T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

HİPOKSİK İSKEMİK HASAR OLUŞTURULAN RATLARDA PENTOKSİFİLİN APOPTOZİS VE NÖROMOTOR YETİLER ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Proje No: TTU-2013-4198.pdf

Tez Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Tamer GÜNEŞ
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları

Araştırmacının Adı Soyadı:
Hülya HALİS
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları

Ağustos 2014
KAYSERİ

Bu çalışma için alınan destek sarf malzemeleri, cihaz ve hizmet alımında harcanmış olup aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

SONUÇLAR

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

2. Parietal kortekste ve dentat girusta kaspaz pozitif apoptotik hücre sayısı açısından sham grubu ile HI, PTX60 ve PTX100 grupları arasında anlamlı fark saptanırken ($p<0.05$), HI, PTX60 ve PTX100 grupları arasında fark saptanmadı ($p>0.05$).

3. Hipokampusun kornu amonius (CA1, CA2, CA3, Hilus) bölgesinde kaspaz 3 pozitif apoptotik hücre sayısı sham grubu ile HI, PTX60 ve PTX100 grupları arasında ve PTX60 grubu ile HI grubu arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p<0.05$).

4. Gruplar toplam dejeneratif hücre sayısı (apoptotik ve nekrotik hücre) açısından değerlendirildiğinde parietal korteks ve dentat girusta dejeneratif hücre sayısı PTX60 grubu HI ve PTX100 ile, kornu amoniusun değerlendirilmesinde ise PTX60 grubu ile HI grubu arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p<0.05$)

5. Beyin sağ yarısındaki canlı hücre sayısı sham grubu dışında diğer gruplarda istatistiksel anlamlı daha düşük saptandı ($p<0.05$).

6. Kortekste PTX100 grubundaki canlı hücre sayısı diğer gruplardaki canlı hücre sayısından anlamlı daha düşük saptandı ($p<0.05$).

7. PTX60 grubundaki canlı hücre sayısı korteks ve hipokampusta (kornu amonius) PTX100'den, dentat girusta ise hem H-İ hem de PTX100 grubundan fazladır ($p<0.05$).

8. Sham grubunun PBS diğer tüm gruplardan istatistiksel anlamlı daha kısa iken (sırasıyla HI ve PTX-100 için $p<0,001$; PTX-60 için $p=0,004$), dördüncü günde PTX-60 ile HI ve PTX-100 grupları arasında anlamlı fark saptandı (sırasıyla $p=0,044$, $p=0,043$).

9. İlk HFS sonrasında bazal değere göre PS'nın genliğinde meydana gelen değişimler; herhangi bir işlem yapılmayan kontrol grubu ve PTX60 grupları arasında fark saptanmazken ($p>0.05$); kontrol ve PTX60 grupları ile sham, HI ve PTX100 arasında ve HI grubu ile sham ve PTX100 grupları arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p<0.05$).

10. HFS sonrasında bazal değere göre EPSP'in eğiminde meydana gelen değişimler; herhangi bir işlem yapılmayan kontrol grubu ve PTX60 grupları arasında fark saptanmazken ($p>0.05$); kontrol ve PTX60 grupları ile HI arasında ve kontrol grubu ile sham grubu arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p<0.05$).

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

HİPOKSİK İSKEMİK HASAR OLUŞTURULAN RATLARDA PENTOKSİFİLİN APOPTOZİS VE NÖROMOTOR YETİLER ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

UZ. DR. HÜLYA HALİS

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. TAMER GÜNEŞ

KAYSERİ-2014

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

HİPOKSİK İSKEMİK HASAR OLUŞTURULAN RATLARDA PENTOKSİFİLİN APOPTOZİS VE NÖROMOTOR YETİLER ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

UZ. DR. HÜLYA HALİS

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. TAMER GÜNEŞ

KAYSERİ-2014

TEŞEKKÜR

Yan Dal Uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalışmamda bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, ayrıca hoşgörüsü, sabrı, etik ve insancıl davranışlarını yaşamım boyunca kendime örnek alacağım tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Tamer Güneş'e ve eğitimimde emekleri olan diğer saygıdeğer hocalarım Bilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. M.Adnan Öztürk ve Prof. Dr. Selim Kurtoğlu ve diğer Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerine; tez çalışmam süresince katkılarını esirgemeyen Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Cem Süer, Araştırma Görevlisi Soner Bitiktaş'a, Veteriner Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Narin Liman'a; Tez çalışmamda yardımlarını benden esirgemeyen Neonatoloji yan dal asistanı Uzm. Dr. Osman Baştuğ' a; Neonatoloji Bilim Dalı asistan, hemşire ve çalışanlarına; Deneysel Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına; sevgi ve özverileriyle güçlüklerin üstesinden gelmemde desteklerini esirgemeyen sevgili aileme en içten duygularla teşekkürlerimi sunarım.

Uzm. Dr. Hülya Halis

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR…….....iv

İÇİNDEKİLER…….v

KISALTMALAR……vi

TABLO ve GRAFİK LİSTESİ…….viii

ŞEKİL ve RESİM LİSTESİ……....ix

ÖZET……..1

ABSTRACT……...3

GİRİŞ VE AMAÇ…….5

GENEL BİLGİLER……..7

Hipoksik İskemik Beyin Hasarı ve Patofizyolojisi…….7

Pentoksifilin…….13

HİBH'de Histolojik Bulgular…….14

HİBH'de Klinik Bulgular……...15

HİBH Tanısı…….17

HİBH'de Tedavi……..21

Sıçanların Bilişsel ve Lokomotor Yetilerinin Değerlendirilmesi……22

GEREÇ VE YÖNTEMLER……..28

Gereçler……..28

Yöntem……..29

Histopatolojik Değerlendirme……...30

Davranış Deneyleri…….32

Uzun Dönemli Güçlenme…….....32

BULGULAR……35

Apoptoz Bulguları……...35

Moris Su Tankı Testi Sonuçları…….....37

Uzun Dönemli Güçlenme Kayıt Sonuçları……....39

TARTIŞMA……41

SONUÇLAR …….....46

KAYNAKLAR……....47

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADH	Antidiüretik hormon
AMPA	α-Amino-3-Hidroksi-5-Metil-4-İzoksazol Propiyonat
Apaf-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
ATP	Adenozin trifosfat
Bcl-2	B cell lenfoma-2
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
BT	Bilgisayarlı Tomografi
Ca^{+2}	Kalsiyum
cAMP	siklik Adenozin monofosfat
Caspase	Cysteine-containing Aspartate Specific Protease
CK	Kreatin Kinaz
D	Gün
DG	Dentat girus
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EPSP	Eksitatör postsinaptik potansiyel
EEG	Elektroensefalogram
GABA	Gama aminobutirik asit
GFAP	Glial fiber asidik protein
HDD	Hayvan Davranış Deneyi
Hİ	Hipoksi-iskemi
HİBH	Hipoksik İsemik Beyin Hasarı
IFN-ɣ	İnterferon gama
IL	İnterlökin
İ.P.	İntraperitoneal (Periton içi)
İ.V.	İntravenöz (Damar İçi)
KD	Kilodalton
MAP Kinaz	Mitojen aktive edici protein kinaz
MBP	Myelin bazik protein
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme

MRS	Manyetik Rezonans Spektroskapi
MSS	Merkezi sinir sistemi
MST	Morris su tankı
Mg^{+2}	Magnezyum
Naa	N-Asetil Aspartat
NMDA	N-Metil D-Aspartat
NSE	Nöron spesifik enolaz
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
PAF	Platelet Activating Factor (Trombosit Aktive Edici Faktör)
PCr	Fosfokreatinin
PgE2	Prostaglandin E2
Pi	İnorganik fosfor
PS	Populasyon spike
PTX	Pentoksifilin
PVHI	Periventriküler Hemorajik İnfarkt
PVL	Periventriküler Lokomalazi
RAS	Retiküler aktive edici sistem
SEP	Sensorial Uyarılmış Potansiyeller
S-100B	Calsiyum bağlayıcı protein B
SO	Siklooksijenaz
SOD	Süperoksit Dismutaz
SOR	Serbest Oksijen Radikalleri
TNF-α	Tumour Necrosis-α (Tümör Nekrozis Alfa)
TNFRI-II	Tumour Necrosis Faktör Reseptör 1-2
TxA2	Tromboksan A2
UDG	Uzun dönemli güçlenme
US	Ultrasonografi
VİK	Ventrikül içi kanama

TABLO VE GRAFİK LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1: Apoptozis ve Nekrozdaki Özelliklerin Karşılaştırılması) 11
Tablo 2: Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Sarnat ve Sarnat Evrelemesi)..... 17
Grafik 1: Beyin farklı bölgelerindeki apoptotik, dejeneratif ve canlı hücre Sayılarının karşılaştırılması. 36
Grafik 2: Grupların Moris su testi sonuçlarının karşılaştırılması. 38
Grafik 3: Gruplara göre akım şiddeti ile PS yüzdesinin değişimi ve ilk HFS sonrası PS genliğindeki değişim. 39
Grafik 4: Gruplara göre akım şiddeti ile EPSP yüzdesinin değişimi ve ilk HFS sonrası EPSP eğimindeki değişim. 40

ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1: Glutamatın Tetiklediği Nekroz ve Apoptoz 10
Şekil 2: İnflamasyon ve Septik Şokta Pentoksifilinin Etki Mekanizması……. 14
Şekil 3: Hipokampus ve Parahipokampal Oluşum…….25
Resim 1: Hipoksi Odacığı……...28
Resim 2: Cilt kesisi ve sağ karotid arteri bağlama……..29
Resim 3: Grupların hipokampal CA1 nöronlarda kaspaz 3 yöntemiyle apoptotik hücrelerin gösterilmesi…….37

ÖZET

HİPOKSİK İSKEMİK HASAR OLUŞTURULAN RATLARDA PENTOKSİFİLİN APOPTOZİS VE NÖROMOTOR YETİLER ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Amaç: Yenidoğan ve gebe takibindeki gelişmelere rağmen perinatal hipoksik iskemik beyin hasarı (HİBH) zeka geriliğinin, görme ve işitme kaybının, motor kusurların, epilepsinin, beyin felcinin ve ölümün en önemli nedenlerinden biridir. Ilımlı hipotermi bradikardi ve trombositopeni gibi bazı yan etkilerine rağmen peripartum hipoksi iskemiyi takiben yenidoğanlarda standart nöron koruyucu tedavidir. Ancak yine de, HİE'nin ilerleyişinin önlenmesinde yeni farmakolojik ve tedavi yaklaşımları araştırılmaya devam etmektedir. Bu çalışmada, yenidoğan HİBH modelinde sentetik bir teobromin türevi olan pentoksifilinin nöronal apoptozis, lokomotor aktivite ve sinaptik plastisite üzerine etkileri araştırıldı.

Mateyal-Metod: Çalışmaya alınan yedi günlük Wistar cinsi erkek yavru sıçanlar rastgele dört gruba ayrıldı. H-İ grubu (n:17), PTX60 grubu (n:18) ve PTX100 grubu (n:17)' ndaki sıçanlara orta hat kesisi yapılarak sağ karotid arterleri bağlandı. Bu sıçanlar %8 oksijen içeren hipoksi odacığında iki saat bekletildi. Hipoksi sonrası H-İ grubuna serum fizyolojik, PTX60 grubuna pentoksifilin 60 mg/kg ve PTX100 grubuna pentoksifilin 100 mg/kg periton içi yolla (i.p) verildi. Sham grubundaki sıçanların (n:19) ise karotid arterleri bulundu, fakat bağlanmadı. Bu sıçanlara hipoksi de uygulanmadı. Serum fizyolojik ve pentoksifilin 2 saat sonra tekrar uygulandı. 24 saat sonra 23 sıçan kaspaz 3 immunohistokimya metodu ile histopatolojik olarak apoptozisi saptamak için öldürüldü. Kalan yavru ratlar 11. haftaya kadar büyütüldü. 77-82. günler arasında bilişsel fonksiyonlar ve sinaptik plastisite sırasıyla Moris su tankı ve uzun dönemli güçlenme testi ile değerlendirildi.

Sonuçlar: Pentoksifilin 60 mg/kg 2 doz tedavi sadece hipokampusta apoptozisin tipik morfolojik özelliklerini gösteren kaspaz 3 pozitif hücre sayısını azalttı ($p<0.05$). PTX60 grubu H-İ grubu ile karşılaştırıldığında parietal korteks ve dentat girustaki kaspaz 3 pozitif apoptotik hücre sayısında azalma olmamasına rağmen, toplam dejeneratif hücre sayısında anlamlı azalma saptandı ($p<0.05$). Ancak pentoksifilin 100 mg/kg 2 doz tedavi beybib tüm bölgelerinde hem kaspaz 3 pozitif hücre sayısını hem de toplam dejeneratif hücre sayısında anlamlı azalmaya neden olmadı ($p>0.05$). serum fizyolojik ile tedavi edilen H-İ ratlarda ciddi uzamsal bellek bozukluğu gelişti. Pentoksifilin 60 mg/kg ile tedavi H-İ'nin neden olduğu uzamsal bellek bozukluğunu ve dentat girus uzun dönemli güçlenmesini iyileştirdi.

Sonuçlar: Düşük doz pentoksifilin tedavisi hem beyin hasarına karşı koruyucu hem de uzamsal öğrenme bozukluğunu ve sinaptik plastisiteyi iyileştirmektedir.

Anahtar kelimeler: Apoptozis, pentoksifilin, hipoksik iskemik beyin hasarı, sinaptik plastisite, lokomotor aktivite,

ABSTRACT

THE EFFECTS OF PENTOXIFYLLINE ON APOPTOSİS AND LOCOMOTOR ACTİVİTY İN RATS PUPS CREATED HYPOXİC ISCHEMİC BRAİN INJURY

Aim: Despite important progress in obstetric and neonatal care, perinatal hypoxic ischemic brain injury (HIBI) is one of the major causes of mental retardation, visual and auditory impairment, motor deficiencies, epilepsy, stroke, and death. Despite some adverse effects such as sinus bradycardia and thrombocytopenia, mild hypothermia is a standard neuroprotective treatment in newborn infants following peripartum hypoxia-ischemia. Nevertheless, new pharmacologic and therapeutic approaches in the preventing progression of HIE continue to be investigated. In this study, the effects of Pentoxifylline that is a synthetic theobromine derivative on neuronal apoptosis locomotor activity and synaptic plasticity in neonatal rat model of HIBI were investigated.

Matherial-Method: Seven-day-old Wistar male rats pups were randomly divided into four groups. Midline incision was performed on the rats in H-I group (n:17), PTX60 group (n:18), and PTX100 group (n:17) and their right carotid arteries were ligated. These rats were kept in a hypoxia chamber containing 8% oxygen for two hours. After the hypoxia, normal saline was administered intraperitonelly to the rats in H-I group, Pentoxifylline 60 mg/kg to those in PTX60 group, and Pentoxifylline 100 mg/kg to those in PTX100 group . The carotid arteries of those in sham group (n:19) were located, but were not ligated. The rats in this group were not exposed to hypoxia. Administration of saline and pentoxifylline was repeated after 2 hours. Twenty-three rat pups, twenty-four hours after hypoxia, the animals were killed for histopathological evaluation to detect apoptosis by caspase-3 immunohistochemistry method. The other rat pups were grown to 11 weeks. The synaptic plasticity and cognitive function of rats were evaluated using long term potentiation (LTP) and Morris water maze (MWM) test on D77–D82, respectively.

Results: Two doses treatment with pentoxifylline 60 mg/kg decreased the number of caspase-3 positive cells that showed the typical morphological features of apoptosis in only hippocampus ($p<0.05$). When compared with the H-I group, although the number of caspase-3 positive apoptotic cells in the dentate gyrus and parietal cortex did not decrease in the

PTX60 group ($p>0.05$), total numbers of degenerative cell significantly diminished (<0.05). But, two doses treatment with Pentoxifylline 100 mg/kg both caspase-3 positive apoptotic cells and total numbers of degenerative cell did not significantly decrease in all regions of brain. H-I rats treated with saline displayed severe spatial memory deficits. Pentoxifylline treatment at the dose of 60 mg/kg resulted in significant protection against H-I-induced spatial memory impairments and improved dentate gyrus-LTP.

Conclusions: Low dose pentoxifylline treatment is protective against both brain injury and improve spacial memory impairment and synaptic plasticity.

Key words: Apoptosis, pentoxifylline, hypoxic-ischemic brain injury, synaptic plasticity, locomotor activity.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Yenidoğanda hipoksik iskemik beyin hasarı (HİBH) bu dönemde meydana gelen ölümlerin, beyin felcinin, zeka geriliğinin ve epilepsinin en önemli nedenlerinden biridir (1). Gelişmiş toplumlarda HİBH görülme insidansı 1000 canlı doğumda 1-2 olup, gelişmekte olan toplumlarda ise bunun 2-3 katı olarak bildirilmektedir (2). Hipokside gelişmekte olan beyinde seçilmiş bölgeler hasar görmektedir (3). Olgunlaşmamış beynin hipoksi ve iskemiye yanıtı olgunlaşmış beyninkinden farklı olduğu bilinmektedir (1).

Hipoksi-iskemi ve yeniden kanlanma sonrasında gelişen apoptozisin şiddeti beyin hasarlanmasının bir göstergesi olabilir. Yapılan çalışmalarda yenidoğan döneminde gelişen hipoksik iskemik beyin hasarında apoptozisin nekrozdan daha önemli olduğu gösterilmiştir (4,5). Hipoksi ve iskemiyi takiben başlayan yeniden kanlanma dönemi ağır hasarın oluştuğu en kritik evredir. Bu dönem başlamadan "Terapötik pencere döneminde" yapılacak tedaviler ile HİBH' yi önleme ya da azaltma mümkün olabilir (6). Bu nedenle yenidoğanın HİBH modellerinde nöronal hasarı önlemek için çeşitli farmakolojik ilaçlar ve yöntemler bu dönem içerisinde kullanılmıştır.

HİBH' de sitokin ilişkili beyin zedelenmesi konusu giderek önem kazanmaktadır. Proinflamatuar sitokinler içinde TNF-α ve IL-1' in sitokin kaskadında çok önemli rolleri vardır. Sitokinlerin başlıca etkileri endotel hücresi aktivasyonu, lökosit endotel yapışması, lökositlerin enflamasyon bölgesine kemotaksisi, serbest oksijen radikalleri salınımı, NO sentezi, degranülasyon, sodyumun hücre içine girişi, fagositoz ve prokoagülan aktivitedir. TNF-α' nın apoptoz aktivatörü olduğu bilinmektedir. TNF-α esas olarak T lenfositler, makrofajlar, astrositler, mikroglia ve nöronlar tarafından sentezlenir (7).

Ayrıca iskemi reperfüzyon sonrası gelişen nöronal hasarlanmada trombosit active edici faktör (platelet activated factor-PAF) de önemli bir mediatör olarak görev yapmaktadır. PAF'ın gerek sistemik gerekse bölgesel uygulamalarıyla beyindeki kan dolaşımını olumsuz etkilediği bildirilmektedir (8,9). Son yıllarda yapılan çalşmalarda fosfodiesteraz inhibitörü olan pentoksifilinin TNF-α, IL-1, IL-6 gibi kemotaktik mediatörlerin yapımını azalttığı ve deneysel iskemi reperfüzyon hasarında ve AIDS farelerde beyinde PAF üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir (10-12).

