



T.C.

BEZMÎÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

İmmatür Beyinde Hiperoksiye Bağlı Hasara Levetirasetamın Etkisi

UZMANLIK TEZİ

DR. RUMEYSA TUNA

TEZ DANIŞMANI

YRD. DOÇ. DR. BİLGE BAYRAKTAR

İSTANBUL-2016

TEŞEKKÜR

Bezmialem Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanlığı'nı hassasiyet ve özveri ile yürütmüş ve yürütmekte olan değerli hocalarım Sayın Prof.Dr.Mehmet Ruşen DüNDARÖZ ve Sayın Prof.Dr.Akın İŞCAN'a,

Tüm uzmanlık eğitimim boyunca olduğu gibi tezimin yapım aşamasında da bilimsel rehberliğini ve insani desteğini her zaman hissettiğim değerli tez danışmanım Sayın Yrd.Doç.Dr.Bilge Bayraktar'a,

Uzmanlık eğitimim sırasında tıbbi bilgi, tıbbi etik ve çalışma ahlaki hususlarında bana çok şey katan, ufkumu genişleten değerli hocalarım Sayın Prof.Dr.Demet Demirkol, Sayın Prof.Dr.Nurettin Onur Kutlu, Sayın Doç.Dr.Fatma Betül Çakır, Sayın Doç.Dr.Erkan Çakır ve Sayın Doç.Dr.İlker Tolga Özgen'e,

Uzmanlık eğitimim süresince samimi desteklerini esirgemeyen değerli abi ve ablam Yrd.Doç.Dr.Selçuk Uzuner ve Yrd.Doç.Dr.Ayşegül Doğan Demir'e,

Tüm eğitim hayatım boyunca üzerimde emeği olan, özverili çalışma, ilmi ve ahlaki değerler hususunda bana örnek olan tüm hocalarıma,

Tezimin hazırlanmasında emeği olan Tıbbi Patoloji uzmanı Sayın Öğr.Gör.Dr.Zeynep Tosuner'e, Tıbbi Biyokimya uzmanı Sayın Uzm.Dr.Ömer Faruk Özer'e, Deney Hayvanları Laboratuvarı sorumlusu Sayın Veteriner Dr.Mert Çelikten ve ekibine,

Kliniğimiz uzmanlarına, asistan arkadaşlarıma, kliniğimizin ve hastanemizin diğer çalışanlarına, birlikte çalıştığımız diğer disiplinlerdeki meslektaşlarıma,

Haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim fedakar anne ve babama, sevgili kardeşlerime, aileme,

En içten hürmet ve şükranlarımı sunarım.

Dr.Rumeysa Tuna

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER.....	II
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	IV
TABLolar DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
ÖZET.....	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ	3
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Prematürite	4
2.2. Beyin Gelişimi ve İmmatür Beyinde Hasar Mekanizmaları	5
2.3. İmmatür Beyinde Hiperoksinin Etkileri.....	8
2.4. Prematüre Yenidoğanlarda Nöroprotektif Önlemler.....	12
2.5. Yenidoğanlarda Kullanılan Antiepileptik İlaçlar	14
2.6. Levetirasetam	16
3. AMAÇLAR.....	22
4. GEREÇ VE YÖNTEM	23
4.1. Çalışma Ekibi	23
4.2. Etik Kurul Onayı	23
4.3. Gereçler	23
4.4. Çalışma Grupları	24
4.5. Hiperoksi Hayvan Modeli Oluşturulması ve Levetirasetam Tedavisi	25
4.6. Beyin Dokusu ve Kan Örneklerinin Alınması	28
4.7. Patolojik ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme.....	28

4.8. Biyokimyasal Çalışmalar	30
4.9. İstatistiksel Değerlendirme.....	30
5. BULGULAR.....	32
5.1. İmmünohistokimyasal Çalışmalar.....	32
5.1.1. Kaspaz-3	32
5.1.2. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF).....	35
5.2. Biyokimyasal Çalışmalar	38
5.2.1. Katalaz.....	38
5.2.2. TiyoL	39
6. TARTIŞMA	40
7. SONUÇ	45
8. KAYNAKLAR.....	46

