 \pm 9,2135$; $74,5533 \pm 10,8267$; $103,3333 \pm 25,4453$; $56,4444 \pm 4,6459$, $114,5556 \pm 11,2183$; HİE grubunun ortalama yaşıyan hücre sayıları sırasıyla ise $63,2592 \pm 10,4187$; $61,5185 \pm 8,6347$; $86,5 \pm 20,7448$; $56,5 \pm 4,7565$; $116,9259 \pm 9,4542$ bulundu (Şekil 4.11;4.12;4.13;4.14;4.15).

HİE grubunda sıçanların beyinlerinin korteks ve CA1 alanlarında kresil violet yöntemi ile saptanan yaşıyan hücre sayıları normoksi grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($p < 0.05$). Ancak CA2,CA3 ve girus dentatus alanlarında ise yaşıyan hücre sayıları normoksi grubuna göre daha düşük bulunmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$).

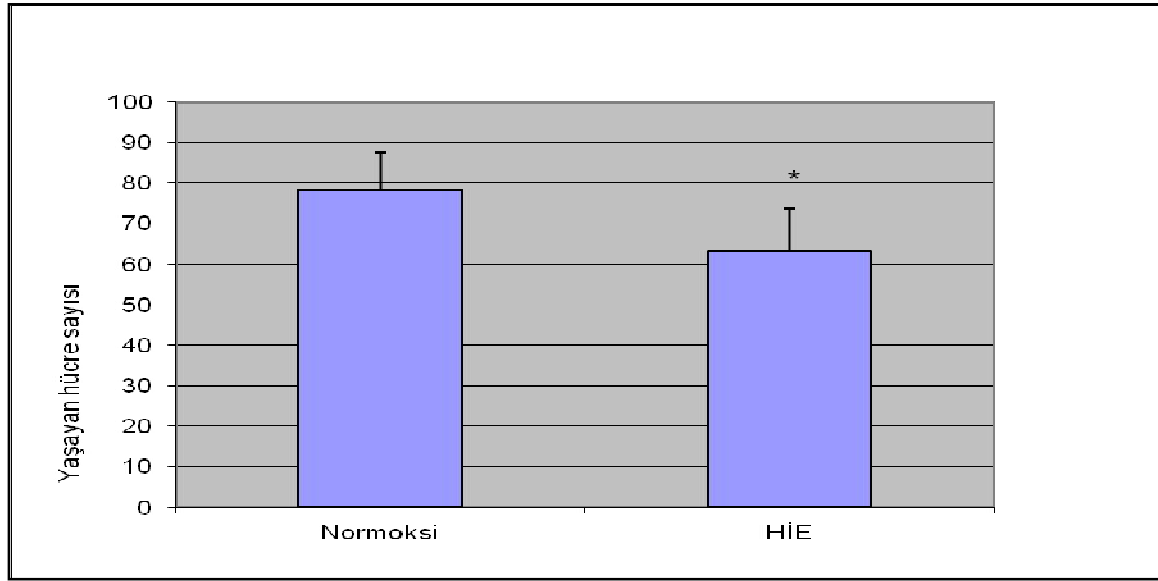
Şekil 4.10. Kresil violet boyaması, (x40)'lık büyütme. A: Normoksik gruba ait sağ korteks. B:HİE gruba ait sağ korteks. C: Normoksik gruba ait sağ CA1 D: HİE gruba ait sağ CA1. E: Normoksik gruba ait sağ CA2. F: HİE gruba ait sağ CA2. G: Normoksik gruba ait sağ CA3. H: HİE gruba ait sağ CA3. I: Normoksik gruba ait sağ dentat girus. J: HİE gruba ait sağ dentat girus