Kapalı kafa travması oluşturulan erişkin rat modelinde pentoksifilinin beyinde TNF-α düzeyini yaklaşık %80 azalttığı ve buna paralel olarak beyin ödeminde azalma, fonksiyonel iyileşmede anlamlı artış saptanmıştır (13).

Literatürde, deneysel hayvan modellerinde pentoksifilinin kullanımıyla ilgili çok sayıda çalışma olmasına rağmen, bilgilerimize göre HİBH oluşturulan hayvan modellerinde pentoksifilin kullanımı ve nöronal apoptozis üzerine etkileriyle ilgili yayımlanmış sadece iki çalışma bulunmaktadır. Her iki çalışmada da kognitif fonksiyonlar değerlendirilmemiştir.

Bu çalışmada, HİBH oluşturulan yenidoğan sıçan modelinde bir immunmodülatör olan pentoksifilinin nöronal apoptozis ve uzun dönemde öğrenme ve bellek üzerine olan etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI

Perinatal hipoksik iskemik zedelenme fetus ve yenidoğan bebekte plasental ve pulmoner gaz değişiminin bozulması ile oluşur. Sistemik hipoksi ve serebral kan akımının azalması sonucu başta santral sinir sistemi olmak üzere tüm doku ve organlarda zedelenmeye neden olur (2). Yenidoğanda HİBH mortalitenin, serebral palsinin, mental geriliğin ve epilepsinin en önemli nedenlerinden biridir (1,2). Hipoksi durumunda kan beyin, kalp ve adrenal beze toplanır. Akciğer, böbrek, barsak ve ciltten uzaklaşır. Hipoksi ağır ise, öncelikle talamus ve beyin sapı hasar görmektedir. Sonrasında ventrikül çevresindeki beyaz cevherde nekroz gelişir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, hipokside gelişmekte olan beyinde seçilmiş bölgeler hasar görmektedir (2,3). İskemi ise bir doku veya organdaki kan akımının azalması veya kesilmesini ifade eder. İskemi durumunda dokuya yeterli oksijen ve besin maddeleri gidemeyeceğinden ve toksik maddeler uzaklaştırılamayacağından hipoksiye göre daha ağır bir hasar oluşur. Olgunlaşmamış beynin hipoksi ve iskemiye yanıtı olgunlaşmış beyninkinden farklı olduğu bilinmektedir (2) .

Hipoksi ve iskemi, fetüs ve yenidoğanın beyninde hasara yol açan nedenlerin başında gelmektedir. Gelişmiş toplumlarda HİBH görülme insidansı 1000 canlı doğumda 1-2 olup, gelişmekte olan toplumlarda ise bunun 2-3 katı olarak bildirilmektedir (2).

Asfiksi, hipoksi ve iskeminin bir arada görüldüğü bir süreçtir. Anne, fetus ve plasentadan oluşan biyolojik birimin işlevleri veya doğum sonrası akciğerde gaz değişiminin bozukluğu mevcuttur. Buna bağlı olarak fetus ve yenidoğanda hipoksemi, hiperkapni ve asidoz ile birlikte klinik bulgular gelişir (2). Asfiksi tanısı düşük apgar skoru, kord kanında asidoz ve hipoksik iskemik hasara bağlı yenidoğanda ortaya çıkan klinik bulgularla konur (14).

2.1.1.Fetüs ve yenidoğanda asfiksiye neden olan durumlar şunlardır (2):

Anneye Ait Nedenler

a. Kardiyak arrest

b. Boğulma

c. Ciddi anaflaktoid reaksiyon

d. Status epileptikus

e. Hipovolemik şok

f. Annede tiroid hastalığı

Plasentayla İlgili Nedenler

a. Plasenta ablasyonu

b. Kord prolapsusu

c. Uterin rüptürü

d. Oksitosik ajan ile hiperstimülasyon

e. Ödem veya infarkt olması

Fetüsle İlgili Nedenler

a. Fetomaternal kanama

b. İkizden-ikize transfüzyon

c. Ciddi izoimmun hemolitik hastalık

d. Kardiyak aritmi

2.1.2HİBH'nda Patofizyoloji

Hipoksik iskemik hasar sıklıkla uteroplasental kan akımının durması veya göbek kordonunun ani oklüzyonuna bağlı fetomaternal gaz değişimdeki yetersizlik sonucu ortaya çıkar. Altta yatan patolojik olayın bilinmesi hastalığın tüm yönlerinin anlaşılmasını sağlayacaktır. Yenidoğandaki hipoksik beyin hasarına hipoksi ve iskemi birlikteliği neden olur. Olgunlaşmamış beynin hipoksi ve iskemiye yanıtının erişkin beyninden farklı olduğu bilinmektedir. Hipoksemi ağır ise çevresel dokularda ve beyinde anaerobik glikolizis ile laktik asit oluşumunda artma meydana gelir. Ayrıca yüksek enerjli fosfat yapımında azalma, hücre içi kalsiyum ve hücre dışı potasyum birikimi olmaktadır. Bununla birlikte serbest radikal oluşumu, uyarıcı aminoasit metabolizmasında bozulma meydana gelmektedir(1,2).

Hipoksi ve iskemiyi takiben başlayan reperfüzyon dönemi ağır hasarın oluştuğu evredir. Bu dönem başlamadan yapılacak tedaviler ile beyin hasarını önleme ya da azaltma mümkün olabilir (15). Hipokampus, serebellum ve korteksin bazı katmanları hipoksi iskemiye daha hassastır. Sinir sisteminin olgunlaşma derecesi ile hipoksik iskemik olaydan etkilenme şekli değişir. Erkendoğan bebeklerde daha çok ventrikül çevresinde lökomalazi ve kanamalar görülürken, zamanında doğanlarda seçici nöronal nekroz, parasagital beyin hasarı (parieto-oksipital), bölgesel ve çoklu bölgesel beyin hasarı daha sıktır (2).

2.1.3.Eksitotoksisite ve HİBH

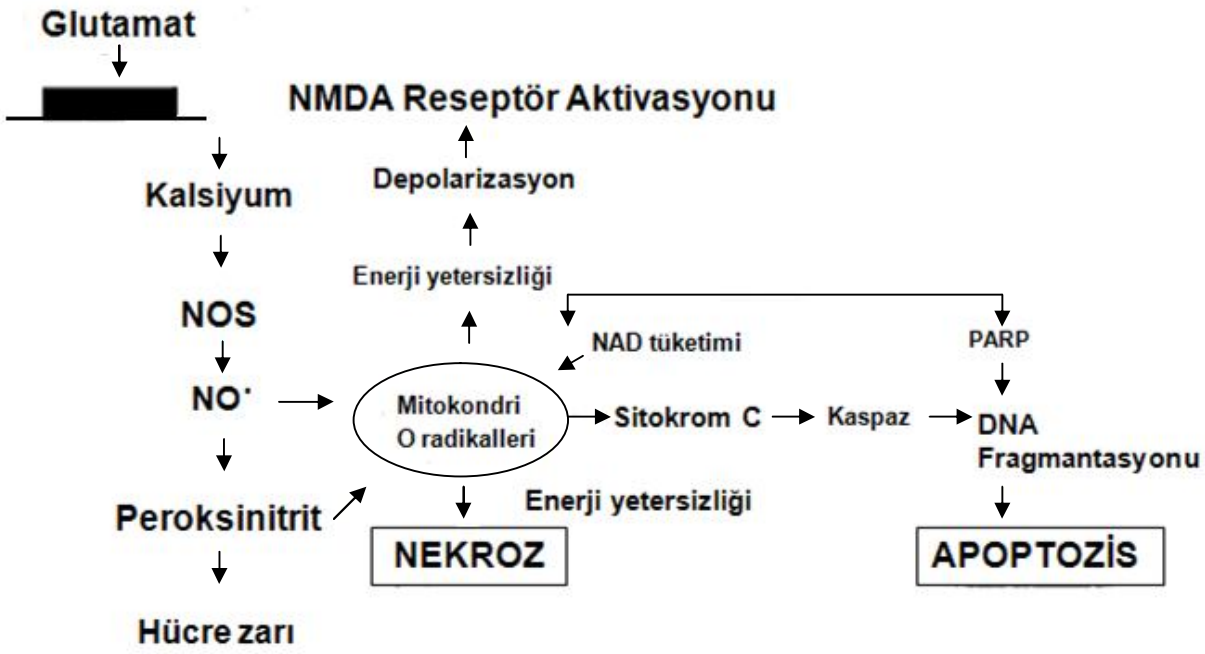
Nöronların hipoksik iskemik hasarından sorumlu temel oluşum eksitotoksisitedir. Ekstraselüler uyarıcı aminoasit reseptörlerinin aşırı stimulasyonunun neden olduğu hücre ölümü olarak 1970'lerde Jhon Olney tarafından tanımlanmıştır (16). Yapılan çalışmalarda glutamat reseptör aracılı eksitotoksisitenin nöronal hücre ölümünde kilit rol oynadığı ve bunun gelişmekte olan beyinde, erişkin beyninden daha önemli olduğu gösterilmiştir (16-19).

Glutamat için dört reseptör bilinmektedir.

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

Akut enerji eksikliği ekstraselüler aşırı glutamat salınımına ve iyonotrofik NMDA, AMPA ve kainate reseptörlerinin kontrolsüz aktivasyonuna neden olmaktadır (16,20). Böylece intraselüler Ca konsantrasyonu artarak kinaz, fosfataz, proteaz, serbest radikal üretimi, mitekondrial disfonksyon, inflamasyon, DNA hasarı ve sonuç olarak geri dönüşümsüz nöron hasarı ve ölümüne neden olan hücre içi toksik yolakların aktivasyonunu tetikler (20-22).

Hipoksi iskeminin neden olduğu sinaptik disfonksiyonun bir diğer önemli parçası postsinaptik nöronal membran depolarizasyonudur. Aşırı miktarda sinaptik glutamat düzeyi nedeniyle oluşan membran depolarizasyonu kanalların daha fazla açılmasına ve Na^{+} ve Ca^{+2}'un daha fazla hücre içine girişine neden olur. Normal mitokondrial fonksiyon varlığında glutamatın yüksek düzeylerine rağmen membran depolarizasyonu bir dereceye kadar olurken, oksidatif stres ve hücrelere glukoz sunumundaki bozulmanın neden olduğu aşırı sinaptik glutamat salınımının sinerjistik etkisiyle aşırı düzeyde eksitotoksisite meydana gelebilir (23). Glutamat reseptörlerinin uyarılması nöronal hücre ölümünde anahtar rol oynamaktadır (17) (Şekil 1). Glutamat, özgün reseptörleri ile etkileşerek duyusal bilgilerin iletilmesi, motor aktivite, spinal reflekslerin düzenlenmesi, hafıza ve öğrenme gibi birçok işlevde önemli rol oynamaktadır (16) .



Şekil 1: Glutamatın Tetiklediği Nekroz ve Apoptoz

2.1.4.Apoptozis

Eksitotoksik hücre ölümü nekrozis ya da apoptozis şeklinde olur. Geç dönemdeki nöronal ölüm saatler ve günler içerisinde gelişen apoptozisle meydana gelir. Yapılan çalışmalarda yenidoğan döneminde gelişen hipoksik iskemik beyin hasarında apoptozisin nekrozdan daha önemli olduğunu göstermiştir (23,24). Apoptoz süreci, DNA hasarına genlerin yanıtı, hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınması (Fas ligandı), hücreye doğrudan proteolitik enzim girişi olmak üzere üç farklı şekilde işleyebilir. Bu süreçte belli başlı üç anahtar bileşen vardır. Bunlar: Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1) protenidir. Bu bileşenlerin biyokimyasal aktivasyonu ile apoptozda gözlenen mitokondriyal hasar, çekirdek zarı kırılması, DNA parçalanması, kromatin marjinasyonu ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişiklikler ortaya çıkar (25). Apoptozis çok sayıda mediatör tarafından düzenlenir. Bunlar arasında, bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (bcl-2), proteinler (p53) ve hatta organeller bulunmaktadır (5). Apoptozis sürecinde hücre içine sürekli olarak kalsiyum girer. Kalsiyum iyonu da endonükleaz, proteaz, lipaz ve deoksiribonükleaz aktivasyonuna neden olur. Ayrıca kalsiyum reaktif oksijen moleküllerinin artışına neden olur. Seramid apoptotik etkisini proteazları ve endonükleazları aktive ederek DNA parçalanmalarına sebep olarak yaptığı

sanılmaktadır (25,26). Apoptozu başlatan ve engelleyen genler yaşamsal dengenin sağlanmasında önemlidir.

Kaspazlar apoptotik programın önemli bir bileşenidir. Görevleri sitokin üretimine katkıda bulunmak ve proteolizisi başlatmaktır. Kaspaz aktivasyonu hücreye özgüdür. Kaspaz inhibitörlerinin apoptozisi engellediği gösterilmiştir (27) . Apoptoz ve nekroz yoluyla meydana gelen hücre ölümü arasında önemli farklar bulunmaktadır (4). Bu farklar Tablo 1' de özetlenmiştir. Nekroz patolojik bir olaydır. Apoptozis ise fizyolojik veya patolojik uyaranlarla oluşabilir.

Tablo 1: Apoptozis ve Nekrozdaki Özelliklerin Karşılaştırılması

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

2.1.5.HİBH'da Kaspazların (caspase) Rolü

Kaspazlar (cysteine-containing aspartate specific protease) kalsiyum bağımsız hücre içi sistein proteaz sınıfının en önemli bölümünü oluştururlar (28,29) . Apoptozis ile ilişki kurulan en önemli olay kaspazların aktivasyonudur.

Bilinen 14 adet kaspaz mevcuttur. Kaspaz 2,8,9,10 apoptozu başlatıcı; 3,6,7 ise apoptozu yürüten kaspazlar olarak bilinmektedir (4). Kaspazlar inaktif prekürsörler olarak hücre sitoplazmasında bulunurlar ve çoğu proapoptotiktir. Sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesi ve prokaspaz 9'u uyarması ile apoptoz başlar (4). Kaspazlar apoptozisi aktive

eden sinyaller tarafından tetiklenmektedirler. Kaspazlar belirli proteinleri parçalamaktadırlar. Bu parçalanma sonucunda diğerleri de aktive olarak proteolitik bir süreci başlatırlar. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarı ile başlayan ölüm sinyallerini yürütücü kaspazlara iletirler. Yürütücü kaspazlar ise ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücrenin oluşmasına neden olmaktadır (4). Kaspaz 1 ve kaspaz 3 iskemide başlayan hücre ölümü mekanizmasında en önemli mediatörlerdir (30,31). Chen ve arkadaşları kaspaz 3'ün geçikmiş nöronal ölüme aracılık ettiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca kaspaz 3 inhibitörlerinin hücre ölümü üzerine etkilerinin kaspaz 1 inhibitörlerine göre daha etkili olduğunu bildirmişlerdir (32,33). Kaspazların baskılanması ile apapoptozun önleneceği ve HİBH'nin azaltılabileceği düşünülmektedir.

2.1.6.HİBH'da Sitokinlerin Rolü

Hipoksik iskemik beyin hasarında proinflamatuar sitokin-beyin zedelenmesi ilişkisi önemle sorgulanmaktadır. TNF-α'nın apoptoz aktivatörü olduğu bilinmekle birlikte, bu etkisini sitozolde sifingomyelinazı aktive edip seramid artışını sağlayarak yapmaktadır (34). Hipoksi sonrası altıncı saatte zirve yapan geçici bir IL-1beta ve TNF-α yüksekliği olduğu ve rekombinant IL-1 ra hipoksi öncesi veya sonrasında verildiğinde beyin zedelenmesini engelleyebildiği gösterilmiştir (35). Proinflamatuar sitokinler içinde TNF ve IL-1, sitokin kaskadındaki çok önemli rolleri nedeniyle proinflamatuar orkestra şefleri olarak tanımlanabilirler. Diğer proenflamatuar mediatörler endotelden TNF-α ve IL-1 etkisi ile salınırlar ve vazodilatötör (NO, PAF, PGE-2) veya vazokonstriktör etki yaparlar (36).

TNF-α proinflamatuar sitokinlerin yanı sıra antiinflamatuar sitokinleri ve doğal sitokin inhibitörü olan IL-1 ra reseptörlerin üretimini de etkiler. Böylece aşırı sitokin yanıtını dengeler (34). TNF-α esas olarak T lenfositler, makrofajlar, astrositler, mikroglia ve nöronlar tarafından sentezlenen ve sekretuar formu 17 KD, membran formu ise 26 KD olan bir sitokindir. Molekül ağırlıklarına göre P55 reseptörü (TNFRI) ve p75 reseptörü (TNFRII) olmak üzere iki adet reseptörü vardır. P55 birçok biyolojik etkinin başlamasında rol oynar (36). Deneysel beyin zedelenmesi modellerinde artmış TNF-α gösterilmiştir. Hayvan modellerinde hipoksi iskemi ertesi dördüncü saatte serum ve BOS'ta TNF-α'da artışla birlikte beyinde ödem ve nötrofil birikimi olmaktadır (37). Ayrıca yapılan son çalışmalar TNF-α'nın NMDA aracılı glutamat nörotoksisitesini potansiyalize ettiği gösterilmiştir (38).

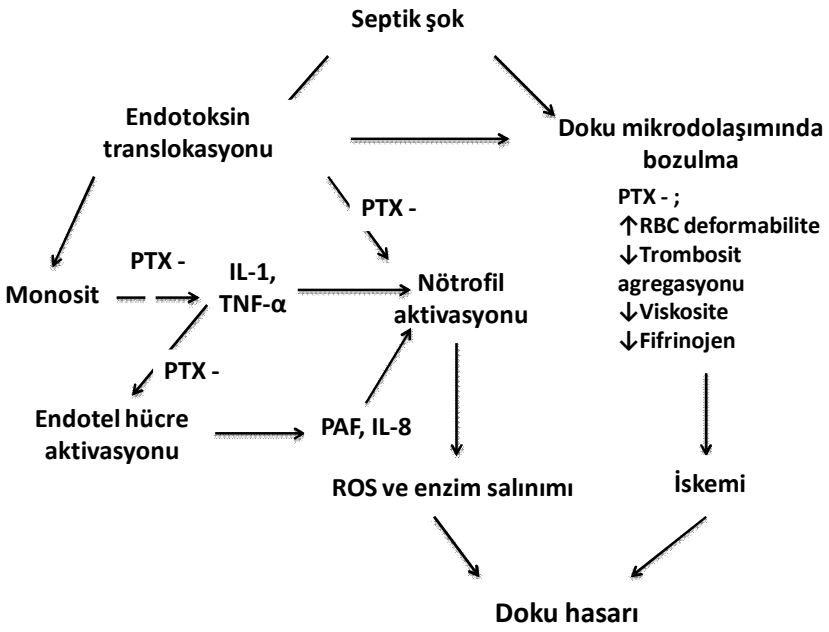
2.2.PENTOKSİFİLİN

Pentoksifilin sentetik bir teobromin derivesi olup yapısal olarak metilksantin, teofilin ve kafein ile benzerlik gösteren fosfodiesteraz inhibitörüdür. Ancak diğer metilksantin türevlerinden farklı olarak hemoreholojik etkilere sahiptir. Eritrosit deformobilitesini iyileştirip agregasyonu azaltır. Ayrıca plazma viskositesini de azaltarak mikrosirkülasyonu iyileştirir. Bu nedenle pentoksifilinin başlıca kullanım alanı periferik ve serebrovasküler hastalıklardır. Ayrıca hemotolojik malignitesi olan hastalarda özellikle kemik iliği transplantasyonu sonrası ortaya çıkan toksik yan etkileri ve greft reddi reaksiyonunun önlenmesinde koruyucu ajan olarak kullanılmaktadır (39).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda pentoksifilinin TNF-α, IL-6 gibi kemotaktik mediyatörlerin yapımını azalttığı ve böylece inflamatuar reaksiyonları baskıladığı gösterilmiştir. Dolayısıyla yenidoğan ünitelerinde de sepsis ve nekrotizan enterekolit gibi ciddi inflamatuar olaylarda immünmodülatör olarak kullanılmaktadır.