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AMPA	alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolepropiyonik asit
BDNF	Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
CD95	Fas
ÇDDA	Çok düşük doğum ağırlıklı
DDA	Düşük doğum ağırlıklı
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentetaz
FADD	Fas ilişkili ölüm parçası
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Cemiyeti
GABA	Gamma aminobütirik asit
GDNF	Glia kaynaklı nörotrofik faktör
GH	Gestasyonel hafta
GPO	Glutasyon peroksidaz
HIF	Hipoksi ile indüklenen faktör
H₂O₂	Hidrojen peroksit
İDDA	İleri derecede düşük doğum ağırlıklı
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz
IL	İnterlökin
IP	İntraperitoneal
IV	İntravenöz
LEV	Levetirasetam
MBP	Miyelin basic protein
MDA	Malonildialdehit
MgSO₄	Magnesium sülfat

MR	Manyetik rezonans
NCSS	Number Cruncher Statistical System
NGF	Sinir büyüme faktörü
NMDA	N-metil-D-aspartat
NO	Nitrik oksit
NT	Nörotrofin
O₂	Oksijen
OPC	Oligodendrosit progenitor hücreler
PO₂	Parsiyel oksijen basıncı
pre-OL	Preoligodendrositler
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
SAK	Subaraknoidal kanama
-SH	Serbest sülfidril grubu
SOD	Süperoksit dismutaz
TLR-4	TOLL benzeri reseptör-4
TNF	Tümör nekroz faktörü
TRAIL	TNF ilişkili apoptoz indükleyici ligand
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Çalışmada Kullanılan Gereç Listesi	23
Tablo 2: Çalışmada Kullanılan Kimyasal Madde Listesi.....	24
Tablo 3: Çalışma Grupları.....	24
Tablo 4: Gruplara Göre Kaspaz-3 Frontal Bölge Dağılımları.....	32
Tablo 5: Gruplara Göre Kaspaz-3 Parietal Bölge Dağılımları.....	33
Tablo 6: Gruplara Göre Kaspaz-3 Oksipital Bölge Dağılımları	34
Tablo 7: Gruplara Göre VEGF Frontal Bölge Dağılımları	35
Tablo 8: Gruplara Göre VEGF Parietal Bölge Dağılımları.....	36
Tablo 9: Gruplara Göre VEGF Oksipital Bölge Dağılımları	37
Tablo 10: Gruplara Göre Katalaz Dağılımları.....	38
Tablo 11: Gruplara Göre Tiyol Dağılımları	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Kontrol grubu.....	26
Şekil 2: Hiperoksi grubu	27
Şekil 3: Hiperoksi+ LEV grubu	27
Şekil 4: Hiperoksi Grupları	27
Şekil 5: Hematoksilen-Eozin Boyama (x400): 1- Normooksi, 2-Hiperoksi, 3-Hiperoksi+LEV grupları. Hiperoksi gruplarında ödem ve vakuoler dejenerasyon görülmektedir.....	29
Şekil 6: Kaspaz-3 Boyama (x400): 1- Normooksi, 2-Hiperoksi, 3-Hiperoksi+LEV grupları. İşaretler apoptotik hücreleri göstermektedir.	29
Şekil 7: VEGF Boyama (x400); 1- Normooksi, 2-Hiperoksi, 3-Hiperoksi+LEV grupları. İşaretler VEGF eksprese eden hücreleri göstermektedir.....	29
Şekil 8: Kaspaz-3 Frontal Bölge Ölçümler	32
Şekil 9: Kaspaz-3 Parietal Bölge Ölçümler.....	33
Şekil 10: Kaspaz-3 Oksipital Bölge Ölçümleri	34
Şekil 11: VEGF Frontal Bölge Ölçümleri.....	35
Şekil 12: VEGF Parietal Bölge Ölçümleri	36
Şekil 13: VEGF Oksipital Bölge Ölçümleri.....	37
Şekil 14: Katalaz Ölçümleri	38
Şekil 15: Tiyoil Ölçümleri.....	39