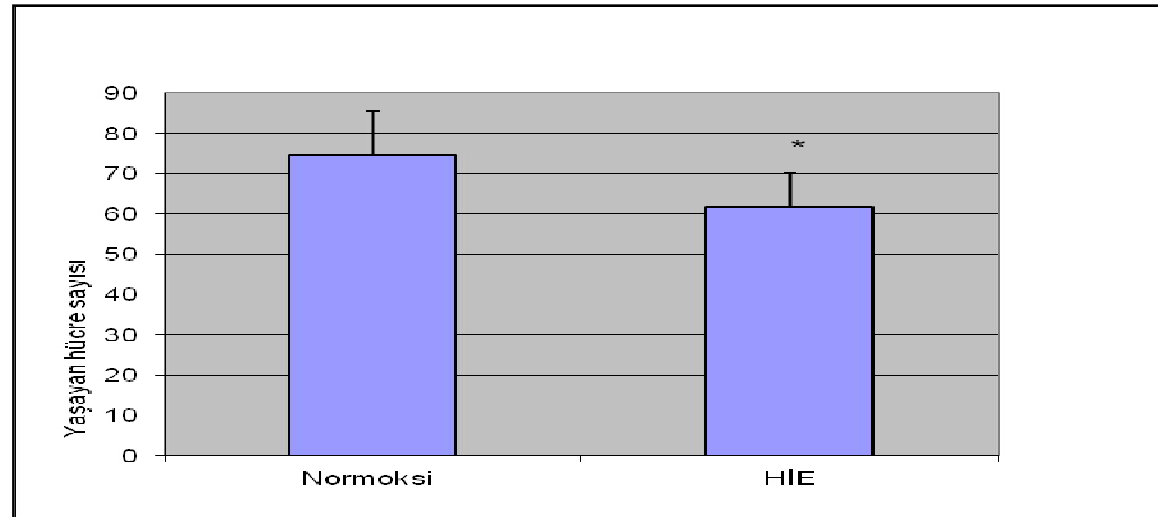




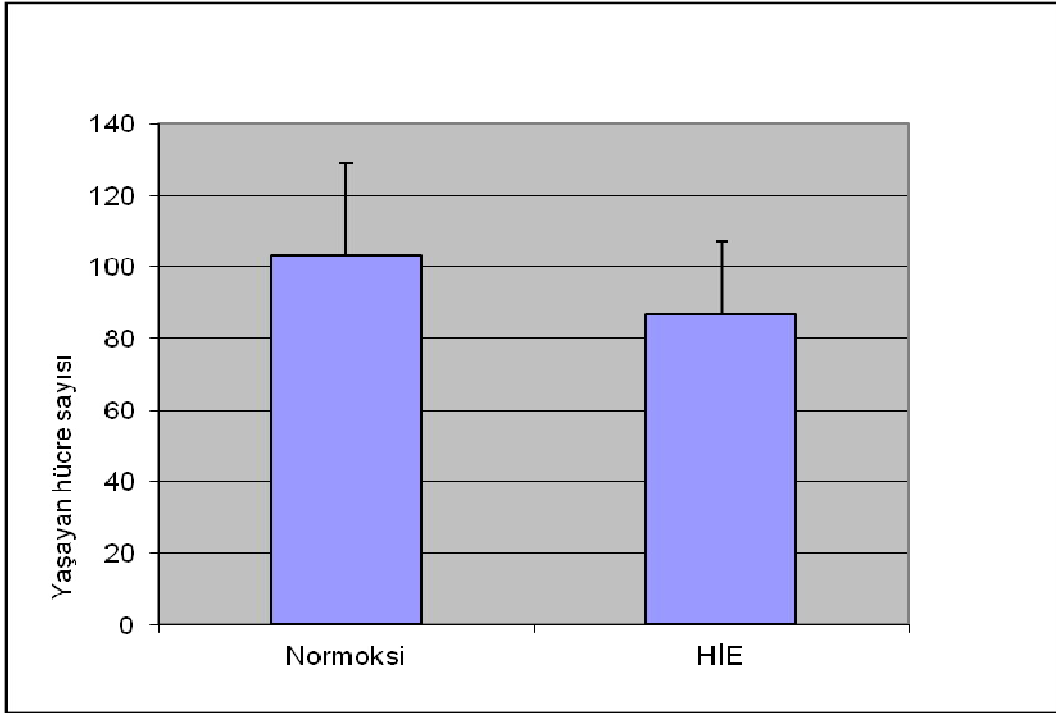
Şekil 4.11. Postnatal 22. günde normoksi ve HİE gruplarının kresil violet yöntemi kullanılarak yapılmış kortikal kesitlerinde yaşayan nöron sayıları.



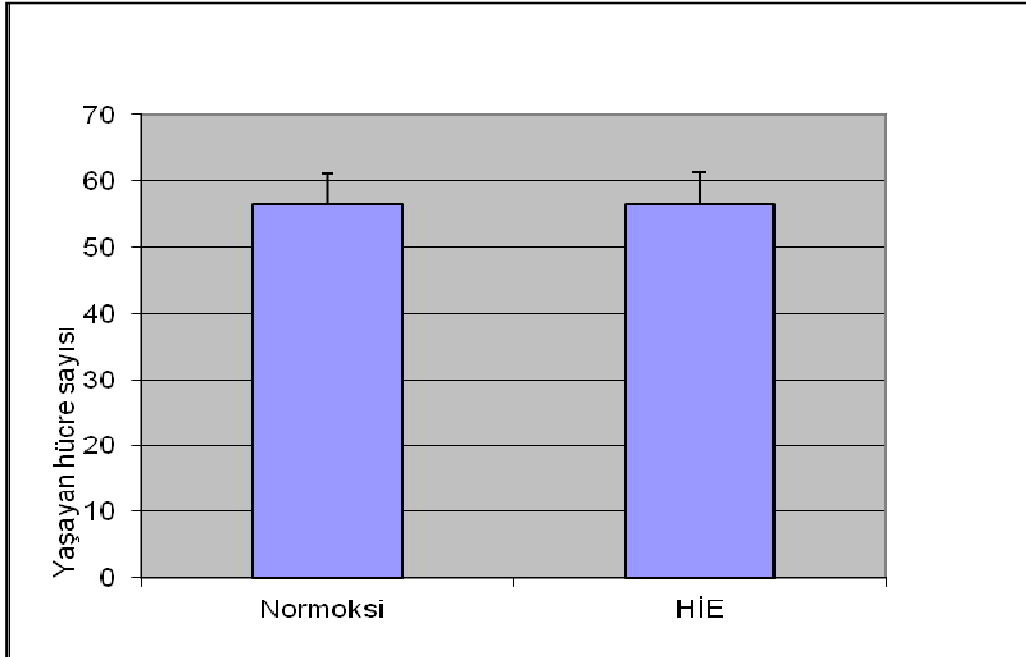
Şekil 4.12. Postnatal 22. günde normoksi ve HİE gruplarının kresil violet yöntemi kullanılarak yapılmış CA1 kesitlerinde yaşayan nöron sayıları.



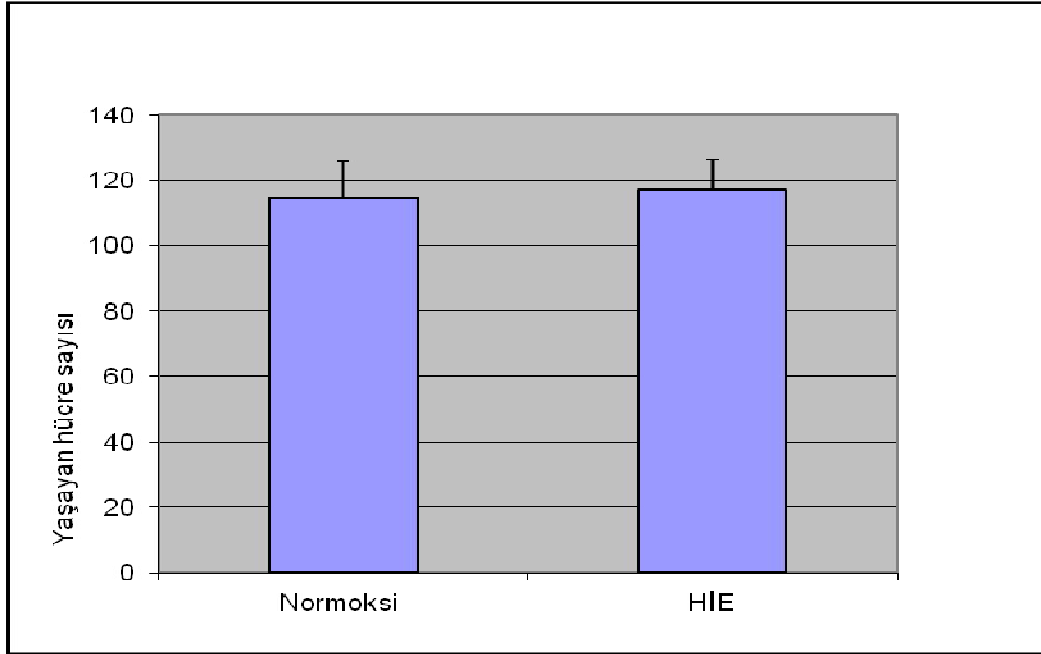
Şekil 4.13. Postnatal 22. günde normoksi ve HİE gruplarının kresil violet yöntemi kullanılarak yapılmış CA2 kesitlerinde yaşayan nöron sayıları.