2.2.1.Etki Mekanizması

İnflamasyon ve septik şokta pentoksifilinin etki mekanizması Şekil 2'de özetlenmiştir. Pentoksifilinin antiinflamatuar özelliği intrasellüler cAMP aktivitesini arttırıp eritrosit fosfodiesterazını inhibe etmesi yoluyla gerçekleşir. Ayrıca pentoksifilinin hemoreholojik etkisi sayesinde kanın viskozitesi azalır ve böylece doku perfüzyonu ve mikrosirkülasyonu iyileşir. Bir fosfodiesteraz inhibitörü olduğu için TNF-α, IL-6 ve IFN-ɣ gibi güçlü proinflamatuar sitokinleri azaltır. Pentoksifilin nötrofil fonksiyonları üzerinde çift yönlü etkiye sahiptir. Düşük dozlarda yangıyı arttırırken yüksek dozlarda azaltmaktadır (39). Ayrıca iskemi reperfüzyon hasarında pentoksifilinin PAF üretimini inhibe ettiği de gösterilmiştir (11).



Şekil 2: İnflamasyon ve Septik Şokta Pentoksifilinin Etki Mekanizması

2.2.2.Pentoksifilinin Farmakokinetik Özellikleri

Pentoksifilin suda ve etanolde çözünür. Kanda % 70 oranında çözünmüş olarak bulunur. Eliminasyon yarı ömrü 0.4-0.8 saattir. Ancak yenidoğan ve çocuklarda pentoksifilinin farmakokinetiği hakkında veriler sınırlıdır. Szymura-Oleksiak ve arkadaşları septik şoklu yenidoğanlarda 6 saatten uzun süre intravenöz pentoksifilin infüzyonunu, erişkin septik şoklu hastalarla karşılaştırması sonucunda aynı doz ile tedavi edildiğini bildirmiştir (40). Ancak klinik iyileşme geçici olup sadece birkaç saattir. Bu otörler bu yüzden 12 saatten uzun süre 60 mg/kg/gün kullanmışlardır, ki bu da pentoksifilinin serum konsantrasyonunda anlamlı bir artış ile sonuçlanmıştır. Bu dozun yan etki olmaksızın iyi tolere edildiği bildirilmiştir (39).

2.3.HİBH'DA HİSTOLOJİK BULGULAR

Volpe, hipoksik iskemik beyin hasarında önemli nöropatolojik bulgular tanımlamıştır (41). Bir kişide birden fazla lezyon gözlenebilmektedir. HİBH'den sonra gözlenen klinik ve nöropatolojik anomaliler, hasarın yapısı ve etkilenen bebeklerin gebelik yaşına göre değişmektedir. Zamanından önce doğan bebeklerde germinal matriks veya ventrikül içinde kanamaya neden olabilir. Zamanında doğanlarda patoloji daha çok serebral korteks ve bazal gangliyonlardadır. Bu nedenle zamanında doğan ve zamanından önce doğan bebekteki beyin hasarı ayrı ayrı ele alınmalıdır (2).

2.3.1.Seçici Nöronal Nekroz

HİBH'nın en sık rastlanan nöropatolojik durumudur. Hipokampus, serebellum, beyinsapı, talamus ya da korteksin spesifik bölgelerini içerebilir. Uterin rüptür ve kord prolapsusu gibi akut global bir hasarda beyin sapı, talamus ve bazal ganglionlar sıklıkla hasarlanırken, kronik hipoksi iskemide korteks ve subkortikal beyaz cevher hasarı daha sık olmaktadır. Klinik bulgular hasarın yerine bağlıdır. Konvülzyonlar kortikal hasarın bir özelliği iken, bazal ganglion ve talamusu ilgilendiren infarklarda irritabilite, postür bozukluğu ve beyin sapı disfonksiyonu gelişir (41).

2.3.2.Status Marmoratus

En az görülen nöropatolojik lezyon olup genellikle zamanında doğan bebeklerde gözlenir. Temel olarak bazal ganglia ve talamusta oluşur ve bölgelerin mermerimsi bir görünümüne neden olur. Yenidoğan dönemindeki kısa dönem etkileri bilinmemektedir. Uzun dönem sekelleri ise entelektüel bozulma, distoni, koreoatetoz ve tremoru içermektedir (41).

2.3.3.Parasagital Serebral Nekroz

Serebral korteksin ve serebral konveksitelerin parasagital bölgelerine lokalize beyaz madde nekrozunu ifade eder. Lezyonlar ön, orta ve arka serebral arterlerin sulama alanlarındadır. Bozulmuş serebrovasküler otoregülasyon bu alanlarda belirgin iskemi ile sonuçlanır. Genellikle bilateral ve simetrik olmakla beraber asimetrikte olabilir. Kısa dönem etkileri proksimal ekstremitelerin proksimalinde hipotoni ve kuvvet kaybıdır. Üst ekstremiteler alt ekstremitelerden daha fazla etkilenir. Uzun dönem etkileri spastik kuadriparezi, konuşma bozukluğu ve göz hareketlerinde bozukluktur (41).

2.3.4.Bölgesel ve Çoklu Bölgesel İskemik Beyin Nekrozu

Genellikle zamanında doğan bebeklerde doğumdan sonraki iskemik olaylar sonucunda gözlenir. En sık etkilenen bölge orta serebral arterin beslediği alanlardır. Genellikle tek taraflıdır. Beyin parankiminde infarktlara bağlı oyuklar oluştuğunda porensefalik kist, multikistik ensefalomalazi ve hatta hidrensefali gelişebilir. Bebeklerin en az %80'inde belirgin semptom nöbettir. Bölgesel veya çoklu bölgesel beyin nekrozunun uzun dönem sekelleri spastik hemiparezi, kuadriparezi, bilişsel bozukluklar ve nöbetlerdir (41).

2.4.HİBH' DE KLİNİK BULGULAR

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

yaşı ile ilişkilidir. Genellikle hipoksik iskemik ensefalopati süreci doğum sonrasında 12 saatlik dilimler halinde incelenir (42).

İlk 12 Saatlik Dönem: Ağır olgularda ilk 12 saatte stupor, koma, düzensiz solunum, solunum yetmezliği, hipotoni, yenidoğan reflekslerinde baskılanma, kendiliğinden hareketlerde azalma vardır. Ağır olguların %50-60'ında ilk 6-12 saat içinde konvülziyon görülür. Pupillanın ışığa yanıtı başlangıçta tamdır. Hafif olgularda pupilla genellikle geniş ve uyarılabilirken, ağır olgularda dar veya ışığa duyarlı değildir (42).

12- 24 Saatlik Dönem: Bu dönemde ağır olgularda koma devam ederken hafif vakalarda bilinç durumunda bir miktar iyileşme görülür. Uyanıklığın artması ile beraber konvulziyonlar, apne, huzursuzluk, titreme benzeri klinik belirtiler artabilir (42).

24- 72 Saatlik Dönem: Ağır olgularda 24- 72 saat içinde beyin ve beyin sapı işlevleri bozulur, bilinç giderek kötüleşir, pupil ışık tepkisi ve okülosefalik tepki alınamaz, koma gelişir, solunum durması olur ve bu dönemde bebeklerin çoğu kaybedilir (42).

72. Saatten Sonraki Dönem: 72 saatten sonra hayatta kalan olgularda günler, haftalar içerisinde bir miktar düzelme olur. Bilinç düzeyinde kısmen iyileşme olmakla birlikte hafif bir stupor hali devam eder, emme, yutma ve dil hareketlerinde sorunlar ortaya çıkar. Genellikle beslenmede sorunlar yaşanır. Bazal ganglion tutulumu olan hastalarda tonus artışı belirgin olmakla birlikte çoğu hastada ekstremitelerde yaygın tonus azalması olur (42).

Perinatal hipoksik iskemik olaylar çoğunlukla beyin dışındaki organları da etkiler. Akciğerlerde surfaktan yapımının baskılanmasına bağlı olarak respiratuvar distres sendromu gelişebilir. Doğum öncesi başlayan hipoksi mekonyum aspirasyonu sendromu ile sonuçlanabilir. Akciğerde ödem, kanama, pulmoner hipertansiyon ve devamlı fetal dolaşım gelişebilir (2). Kalpte miyokard iskemisine bağlı olarak konjestif kalp yetmezliği, hipotansiyon, ritim bozukluğu, mitral ve triküspit kapak yetmezliği görülebilir. Perinatal hipoksi-iskemiyi takiben böbrek kanlanması azalır, akut tubuler nekroz, kortikal veya meduller hasar sonucunda böbrek yetmezliği gelişebilir. Olguların çoğunda oligüri gelişir, üre ve kreatinin değerlerinde yükselme görülür (2). Hematüri ve renal ven trombozu gelişebilir. Barsaklarda yaşanan hipoksi ve iskemi sonucunda nekrotizan enterekolit görülebilir. Sıklıkla karaciğer enzimlerinde yükselme ve pıhtılaşma testlerinde bozulma olur. Ağır olgularda adrenal yetmezlik, adrenal bezlerde kanama, uygunsuz antidiüretik hormon (ADH) salınımı görülebilir. Ayrıca trombositopeni, deri altı yağ dokusu nekrozu ve hipoglisemi, hipokalsemi, hiponatremi gibi metabolik sorunlarla sık karşılaşılır (2).

Modifiye Sarnat sınıflaması günümüzde hipoksik iskemik ensefalopatinin evrelemesinde en sık kullanılan sınıflamadır. Bu sınıflamaya göre olgular hafif, orta ve ağır olarak sınıflandırılmaktadı (2) (Tablo 2).

Tablo 2: Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Sarnat ve Sarnat Evrelemesi

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

2.5.HİBH TANISI

Perinatal HİE'nin tanısında öykü ve fizik muayene oldukça önemlidir. Öyküde doğum öncesi dönem, doğum süreci ve doğum sonrası dönemle ilgili ayrıntılı bilgiler alınmalıdır. Bebeğin fiziksel incelemesinin özellikle de nörolojik muayenesinin dikkatli bir şekilde yapılması HİE tanısının konmasına, ağırlığının belirlenmesine ve erken dönemde tedavinin başlanmasına yardımcı olacaktır. Amerikan Obstetrik ve Jinekoloji Derneği 2004 yılında aşağıda yer alan tanı ölçütlerinin kullanılmasını önermiştir (43).

Tanı için bulunması zorunlu tutulan ölçütler:

1. Göbek kordonundan alınan arteriyel kan gazında metabolik asidozun varlığı (pH< 7.0 ve baz açığı≥ 12 mmol/L),

2. Gebelik yaşı 34 hafta veya daha büyük olan bebeklerde erken dönemde orta veya ağır derecede ensefalopati bulgularının varlığı,
3. Enfeksiyon, travma, kanama bozuklukları, genetik bozukluklar gibi ensefalopatiye neden olabilecek diğer nedenlerin dışlanması.

Hipoksik iskemik ensefalopatiye özgün olmayan ek ölçütler:

1. Beşinci dakika Apgar puanının sıfır ile üç arasında olması,
2. İlk 72 saat içinde çoklu organ tutulumunun olması,
3. Hipoksik iskemik olayın doğum öncesinde veya doğum sırasında başlamış olması,
4. Erken dönemde yapılan görüntülemede akut ve yaygın beyin hasarı varlığının kanıtlanması,
5. Başlangıçta fetal izlem bulguları normal iken hipoksik olay sonrasında anormal bulguların (bradikardi, geç veya değişken deselerasyonlar) saptanması.

HİE tanısının konması kadar ağırlığının belirlenmesi de önemlidir. Hafif HİE çoğu zaman tedavi gerektirmeden kısa zamanda düzelmekte ve önemli sakatlıklara neden olmamaktadır. Ağır HİE ciddi seyretmekte ve var olan tedavi yöntemlerine rağmen ağır sakatlıklara neden olmaktadır. Orta derecede HİE'li bebeklerin ise bir kısmı tedaviden yarar görürken ve önemli sakatlıklar gelişmezken, diğer kısmında önemli sakatlıklar gelişmektedir (44). Orta derecede HİE'nin bu kadar farklı şekilde sonuçlanabilmesi evreleme için yaygın olarak kullanılan Sarnat ve Sarnat sınıflamasının yetersiz olduğunu düşündürmektedir. Erken dönemde tanının konması ve hangi hastaların tedaviden yarar göreceklerinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Öykü ve fiziksel inceleme her zaman HİE tanısının konması ve tedaviden fayda görecek hasta grubunun belirlenmesi için yeterli olmamaktadır, bu nedenle elektrofizyolojik, biyokimyasal ve radyolojik yöntemlerden de yararlanılmaya çalışılmaktadır.

2.5.1.Biyokimyasal İncelemeler

HİBH'nin varlığını, şiddetini, başlama zamanını, prognozunu gösterebilen ve klinik kullanımda olan bir biyokimyasal test şuan 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 IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-9, IL-12, IL-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, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, bulunmaktadır (44).

2.5.2.Elektrofizyolojik testler

2.5.2.1.Elektroensefalogram (EEG)

Elektroensefalogram (EEG) hipoksik iskemik ensefalopatinin tanısı, evrelemesi ve prognozunun ön görülebilmesi için oldukça önemlidir. Ayrıca klinik olarak tanınması güç olabilen gizli konvülziyonların tanı ve tedavisinde de oldukça önemlidir. Hafif HİE'de genellikle EEG normaldir. Orta HİE de düşük voltaj veya nöbet aktivitesi sık gözlenir. Ağır HİE de ise nöbet aktivitesi veya sürekli izoelektrik hatta çizecek kadar baskılanma görülebilir (2).

2.5.2.2.Amplitüd-Entegre Elektroensefalogram

Son yıllarda uygulanmaya başlanan amplitüd-entegre elektroensefalogram (aEEG) ile geleneksel EEG'den farklı olarak daha az sayıda elektrot kullanılarak ve daha kolay bir şekilde hasta başında sürekli olarak beynin elektriksel aktivitesi izlenebilmektedir (45). Yakın zamanda yayınlanan bir toplu çözümlemede HİE'li bebeklerde yapılan aEEG'nin %91 duyarlılık ve %88 özgüllükle uzun dönemli sonuçları öngörebildiği bildirilmiştir (46). Bu toplu analizin işaret ettiği gibi erken dönemde aEEG hangi hastalara nöron koruyucu tedavi yöntemlerinin uygulanması gerektiğini göstermesi açısından oldukça önemli bir yöntemdir. Bazı merkezler soğutma uygulanacak HİE'li bebekleri belirlerken aEEG'yi bir ölçüt olarak alırlarken diğerleri almamaktadır (46,47). aEEG'yi soğutma için bir ölçüt olarak alan merkezler orta veya ağır derecede aEEG bozukluğu varlığında soğutma tedavisini uygulamaktadırlar (47).

2.5.2.3.Beyin sapının işitsel ve görsel uyarılmış potansiyelleri (BAEP ve VEP) ölçümü

Beyin sapının işitsel ve görsel uyarılmış potansiyellerinin ölçümünün sinirsel sağırlık ve görsel bozukluğu retrospektif olarak önceden bildiren yöntemler olduğu kabul edilir. Uyarılmış beyin sapı potansiyelleri perinatal asfiksinin tanı, izlem ve prognoz tayininde kullanılmaktadır. Bu testler, beyin sapı yapılarını değerlendirmeye olanak tanır. Zamanında doğan bebeklerde yapılan bir çalışmada ilk 24 saatte normal somato-sensöriyel uyarılmış potansiyeller (SEP) varlığı iyi prognozu önceden belirlemede %94 duyarlı olduğunu gösterilmiştir (48).

2.5.3.Görüntüleme teknikleri

2.5.3.1.Kraniyal Ultrasanografi (US)

Bu yöntem yüksek etkili, zararsız ve ucuz olması nedeniyle sık tercih edilen bir tanı aracıdır. Perinatal HİE'li bebekte erken dönemde beyin ekodansitesinin artması, temel anatomik yapıların ayırt edilememesi, sulkusların silinmesi ve ventriküllerin basıya uğramış olması beyin ödemini düşündürür (48).

2.5.3.2.Renkli Dopler Sonografi

Bu yöntem ile beyin arter kan akım hızı ve beyin kan hacmi ölçülerek tanı ve prognoz hakkında fikir edinilebilmektedir. Ön serebral arterden yapılan ölçümlerde diyastol sonu kan akım hızının sistolik kan akım hızına oranının 0,55'den küçük olmasının HİE'li bebeklerde prognozun kötü olacağını gösterdiği bildirilmiştir (48).

2.5.3.3.Bilgisayarlı Tomografi (BT)

Hipoksi-iskemi sonrasında beyinde ortaya çıkan dansite azalması ve zamanında doğan bebeklerde daha sık olarak rastlanan parasagital infarktların gösterilmesinde bilgisayarlı tomografi oldukça yararlıdır BT'nin özellikle beyin ödeminin en belirgin olduğu iki ile beşinci günler arasında dansite değişikliğini yansıtacağı kabul edilmektedir. Beyin dansitesindeki azalmanın kötü prognozu yansıttığı gösterilmiştir (48).

2.5.3.4.Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG)

Parasagittal serebral hasar MRG ile diğer görüntüleme yöntemlerinden çok daha iyi görüntülenebilir. PVL'nin akut döneminde BT ile sıklıkla şüpheli sonuçlar alınırken, MRG ile kesin tanı konulabilir. Ancak MRG'nin pahalı oluşu ve her yerde bulunmayışı nedeniyle kullanımı sınırlı kalmaktadır (48).

2.5.3.5.Manyetik Rezonans Spektroskopi (MRS)

Bu yöntemle hipoksi ve iskeminin erken ve geç bulgularını detaylı bir şekilde değerlendirmek ve bunları prognoz ile ilişkilendirmek mümkündür. MRS ile ^{31}P kullanılarak fosfokreatinin (PCr) ve inorganik fosfat (Pi) ölçümü yapılabilmektedir. PCr/Pi oranı beyindeki fosforile enerji durumunu yansıtır, asfiktik bebeklerde bu oranın düşük olması kötü prognoza işaret eder (48).

2.5.3.6.Proton MRS

HİBH'li bebeklerin beyinlerinde laktat oranında artış ve N-asetil-aspartat (Naa) düzeyinde düşüş olduğu bu yöntemle saptanmıştır. Naa/kreatinin veya Naa/kolin oranındaki düşüklüğün kötü prognozu yansıttığı gösterilmiştir (48).

2.5.3.7.Near- infrared Spektroskopi

Hasta başında kullanılabilen, invazif olmayan bir tanı yöntemi olup, bu yöntemle beyinin oksi ve deoksi hemoglobin düzeyinin belirlenmesi mümkün olmaktadır (49). HİE'li bebeklerde prognozun tahmininde kullanılmasına yönelik araştırmalar devam etmektedir.

2.6.HİBH' DE TEDAVİ

Özellikle ciddi HİBH'li bebekler sıklıkla kalp, akciğer, böbrek ve karaciğeri içeren çoklu organ yetmezliğine sahiptir. HİBH'li bebeklerin çoğunda etkilenme intrauterin dönemde olur. HİBH oluştuktan sonra uygulanan tedavilerde henüz istenen başarı sağlanamamıştır. Bu yüzden HİBH gelişiminin önlenmesine yönelik çalışmaların önemi devam etmektedir.