ÖZET

İmmatür beyinde hiperoksiye bağılı hasara levetirasetamın etkisi

Giriş: Yenidoğan Yoğun Bakım Üniteleri'nde prematüre bebeklerin tedavisinde sıklıkla kullanılmakta olan oksijen tedavisi gelişmekte olan beyinde nöronal apopitoza sebep olmaktadır. Levotirasetam (LEV) yenidoğanlarda kullanımı ile ilgili yeterli veri olmayan yeni nesil bir antiepileptiktir. Literatürde LEV'in diğere bazı beyin hasarı modellerinde nöroprotektif etkileri bildirilmiş olmakla birlikte immatür beyinde hiperoksik hasar üzerindeki etkilerini değerlendiren bir çalışma yoktur.

Amaç: Bu çalışmanın amacı, immatür beyinde hiperoksiye bağılı hasar üzerine LEV'in olası nöroprotektif etkilerini araştırmaktır.

Yöntemler: Toplam 24 adet Wistar-albino sıçan yavrusu kullanıldı. Sıçan yavruları üç gruba ayrılarak iki gruba postnatal 6.günden 10.güne kadar hiperoksi (% 80-%90 oksijen) uygulandı. Hiperoksi gruplarından biri 200 mg/kg LEV ile tedavi edilirken, diğere iki gruba normal salin intraperitoneal olarak uygulandı. Kontrol grubu sıçanlar normooksik koşullarda takip edildi. Frontal, parietal, oksipital bölgelerde apopitoz değerlendirilmesi için aktif kaspaz-3, anjiogenez değerlendirilmesi için vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) immunhistokimyasal olarak çalışılarak işaretili hücre yüzdesi hesaplandı. Antioksidan durumun değerlendirilmesi için katalaz ve tiyol kan düzeyleri çalışıldı.

Bulgular: Hiperoksi+LEV grubunda LEV tedavisi ile incelenen hiçbir bölgede apopitozda anlamlı azalma saptanmazken sadece parietal bölgede kontrol grubuna göre apopitozda anlamlı artış görülmüştür. VEGF düzeyi her üç bölgede hiperoksi ile artmış ve LEV tedavisi ile frontal bölgede artarken parietal ve oksipital bölgede kontrol grubuna yaklaşmıştır. Katalaz düzeyi hiperoksi guruplarında normooksik grubuna göre azalmış iken, LEV ile tedavi edilen grupta artarak kontrol grubuna yaklaşmaktadır. Ancak gruplar arasındaki bu farklar istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildir. Tiyol düzeyinde de gruplar arasında belirgin ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır.

Sonuç: Bu çalışmada immatür beyinde hiperoksiye bağılı hasara karşı LEV'in nöroprotektif etkisine dair veri elde edilememiştir. Prematüre bebeklerin kısa ve uzun dönemde nörokognitif fonksiyonlarını düzeltecek tedaviler açısından daha fazla deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: İmmatür beyin, Hiperoksi, Nöroprotektif, Levotirasetam

ABSTRACT

Effects of levetiracetam on hyperoxia-related injury in immature brain

Background: Oxygen therapy widely being used in neonatal intensive care units causes neuronal apoptosis in developing brain. Levetiracetam (LEV) is a new generation antiepileptic drug with insufficient data on its use in newborns. The neuroprotective effects of LEV have been reported in some other brain injury animal models but there is no study evaluating its effects on hyperoxic immature brain injury.

Objective: The aim of this study was to investigate the possible neuroprotective effects of LEV on hyperoxia-induced immature brain damage.

Methods: A total of 24 Wistar-albino rat pups were used. Rat pups were separated into three groups. Two groups subjected to hyperoxia (80-90% oxygen) from postnatal sixth day to tenth day. Hyperoxia groups were treated with LEV or normal saline. Control group rats stayed in normoxic conditions and treated with normal saline. The immunohistochemistry procedure was performed for active Caspase-3 for neuronal apoptosis and vascular endothelial growth factor (VEGF) for angiogenesis in frontal, parietal and occipital regions. Marked cell percentage was calculated. To assess antioxidant status, catalase and thiol blood levels were investigated.