Şekil 4.14. Postnatal 22. günde normoksi ve HİE gruplarının kresil violet yöntemi kullanılarak yapılmış CA3 kesitlerinde yaşayan nöron sayıları.



Şekil 4.15. Postnatal 22. günde normoksi ve HİE gruplarının kresil violet yöntemi kullanılarak yapılmış DG kesitlerinde yaşayan nöron sayıları.



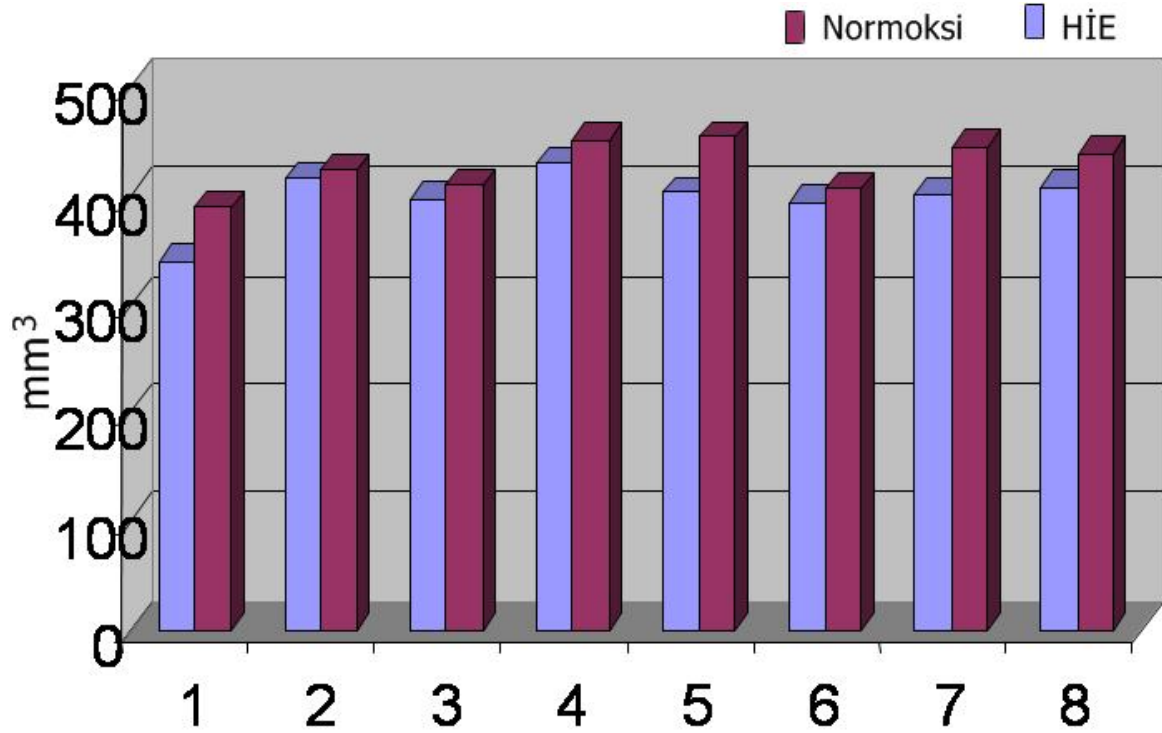
Hipoksik iskemik hasarlı beyin ile normoksik beyin arasında nöronal kayba bağlı beyin hacmindeki azalma olup olmadığını kontrol amaçlı hemotoksilen eozin boyalı lamalar kullanılarak yapılan ölçümlerde nöron kaybını gösteren sonuçlar elde edildi.

HİE grupta ortalama beyin volümü $399,520 \text{ mm}^3 \pm 26,728$ iken normoksik grupta $427,844 \text{ mm}^3 \pm 23,553$ olarak bulundu. HİE grupta normoksik gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede beyin volümünde azalma saptandı ($p < 0.05$) (Tablo 4.5) (Şekil 4.16).

Tablo 4.5. Postnatal 22. günde normoksi ve HİE grupların ortalama beyin volümleri.

	Gruplar	N	Ortalama (mm ³)	p
Beyin Volümü	HİE	8	399,52 ± 26,73	< 0,05
	NORMOKSİ	8	427,84 ± 23,55	

Şekil 4.16. Postnatal 22. günde normoksi ve HİE gruplarının ortalama beyin volüm oranları.



TARTIŞMA

Bu çalışmada hipoksik iskeminin yenidoğanda büyüme faktörlerinin salınımını etkileyerek beyin ve vücut gelişimini negatif etkilemektedir hipotezi üzerinden doku hasarı yanında büyüme faktörlerinin üretim ve salınımları değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda postnatal 22. günde normoksi ve HİE grupları arasında GH ve IGF-1 düzeyleri karşılaştırıldığında her iki grup arasında istatistiksel olarak belirgin fark bulundu. Serum IGFBP-3 düzeyleri ise HİE grubunda daha düşük bulunmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunamadı.

Zhang ve arkadaşlarının 54 hipoksik iskemik ensefalopatili yenidoğanda (Sarnat ve Sarnat sınıflamasına göre 20'si hafif, 19'u orta ve 15'i ciddi hipoksik iskemik ensefalopatili yenidoğan) yaptığı çalışmada akut dönemde GH seviyesini düşük olarak bulmuştur. Ancak geç dönem üzerine olan etki incelenmemiştir (75). Literatürde hipoksik-iskemik ensefalopatili hastalarda ya da hayvanlarda büyüme faktörlerinin geç dönemde nasıl etkilendiğine dair bir bilgi bulunmamaktadır. Çalışmamızda yenidoğan sıçanlarda hipoksik iskemik ensefalopati sonrası elde edilen serumlardan GH, IGF-1 ve IGFBP-3 düzeylerini değerlendirdik. Değerlendirme sonucunda serum GH ve IGF-1 düzeyleri HİE'li sıçanlarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu belirlenmiştir. Serum IGFBP-3 düzeyinde ise HİE'li sıçanlarda belirgin bir düşme tespit edildi ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Hormonal düzeydeki bu bulgulara beyin hasarı veya nöron kaybının eşlik etmesi yenidoğan hipoksisinin nöroendokrin sistem üzerine negatif bir etkisinin olduğunu düşündürmektedir.