2.6.1.Destek Tedavisi

Tüm perinatal hipoksik iskemik ensefalopatili bebeklerin %90 kadarı doğum öncesi dönemde ve doğum sırasında, %10 kadarı ise doğum sonrası dönemde hipoksik iskemik olayla karşı karşıya kalırlar (50). Bu nedenle yenidoğanın canlandırılması konusunda deneyimli en az bir, mümkünse iki kişinin doğum odasında bulunması ve gerektiğinde etkin bir şekilde solunum ve dolaşım desteği sağlamaları oldukça önemlidir. Hipoksik iskemik ensefalopatili bebeklerde yeniden canlandırma uygulamalarının ardından gerekiyorsa solunum desteğine etkin şekilde devam edilmelidir. Karbondioksit normal sınırlar içerisinde tutulmalıdır. Hipotansiyon açısından bebek yakından takip edilmeli gerekiyorsa sıvı ve inotrop desteği verilmelidir. Sıvı desteği uygulanırken uygunsuz ADH salınımı ve beyin ödemi açısından dikkatli olunmalıdır. Hipoglisemi, hipokalsemi, hiponatremi, hipomagnezemi, metabolik asidoz, böbrek yetmezliği ve konvülziyonlar açısından bebek yakından izlenmeli ve uygun şekilde tedavi edilmelidir (51).

2.6.2.Konvülziyonların Tedavisi

Orta ve ağır derecede hipoksik iskemik ensefalopatili bebeklerde ilk saatlerden itibaren sıklıkla konvülziyonlar görülür. Yapılan hayvan ve insan çalışmalarında konvülziyonların sadece bir bulgu olmadığı, var olan HİBH'yi arttırdığı gösterilmiştir (52). Bu nedenle HİE'li bebeklerde konvülziyonların etkili bir şekilde tedavi edilmesi beyin hasarının artmasını engelleyebilir. Fenobarbital HİE'li yenidoğanlarda en sık tercih elden antikonvülzandır (42). Son yıllarda yapılan hayvan çalışmalarında topiramatın ve levatirasetamın HİBH'de nöron koruyucu etkilerinin olduğu bildirilmiştir (53).

2.6.3.HİBH Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar

Beyni korumanın farklı yöntemleri henüz araştırma aşamasındadır. Yenidoğan bebeklerdeki etkileri henüz tam olarak belirlenmemiştir. Beyin koruması için barbitürat, glutamat reseptör antagonistleri, serbest radikal baskılayıcıları, hipoksantin, kök hücre uygulaması ve hipotermi gibi çeşitli deneysel yöntemler hala araştırılmaktadır. Çalışmaların çoğu deneysel düzeyde olup, henüz klinik uygulamaya geçmemiştir (54).

2.6.4.Hipotermi Uygulanması

Hipotermi serebral metabolizma hızını azaltır. Nekrotik ve apoptotik hücre ölümünü başlatan nöronal enerji kaynaklarındaki azalmayı önleyerek apoptozu önler. Ayrıca oksijen metabolizmasını yavaşlatır, sitotoksik ödemi önler, eksitotoksin ve NO salınımını azaltır (42).

Soğutma tedavisi tüm vücut soğutma veya seçici baş soğutma tedavisi şeklinde uygulanabilmektedir (2). Tüm vücut soğutma yönteminde bütün vücut soğutularak rektal sıcaklığın 33-34°C arasında tutulması hedeflenmektedir. Baş soğutma tedavisinde ise özellikle başa soğutma uygulanmakta ve böylece beyine daha etkili soğutma uygulanabileceği varsayılmakta ve rektal sıcaklığın biraz daha yüksekte (34- 35°C) tutularak soğutmanın sistemik yan etkilerinden kaçınılması hedeflenmektedir (2). Her iki yöntemde de mümkün olan en erken zamanda (ilk 6 saat) soğutmaya başlanmakta ve 72 saat boyunca soğutmaya devam edilmektedir. Bazı merkezler tüm vücut soğutma yöntemini tercih ederken bazıları da seçici baş soğutma yöntemini tercih etmektedirler ancak henüz hangi yöntemin daha üstün olduğuna dair yeterli kanıt bulunmamaktadır (47,55,56).

Yakın zamanda yapılan bir toplu çözümlemede soğutma tedavisi ile ölüm veya ağır nörolojik sakatlık görülme oranı anlamlı derecede azalmıştır. Ayrıca soğutma tedavisi uygulanan gruplarda nörogelişimsel testlerde daha iyi sonuçlar alınmış ve nörolojik sakatlık olmadan yaşam oranları da artmıştır (57).

2.7.SIÇANLARIN BİLİŞSEL VE LOKOMOTOR YETİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

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

Davranış deneylerinin sıçanların çevresel (nöromotor) gelişimin tamamlandığı 80-85. günlerden sonra yapılması önerilmektedir (58). Ancak sıçanların doğumu takiben kaç haftalık olduğu belirtilen ya da belirtilmeyen pek çok çalışmada, deneylerin ortalama 180-400 gr ağırlığındaki erişkin erkek sıçanlarla yapıldığı bildirilmiştir (59) . Bu deneylerde sıçanların cinsiyetlerine göre farklı davranışlar sergilediği tespit edilmiştir. Özellikle uzaysal (spatial) öğrenmenin değerlendirilmesinde erkek cinsiyeti daha uygun olduğu saptanmıştır. Bu

durumun hormonal farklılık ve hipokampüs gelişimdeki farktan kaynaklandığı ileri sürülmüştür (60). Bu nedenle yapılan pek çok çalışmada erkek sıçan kullanılmıştır.

Deney hayvanlarında öğrenmenin test edilmesi için davranışsal, ektrofizyolojik ve moleküler çalışmalar yapılmaktadır. Öğrenmenin değerlendirilmesinde kullanılan davranış testleri; Morris su tankı, Radyal labirent, Y labirent, Açık alan testi gibi testlerdir.

2.7.1.Hafıza ve Öğrenmeden Sorumlu Beyin Yapıları

Hafıza oluşumunda frontal, parietal, oksipital ve temporal loblar, hipokampus ve limbik sistemin diğer yapıları arasındaki nöronal ağlar görev yapar. Anlık hafızadaki bilgilerin uzun süreli hafızaya aktarılması için kodlama işlemi, hipokampus, entorhinal, peririnal ve parahipokampal korteks kısımları hipokampusun diensefalon ile bağlantıları talamus hafızanın oluşum süreçlerinde önemli görev yapar. Talamus hafıza ile ilgili bilgileri, prefrontal korteks aracılığıyla ön beyne gönderir. Burası kodlanmış bilgilerin depolandığı alandır. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar, assosiyasyon bölgelerinde değişik hafıza alanlarının bulunduğu ve her alanın değişik bir bilgiyi kodladığı gösterilmiştir (61).

2.7.2.Hipokampus

Her türlü duyusal uyarı (görme, işitme, koku, dokunma v.s.) küçük bir alan dahi olsa, hipokampüsü aktive eder. Buna karşılık hipokampüs, özellikle en büyük çıkış yolu olan ön talamus ve limbik sistemin diğer bölgelerine sinyaller gönderir. Böylece hareketlerin davranış biçimine dönüşmesinden önce, davranışların şekillenmesine katkıda bulunmuş olur. Böylece hipokampüs, gelen duyusal sinyalleri farklı amaçlar için uygun davranış reaksiyonlarının içerisinden geçiren ek bir kanal rolü oynar.

2.7.3.Hipkampal Formasyon : Öğrenme/bellek İşlevinin Anahtar Yapısı

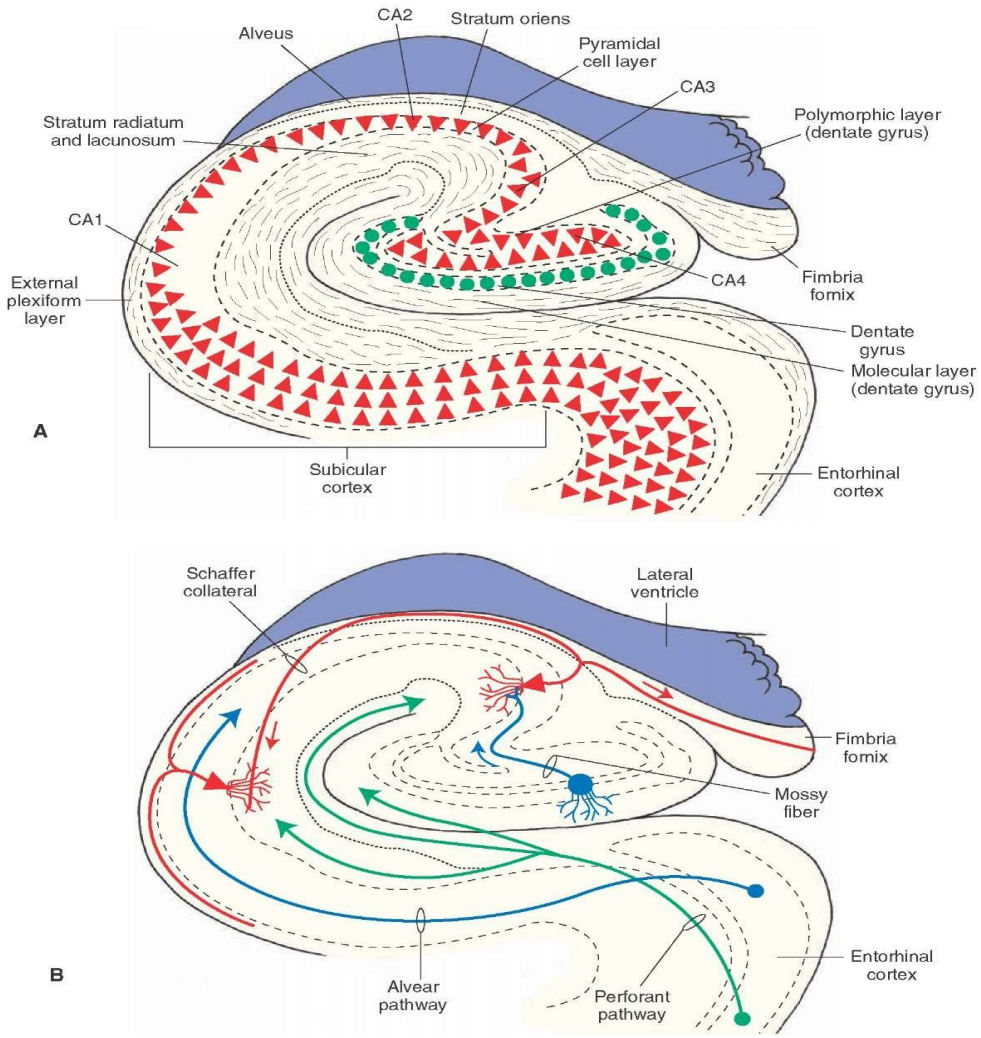
Hipokampüs medial temporal lobda yer alan limbik sistem parçasıdır ve uzun süreli hafıza ve uzamsal bellekte rol alır. Hipokampal formasyon; dentat girus, CA1, CA2 ve CA3 alanları ile subikuler kortekste ve entorinal korteksten oluşur. CA1, CA2 ve CA3 esas hipokampusu oluşturan yapılardır. Hipokampus aşağıdaki tabakalardan oluşur;

1. Bazal seviye: Granüler hücreler bulunur.
   a. Alveus: En yüzeyel tabakadır. Piramidal hücrelerin kommisural liflerini içerir.
   b.Stratum oriens: İnhibitör sepet hücreleri ve piramidal nöronların bazal dentritlerini içerir.
   c. Stratum piramidale: Piramidal nöronların somalarını bulundurur. Yosunsu lifler de bu tabakada sinaps yaparlar.
2. Apikal seviye: Çoğunlukla aselülerdir.
   a. Stratum lucidum: Yosunsu lifler bu tabakada transvers eksenda uzanır ve sonlanırlar.

b. Stratum radiatum: C3-1 yolunun Schaffer kollaterallerini bulundurur.

3. Stratum lakunozum-moleküläre: Burası da bir miktar Schaffer kollaterali bulundurur. Ayrıca CA1 bölgesinde burada entorinal kortekse ait perforan lifler bulunur ve piramidal hücrelerin apikal dentritleri ile sinaps yaparlar (65) (Şekil 3).

Hipokampal formasyonun ikinci yapısı demtat girustur (DG). DG'un esas hücreleri olan granüler hücrelerin somaları ortadaki granüler tabakada otururlar. Bu hücrelerin aksonları yosunsu lif denen uzantıları oluşturur CA3 bölgesindeki piramidal hücrelerin aksonlarının bazalinde st. radiatumda sonlanırlar. Granüler tabakanın diğer önemli bileşeni dentat sepet hücrelerdir. Bunlar granül hücre gövdelerinin sonlanan GABAerjik liflerini verirler. Granüler tabakanın üstünde moleküler tabaka yer alır ve burada entorinal korteksten gelen perforan yol aksonları granüler hücrelerle sinaps yapar. En altta ise polimorfik tabaka vardır ve granüler hücrelerle ilişkili lokal bağlantıları sağlar (66).



Şekil 3: Hipokampus ve Parahipokampal Oluşum

Hipokampal formasyonun üçüncü elemanı subikuler komplekstir. Subikulum, presubikulum ve parasubikulumdan oluşur. Üç tabakalı kortekse sahiptir: moleküler tabakası piramidal hücrelerin apikal dentritlerini; piramidal hücre tabakası aynı hücrelerin somalarını içerir ve en altta bir polimorfik tabaka vardır. Subikulumun rostro-kaudal bölgelerinde dördüncü ve beşinci tabaka da vardır. Pre- ve parasubikulum LII'de piramidal hücreleri bulunduran komşu korteks alanlarıdır. Subikulum, esas hipokampusun CA1 alanını entorinal kortekse bağlar (67).

Entorinal korteks, hipokampal formasyonun en rostralinde yer alan ve en iyi evrimleşmiş yapısıdır. Mediyal sınırını ise pre- ve parasubikulum yapar. Parahipokampal girusun (peririnal korteksle beraber) ön kısmını meydana getirir. Altı tabakalı korteks yapısına sahiptir. LI, aselüler veya pleksiformdur. LII, entorinal korteksin ayırıcı özelliği olan ve beynin yüzeyine doğru küçük kabartılar oluşturan büyük piramidal hücre adalarından ve yıldız hücrelerden oluşur. Ayrıca neokorteksten farklı olarak internal granüler tabaka yerine lamina dissekans denen bir lif tabakası vardır (68).

2.7.4.Kognitif Fonksiyonlar ve Belleğin Elektrofizyolojisi

2.7.4.1.Sinaptik Plastisite

Öğrenme süreçlerini açıklayabilecek nöral devrelerle ilgili ilk görüşlerden biri "tekrarlayan girişli devre" modelidir. Böyle bir devrede bir nöron diğerini uyarır; bu nöron da direk ya da dolaylı olarak aynı nöronu uyarır. Böyle bir devre, bir kez aktive olduğunda sinyal sürekli olarak devreyi dolanacaktır. Donald Hebb teorisine göre bir A nöronu B nöronunu tekrarlayan bir şekilde uyardığı zaman hücrelerden birinde veya her ikisinde bazı metabolik ve morfolojik değişiklikler olur ve bu değişiklikler A-B hücreleri arasındaki sinapsın etkinliğini arttırır. Bellek hakkındaki bugün geçerli olan düşünce, bu kuralın uzantısıdır (69).

Nöroplastisite, kısaca çeşitli iç ve dış uyaranlara bağlı olarak beyindeki nöronların ve bunların oluşturduğu sinapsların yapısal özellikleri ve işlevlerindeki değişiklikler olarak tanımlanabilir. Sinir sisteminin adaptasyonunda sinaptik etkinliğin değişebilmesi rol oynar. Çevresel değişikliklere uyum ancak öğrenme yolu ile sağlanabilir. Öğrenme de sinaptik plastisite yolu ile gerçekleşir. Sinaptik plastisite fonksiyonel ve morfolojik değişiklikler ile birliktedir. Bu değişiklikler pre ve post sinaptik nöronu ilgilendirir. Bu değişiklikler arasında dentritlerdeki dallanmanın artması/azalması, mevcut nöronların sinaps sonrası potansiyellerindeki değişiklikler sayılabilir (70). Nöroplastisite ile nöronların dentritleri gibi

belli bir bölümünde veya bütününde bazı fiziksel değişiklikler ortaya çıkabilir. Ayrıca yeni nöron oluşumu, nöronların kronik şiddetli stres gibi olumsuz etkenlere karşı dirençlerinde değişiklikler ve sinaptik etkinlikte artış veya azalmalar ortaya çıkabilir.

2.7.4.2.Sinaptik Plastisitenin Elektrofizyolojik Göstergeleri

Sinaptik plastisite, elektrofizyolojik olarak sinaptik etkinliğin gücünün, uyarı şiddeti ve koşullarında değişme olmaksızın bir süreliğine öncesinden daha farklı büyüklükte kaydedilmesidir.

2.7.4.3.Uzun dönemli güçlenme (UDG)

Hipokampüsün afferent liflerine yüksek frekanslı stimulus zinciri uygulanmasıyla, hedef nörondaki EPSP amplitüdü artar. Bu artış günler ve haftalar boyunca sürer ve beraberinde birçok afferent aksonun aktivasyonunu da sağlar. Örneğin CA3 nöronlarının Schaffer kollateralleri yüksek frekanslı bir dizi ile uyarıldığında, CA1 nöronlarının tek bir uyarana karşı oluşan EPSP yanıtının genliği artar. Birçok bilim adamı bu fenomenin belleğin fizyolojik temeli olduğunu düşünmektedir (71).

UDG'nin oluşumunda glutamatın önemli bir yeri vardır. Postsinaptik membranlarda bulunan glutamat reseptörleri, ligand kapılı iyon kanalları olan AMPA ve NMDA reseptörleridir. AMPA reseptörleri eksitatör postsinaptik reseptörler gibi işlev görür. Glutamat bağlanınca kanal hem sodyuma hem de potasyuma geçirgen hale gelir. Fakat daha çok sodyum girişi postsinaptik hücrede depolarize edici bir EPSP oluşturur. Tersine NMDA-reseptör kanalları kalsiyum girişine aracılık eder, fakat açılması için sadece glutamatın bağlanmasından daha fazlası gerekir. Membranın voltajı negatif dinlenim potansiyeline yakın olduğu zaman bir magnezyum iyonu NMDA reseptör kanalını bloke eder ve magnezyumun bu blokajının ortadan kalkması için membran AMPA kanallarından geçen akımla önemli derecede depolarize olmak zorundadır. Bu da bize, uzun süreli pekiştirme mekanizmasının tamamlanması için neden yüksek frekanslı presinaptik aksiyon potansiyellerinin gerekli olduğunu açıklar: Düşük frekanslarda, magnezyum iyonunu bloke ettiği kanaldan kaldırmak için gerekli olan 20-30 Mv'luk depolarizasyonun sağlanması için AMPA-reseptör EPSP'lerinin zamansal birikimleri yetersiz kalır ve NMDA reseptörleri açılamaz. Depolarizasyon yeterli olduğu zaman NMDA reseptörleri açılarak postsinaptik hücreye kalsiyumun girişini sağlar. Sonra kalsiyum postsinaptik hücrede, farklı iki protein kinazın sürekli aktive olduğu, ikincil haberci kaskadını aktive eder ve de postsinaptik nöronun glutamata duyarlılığını arttırır. Bu ikinci haberci sistemi ayrıca, henüz tanımlanmamış retrograd haberci ile presinaptik glutamat slınımını uzun süreli aktive eder. Bu presinaptik

hücre boyunca sonradan gelen her aksiyon poltansiyeli postsinaptik membranın daha fazla depolarize olmasına neden olacaktır. Böylece sinaptik ateşlemenin belirli bir şekilde tekrar tekrar ve şiddetle aktive olması kimyasal ve yapısal değişikliklere yol açar. AMPA ve NMDA reseptörlerinin birlikte gösterdikleri aktivite UDG ile yakından ilişkilidir. UDG'nin geç fazında ise, kalsiyum hücreye girer ve kalmoduline bağlanır. Bu bağlanma adenilat siklazın aktivasyonu ve cAMP oluşumuyla sonuçlanır. Daha sonra cAMP, cAMP Kinaz ve MAP Kinaz ile fosforillenir ve nükleusa gidip CRE bölgesini uyarır. Bunun sonucu protein sentezi ve yeni sinaps formasyonu gibi yapısal değişiklikleri içeren bir süreç başlar. Yeni sinaps formasyonu sinaptik güçlenmeyi uzun süreli kılar (71).