Results: No significant decrease in apoptosis with LEV treatment was observed in any of the areas examined in the hyperoxia+LEV group, but only a significant increase in apoptosis was observed in the parietal region compared to the control group. VEGF levels were increased by hyperoxia in all regions examined and decreased with LEV treatment except for frontal region but these differences are not significant. Catalase levels in the hyperoxia groups were decreased compared to the control normoxia group, while in the group treated with LEV, increased and closed to normal values. However, this difference between groups did not reach a statistically significant level. Thiol levels were not significantly different between the groups.

Conclusions: In this study, we couldn't obtain any evidence about neuroprotective effect of LEV against hyperoxia-induced damage in immature brain. More clinical and preclinical studies are needed to improve the neurocognitive outcomes of premature infants.

Keywords: Immature brain, Hyperoxia, Neuroprotection, Levetiracetam

1. GİRİŞ

Son zamanlarda yenidoğan bakımında teknolojik imkanların gelişmesi ile prematüre bebeklerin hayatta kalımı artmakla birlikte, bu dönemdeki etkilenmeye bağlı uzun dönem fiziksel ve mental morbidite oranı azalmamaktadır (1). Preterm bebeklerin hayatta kalımının artması, gerektiğinde oksijen desteğini de içeren hayat kurtarıcı girişimlere bağlıdır. İntraserebral kanama veya parankimal enfarkt gibi ağır hasarlar prematüre doğan çocuklarda görülen nörolojik etkilenme spektrumunu tek başına açıklamamaktadır. Bu durum araştırmacıları beyin hasarının başka tetikleyicilerini ve bunlara karşı alınacak önlemleri araştırmaya sevk etmektedir.

Hiperoksinin immatür beyin üzerine potansiyel etkileri son dönemde araştırmacıların odaklandığı noktalardan birini oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda pulse oksimetre %93 ve korele olarak PaO₂: 107.3 ± 59.3 mmHg'nın üzerindeki değerlerin prematüre bebeklerde bronkopulmoner displazi, prematüre retinopatisi, nörogelişimsel hasar gibi kronik morbiditeleri arttırdığı görülmüştür (2, 3). Oksijenin prematüre bebeklerdeki zararlı etkileri bronkopulmoner displazi ve prematüre retinopatisi ile ilgili çalışmalarda daha iyi tanımlanmış olmakla birlikte nörolojik gelişime etkileri son yıllarda daha fazla deneysel ve klinik çalışmalara konu olmaktadır. İmmatür beyinde oksijen toksisitesinin nörobiyolojik, yapısal ve fonksiyonel yönleriyle ortaya konulması prematüre bebeklerin nörolojik gelişimini iyileştirecek önlemler alınmasına katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Prematürite

Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre preterm doğum; gebelik süresinin son adet tarihine göre 259 gün veya 37 gestasyonel haftadan (GH) daha kısa olması olarak tanımlanmaktadır (4). Preterm doğum oranı 2010 verilerine göre tüm canlı doğumların %5-18'i arasında olup, her yıl yaklaşık 15 milyon preterm bebek doğduğu ve bu sayının her geçen yıl artmakta olduğu görülmektedir. Her yıl yaklaşık 1 milyon bebek prematüriteye bağlı komplikasyonlardan dolayı kaybedilmektedir. Prematürite yenidoğan dönemindeki ölüm sebeplerinde birinci, ilk beş yaşta yaşanan ölümlerde pnömoniden sonra ikincidir (5, 6). Hayatta kalanların bir kısmı ise yaşamını öğrenme güçlüğü, görme, işitme problemleri, ağır motor mental gerilik gibi nörolojik problemlerle geçirmektedir. Preterm doğuma bağlı nörolojik sekeller toplum, sağlık sistemi ve aileler için hem maddi hem manevi sorun oluşturmaktadır.