Hipoksik iskemik ensefalopatiye bağlı beyin hasarının gösterilmesi amacıyla birçok model geliştirilmiştir ancak yenidoğan sıçanlarda en çok kullanılan model Levine-Rice modelidir (76). Levine-Rice modeli apoptozun gösterilmesi amacıyla immatür hayvanlarda sıklıkla kullanılmaktadır (76). Biz de apoptozun oluşturulması amacıyla bu modeli kullandık.

Hücre ölümleri bu modelde sadece klasik nekroz ile olmamakta bir veya birkaç adet apoptoz kaskadını içermektedir (77,78). Modelimizde hipoksik iskemik ensefalopatinin geç dönemde beynin hipoksiye en duyarlı alanları olan kortikal ve hipokampal alanlarını değerlendirdik. Hücre hasarını değerlendirmek için TUNEL

alışması ve kresil violet boyama yöntemlerini kullandık. Bizim modelimizde de daha önce yapılmış olan diğer çalışmalarda olduğu gibi korteks ve hipokampal CA3 alanı hipoksiye diğer hipokampal alanlara göre daha duyarlı bulundu (79,80). Çalışmamızda şimdiye kadar yapılan çalışmalardan farklı olarak hipoksik iskemik ensefalopatiye bağlı geç dönem hasarı değerlendirdik. Erken dönemde yapılan değerlendirmelerden farklı olarak hipoksiye duyarlılık hipokampal alanlar arasında CA3 de girus dentatus'a göre daha fazla bulundu. Schwartz ve arkadaşlarının yapmış oldukları ve erken dönem hipoksik iskemik ensefalopati modelini uyguladıkları çalışmada hipoksiye en duyarlı beyin bölgesi korteks, hipokampal alanda ise girus dentatus olarak tespit edilmiştir (81). Bizim uyguladığımız modelde de daha önceki çalışmalara benzer şekilde korteks hipoksiye en duyarlı beyin bölgesi olarak bulundu. Hipokampal alanlar arasında ise hipoksiye en duyarlı alan CA3 olarak bulundu. Nöron hasarına göre sıralandığında ise sırasıyla korteks>CA3>CA1>CA2>girus dentatus olarak gözlemlendi. Bu sıralamanın daha önce schwartz ve arkadaşlarının yapmış oldukları erken dönem hipoksi modelindeki sıralamadan farklı olduğu tespit edildi (81,82). Bunun immatür beyinde geç dönemde meydana gelen matürasyon değişikliğine bağlı olabileceği düşünöldü (50).

Hipoksik iskemik ensefalopati sonrası oluşan hasarı ölçmenin diğer bir yolu da beyin ağırlığı ve volümünü kullanarak nöropatolojik değerlendirmedir. Hipoksik-İskemik ensefalopatide beyin ağırlığı ve volümünün kaybı hücresel hasarla, dolayısıyla beyin hasarının derecesiyle ilişkilidir (83,84). İnsan beyninin gelişim süreci gebe kalındıktan sonra yaklaşık 15 yıl boyunca sürer (85). Büyüme oranı intrauterin yaşam ve ilk postnatal aylarda oldukça hızlıdır. İki yaşında beyin yetişkin hacminin %75'ine erişir ama beyin yapısındaki ve fizyolojisindeki değişiklikler ömür boyu sürer (86). Prenatal gelişimden 8 yaşına kadar beyin hücre sayısı artmaktadır (87). Beyin hacmi hipoksik iskemik ensefalopati, epilepsi ve otizm gibi birçok hastalıkta etkilenmektedir (87). Lawson ve arkadaşlarının 4–18 yaşları arasındaki 112 hipoksiye maruz kalmış ve 44 sağlıklı kontrol grubunda MRI ile yaptıkları araştırmalarında hipoksiye maruz kalmış çocukların beyin hacmi 1081 bulunurken kontrol grubundaki çocukların beyin hacmi 1236 olarak bulunmuştur (88). Michael ve arkadaşları 1–13 yaşları arasındaki 26 hipoksik iskemik ensefalopatili hastanın kontrol grubu ile beyin MR görüntülerini karşılaştırmış. 12 hastada beyin volümünde azalma tespit edilmiş (89). Çalışmamızda hipoksik iskemik grupta normoksik gruba göre beyin ağırlığı ve

volümünde istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma tespit edildi. Bu farkın nöronal kayba bağlı olduğu düşünüldü. Nöron kaybına bağlı olarak yaşamın ilerleyen dönemlerinde klinik bulgular ortaya çıkabilmektedir.

Beyin hasarı yapacak nedenler arasında hipoksemi, iske mi, kanama, enfeksiyon ve metabolik bozukluklar olmasına karşın en önemli kısmını hipoksik iskemik ensefalopati oluşturmaktadır (90). Hipoksik iskemik ensefalopati santral sinir sistemi hücrelerinde nöron ölümü ya da apoptozuna bağlı olarak kalıcı hasara yol açabilir. Yenidoğan döneminde görülen ölümlerin %15-20'si, mental retardasyon gibi kalıcı nörogelişimsel anomalilerin de %15-30'u HİE sonrası gelişmektedir. Ayrıca hipoksik iskemik ensefalopati tanısı alan bebeklerin üçte birinde akciğer, böbrek ve kardiyak fonksiyon bozukluklarına rastlanmaktadır. Bu nedenle hipoksik iskemik ensefalopati erken tanı, önlem ve tedavi açısından önem taşır (91). Monster ve arkadaşları 1983–1987 yılları arasında 235165 bebek üzerinde geniş katılımlı bir çalışma yapmışlar ve Apgar skoru birinci ve beşinci dakikalarda 0–3 arası olanların 7–10 skor alan bebeklere göre ensefalopati ve ölüm riskinin sırası ile 642 ve 145 kat arttığını göstermişlerdir (92). Lindström ve arkadaşları yenidoğan dönemine ait orta derecede hipoksik ensefalopati öyküsü olan 15–19 yaş arasındaki 56 çocuğun ileriye dönük prognozunu incelemiş bunların %81'inde kognitif fonksiyonlarda bozukluk ve gelişme geriliği, %30'unda serebral palsi geliştiğini göstermişlerdir (93). Çalışmamız hipoksik iskemik ensefalopatinin deneysel bir modeli olduğu için beyin hasarına bağlı gelişen sonuçların uzun dönem verilerini değerlendiremedik. Bu yüzden yenidoğan döneminde büyüme faktörleri açısından değerlendirilmiş olgularda nörokognitif fonksiyonlar, büyüme ve gelişmenin uzun dönem takip edilmesi şeklinde yapılacak klinik çalışmalar çok daha yol gösterici olacaktır.