3.GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1.ÇALIŞMA EKİBİ

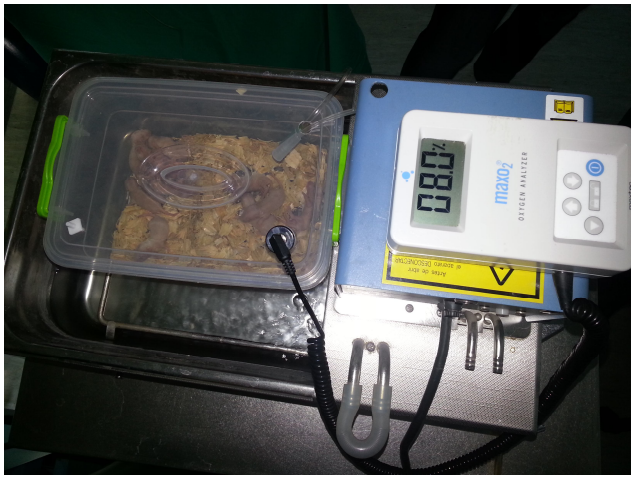
Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Neonatoloji Bilim Dalı, Fizyoloji Anabilim Dalı ve Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı tarafından yürütülmüş, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma ve Fizyoloji Anabilim Dalı Davranış Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma Erciyes Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

3.2.ETİK KOMİTE ONAYI

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

3.3.GEREÇLER

Deney sırasında, diseksiyon için mikroskop ve çeşitli ebatlarda pens, bistüri, karotid arteri bağlamak ve cildin kapatılması için 6.0 ipek, portegü, ilaç ve SF uygulamalar için enjektörler, hipoksi odacığı (Resim 1), %92 azot ve %8 oksijen karışımını içeren tüp, oksimetre, sıçanların vücut sıcaklığını korumak için ısıtıcı su banyosu (benmari), hipoksi odacığı sıcaklığının kontrolü için termometre, dekapitasyon için pens ve bistüri, çıkarılan beyinleri korumak için saklama kapları, ağırlık ölçümleri için hassas terazi, steril örtü ve eldivenler kullanıldı.



Resim 1: Hipoksi Odacığı (25x15x10cm^3)

3.3.1.Deney Hayvanları

Bu çalışma ağırlıkları 11.8±1.2 g olan Wistar cinsi, 95 adet yedi günlük erkek yavru sıçan üzerinde gerçekleştirildi. Erken dönemde hipoksi-iskemi ve pentoksifilinin beyin üzerine etkilerini hücresel düzeyde değerlendirmek üzere dekapite edilerek histolojik inceleme yapılan 23 adet ve çalışmanın çeşitli aşamalarında ölen 26 adet sıçan dışında, canlı kalan 46 sıçana davranış deneyleri uygulandı.

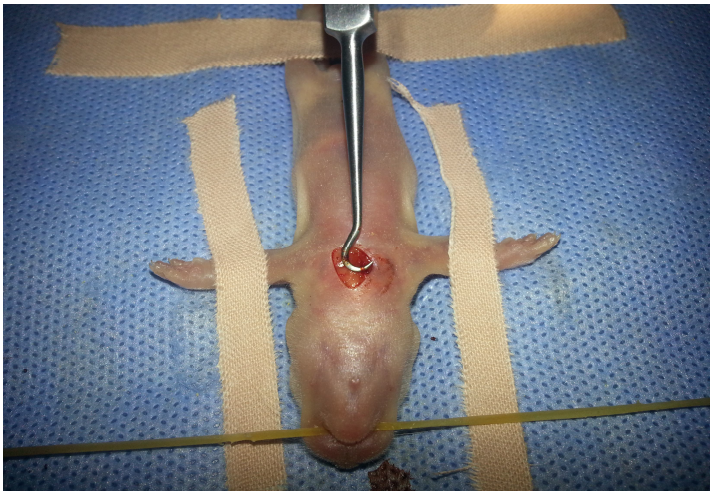
Davranış deney tarihlerine dek tüm sıçanlar Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanı Laboratuvarı'nda; havalandırılma ve iklimlendirme uygulanan, gece-gündüz ritmi otomatik olarak ayarlanan ve nemi ölçülen bir odada; annelerinden ayrıldıkları birinci aydan itibaren her kafeste 4-5 adet sıçan olacak şekilde ayrı kafeslerde barındırıldı. Kafesler gruplara göre adlandırıldı.

3.4.YÖNTEM

İlaç: Pentoksifilin (TRENTAL 100 mg/5ml ampul, Sanofi-Aventis) 60 mg/kg ve 100 mg/kg intraperitoneal (i.p) yoldan hipoksi-iskemiden hemen sonra ve 2 saat sonrasında iki kez verildi.

3.4.1.Hipoksik İskemik Beyin Hasarının Oluşturulması

Postnatal yedinci günde 20 adet anne sıçanın erkek yavruları, rastgele seçilerek dört gruba ayrıldı. Tüm sıçanlara isofloran emdirilmiş pamuk ile 15-20 saniye inhalasyon anestezisi verildi. Sıçanlar uyandıkça doz tekrarlandı. İsofloran ile anesteziyi takiben sıçanlar işlem yapılacak masaya dört ayağından flasterle sırt üstü sabitlendi. Ardından boyunda orta hattan kesi yapılarak mikroskop altında sağ karotid arter bulundu. Sham grubu hariç tüm sıçanların sağ karotid arterleri bağlandı (Resim 2).



Resim 2: Cilt kesisi ve sağ karotid arteri bağlama

Tüm yavru sıçanlar derlenme ve beslenme süreci için anne yanında bir saat bırakıldı. Bu sürecin sonunda sham grubu dışındaki sıçanlar iki saat süreyle hipoksi odacığına kondu. Hipoksi odacığının kapağına, içerideki havanın oksijen yüzdesini ölçmek için oksimetre algacı yerleştirildi. Sıçanlar hipoksi odacığına yerleştirildikten sonra hipoksi odacığının kapağı kapatıldı. Hipoksi odacıkları sıçanların vücut sıcaklıklarının korunabilmesi için 38 ˚C' de ısıtılan su üzerine konuldu. Hipoksi odacığına %8 yoğunlukta oksijen ve %92 yoğunlukta azot içeren gaz verildi. İki saatlik hipoksi uygulaması sonunda ilaç veya SF verilen yavru sıçanlar anne yanına verildi. Sham grubu da hipoksi uygulanmamasına karşın annelerinden iki saat süreyle ayrıldı.

Sham (n:19) : Sıçanlara anesteziyi takiben sadece boyun diseksiyonu yapılarak karotid arter bulundu, ancak arter bağlanmadan diseksiyon alanı dikiş ile kapatıldı.

H/İ (n:17): Hipoksi sonrası ve 2 saat sonra SF i.p verildi.

PTX60 (n:18): Hipoksi sonrası ve 2 saat sonra pentoksifilin 60 mg/kg i.p verildi.

PTX100 (n:17): Hipoksi sonrası ve 2 saat sonra pentoksifilin 100mg/kg i.p verildi.

Cerrahi işlem sırasında ve hipoksi odacığında iken her 5 dakikada bir sıçanların solunum, cilt rengi ve hareketleri yakından izlendi.

Beyin dokusunda erken dönemde nöronal apopitozu değerlendirmek için sham grubundan 5, H/İ, PTX60 ve PTX100 gruplarından 6'şar sıçan ayrıldı. Davranış deneylerini gerçekleştirmek için ise sham grubuna ait 13, H/İ, PTX60 ve PTX100 gruplarına ait 11'er sıçan 1 aylık olana kadar anne yanında bırakıldı. Doğumu takiben birinci aydan sonra annelerinden ayrılan sıçanlar her kafeste 3-4 adeti bir arada olacak şekilde grup adları belirtilerek barındırıldı. Doğumu takiben 11. haftada uzaysal öğrenmeyi değerlendirmek için Morris su tankı testi yapıldı. Morris su tankı testi ile bellek performansı ölçülen sıçanlarda nöronal plastisiteyi değerlendirmek için fizyoloji laboratuarında uzun erimli güçlenme kayıtları alındı. Deneylerini tamamlayan sıçanlara ötenazi uygulandı.

3.5.HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME

Beyin dokusunda Kaspaz-3 aktivitesini belirlemek amacıyla her bir gruba ait olan sıçanlar iki saatlik derlenme sürecini takiben, 24. saatlerinde sol ventrikül içerisine yerleştirilen bir kanül vasıtasıyla önce 50 mL SF ile sonra 50 mL Bouin solüsyonu ile sabit basınç altında perfüze edildi. Perfüzyon işlemi biter bitmez beyin dokuları bütün halde çıkarıldı. Daha sonra, her grup için 6'er sıçana ait her bir beyin örneği koronal olarak trimlendi. Beyinler kasetler

içerisine yerleştirilerek Bouin solüsyonunda 6-8 saat kadar tespit edildi. Bu sürenin sonunda dokular %50'lik alkolde her bir saate alkol değiştirilmek suretiyle 4 saat süreyle bekletildi. Daha sonra %70 alkolden başlayarak %80, %96, %100 alkollerden geçirilerek dehidre edilen dokular metil benzoatta 2 gün süreyle bırakıldı. Bu sürenin sonunda benzollerden geçirilen dokular paraplastta bloklandı. Bu bloklardan 100'er mikrometrelik aralıklarla 6 mikron kalınlığında kesitler lizin ile kaplanmış olan lamlara alındı. Gruplara ait her bir hayvan için her bir peparatta en az dört kesit içeren 4 seri preparat hazırlandı.

3.5.1.İmmunohistokimyasal analiz

Çalışmada erken dönemde nöronal apopitoz Kaspaz-3 antikoru kullanılarak immunohistokimyasal yöntemle tespit edildi. Hazırlanan kesitlere Strepavidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) immunoperoksidaz tekniği uygulandı. Ksilollerde deparafinizasyon ve alkollerde rehidratasyon işlemlerinden sonra kesitler PBS'de çalkalandı ve metanol'de hazırlanmış %3' lük H_2O_2 ile muamele edildi ve tekrar PBS'de 2 kez 5 dak. süreyle yıkandı. Takiben doku antijeninin yeniden kazanımı sağlamak amacıyla 0.01 M sitrat buffer (pH 6.0)'da 80 °C'de 30 dak. kaynatıldı ve takiben aynı solüsyon içerisinde oda ısısında 20 dak. süreyle bırakıldı. Tekrar PBS ile 3 kez yıkamayı takiben nonspesifik bağlanmaları önlemek için kesitler 5 dakika bloking solüsyonu ile bir nem odası içinde inkube edildi. PBS ile 3 kez yıkamayı takiben 1:100 dilusyonda hazırlanmış Kaspaz-3 primer antikour kesitler üzerine damlatıldı ve +4 °C'de nem odası içinde bir gece inkube edildi. Negatif kontroller olarak alınan doku örnekleri ise primer antikor katılmaksızın PBS ile veya normal rabbit IgG ile muamele edildi. Takiben PBS'te 4 kez yıkanan kesitler, biotinlenmiş sekonder antikor ile 20 dakika oda ısısında inkube edildi ve tekrar 4 kez PBS ile yıkandıktan sonra da enzim konjugatlı strepavidinde 20 dakika muamele edildi. PBS ile 4 kez yıkanan kesitler 5 dakika DAB (Diaminobenzidine) kromojen solüsyonunda bekletildi. Kahverengi reaksiyonun şekillenmesini takiben mikroskop altında kontrol edilen kesitler, Gill'in Hematoksilen'inde 3 dakika boyandıktan sonra çeşme suyunda mavileşinceye kadar yıkandı. Boyanan kesitler Alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek yapıştırıcı damlatılıp lamelle kapatıldı.

3.5.2.Apopitozun Değerlendirilmesi

Immünohistokimyasal yöntemle boyanan koronal beyin kesitlerinde Kaspaz-3 aktivitesi Digital kamera (DP72, Olympus, Japonya) ataçmanlı BX51 Olympus (Japonya) marka ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirildi. Değerlendirme sıçanların hangi gruptan olduğunu ve sıçanın hangi karotid arterinin bağlandığını bilmeyen bir histolog tarafından yapıldı. Kaspaz-3 ile immünreaktivite gösteren nöronların sayımları sağ ve sol beyin yarımlarında hipokampüs ve

pariyetal kortekste gerçekleştirildi. Işık mikroskopik düzeyde kesitler önce küçük büyütme (X40) ve takiben X400 büyütme alanında taranarak sağ ve sol yarımlar için sayım yapılacak alanlar seçildi ve fotoğraflandı. Her bir kesit için 5 alan (her büyük büyütme =152 μm^2, toplam alan 760 μm^2) olmak üzere her bir hayvana ait toplam en az 80 alan fotoğraflanarak sayım işlemi gerçekleştirildi.

3.6.DAVRANIŞ DENEYLERİ

3.6.1.Morris su tankı testi

Kullanılan Morris su tankı 131 cm çapında, 50 cm derinliğinde ve galvanize çelikten yapılmıştır. Tankın içi 40 cm'ye kadar 25 ºC'ye ısısı ayarlanmış su ile dolduruldu. Tank içerisindeki su, boya ile siyah renge boyanarak sıçanın platformu görmesi engellendi. Tankın içine çapı 10 cm olan kaçma platformu suyun 1-2 cm altında kalacak şekilde yerleştirildi. Platformun yüzeyi hayvanın düşme tehlikesini azaltmak ve kendini güvende hissetmesini sağlamak için lifli bir kumaşla kaplandı. Deney süresince odada hiçbir şeyin yeri değiştirilmedi. Deneyler her gün 13.00-15.00 saatleri arasında yapıldı. Tank hayali olarak dört kadrana bölündü. Her hayvan sırasıyla her seferinde farklı olmak üzere üç kadrandan da (hedef kadran dışı) suya bırakıldı. Bırakılırken yüzlerinin tankın duvarına dönük olmasına dikkat edildi. Suya bırakıldıktan sonra hayvanın yüzerek platformu bulması beklendi. Eğer 1. dakikanın sonunda platformu bulamazsa hayvan tarafımızdan platformun üzerine kondu. Hayvanın platformun üzerinde 20 saniye geçirmesi beklendikten sonra alındı. Bu işlem ardışık dört gün boyunca günde dört kez tekrarlandı. Gün içindeki tekrarlar 20 dakika aralıklarla yapıldı. Son denemeden 24 saat sonra prob denemesi yapıldı. Prob denemesi sırasında platform kaldırıldı. Hayvanların hepsi sırasıyla daha önce platformun bulunduğu kadranın karşısından suya bırakıldılar ve iki dakika boyunca yüzmelerine izin verildi. Tüm denemeler boyunca hayvanın platformu bulma süresi, platformu bulmak için yüzdüğü mesafe, test sırasında geçilen kadran sayısı, platforma olan ortalama mesafe, platformlu kadranda geçirilen zaman ve yüzme hızı ethovision video izleme sistemi vasıtası ile eş zamanlı olarak kayıt edildi. 60 saniye içinde platformu bulamayan sıçanların platformu bulma süreleri 120 saniye olarak kabul edildi.

3.7.UZUN DÖNEMLİ GÜÇLENME

Her gruptan Morris su tankı ile bellek performansı ölçülen sıçanların postnatal 11. haftasında UdG kaydı alındı.

3.7.1.Uyarı ve kayıt

Sıçanlara üretan (1.5 g/kg, ip) ile anestezi yapıldı ve stereotaksik çerçeveye kondu. (Kopf Instruments, Tjunga, CA, ABD). Sağ medial perforan yolunu (bregmadan mm olarak AP:-8,0, ML:4,2, DV:2,3) uyarmak için bipolar bir tungsten elektrot (paslanmaz çelik, teflon kaplı, 127 μm, ucu dışındaki kısımlar izole edilmiş) kullanıldı. Uyarı elektrodu bir uyarı izolatörüne (World Precision Instruments; A385) bağlandı. 3M NaCl (uç direnci:2-10 MΩ) ile doldurulmuş bir cam mikropipet (Borosilicate, o.d.:1,5 mm, 10 cm uzunluk, (World Precision Instruments) eksitatör postsinaptik potansiyel alanlarının (fEPSPs) kaydını almak için ipsilateral dentat girusun (mm olarak: AP:-3,5, ML:2,14, DV:3,3 mm duradan aşağıya) granül hücre bariyerine sokuldu. Bir Ag-AgCl disk elektrot, referans elektrot olarak boyun derisinin altına yerleştirildi.

Aktif ve referans elektrotlar bir head-stage kullanılarak bir yükseltece (VCC600 tek kanallı epitelyal voltage/current clamp sistemi; Physiological Instruments, Harvard Apparatus, Holliston, MA, ABD) bağlandı. Bütün sistem bir Faraday kafesi kullanılarak topraklandı. Kaydın derinliği 0.1 mm'lik adımlarla uyarılarak geniş bir pozitif fEPSP ve üst üste negatif seyirli PS elde etmek için denendi. En son derinlikte tipik cevap kaydedildikten sonra perforan yol uyarımına verilen cevaptaki PS amplitüdünün maksimum olması için uyarı elektrodunun uyumu sağlandı. Uyarı ve kaydın kontrolü için "Scope" programı (AD Instruments, Colorado Springs, CO, ABD) kullanıldı. Monofazik 10V ve 0.175 ms'lik uyarılar A/D boardı (Powerlab/8SP, AD Insruments, Colorado Springs, CO, ABD) tarafından üretildi ve izolatörle bağlantılı bir stimülatörü tetikledi. Biyolojik sinyaller 0.1-10 kHz bant genişliğinde bir pre-amplifiyerde yükseltildi (1000x). Dalga biçimi 20 ms'de 40 kHz oranında on-line olarak sayısallaştırıldı, bilgisayar monitöründe gösterildi ve offline analiz için "Scope" kullanılarak saklandı.

3.7.2.Input – Output (I/O) Eğrisi

Elektrot yerleştirildikten 15 dk sonra, bir input-output eğrisi elde etmek için her 20 sn'de bir 175 ms devam eden uyarı ve monofazik elektrik akımları verildi. Uyarı akımı 0,1-1,5 mA aralığında uygulandı. Her akım değeri için üç uyarılmış cevabın ortalaması alındı. Uyarı şiddeti ve fEPSP eğimi veya PS amplitüdü arasındaki sigmoidal bir eğri ile tanımlandı. Bu eğriden maksimal yanıtın yarısını oluşturan uyarı şiddeti belirlendi.

3.7.3.Uzun dönemli güçlenme (UDG)

EPSP'lerin 15 dk bazal kaydından sonra UDG oluşturmak için 10 dk ara ile 60,70,80,90. dakikalarda dört tetanik (100Hz) uyarı verildi. Son tetanik uyarıyı takiben test

uyarısı her 30 sn'de bir olacak şekilde 150. dakikaya kadar uygulandı. Böylece son tetanik uyarımdan sonra 60 dakika süre ile fEPSP eğimi ve PS genliği kaydedildi.

3.8.İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

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

Apopitotik hücre sayısının değerlendirmesinde, beynin bir yarısındaki apopitotik hücre sayılarının gruplar arası karşılaştırılması tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile yapıldı. Her grubun kendi sağ ve sol beyin yarımları arasındaki apopitotik hücre sayılarının karşılaştırılmasında ise eş yapma t testi (Paired Samples t Test) kullanıldı.

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

4.BULGULAR

4.1.APOPTOZ BULGULARI

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

Kaspaz 3 ile apoptotik olan nöronlarda sitoplazmik ve nükleer pozitif boyanma görülürken; normal morfoloji sergileyen nöronlarda Kaspaz 3 ile boyanma görülmedi.

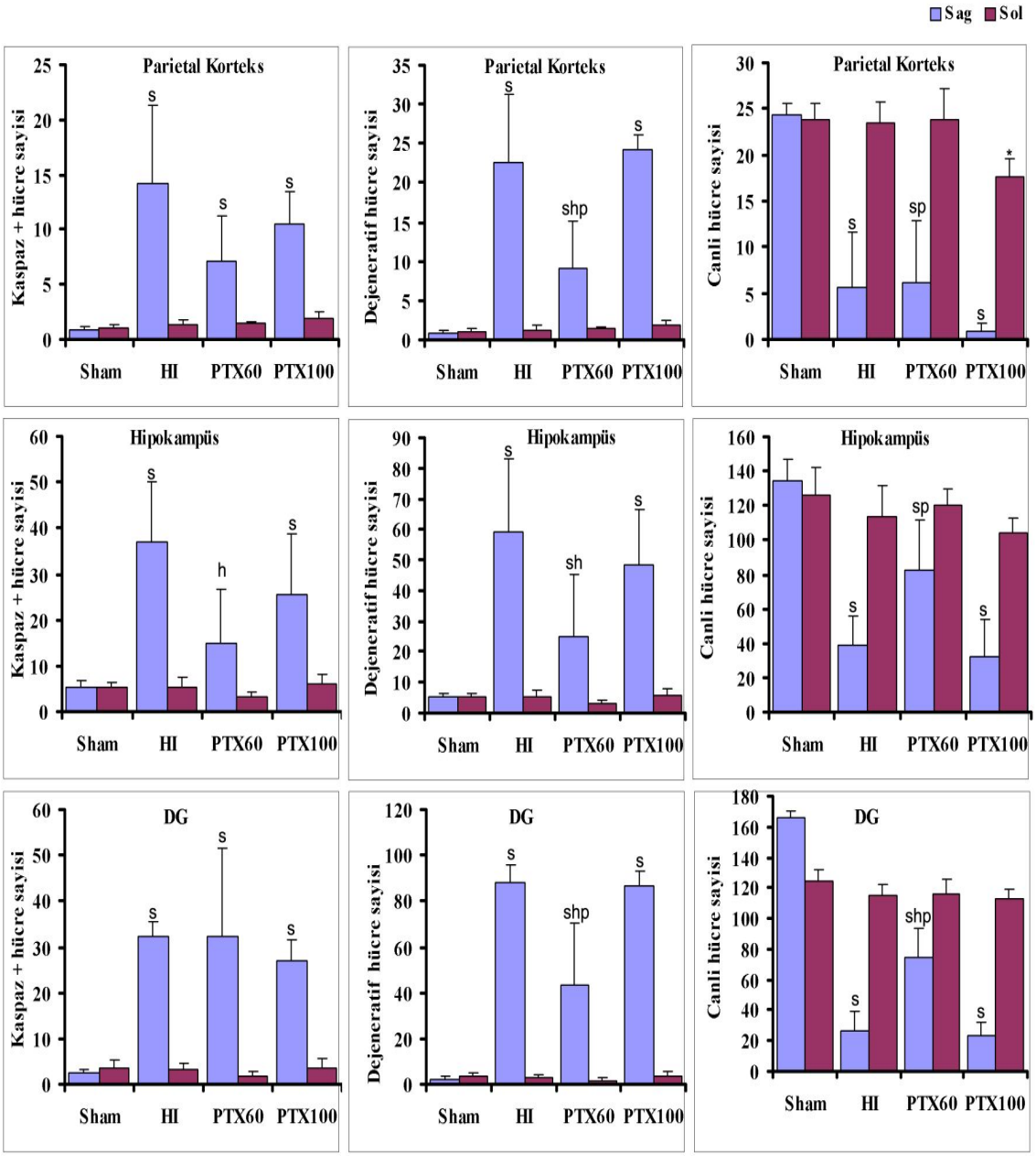
4.1.1.Kaspaz 3 İmmünohistokimya Yöntemiyle Beyindeki Apoptotik Hücrelerin Değerlendirilmesi

Uygulanan hipoksi iskemi modeliyle beyin sağ yarısında Kaspaz 3 immunohistokimya yöntemiyle apoptotik hücre sayılarında artış saptandı. Sham, HI, PTX60 ve PTX100 gruplarında beyin sağ ve sol yarısındaki hipokampusun kornu amonius (CA1, CA2, CA3 ve hilus) ve dentat girusu bölgeleri ile parietal korteksteki apoptotik hücre sayıları ve gruplar arasındaki istatistiksel farklılık Grafik 1'de sunulmaktadır. Buna göre parietal kortekste ve dentat girusta kaspaz pozitif apoptotik hücre sayısı açısından sham grubu ile HI, PTX60 ve PTX100 grupları arasında anlamlı fark saptanırken ($p<0.05$), HI, PTX60 ve PTX100 grupları arasında fark saptanmadı ($p>0.05$). Hipokampusun kornu amonius bölgesinde kaspaz 3 pozitif apoptotik hücre sayısı sham grubu ile HI, PTX60 ve PTX100 grupları arasında ve PTX60 grubunda HI grubuna göre istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p<0.05$) (Grafik 1).

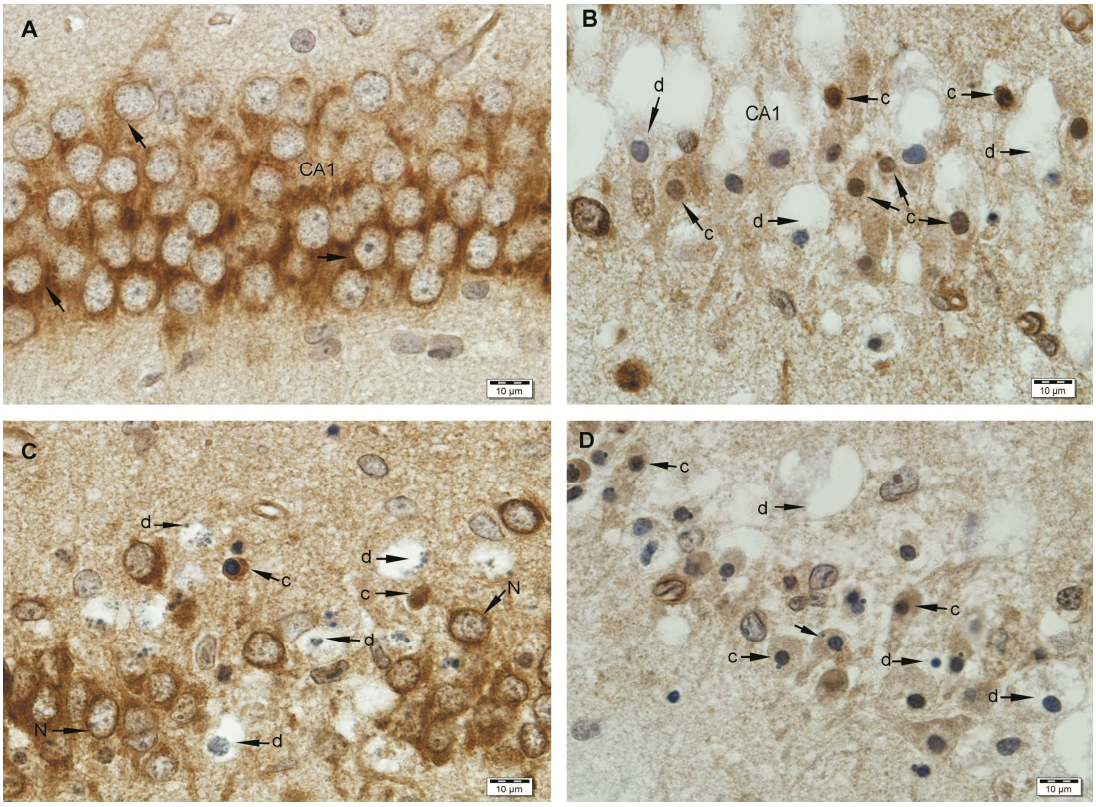
Gruplar ayrıca toplam dejeneratif hücre sayısı (apoptotik ve nekrotik hücre) açısından değerlendirildiğinde parietal korteks ve dentat girusta dejeneratif hücre sayısı PTX60 grubu HI ve PTX100 ile, kornu amoniusun değerlendirilmesinde ise PTX60 grubu ile HI grubu arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p<0.05$) (Grafik 1).

Gruplar ayrıca canlı hücreler açısında da değerlendirildiğinde, beyin sağ yarısındaki canlı hücre sayısı sham grubu dışında diğer gruplarda istatistiksel anlamlı daha düşük saptandı ($p<0.05$). Ayrıca kortekste PTX100 grubundaki canlı hücre sayısı diğer gruplardaki canlı hücre sayısından anlamlı daha düşük saptandı ($p<0.05$). HI uygulanan tarafta ise sham grubu diğer gruplardan anlamlı daha yüksek ($p<0.05$), parietal korteks ve hipokampus kornu amonius bölgesindeki canlı hücre sayısı PTX60 grubunda PTX100 grubuna göre anlamlı daha yüksek iken, dentat girus bölgesindeki canlı hücre sayısı PTX60 grubunda hem HI hem de

PTX100 grubundan istatistiksel anlamlı daha yüksek saptandı ($p<0.05$) (Grafik 1). Tüm gruplardaki kaspaz (+) boyanan apoptotik hücreler ve dejeneratif hücreler Resim 3'de gösterilmektedir.



Grafik 1: Parietal korteks, hipokampus ve hipokampal DG bölgelerindeki kaspaz + apoptotik hücreler, toplam dejeneratif hücreler ve canlı hücrelerin gruplara göre dağılımı (s; sham grubundan, h; H-İ grubundan, p; PTX100 grubundan istatistiksel olarak farklı, *;sol parietal kortekstekı canlı hücre sayısı azalma eğilimi göstermektedir) ($p<0.05$)



Resim 3: A=Sham grubu, B=H-İ sonrası SF, C=H-İ sonrası 60 mg/kg pentoksifilin, D=H-İ sonrası 100 mg/kg pentoksifilin verilen gruplarda hipokampal CA1 nöronlarda kaspaz 3 yöntemiyle apoptotik hücrelerin gösterilmesi (c;kaspaz d;dejeneratif)

4.2.MORRİS SU TANKI TESTİ SONUÇLARI

4.2.1.Platformu bulmak için yüzülen mesafe

Platformu bulmak için yüzülen mesafe günler içinde azalmaktadır ($p<0,001$). Grup faktörünün bu azalmadaki etkisi incelendiğinde sham grubu ile HI, PTX-60 ve PTX-100 arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p<0,05$). PTX-60 grubunda üçüncü ve dördüncü günlerde azalma eğilimi olsa da istatistiksel anlamlı değildi ($p=0,067$). Araştırma gruplarının öğrenme denemeleri boyunca gösterdikleri yüzme mesafe performansı aşağıda grafikte gösterilmiştir (Grafik 2A).

4.2.2.Platformu bulma süresi

Ardışık günlerde ölçülen platformu bulma süresinin (PBS) giderek istatistiksel anlamlı kısaldığı ($p<0,001$), ancak grup faktörünün etkisi değerlendirildiğinde, sham grubunun PBS diğer tüm gruplardan istatistiksel anlamlı daha kısa iken (sırasıyla HI ve PTX-100 için $p<0,001$; PTX-60 için $p=0,004$), dördüncü günde PTX-60 ile HI ve PTX-100 grupları arasında anlamlı fark saptandı (sırasıyla $p=0,044$, $p=0,043$). Araştırma gruplarının öğrenme

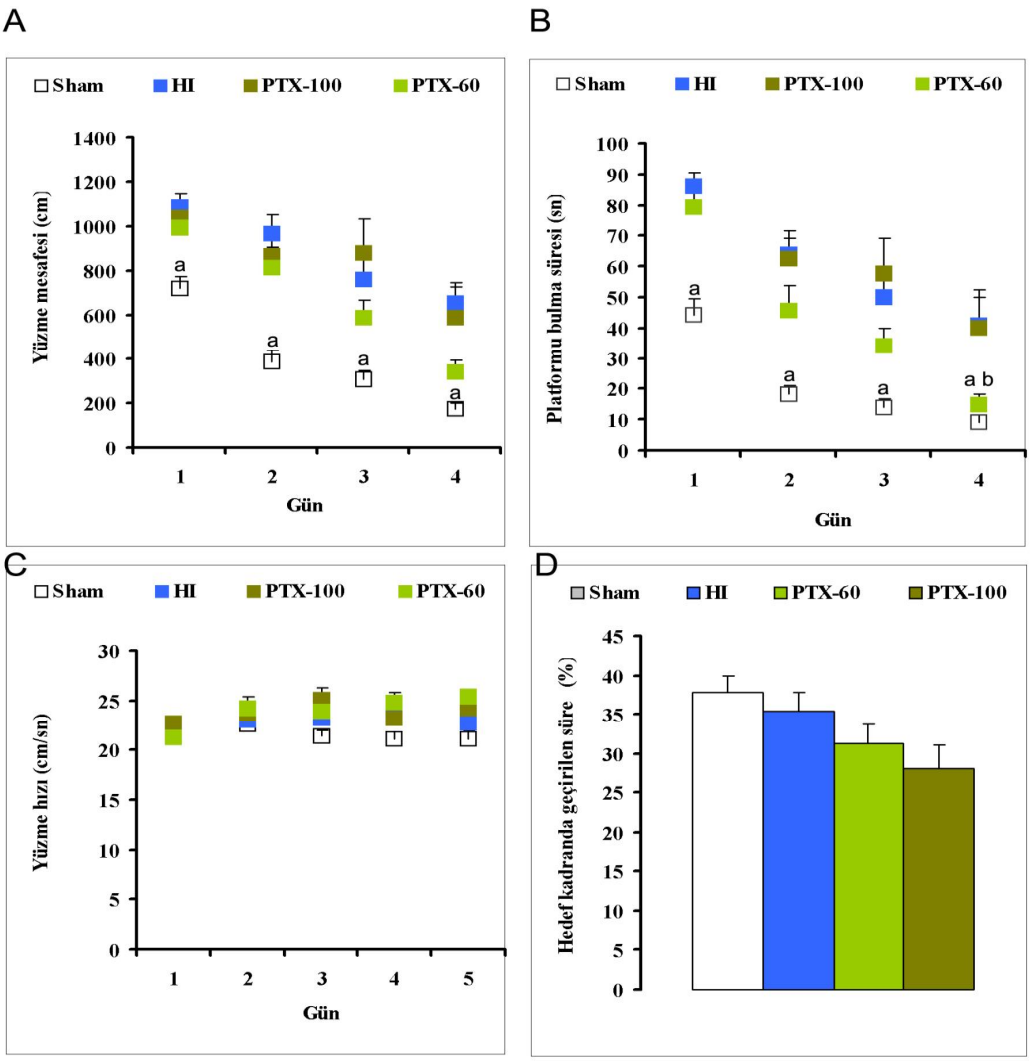
denemeleri boyunca gösterdikleri platformu bulma süresi performansı aşağıda grafikte gösterilmiştir (Grafik 2B).

4.2.3.Yüzma Hızı

Platformu bulmanın öğretildiği denemelerde yüzme hızındaki değişim günler içinde istatistiksel anlamlı olmayıp (p>0,05), grup faktörünün etkisi de saptanmadı. Bu sonuç, sıçanların motor performansının denemeler boyunca değişmediğini ve gruplar arasında motor performans açısından farklılık olmadığını göstermektedir (Grafik 2C).

4.2.4.Probe Denemesi

Tek varyanslı ANOVA testi, probe denemesinde hedef kadranda geçirilen zaman yüzdesi üzerine anlamlı bir grup etkisi olmadığını göstermektedir (p=0,054) (Grafik 2D).

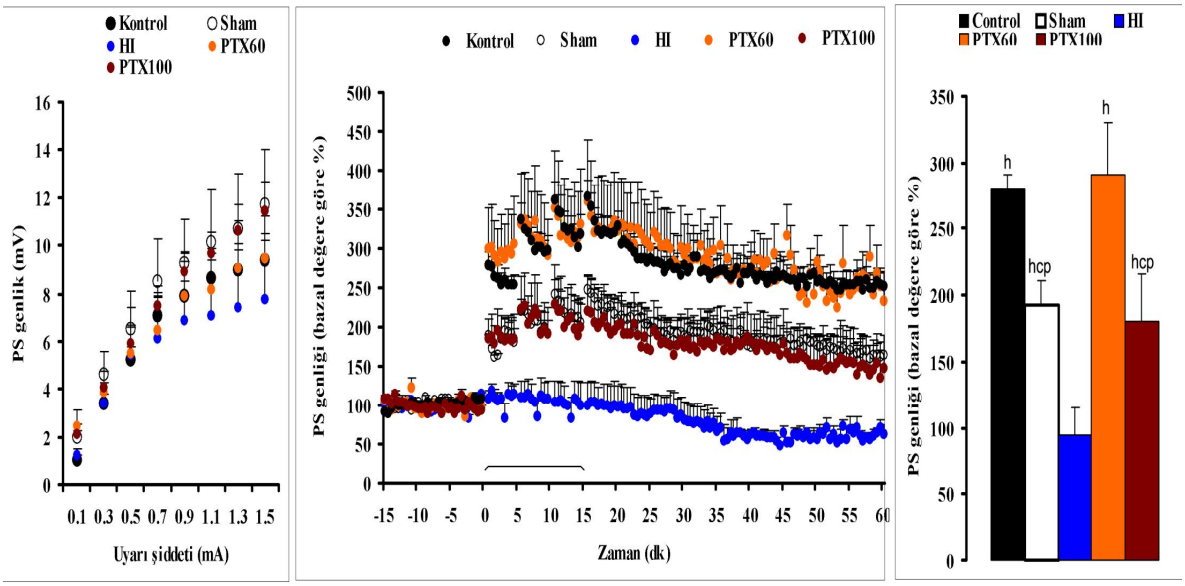


Grafik 2: a; Platformu bulmak için yüzülen mesafe ve platformu bulma süresi günler içinde azalmakla birlite sham grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır. b; dördüncü günde PTX60 ile HI ve PTX100 grupları arasında da anlamlı fark saptandı (p<0.05).