Sonuç olarak birçok çalışma hipoksik iskemik ensefalopatili bireylerde ileri dönemde hasarlanma derecesine bağlı olarak multisistemik etkilenme olabileceğini göstermektedir (94,95,96,97). Bu etkilenmenin derecesine bağlı olarak da organ ve sistemler üzerine etkili olan GH, IGF–1 ve IGFBP–3 düzeyleri HİE yenidoğanlarda düşük bulunabilir. Büyüme faktörlerinin eksikliği ne kadar erken saptanırsa büyüme, gelişme ve kognitif fonksiyonlar gibi birçok alan üzerine olan olumsuz etki erken önlenabilir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda postnatal 22. günde normoksi ve HİE grupları arasında GH ve IGF-1 düzeyleri karşılaştırıldığında her iki grup arasında istatistiksel olarak belirgin fark bulundu ($p < 0.05$). Serum IGFBP-3 düzeyleri ise HİE grubunda daha düşük bulunmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunamadı ($p > 0.05$).

Postnatal 22. günde dekapitasyon öncesi ortalama vücut ağırlığı HİE grupta normoksik gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük bulundu ($p < 0.05$).

Postnatal 22. günde dekapitasyon sonrası ortalama beyin ağırlığı ise HİE grupta normoksik gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük bulundu ($p < 0.05$).

Hipoksik iskemik ensefalopati grubunda sıçanların beyinlerinin sağ yarısında korteks ve hipokampus alanlarında TUNEL yöntemiyle saptanan apoptotik hücre sayıları normoksi grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0.05$).

Hipoksik iskemik ensefalopati grubunda sıçanların beyinlerinin korteks ve CA1 alanlarında kresil violet yöntemi ile saptanan yaşayan hücre sayıları normoksi grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($p < 0.05$). Ancak CA2, CA3 ve girus dentatus alanlarında ise yaşayan hücre sayıları normoksi grubuna göre daha düşük bulunmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$).

Hipoksik iskemik ensefalopati grubunda normoksik gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede beyin volümünde azalma saptandı ($p < 0.05$).

Literatür açısından hipoksik-iskemik ensefalopatili hastalarda ya da hayvanlarda büyüme faktörlerinin nasıl etkilendiğine dair bir bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamız bu konuda yapılmış olan ilk çalışmadır. Hipoksik-iskemik ensefalopatili hastalarda serum GH, IGF-1, IGFBP-3 düzeylerinin erken tespiti büyüme, gelişme, nöroendokrin sistem ve nörolojik fonksiyonlarda olabilecek sorunların azaltılmasına katkı sağlayacaktır. Hipoksik iskemik ensefalopatili hastalarda büyüme faktörlerinin serum düzeyinin değerlendirilmesi yenidoğanın hipoksiden etkilenme derecesi hakkında fikir verebilir. Ayrıca yaşamın ilerleyen

dönemlerinde hipoksik hasara bağılı kognitif fonksiyonlar ve büyüme gelişme üzerine olabilecek komplikasyonlar önlenabilir.

KAYNAKLAR

- 1 Vannucci, RC., Fanoroff, AA., Martin, RJ., Hypoxia-ischemia. Neonatal-Perinatal Medicine Disease of the Fetus and Infant. 6TH ED, The CV Company, St Louis, Missouri, 812-951, 1997.
- 2 Vannucci, RC., Perlman, JM., Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy, Pediatrics., 100(6) 1004-1014, 1997.
- 3 Fatemi, A., Wilson, MA., Johnston, MV., Hypoxic ischemic encephalopathy in the term infant, Clin Perinatol., 36(4), 835-858, 2009.
- 4 Grafe, MR., Woodworth, KN., Noppens, K., Perez-Polo JR., Long-term histological outcome after post-hypoxic treatment with 100% or 40% oxygen in a model of perinatal hypoxic-ischemic brain injury, Int J Dev Neurosci., 26(1), 119–124, 2008.
- 5 Vannucci, SJ., Hagberg, H., Hypoxia–ischemia in the immature brain, J Exp Biol., 207(18), 3149–3154, 2004.
- 6 Verklan, MT., The Chilling details hypoxic-ischemic encephalopathy, J Perinat Neonat Nurs., 23(1), 59–68, 2009.
- 7 Menkes, JH., Sarnat, HB., Maria, LB., Perinatal Asphyxia and Trauma, Child Neurology, 4TH ED, Lippincott Williams Wilkins, Philadelphia, 401–455, 2000.
- 8 Kumar, A., Mittal, R., Khanna, HD., Basu, S., Free radical injury and blood-brain barrier permeability in hypoxic-ischemic encephalopathy, Pediatrics, 122(3), 122-722, 2008.

- 9 Scheepens, A., Williams, CE., Breier, BH., Guan, J., Gluckman, PD., A role for the somatotrophic axis in neural development, injury and disease, *J Ped Endoc Metabol*,13(6), 1483-1491, 2000.
- 10 Wilson, JD., Foster, DW., Kronenberg, HM., Williams textbook of endocrinology, 9TH ED, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 249–326, 1998.
- 11 Taniguchi, H., Andreasson, K., The hypoxic-ischemic encephalopathy model of perinatal ischemia, *J Vis Exp.*, 19(21), 791-955, 2008.
- 12 Spong, CY., Therapy for hypoxic ischemic encephalopathy: a cool idea, *Obstet Gynecol*, 106(6), 1226-1227, 2005.
- 13 Bronn, AW., Schwartz, JF., Fanoroff, AA., Martin, RJ., Birth injury. In *Neonatal Perinatal Medicine*, 4TH ED, The CV Company, St. Louis, Missouri, 506-529, 1987.
- 14 Low, JA., Metabolic acidosis and fetal reserve, *Beillieres Clin Obstet Gynaecol.*, 10 (2), 211-224, 1996.
- 15 Tekin, N., Perinatal asfiksini önlenmesi ve yönetimi, *Perinatoloji Dergisi.*, 19(1), 36-39, 2011.
- 16 Maccario, M., Grottoli, S., Procopio, M., Oleandri, SE., Rossetto, R., Gauna, C., Arvat, E., Ghigo, E., The GH/IGF-1 axis in obesity influence of neuro-endocrine and metabolic factors, *Int J Obes Relat Metab Disord.*, 24 (2), 96-99, 2000.
- 17 Perlman, JM., Summary proceedings from the neurology group on hypoxic-ischemic encephalopathy, *Pediatrics.*, 117(3), 28–33, 2006.

- 18 Arslan, N., Sayın, O., Altun, Z., Çavdar, Z., Eğrilmez, MY., Yener, N., Genç, Ş., Genç, K., Oktay, G., İşlekel, H., Güner, G., İnsan beyin mikrovasküler endotel hücrelerinde in vitro iskemi reperfüzyon modelinin geliştirilmesi ve hasarın değerlendirilmesi, *Türk Biyokimya Dergisi.*, 35 (3), 195–202, 2010.
- 19 Volpe, JJ., Hypoxic-ischemic encephalopathy. *Neurology of the Newborn*, 5TH ED, WB Saunders, Philadelphia, 506-520, 2008.
- 20 Cowan, F., Mercuri, E., Groenendaal, F., Bassi, L., Ricci, D., Rutherford, M., de Vries, L., Does cranial ultrasound imaging identify arterial cerebral infarction in term neonates?, *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.*, 90(3), 252–256, 2005.
- 21 Hagberg, B., Hagberg, G., Beckung, E., Uvebrant, P., Changing panorama of cerebral palsy in sweden. VIII. Prevalence and origin in the birth year period 1991-94, *Acta Paediatr.*, 90(3), 271-277, 2001.
- 22 Mimouni, F., Miodovnik, M., Siddiqi, TA., Khoury, J., Tsang, RC., Perinatal asphyxia in infants of insulin-dependent diabetic mothers, *J Pediatr.*, 113(2), 345–353, 1988.
- 23 Jarvis, S., Glinianaia, SV., Torrioli, MG., Platt, MJ., Miceli, M., Jouk, PS., Johnson, A., Hutton, J., Hemming, K., Hagberg, G., Dolk, H., Chalmers, J., Cerebral palsy and intrauterine growth in single births: European Collaborative Study, *Lancet.*, 262(9390), 1106–1111, 2003.
- 24 Tolsa, CB., Zimine, S., Warfield, SK., Freschi, M., Sancho, RA., Lazeyras, F., Hanquinet, S., Pfizenmaier, M., Huppi, PS., Early alteration of structural and functional brain development in premature infants born with intrauterine growth restriction, *Pediatr Res.*, 56(1), 132–138, 2004.
- 25 Thordstein, M., Kjellmer, I., Cerebral tolerance of hypoxia in growth-retarded and appropriately grown newborn guinea pigs, *Pediatr Res.*, 24(5), 633–638, 1988.

- 26 Detmer, A., Gu, W., Carter, AM., The blood supply to the heart and brain in the growth retarded guinea pigs fetus. *J Dev Physiol.*, 15(3), 153–160, 1991.
- 27 Berger, RP., Adelson, PD., Richichi, R., Kochanek, PM., Serum biomarkers after traumatic and hypoxemic brain injuries: insight into the biochemical response of the pediatric brain to inflicted brain injury, *Dev Neurosci.*, 28(4-5), 327-335, 2006.
- 28 Shalak, LF., Laptook, AR., Velaphi, SC., Perlman, JM., Amplitude-integrated electroencephalography coupled with an early neurologic examination enhances prediction of term infants at risk for persistent encephalopathy, *Pediatrics.*, 111(2), 351–357, 2003.
- 29 Kusaka, T., Matsuura, S., Fujikawa, Y., Okubo, K., Kawada, K., Namba, M., Okada, H., Imai, T., Isobe, K., Itoh, S., Relationship between cerebral interstitial levels of amino acids and phosphorylation potential during secondary energy failure in hypoxic-ischemic newborn piglets, *Pediatr Res.*, 55(2), 273–279, 2004.
- 30 Vannucci, RC., Towfighi, J., Vannucci, SJ., Secondary energy failure after cerebral hypoxia-ischemia in the immature rat, *J Cereb Blood Flow Metab.*, 24(10), 1090–1097, 2004.
- 31 Johnston, MV., Trescher, WH., Ishida, AW., Nakajima, W., Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain, *Pediatr Res.*, 49(6), 735– 741, 2001.
- 32 Thornton, C., Rousset, Cl., Kichev, A., Miyakuni, Y., Vontell, R., Baburamani, AA., Fleiss, B., Gressens, P., Hagberg, H., Molecular mechanisms of neonatal brain injury, *Neurol Res Int.*, 506–320, 2012.
- 33 Levene, M., The management of birth asphyxia new therapies for neuroprotection, *Aggior in Neonatol.*, 65–75, 1996.

- 34 Lorek, A., Takei, Y., Cady, EB., Wyatt, JS., Penrice, J., Edwards, AD., Peebles D., Wylezinska, M., Owen-Reece, H., Kirkbride, V., Cooper, CE., Aldridge, RF., Roth, SC., Brown, G., Delpy, DT., Reynolds, EOR., Delayed ("secondary") cerebral energy failure after acute hypoxia-ischemia in the newborn piglet: continuous 48-hour studies by phosphorus magnetic resonance spectroscopy, *Pediatr Res.*, 36(6), 699–706, 1994.
- 35 Kusaka, T., Matsuura, S., Fujikawa, Y., Okubo, K., Kawada, K., Namba, M., Okada, H., Imai, T., Isobe, K., Itoh, S., Relationship between cerebral interstitial levels of amino acids and phosphorylation potential during secondary energy failure in hypoxic-ischemic newborn piglets, *Pediatr Res.*, 55(2), 273–279, 2004.
- 36 Penrice, J., Lorek, A., Cady, EB., Amess, PN., Wylezinska, M., Cooper, CE., D'Souza, P., Brown, GC., Kirkbride, V., Edwards, AD., Wyatt, JS., Reynolds, EOI., Proton magnetic resonance spectroscopy of the brain during acute hypoxiaischemia and delayed cerebral energy failure in the newborn piglet, *Pediatr Res.*, 41(6), 795–802, 1997.
- 37 Green, CJ., Gower, JD., Healing, G., Cotterill, LA., Fuller, BJ., Simpkin, S., The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys, *Free Radic Res Commun.*, 7(3-6), 255–264, 1989.
- 38 Orrenius, S., Burkitt, MJ., Kass, GE., Dypbukt, JM., Nicotera, P., Calcium ions and oxidative cell injury, *Ann Neurol.*, 32, 33–42, 1992.
- 39 Barks, JD., Silverstein, FS., Excitatory amino acids contribute to the pathogenesis of perinatal hypoxic-ischemic brain injury, *Brain Pathol.*, 2(3), 235–243, 1992.
- 40 McQuillen, PS., Ferriero, DM., Selective vulnerability in the developing central nervous system, *Pediatr Neurol.*, 30(4), 227–235, 2004.