4.3.UDG KAYIT SONUÇLARI

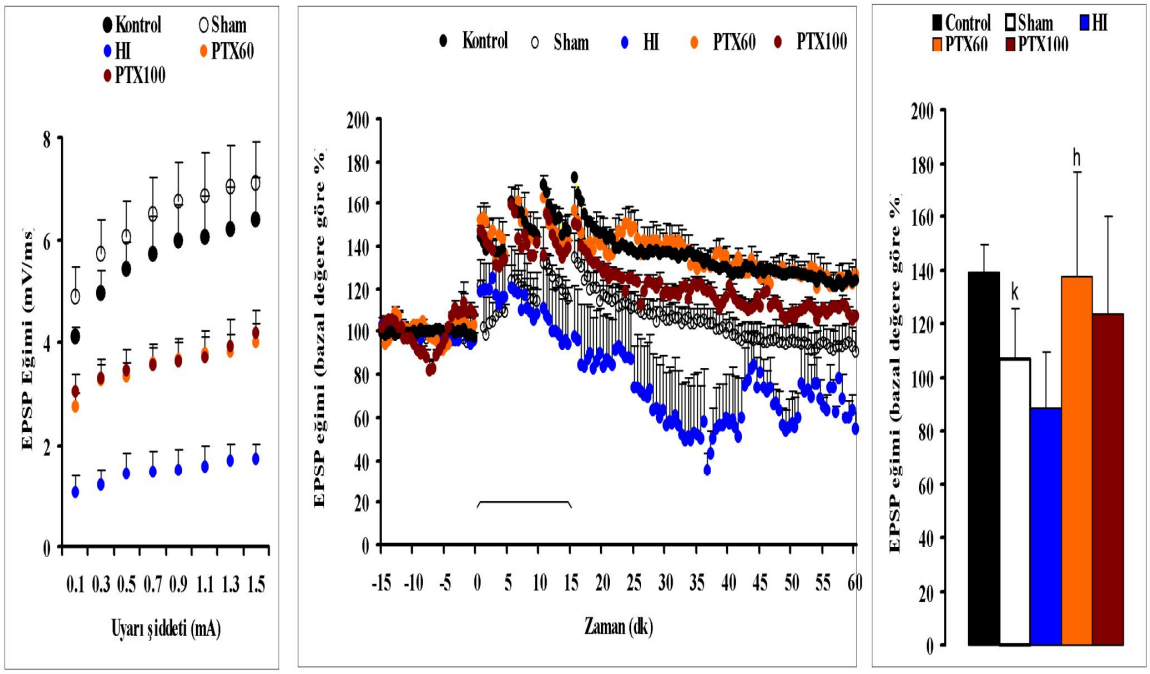
4.3.1.PS'nin genliği - EPSP'in eğimi

Tüm gruplarda uygulanan akım şiddeti arttıkça oluşan PS ve EPSP dalgasının genliği de arttı. Tüm gruplarda 15dakika süren bazal dönemde test uyaran şiddeti ile oluşturulan ortalama alan potansiyellerinin EPSP eğimi ve PS genliği değerleri %100 kabul edildi. İlk HFS uyarım verildikten sonra 5 dakika süre ile test uyaranlarına karşı oluşan alan potansiyellerinin EPSP eğimi ve PS genliği bazal değerin yüzdesi olarak ifade edildi. Buna göre HFS sonrasında bazal değere göre PS'nın genliğinde meydana gelen değişimler; herhangi bir işlem yapılmayan kontrol grubu ve PTX60 grupları arasında fark saptanmazken ($p>0.05$); kontrol ve PTX60 grupları ile sham, HI ve PTX100 arasında ve HI grubu ile sham ve PTX100 grupları arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p<0.05$). Bazal ve indüksiyon dönemlerinde elde edilen traselerin ortalamaları Grafik 3'de gösterilmiştir.



Grafik 3: HFS sonrasında bazal değere göre PS'nın genliğinde meydana gelen değişimler, c; kontrol grubundan, h; H-İ grubundan, p; PTX60 grubundan istatistiksel olarak farklı, ($p<0.05$).

HFS sonrasında bazal değere göre EPSP'in eğiminde meydana gelen değişimler; herhangi bir işlem yapılmayan kontrol grubu ve PTX60 grupları arasında fark saptanmazken ($p>0.05$); kontrol ve PTX60 grupları ile HI arasında ve kontrol grubu ile sham grubu arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p<0.05$). Bazal ve indüksiyon dönemlerinde elde edilen traselerin ortalamaları Grafik 4'de gösterilmiştir.



Grafik 4: HFS sonrasında bazal değere göre EPSP'nin eğiminde meydana gelen değişimler, k; kontrol grubundan, h; H-İ grubundan istatistiksel olarak farklı, ($p<0.05$).

5.TARTIŞMA

Tüm dünyada yenidoğan ölümlerinin ve sakatlıklarının önde gelen nedenlerinden biri perinatal dönemde meydana gelen hipoksik iskemik ensefalopatidir (66). Son yıllarda gebe ve yenidoğan izleminde kaydedilen ilerlemelere karşın görülme sıklığında büyük bir değişiklik olmamıştır ve ne yazık ki istenen düzeyde etkili bir tedavi yöntemi de bulunmamaktadır (66). Yakın zamana kadar destek tedavisi dışında bir tedavi seçeneği bulunmazken, HİE'nin fizyopatolojisinin daha iyi anlaşılması ile birlikte çok sayıda tedavi yöntemi geliştirilmiştir. Bunlardan arasında N-asetil sistein, allopurinol, magnezyum sülfat, eritropoetin, melatonin, desferoksamin, ksenon, nitrik oksit sentaz baskılayıcıları, kalsiyum kanal blokerleri, serbest radikal temizleyicileri, soğutma tedavisi, kök hücre nakli ve büyüme faktörü tedavileri sayılabilir (67).

Günümüzde doğum öncesi izlem yöntemleri arasında hangi bebeğin hipoksi- iskemiye maruz kalacağını kesin olarak gösterecek bir yöntem bulunmamaktadır. Bu nedenle zaman zaman doğum öncesi izlemlerinde herhangi bir sorunun olmadığı düşünülen bebeklerde de HİE gelişebilmektedir. Erken dönemde genellikle enerji eksikliği hücrelerin ölümünden sorumlu olmaktadır. Yeniden canlandırma uygulamaları gereken bebeklerde ise yeniden kanlanma ve oksijenlenmeyle birlikte gelişen oldukça karmaşık ve çok sayıda mekanizma hücreleri ölüme götürmektedir. Yeniden kanlanma ve oksijenlenmenin başlamasından hücre ölümünün gerçekleşmesine kadar geçen süre bir bakıma tedavi için önemli bir fırsattır. Bu nedenle deneysel tedavi yöntemlerinin çoğu bu döneme odaklanmaktadır. Günümüzde bu dönemde en etkili olan tedavi yöntemi soğutma tedavisidir. Soğutma tedavisi çok sayıda mekanizma üzerine etki ederek beyin metabolizma hızını, uyarıcı aminoasit salınımını, apoptozisi, NO üretimini ve lipid peroksidasyonunu azaltır, serbest radikal hasarını sınırlandırır ve daha çok nöronun ölmesini engeller (68). Soğutma tedavisinin etkin olduğu artık tüm dünyada kabul görmüştür ve birçok klinik tarafından uygulanmaya başlanmıştır(72). Yakın zamanda yayınlanan bir meta-analizde soğutma tedavisi ile ölüm ve ağır sakatlıkların azaldığı bildirilmiştir (57). Ancak soğutma tedavisi ile ilgili de önemli sorunlar bulunmaktadır. Hangi hastaların soğutulacağı, soğutma tedavisine en geç ne zaman başlanabileceği, tüm vücut soğutma mı yoksa seçici baş soğutma mı yapılması gerektiği gibi çok sayıda cevap bekleyen soru bulunmaktadır (66). Yapılan çalışmaların hemen hepsinde yalnızca 35 haftanın üzerinde gebelik yaşına sahip bebekler soğutulmuştur, bunun altındaki bebeklere ne yapılacağı önemli bir sorundur. Yine yapılan çalışmaların hepsinde perinatal asfiksiyi takiben

ilk altı saat içinde ulaşılabilen bebekler çalışmalara alınmış ve soğutulmuştur (46,47,57,69). Geç dönemde getirilen bebeklere nasıl bir tedavi uygulanacağı yine önemli bir sorundur. Daha da önemlisi soğutma tedavisinden ağır derecede HİE'li bebeklerin pek fayda görmedikleri bildirilmiştir (47). Yakın zamanda yayınlanan çok merkezli randomize kontrollü bir başka çalışmada ise soğutma tedavisinin ağır sakatlıkları sadece %15 oranında azaltabildiğini göstermiştir (69). Bütün bu çalışmaların gösterdiği gibi soğutma tedavisinin etkinliği kanıtlanmıştır ancak tüm hasta grupları için yeterince etkin ve kullanılabilir değildir. Bu durumda soğutma tedavisine ek olarak yapılacak yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç olduğu görülmektedir. Ayrıca yeniden kanlanma döneminde etkili olması beklenen tedavi yöntemlerinin hiçbiri geç dönemde etkili olmayacaklardır.

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

HİBH' yi anlayabilmek için değişik deneysel hayvan modelleri kullanılmıştır. Bu modellerde beynin kan akımı ve oksijen yoğunluğu azaltılarak beynin belirli bölgelerinin nasıl etkilendiği incelenmiştir (70-72). Günümüzde yenidoğan HİBH' nin değerlendirildiği deneysel çalışmalarda en çok kullanılan model Rice ve Vannucci tarafından tarif edilen yöntemdir (73). Bu modelde tek taraflı karotid arter bağlanmasına ek olarak deney hayvanları hipoksi odacıklarına konulmaktadır. Hipoksi modellerinde %5-10 oksijen ve %90-95 azot kullanılmaktadır. Çalışmamızda yedi günlük sıçanların sağ karotid arterleri bağlandıktan sonra derlenme sürecini takiben iki saat süreyle %8 oksijen ve %92 azot karışımıyla hipoksi oluşturulmuştur.

HİBH' nin insanlarda ortaya çıkardığı klinik ve histopatolojik bulguları taklit edebilecek en uygun hayvanın ne olduğu tartışmalıdır. HİBH' nin histopatolojik ve biyokimyasal sonuçlarını, uzun dönem nörolojik etkilerini anlamada sıçanlar ile yapılan H-İ modelleri daha uygun olmaktadır (74). Bizim çalışmamızda da yedi günlük sıçanlar kullanılmıştır. Özellikle insanların beyin gelişimi göz önüne alındığında, yedi günlük yavru sıçan beyinlerinin insanlardaki perinatal dönem için uygun olduğu düşünülmektedir (75).

HİBH' de sitokin ilişkili beyin zedelenmesi konusu giderek önem kazanmaktadır. TNF-alfanın sitozolde sifingomyelinazı uyarıp seramid artışını sağlayarak apoptozisi uyardığı

bilinmektedir (76). TNF-alfanın iskemik hasarda önemini belirten diğer bir çalışmada, orta serebral arter tıkanıklığı yapılması TNF-alfanın önemli oranda artışına ve beyin dokusunda infarkta neden olduğu gösterilmiştir. İskemiden önce anti-TNF-alfa monoklonal antikorların ventrikül içine verilmesi ile bölgesel iskemik beyin hasarlanması %20.2 oranında azaldığı gösterilmiştir (77).

Oygür ve arkadaşlarının zamanında doğan ve HİBH öyküsü olan bebeklerin plazma ve BOS IL-6 ve TNF-alfa düzeyi ile nörolojik bulgu arasındaki ilişkiyi değerlendirdikleri çalışmaya otuz bebek dahil edilmiş ve bu bebeklerin ilk 24 saat içinde kan ve BOS örnekleri alınmıştır. Nörolojik muayenenin değerlendirilmesinde Denver gelişim testi kullanılmıştır. Bebekler normal nörolojik bulgusu (grup 1) olan ve olmayan (grup 2) diye iki gruba ayrılmıştır. Grup 2' de BOS İL-1 beta ve TNF-alfa seviyesi grup 1' e oranla önemli derecede yüksek saptanırken, serum seviyeleri bakımından iki grup arasında fark saptamamışlardır. Bunun nedenini hipoksik hasarın bir sonucu olarak MSS' de IL-1 beta ve TNF-alfa' nın bölgesel olarak üretildiğini belirterek açıklamışlardır. TNF-alfa' nın hipoksiye bağlı gelişen beyin hasarına katkıda bulunabileceğini göstermişlerdir (35).

Pentoksifilin sıklıkla erişkin rat strok, iskemi ve kapalı kafa travması modellerinde kullanılmıştır. Kapalı kafa travması modelinde kullanılan pentoksifilinin beyinde TNF-alfa düzeyini yaklaşık %80 oranında azalttığı ve buna bağlı olarak beyin ödeminin azaldığı gösterilmiştir (78-80). Movassaghi ve arkdaşlarının çalışmasında ise bilateral karotid arter oklüzyonu ve reperfüzyonla oluşturulan global serebral iskemi modelinde pentoksifilin 200 mg/kg/doz i.p. uygulama sonrası, Moris su tankı testi ile hipokampal bağımlı hafıza ve kognitif yeteneklerde anlamlı iyileşme olduğunu göstermiştir (81).

Neonatal hipoksik iskemik beyin hasarı üzerine pentoksifilinin etkisini inceleyen sadece iki çalışma bulunmaktadır. İlk çalışma Eun ve arkadaşlarına ait olup, bu çalışmanın tasarımı oldukça farklıdır. Çalışmada 25, 40, 75 ve 150 mg/kg/doz pentoksifilin hipoksi-iskemi öncesi ve sonrası kullanılmış ve nöron koruyucu etki, nekrotik alan ölçümüyle değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda 25 mg/kg/doz'un etkisiz, 150 mg/kg/doz'un ölümcül olduğu ve 40 ve 75 mg/kg/doz'unda ise doz bağımlı olarak nöron koruyucu etkinin arttığı saptanmıştır. Bu çalışmanın ikinci ayağında pentoksifilin 40 mg/kg hipoksi iskemi sonrasında kurtarma tedavisi olarak kullanılmış ve ortalama hemisfer alanlarında farklılık saptanmamıştır. Ancak bilateral kortikal, striatal ve hipokampal volümlerin morfometrik analizinde sadece neokortikal hasarın pentoksifilin ile tedavi edilen grupta daha az şiddette olduğu gösterilmiştir (82). Biz bu çalışmadan yola çıkarak ortalama 60 ve 100 mg/kg/doz uygulamasını belirledik.

Neonatal hipoksik iskemik ensefalopati rat modelinde pentoksifilinin sitokin gen ekspresyonu ve nöronal apoptozis üzerine etkisinin incelendiği son çalışmada, pentoksifilin 60 mg/kg tek doz uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda pentoksifilin uygulanan grupta mesajcı RNA ekspresyonu ve kaspaz 3 aktivitesi anlamlı düşük bulunmuştur (83).

Çalışmamızda hipokampusta H-İ sonrasında 60 mg/kg pentoksifilin verilmesiyle kaspaz 3 pozitif apoptotik hücre sayısı belirgin bir azalma sağlandı. Ancak parietal korteks ve dentat girusta kaspaz 3 pozitif apoptotik hücre sayıları arasında farklılık saptamadık. Bu durumun nedeni beynin farklı bölgelerinin H-İ'ye duyarlılığının hücre ölüm şeklinin ve bölgeler arasındaki kaspaz aktivitelerinin birbirinden farklılığı ile speküle edilebilir (84). Ayrıca apoptotik hücrelerin yarı ömrü nekrotik hücrelere göre daha kısa olduğu için nöroprotektif etkiyi net yansıtmamış olabilir (85,86). Ancak hem kaspaz aktivitesi gösteren apoptotik hücreleri hem de diğer dejeneratif hücreleri birlikte değerlendirdiğimizde pentoksifilin 60 istatistiksel olarak en fazla apoptotik hücre sayısı H-İ sonrası SF uygulanan gruptaydı. Hipoksi iskemi grubu ile karşılaştırıldığında, mg/kg dozda uygulandığında hem H-İ hem de PTX100 grubuna göre nöron ölümünü azalttığını saptadık. Pentoksifilinin 100 mg/kg/dozda uygulanmasıyla apoptotik hücre sayısında azalma olmadı. Aksine, ölen toplam nöron sayısı artış eğilimi göstermekteydi. Bu durum yüksek dozda uygulanan pentoksifilinin nöronlar için toksik etkili olduğunu düşündürmektedir. Neonatal ratlarda pentoksifilinin nöroprotektif etkisinin değerlendirildiği ilk çalışmada ise 150 mg/kg doz uygulanması %100 mortalite ile sonuçlandığı bildirilmiştir (82). Ancak erişkin ratlarda yapılan çalışmalarda daha yüksek dozlarda kullanım yan etki görülmeksizin bildirilmiştir (80,81).

UDG potansiyeli bir sinaptik bağlantının plastisite gösterme yeteneğinin bir ölçüsü olarak yaygın şekilde kullanılır. Sıçanlarda hipokampüs uzamsal öğrenme için kilit önemdedir ve hipokampal lezyonlar hem uzamsal öğrenme testlerini hem de UDG yanıtlarını bozar. UDG, hipokampus dahil beyinde yaygın olarak bulunan bütün gulutamerjik sinapsların gösterdiği bir özellik olup, öğrenme ve belleği açıklayabilen bir hücresel model olarak düşünülür. Glutamaterjik sistem, özellikle neokorteks ve hipokampusun nöronal ağlarında bilgi işleme için çok önemli olan hızlı bir sinyalleşme sistemidir. Glutamaterjik sinapslarda eksitatör postsinaptik potansiyelleri oluşturan iki bileşen vardır. Bunlar AMPA ve NMDA reseptör aracılı bileşenleridir.

Çalışmamızda farklı dozlarda uygulanan pentoksifilinin uzun dönemde bilişsel ve motor yetiler üzerine olan etkisi 11. haftada Moris su tankı, sinaptik plastisiteye olan etkisi ise 12. haftada elektrofizyolojik olarak uzun dönemli güçlenme testleri ile değerlendirildi.

Öğrenme denemelerinin dördüncü gününde, platformu bulma süresi bakımında sham grubu ile pentoksifilinin 60 mg/kg dozda uygulandığı PTX60 grubu arasında fark olmaması öğrenmenin bu grupta diğer gruplara göre daha iyi olduğunu göstermektedir. Belleğin değerlendirildiği probe denemesinde hedef kadranda geçirilen süre için gruplar arasında fark saptanmadı. Ancak bu testin de çevresel bir çok faktörden etkilendiği unutulmamalıdır.

UDG testlerinde PS'nin genliği nöron gövdesinden ölçülen hücrelerin toplu aksiyon potansiyeli yanıtıdır. EPSP ise nöron dentritlerinde oluşan toplu postsinaptik potansiyel aktivitesidir. Literatürde neonatal H-İ rat modelinde UDG testleri ile sinaptik plastisiteyi değerlendiren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak bizim sonuçlarımıza göre H-İ'den sonra uygulanan 60 mg/kg dozdaki pentoksifilin yüksek frekanslı uyarı sonrasında PS genliğinde bazal derlere göre önemli bir artışa neden olmuştur. Benzer şekilde EPSP eğimindeki artış da pentoksifilinin 60 mg/kg dozda uygulanmasıyla daha belirgindir. Bu sonuçlar bize pentoksifilinin bu dozda sinaptik plastisiteyi önemli ölçüde iyileştirdiğini göstermekle birlikte cerrahi sters oluşturulmayan ratlarda direk etkisinin de araştırılması gerektiğini düşündürmüştür. Ayrıca sinaptik plastisitede bu denli bir artış olmasına rağmen bu sonuç Moris su tankı testi sonuçlarına beklendiği ölçüde yansımamıştır. Çalışmamızda UDG testi ile sadece perforan yol dentat girus arasındaki sinaptik bağlantılar değerlendirilmiş olup bellek üzerine etkili diğer yolaklar incelenmemiştir. Ancak tedavinin teropatik dönem süresince uygulanması halinde daha iyi sonuçlar alınabileceğini düşünmekteyiz.

6.SONUÇLAR

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

2. Parietal kortekste ve dentat girusta kaspaz pozitif apoptotik hücre sayısı açısından sham grubu ile HI, PTX60 ve PTX100 grupları arasında anlamlı fark saptanırken ($p<0.05$), HI, PTX60 ve PTX100 grupları arasında fark saptanmadı ($p>0.05$).

3. Hipokampusun kornu amonius (CA1, CA2, CA3, Hilus) bölgesinde kaspaz 3 pozitif apoptotik hücre sayısı sham grubu ile HI, PTX60 ve PTX100 grupları arasında ve PTX60 grubu ile HI grubu arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p<0.05$).

4. Gruplar toplam dejeneratif hücre sayısı (apoptotik ve nekrotik hücre) açısından değerlendirildiğinde parietal korteks ve dentat girusta dejeneratif hücre sayısı PTX60 grubu HI ve PTX100 ile, kornu amoniusun değerlendirilmesinde ise PTX60 grubu ile HI grubu arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p<0.05$)

5. Beyin sağ yarısındaki canlı hücre sayısı sham grubu dışında diğer gruplarda istatistiksel anlamlı daha düşük saptandı ($p<0.05$).

6. Kortekste PTX100 grubundaki canlı hücre sayısı diğer gruplardaki canlı hücre sayısından anlamlı daha düşük saptandı ($p<0.05$).

7. PTX60 grubundaki canlı hücre sayısı korteks ve hipokampusta (kornu amonius) PTX100'den, dentat girusta ise hem H-İ hem de PTX100 grubundan fazladır ($p<0.05$).

8. Sham grubunun PBS diğer tüm gruplardan istatistiksel anlamlı daha kısa iken (sırasıyla HI ve PTX-100 için $p<0,001$; PTX-60 için $p=0,004$), dördüncü günde PTX-60 ile HI ve PTX-100 grupları arasında anlamlı fark saptandı (sırasıyla $p=0,044$, $p=0,043$).

9. İlk HFS sonrasında bazal değere göre PS'nın genliğinde meydana gelen değişimler; herhangi bir işlem yapılmayan kontrol grubu ve PTX60 grupları arasında fark saptanmazken ($p>0.05$); kontrol ve PTX60 grupları ile sham, HI ve PTX100 arasında ve HI grubu ile sham ve PTX100 grupları arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p<0.05$).

10. HFS sonrasında bazal değere göre EPSP'in eğiminde meydana gelen değişimler; herhangi bir işlem yapılmayan kontrol grubu ve PTX60 grupları arasında fark saptanmazken ($p>0.05$); kontrol ve PTX60 grupları ile HI arasında ve kontrol grubu ile sham grubu arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p<0.05$).

KAYNAKLAR

1. Bonifaco SL, Gonzalez F, Ferriero DM. Avery's diseases of the newborn. In: Gleason CA, Devaskar S (eds), Central nervous system injury and neuroprotection (9th ed), Elsevier Saunders, Philadelphia 2012, pp. 869-891.
2. Levene MI, Vries LS. Fanaroff and Martin's neonatal-perinatal medicine. In: Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh MC (eds), Hypoxic-ischemic encephalopathy (9th ed) Elsevier Mosby, 2011, pp 952-976.
3. Johnston MV, Hoon Jr AH. Possible mechanisms in infants for selective basal ganglia damage from asphyxia, kernicterus, or mitochondrial encephalopathies. J Child Neurol 2000;15:588-591.
4. Northington JF, Graham EM, Martin LJ. Apoptosis in perinatal hypoxic–ischemic brain injury: how important is it and should it be inhibited? Brain Res Rev 2005;50:44 –57.
5. Sastry PS, Rao KS. Apoptosis and the nervous system. J Neurochem 2000;74:1–20.
6. Perrone S, Stazzoni G, Tataranno ML, Buonocore G. New pharmacologic and therapeutic approaches for hypoxic-ischemic encephalopathy in the newborn. J Matern Fetal Neonatal Med 2012;25:83-88.
7. Liu F, McCullough LD. Inflammatory responses in hypoxic ischemic encephalopathy. Acta Pharmacol Sin 2013;34:1121-1130.
8. Uhl E, Pickelmann S, Baethmann A, Schurer L. Influence of platelet-activating factor on cerebral microcirculation in rats: part 1. Sytemic application. Stroke 1999; 30:873-879.
9. Uhl E, Pickelmann S, Rohric F, Baethmann A, Schurer L. Influence of platelet-activating factor on cerebral microcirculation in rats: part 2. Local application. Stroke 1999;30:880-886.
10. Harris E, Schulzke SM, Patole SK. Pentoxifylline in preterm neonates: a systematic review. Paediatr Drugs 2010;12:301-311.
11. Adams JG Jr, Dhar A, Shukla SD, Silver D. Effect of pentoxifylline on tissue injury and platelet-activating factor production during ischemia-reperfusion injury. J Vasc Surg 1995;21:742-749.
12. Sei Y, Nishida K, Kustova Y, Markey SP, Morse HC 3rd, Basile AS.Pentoxifylline decreases brain levels of platelet activating factor in murine AIDS.Eur J Pharmacol 1997;325:81-84.

13. Shohami E, Bass R, Wallach D, Yamin A, Gallily R. Inhibition of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) activity in rat brain is associated with cerebroprotection after closed head injury.J Cereb Blood Flow Metab 1996;16:378-384.
14. Sarnat HB, Sarnat MS. Neonatal encephalopathy following fetal distress. A clinical and electroencephalographic study. Arch Neurol 1976;33:696-705.
15. Wang Y, Cao M, Liu A, Di W, Zhao F, Tian Y, et al. Changes of inflammatory cytokines and neurotrophins emphasized their roles in hypoxic-ischemic brain damage. Int J Neurosci 2013;123:191-195.
16. Choi DW, Rothman SW. The role of glutamate neurotoxicity inhypoxic–ischemic neuronal death. Annu Rev Neurosci 1990;13:171–182.
17. Johnston MV. Excitotoxicity in neonatal hypoxia. Ment Retard Dev Disabil Res Rev 2001;7:229-234.
18. McDonald JW, Silverstein FS, Johnston MV. Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. Brain Res 1988;459:200-203.
19. Barks JD, Silverstein FS. Excitatory amino acids contribute to the pathogenesis of perinatal hypoxic–ischemic brain injury. Brain Pathol 1992;2:235-243.
20. Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. Pharmacol Ther 1999;81:163-221.
21. Choi DW. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. Trends Neurosci 1988;11:465-469.
22. Johnston MV, Ishiwa S. Ischemia and excitotoxins in development. Ment Retard Dev Disabil Res Rev 1995;1:193-200.
23. Hossain MA. Molecular mediators of hypoxic–ischemic injury and implications for epilepsy in the developing brain. Epilepsy and Behav 2005;7:204-213.
24. Hu BR, Liu CL, Ouyang Y, Blomgren K, Siesjo BK. Involvement of caspase-3 in cell death after hypoxia–ischemia declines during brain maturation. J Cereb Blood Flow Metab 2000;20:1294–1300.
25. Budihardjo I, Oliver HLM. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. Annual Review of Cell and Developmental Biology 1999;15:269-290.
26. Schwarz A, Futerman AH. Distinct role for ceramide and glucosylceramide at different stages of neuronal growth. J Neurosci 1997;17: 2929-38.

27. Yang YL, Li XM. The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. Cell Res 2000;10:169–177.

28. Ray AM, Owen DE, Evans ML, Davis JB, Benham CD. Caspase inhibitors are functionally neuroprotective against oxygen glucose deprivation induced CA1 death in rat organotypic hippocampal slices. Brain Res 2000;9:62-69.

29. Mukae N, Enari M, Sakahira H, Fukuda Y, Inazawa J, Toh H, et al. Molecular cloning and characterization of human caspase-activated DNase. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:9123-9128.

30. Himi T, Ishizaki Y, Murota SA. Caspase inhibitor blocks ischaemia induced delayed neuronal death in the gerbil. Eur J Neurosci 1998;10:777-781.

31. Rudel T. Caspase inhibitors in prevention of apoptosis. Herz 1999;24:236-241.

32. Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, et al. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. Joumal of Neuroscience 1998;18:4914-4928.

33. Hayashi Y, Jikihara I, Yagi T, Fukumura M, Ohashi Y, Ohta Y, et al. Immunohistochemical investigation of caspase-1 and effect of caspase-1 inhibitor in delayed neuronal death after transient cerebral ischemia. Brain Res 2001;893:113-120.

34. Hannun YA, Obleid LM. Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. Trends Biochem Sci 1995;20:73-77.

35. Oygür N, Sönmez Ö, Saka O, Yeğin O. Predictive value of plasma and cerebrospinal fluid TNF-alpha and IL-1 Beta concentrations on outcome of fullterm infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 1998;79:F190-193.

36. Rothwell NJ, Strijbos PJ. Cytokines in neurodegeneration and repair. Int J Devl Neuroscience 1995;3:179-185.

37. Saliba E, Henrot A. Inflammatory mediators and neonatal brain damage. Biol Neonate. 2001;79(3-4):224-7.

38. Zou JY, Crews FT. Tnf-alpha potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by nf-kappab inhibition. Brain Res. 2005;1034:11-24.

39. Harris E, Schulzke SM, Patole SK. Pentoxifylline in preterm neonates: a systematic review. Paediatr Drugs. 2010;12:301-311.

40. Szymura-Oleksiak J, Bury H, Lauterbach R, et al. Serum concentrations of pentoxifylline and its metabolites in premature neonates with sepsis when administered by continuous intravenous infusion. Pharro Sei. 1997;3:367-371.

41. Volpe JJ. Hypoxic-ischemic encephalopathy: neuropathology and pathogenesis. In: Volpe JJ ed. Neurology of the Newborn. 5th ed. Philadelphia: Elsevier, 2008:259-336.

42. Volpe JJ. Hypoxic-ischemic encephalopathy: clinical aspects. In: Volpe JJ (eds). Neurology of the Newborn. 5th ed. Philadelphia: Elsevier, 2008:400-80.

43. American Collge of Obstetricians and Gynecologists (ACOG). Neonatal encephalopathy and cerebral palsy: executive summary. Obstet Gynecol. 2004;103:780-781.

44. Ramaswamy V, Horton J, Vandermeer B, Buscemi N, Miller S, Yager J. Systematic review of biomarkers of brain injury in term neonatal encephalopathy. Pediatr Neurol 2009;40:215-226.

45. Spitzmiller RE, Phillips T, Meinzen-Derr J, Hoath SB. Amplitude- integrated EEG is useful in predicting neurodevelopmental outcome in full-term infants with hypoxic–ischemic encephalopathy: a meta-analysis. J Child Neurol 2007;22:1069-1078.

46. Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, Tyson JE, McDonald SA, Donovan EF, et al. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. N Engl J Med 2005;353:1574-1584.

47. Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, Ballard R, Edwards AD, Ferriero DM, et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. Lancet 2005;365:663-670.

48. Can G. Perinatal asfiksi. In: Yurdakök M, Erdem G (eds). Neonatoloji. 1. baskı. Ankara: Alp Ofset, 2004:719-729.

49. Toet MC, Lemmers MA, van Schelven LJ, van Bel F. Cerebral oxygenation and electrical activity after birth asphyxia: the irrelation to outcome. Pediatrics 2006;117:333-339.

50. Verklan MT. The chilling details: hypoxic-ischemic encephalopathy. J Perinat Neonatal Nurs 2009;23:59-68.

51. Scafidi J, Gallo V. New concepts in perinatal hypoxia ischemia encephalopathy. Curr Neurol Neurosci Rep 2008; 8:130-138.

52. Glass HC, Glidden D, Jeremy RJ, Barkovich AJ, Ferriero DM, Miller SP. Clinical neonatal seizures are independently associated with outcome in infants at risk for hypoxic-ischemic brain injury. J Pediatr 2009;155:318-123.

53. Cilio MR, Ferriero DM. Synergistic neuroprotective therapies with hypothermia. Semin Fetal Neonatal Med 2010;15:293-298.

54. Perrone S, Stazzoni G, Tataranno ML, Buonocore G. New pharmacologic and therapeutic approaches for hypoxic-ischemic encephalopathy in the newborn. J Matern Fetal Neonatal Med 2012;25:83-88.

55. Azzopardi DV, Strohm B, Edwards AD, Dyet L, Halliday HL, Juszczak E,et al.; TOBY Study Group. Moderate hypothermia to treat perinatal asphyxial encephalopathy. N Engl J Med 2009;361:1349-1358.

56. Eicher DJ, Wagner CL, Katikaneni LP, Hulsey TC, Bass WT, Kaufman DA,et al. Moderate hypothermia in neonatal encephalopathy: efficacy outcomes. Pediatr Neurol 2005;32:11-17.

57. Edwards AD, Brocklehurst P, Gunn AJ, Halliday H, Juszczak E, Levene M, et al. Neurological outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: synthesis and meta-analysis of trial data. BMJ 2010;340:c363.

58. Pereria LO, Arteni NS, Peterson RC, Padilha da Rocha A, Achaval M, Netto CA. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. Neurobiology of Learning and Memory 2007;87:101-8.

59. Szyndler J, Piechal A, Blecharz-Klin K, Skórzewska A, Maciejak P, Walkowiak J, et al. Effect of kindled seizures on rat behavior in water Morris maze test and amino acid concentrations in brain structures. Pharmacological Reports 2006;58:75-82.

60. Bucci DJ, Chia AA, Gallegher M. Spatial learning in male and female long-evans rats. Behav Neurosci 1995;109:180-183.

61. Yiğit R. Kontrol sistemleri, sindirim ve boşaltım fizyolojisi. Ziya Ziylan, Öğrenme ve bellek, Nobel Tıp Kitabevleri, 2001:293-298.

62. Amaral D, Lavenex P. The Hippocampus Book. In: Anderson P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O' Keefe J (eds), Hippocampal neuroanatomy. Oxford University Press. 2007, pp…

63. Carvajal CC, Vercauteren F, Dumont Y, Michalkiewicz M, Quirion R. Aged neuropeptide Y transgenic rats are resistant to acute stress but maintain spatial and non-spatial learning. Behav Brain Res. 2004;153:471-480.

64. Medvedev NI, Popov VI, Rodriguez Arellano JJ, Dallérac G, Davies HA, Gabbott PL, et al. The N-methyl-D-aspartate receptor antagonist CPP alters synapse and spine structure and impairs long-term potentiation and long-term depression induced morphological plasticity in dentate gyrus of the awake rat. Neuroscience. 2010;165:1170-1181.

65. Kandel ER, Schwartz JH. Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. Science. 1982;218:433-443.

66. Wilkinson DJ. Cool heads: ethical issues associated with therapeutic hypothermia for newborns. Acta Paediatr. 2009;98:217-220.

67. Kelen D, Robertson NJ. Experimental treatments for hypoxic ischaemic encephalopathy. Early Hum Dev. 2010;86:369-377.

68. Drury PP, Bennet L, Gunn AJ. Mechanisms of hypothermic neuroprotection. Semin Fetal Neonatal Med 2010;15:287-292.

69. Jacobs SE, Morley CJ, Inder TE, Stewart MJ, Smith KR, McNamara PJ, et al. Whole-Body Hypothermia for Term and Near-Term Newborns With Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: A Randomized Controlled Trial. Arch Pediatr Adolesc Med 2011;165:692-700.

70. Llinas R, Muhlethaler M. Electrophysiology of guinea pig cerebellar nuclear cells in the in vitro, brain stem-cerebellar preparation. J Physiol 1988;186:33-45.

71. Alonso D, Serrano J, Rodríguez I, Ruíz-Cabello J, Fernández AP, Encinas JM, et. al. Effects of oxygen and glucose deprivation on the expression and distribution of neuronal and inducible nitric oxide synthase and on protein nitration in rat cerebral cortex. J Comp Neurol 2002;111:183-200.

72. Muhlethaler M, Serafin M. Talamic spindles in an isolated and perfused brain preparation in vitro. Brain Res 1990;524:17-21.

73. Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. Ann Neurol 1981;9:131-41.

74. Jerome Y.Yager. Animals Models of Hypoxic-ischemic brain damage in the newborn. Seminars in Pediatric Neurology 2004;11:31-46.

75. Park JY, Byeon JH, Park SW, Eun SH, Chae KY, Eun BL. Neuroprotective effect of human placental extract on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. Brain Dev 2013;35:68-74.

76. Devillard R, Galvani S, Thiers JC, Guenet JL, Hannun Y, Bielawski J,et al. Stress-induced sphingolipid signaling: role of type-2 neutral sphingomyelinase in murine cell apoptosis and proliferation. PLoS One 2010;5:e9826.

77. Barone FC, Arvin B, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, et al. Tumor necrosis factor-α. A mediator of focal ischemic brain injury. Stroke 1997;28:1233-1244.

78. Bruno Rde B, Marques TF, Batista TM, Lima JC, de Arruda KG, Lima PF, et al. Pentoxifylline treatment improves neurological and neurochemical deficits in rats subjected to transient brain ischemia. Brain Res 2009;1260:55-64.

79. Vakili A, Mojarrad S, Akhavan MM, Rashidy-Pour A. Pentoxifylline attenuates TNF-alpha protein levels and brain edema following temporary focal cerebral ischemia in rats. Brain Res 2011;1377:119-125.

80. Banfi C, Sironi L, De Simoni G, Gelosa P, Barcella S, Perego C, et al. Pentoxifylline prevents spontaneous brain ischemia in stroke-prone rats. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 2004;310:890-895.

81. Movassaghi S, Nadia Sharifi Z, Soleimani M, Joghataii MT, Hashemi M, Shafaroodi H, et al. Effect of pentoxifylline on ischemia- induced brain damage and spatial memory impairment in rat. Iranian Journal of Basic Medical Sciences 2012;15:1083-1090.

82. Eun BL, Liu XH, Barks JD. Pentoxifylline attenuates hypoxic-ischemic brain injury in immature rats. Pediatr Res. 2000;47:73-8.

83. Kalay S, Oztekin O, Tezel G, Aldemir H, Sahin E, Koksoy S, et al. The effects of intraperitoneal pentoxifylline treatment in rat pups with hypoxic-ischemic encephalopathy. Pediatric Neurology 2013;49:319-323.

84. Nakajima W, Ishida A, Lange MS, Gabrielson KL, Wilson MA, Martin LJ, el al. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. J Neurosci 2000;20:7994-8004.

85. Messam CA, Pittman RN. Asynchrony and commitment to die during apoptosis. Exp Cell Res 1998;238:389-398.

86. Pittman RN, Wang S, DiBenedetto AJ, Mills JC. A system for characterizing cellular and molecular events in programmed neuronal cell death. J Neurosci 1993;13:3669 –3680.