- 41 Liu, C., Lin, N., Wu, B., Qiu, Y., Neuroprotective effect of memantine combined with topiramate in hypoxic-ischemic brain injury, *Brain Res.*, 1282, 173–182, 2009.
- 42 Şener, G., Yeğen, BÇ., İskemi reperfüzyon hasarı, *Klinik Gelişim.*, 21(2), 5-13, 2008.
- 43 Ankarcrona, M., Dypbukt, JM., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, SA., Nicotera, P., Glutamate induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function, *Neuron.*, 15(4), 961–973, 1995.
- 44 Ferriero, DM., Holtzman, DM., Black SM., Neonatal mice lacking neuronal nitric oxide synthase are less vulnerable to hypoxic-ischemic injury, *Neurobiol Dis.*, 3(1), 64–71, 1996.
- 45 Gilland E, Puka-Sundvall M, Hillered L, Hagberg, H., Mitochondrial function and energy metabolism after hypoxia-ischemia in the immature rat brain: involvement of NMDA-receptors, *J Cereb Blood Flow Metab.*, 18(3), 297–304, 1998.
- 46 Hagberg, H., Mallard, C., Rousset, Cl., Wang, X., Apoptotic mechanisms in the immature brain: involvement of mitochondria, *J Child Neurol.*, 24(9), 141–1146, 2009.
- 47 Salford, LG., Plum, F., Brierley, JB., Graded hypoxia oligemia in rat brain. II. neuropathological alterations and their implications, *Arch Neurol.*, 29(4), 234–238, 1973.
- 48 Yue, X., Mehmet, H., Penrice, J., Cooper, C., Cady, E., Wyatt JS., Reynolds, EO., Edwards, AD., Squier, MV., Apoptosis and necrosis in the newborn piglet brain following transient cerebral hypoxiaischaemia, *Neuropathol Appl Neurobiol.*, 23(1), 16–25, 1997.
- 49 Ferriero, DM., Medical progress: neonatal brain injury, *N Eng J Med.*, 351(19), 1985– 1995, 2004.

- 50 Miller, SP., Ferriero, DM., From selective vulnerability to connectivity: insights from newborn brain imaging, *Trends Neurosci.*, 32(9), 496–505, 2009.
- 51 Ambalavanan, N., Carlo, WA., Shankaran, S., Bann, CM., Emrich, SL., Higgins, RD., Tyson, JE., O'Shea, TM., Laptook, AR., Ehrenkranz, RA., Donovan, EF., Walsh, MC., Goldberg, RN., Das, A., Predicting Outcomes of Neonates Diagnosed With Hypoxemic-Ischemic Encephalopathy, *Pediatrics.*, 118(5), 2084-2093, 2006.
- 52 Volpe, JJ., Hypoxic-ischemic encephalopathy. *Neurology of the Newborn*, WB Saunders, Philadelphia, 331–394, 2001.
- 53 Bugie, C., Child development and early intervention centers, *Rev Neurol.*, 34(1), 143–148, 2002.
- 54 Amato, M., Donati, F., Update on perinatal hypoxic insult:mechanism, diagnosis and interventions, *Eur J Paediatr Neurol.*, 4(5), 203–209, 2000.
- 55 Martinez, BM., Diez-Sebastian, J., Kapellou, O., Gindner, D., Allsop, JM., Rutherford, MA., Cowan, FM., Predicting motor outcome and death in term hypoxic-ischemic encephalopathy, *Neurology.*, 76(24), 2055–2061, 2011.
- 56 Dağoğlu, T., Ovalı, F., Hipoksik İskemik Ensefalopati. *Neonataloji*, 2TH ED, Nobel Tıp Kitapevi, Ankara, 557–570, 2008.
- 57 Klinger, G., Beyene, J., Shah, P., Perlman, M., Do hyperoxaemia and hypocapnia add to the risk of brain injury after intrapartum asphyxia, *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.*, 90(1), 49-52, 2005.
- 58 Küçüköçük, Ş., Doğum travmaları. *Yenidoğan ve Hastalıkları*, Ulus kitapevi, Ankara, 28–32, 1994.

- 59 Satar, M., Türkiye'de yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde izlenen hipoksik iskemik ensefalopatili olgular, risk faktörleri, insidans ve kısa dönem prognozları, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi., 51, 123–129, 2008.
- 60 Shah, P., Riphagen, S., Beyene, J., Perlman M., Multiorgan dysfunction in infants with post-asphyxial hypoxicischemic encephalopathy, Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed., 89(2), 152–155, 2004.
- 61 Klinger, G., Beyene, J., Shah, P., Perlman, M., Do hyperoxemia and hypocapnia add to the risk of brain injury after intrapartum asphyxia, Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed., 90(1), 49-52, 2005.
- 62 Rice, JE., Vannucci, RC., Brierley, JB., The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat, Ann Neurol., 9(2), 131–141, 1981.
- 63 Cohen, P., Rosenfeld, RG., Griffin, JE., Ojeda, SR., Growth regulation. Textbook of Endocrine Physiology, 4TH ED, Oxford University Press, Oxford 286-302, 2002.
- 64 Goldenberg N, Barkan A. Factors regulating growth hormone secretion in humans, Endocrinol Metab Clin North Am., 36(1), 37–55, 2007.
- 65 Abrams, RL., Parker, ML., Blanco, S., Reichlin, S., Daughaday, WH., Hypothalamic regulation of growth hormone secretion, Endocrinology., 78(3), 605–613, 1966.
- 66 Frohman, LA., Nernardis, LL., Kant, KJ., Hypothalamic stimulation of growth hormone secretion, Science., 162(3853), 580–582, 1968.
- 67 Thoner, MO., Vance, ML., Laws, ER., Wilson, JD., Foster, DW., Kronenberg, HM., Larsen, RP., The anterior pituitary. Williams Textbook of Endocrinology, 9TH ED, WB Saunders Company, Philadelphia, 249–326, 1998.

- 68 Hirt, H., Kimelman, J., Birnbaum, MJ., Chen, EY., Seeburg, PH., Eberhardt, NL., Barta, A., The human growth hormone gene locus: structure, evolution, and allelic variations, *DNA*, 6(1), 59-70, 1987.
- 69 Macgillivray, MH., Felig, P., Frohman, LA., Disorders of growth and development. *Endocrinology and Metabolism*, 4TH ED, MacGrawHill, New York, 1265–1316, 2001.
- 70 Scheepens, A., Williams, CE., Breier, BH., Guan, J., Gluckman, PD., A role for the somatotrophic axis in neural development, injury and diseases, *J Ped Endoc Metabol.*, 13(6), 1483–1491, 2000.
- 71 Volpe, JJ., Perinatal brain injury from pathogenesis to neuroprotection, *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.*, 7(1) 56–64, 2001.
- 72 Perlman, M., Shah, PS., Hypoxic-ischemic encephalopathy challenges in outcome and prediction, *J Pediatr.*, 158(2), 51–54, 2011.
- 73 Cole, TJ., Freeman, JV., Preece, MA., British 1990 growth reference centiles for weight, height, body mass index and head circumference fitted by maximum penalized likelihood, *Stat Med.*, 17(4), 407– 429, 1998.
- 74 Han, BH., D’Costa, A., Back, SA., Parsadanian, M., Patel, S., Shah, AR., Gidday, JM., Srinivasan, A., Deshmukh, M., Holtzman, DM., BDNF blocks caspase-3 activation in neonatal hypoxia-ischemia, *Neurobiol Dis.*, 7(1), 38–53, 2000.
- 75 Zhang, GY., Lu, XM., Sun, RP., Wang SZ., Serum growth hormone and prolactin levels in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy, *Chin J Contemp Pediatr.*, 8(6), 450-452, 2006.

- 76 Nakajima, W., Ishida, A., Lange, MS., Gabrielson, KL., Wilson, MA., Martin, LJ., Blue, ME., Johnston, MV., Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat, *J Neurosci.*, 20(21), 7994–8004, 2000.
- 77 Kawasaki, K., Traynelis, SF., Dingledine, R., Different responses of CA1 and CA3 regions to hypoxia in rat hippocampal slice, *J Neurophysiol.*, 63(3), 385–394, 1990.
- 78 Kreisman, NR., Soliman, S., Gozal, D., Regional differences in hypoxic depolarization and swelling in hippocampal slices, *J Neurophysiol.*, 83(2), 1031–1038, 2000.
- 79 Van Rooij, LG., Toet, MC., Osredkar, D., van Huffelen, AC., Groenendaal, F., de Vries, LS., Recovery of amplitude integrated electroencephalographic background patterns within 24 hours of perinatal asphyxia, *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.*, 90(3), 245–251, 2005.
- 80 Feng, Y., Piletz, JE., Lebnach, MH., Agmatine suppresses nitric oxideproduction and attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats, *Pediatr Res.*, 52(4), 606–611, 2002.
- 81 Schwartz, PH., Massarweh, WF., Vinters, HV., Wasterlain, CG., Rat model of severe neonatal hypoxic-ischemic brain injury, *Stroke.*, 23(4), 539–546, 1992.
- 82 Liu, J., Raine, A., Venables, PH., Mednick SA., Malnutrition at age 3 years and externalizing behavior problems at ages 8, 11 and 17 years, *Am J Psychiatry* 166(11), 2005–2013, 2004.
- 83 Moster, D., Lie RT., Irgens, LM., Bjerkedal, T., Markestad, T., The association of apgar score with subsequent death and cerebral palsy, a population-based study in term infants, *J Pediatr.*, 138(6), 798–803, 2001.

- 84 Vries, LS., Jongmans, MJ., Long-term outcome after neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy, *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.*, 95(3) 220–224, 2010.
- 85 Caviness, VS., Kennedy, DN., Richelme, C., Rademacher, J., Filipek, PA., The human brain age 7–11 years a volumetric analysis based on magnetic resonance image, *Cereb Cortex.*, 6(8), 726–736, 1996.
- 86 Giedd, JN., Snell, JW., Lange, N., Rajapakse, JC., Casey, BJ., Kozuch, PL., Vaituzis, AC., Vauss, YC., Hamburger, SD., Kaysen, D., Rapoport, JL., Quantitative magnetic resonance imaging of human brain development age 4–18, *Cereb Cortex.*, 6(4), 551–560, 1996.
- 87 Zhang, L., Thomas, KM., Davidson, MC., Casey, BJ., Heier LA., Uluğ, AM., MR quantitation of volume and diffusion changes in the developing brain, *AJNR Am J Neuroradiol.*, 26(1), 45–49, 2005.
- 88 Lawson, JA., Vogrin, S., Bleasel, AF., Haindl, W., Vogrin, S., Cook, MJ., Bye, AM., Cerebral and cerebellar volume reduction in children with epilepsy, *Neurology.*, 55(9), 1391–1393, 2000.
- 89 Michael, AS., Kenneth, JP., Elke, HR., Hill, A., Hendson, G., Cerebellar vermal atrophy after neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy, *AJNR Am J Neuroradiol.*, 25(6), 1008–1015, 2004.
- 90 Koenigsberger, RM., Rudolph, C., Rudolph, A., Hostetter, M., Lister, G., Siegel, N., *Acute encephalopathies of infancy. Rudolph's Pediatrics*, The McGraw Hill Companies, Connecticut, 1882–1883, 1996.

- 91 Barbara, JS., Robert, MK., Behrman, RE., Kliegman, RM., Jenson HB., The fetus and the neonatal infant. Nelson Pediatrics, 17 TH ED, WB Saunders Company, Philadelphia, 561–569, 2005.
- 92 Monster, D., Lie, RT., Irgens, LM., Bjerkedal, T., Markestad, T., The association of apgar score with subsequent death and cerebral palsy a population-based study in term infants, J Pediatr., 138(6), 798–803, 2001.
- 93 Lindström, K., Hallberg, B., Blennow, M., Wolff, K., Fernell, E., Westgren, M., Moderate neonatal encephalopathy pre- and perinatal risk factors and long-term outcome, Acta Obstet Gynecol Scand., 87(5), 503–509, 2008.
- 94 Azzopardi, D., Robertson, NJ., Cowan, FM., Rutherford, MA., Rampling, M., Edwards, AD., Pilot study of treatment with whole body hypothermia for neonatal encephalopathy, Pediatrics., 106(4), 684–694, 2000.
- 95 Nicholas, SA., Daniel, JL., Predicting outcome in children with hypoxic ischemic encephalopathy, Pediatr Crit Care Med., 9(1), 32–39, 2008.
- 96 Martinez-Biarge, M., Diez-Sebastian, J., Kapellou, O., Gindner, D., Allsop, JM., Rutherford, MA., Cowan, FM., Predicting motor outcome and death in term hypoxic-ischemic encephalopathy, Neurology., 76(24), 2055–2061, 2011.
- 97 Pfenninger, J., Bachmann, D., Wagner, BP., Survivors with bad outcome after hypoxicischaemic encephalopathy, full-term neonates compare unfavourably with children, Swiss Med Wkly., 131(19), 267–272, 2001.