Prematüre bebeklerin gebelik haftasına göre sınıflandırılması (7):

1. İleri derecede preterm (32 haftanın altında doğum)
2. Orta derecede preterm (32 0/7- 33 6/7 haftalar arasında doğum)
3. Geç preterm (34 0/7- 36 6/7 haftalar arasında doğum)

Prematüre bebeklerin doğum tartılarına göre sınıflandırılması (4):

1. Düşük doğum ağırlıklı (DDA) yenidoğan; gestasyon haftasına bakılmaksızın 2500 gr'ın altındaki yenidoğanlar,
2. Çok düşük doğum ağırlıklı (ÇDDA) yenidoğan; 1500 gr'ın altındaki yenidoğanlar,

3. İleri derecede düşük doğum ağırlıklı (İDDA) yenidoğan; 1000 gr'ın altındaki yenidoğanlar.

Yenidoğan bakımındaki gelişmelerle prematüre bebeklerde mortalite azalmakta ve daha immatür bebeklerin yaşatılabilmesiyle birlikte nörolojik problemlili bebek sayısı artmaktadır. Serebral palsi görülme olasılığı ÇDDA bebeklerde, doğum tartısı 2500 gr'ın üstünde olanlara göre 20-80 kat artmıştır (8, 9). ÇDDA bebeklerin %25-50'sinde kognitif, davranışsal, dikkat ve sosyalizasyon bozuklukları, %5-10'unda ise serebral palsi gibi major motor defisitler görülmektedir (10). Bir metaanalize göre (4125 ÇDDA ve/veya 33.GH'dan önce doğan bebek ve 3197 term) bebeklerde doğumdaki immatür iteleri ile korele olarak ortadan ağıra akademik başarı, dikkat ve davranış problemleri ile yürütücü işlev bozuklukları görülmektedir (11). Bir başka çalışmada geç preterm bebeklerin okul çağında term bebeklere göre %36 daha fazla gelişme geriliği veya engellilik riski taşıdığı görülmüştür (12). Yüksek riskli preterm bebeklerin perinatal bakımında yaşanan gelişmeler ile major fokal destrüktif lezyonların sıklığı azalmaktadır. Diffüz beyaz ve gri madde hasarı bu klinik durumların arkasındaki temel nöropatolojik mekanizma haline gelmektedir (10, 13, 14). Prematüre doğum öyküsü olan çocuklarda yapılan beyin görüntülemeleri kognitif bozuklukların gri madde yapılarında volüm azalması ile ilintili olduğunu göstermektedir. Bu durum prematüre bebeklerde postnatal dönemde yaşanan nöron kaybının nörolojik morbiditenin bir kısmından sorumlu olduğunu ve beyin gelişimi sürecinde global hasara sebep olan etkenlerin önemini göstermektedir (13-15).

2.2. Beyin Gelişimi ve İmmatür Beyinde Hasar Mekanizmaları

İn utero beyin gelişiminin ilk yarısı sinir hücresi oluşumu ve migrasyon ile karakterizedir. İkinci yarıda glial hücre proliferasyonu ve programlı hücre ölümü ön plana çıkar. Son trimesterde hücresel bağlantıların aksonal, dendritik sinaptik yapıların geliştiği ve

myelinizasyonun başladığı görülür (16). Bu gelişim basamakları beyin farklı bölgelerinde tamamen birbirinden bağımsız olmasa da farklı zamanlarda görülebilir.

İmmatür beyin intrauterin ve ekstrauterin çevredeki hipoksi, iskemi, inflamasyon, hiperoksi, hipoglisemi, hiperbillirubinemi gibi beyin hasarına sebep olacak risk faktörlerinden etkilenir (17). Bunun yanısıra bazı anestetik, sedatif ve antikonvülzan maddelerin de immatür beyinde apopitotik nörodejenerasyona sebep olduğu hayvan çalışmalarında gösterilmiştir (18-21). Beynin nörotoksik etkilere özellikle hassas olduğu hızlı beyin gelişimi dönemi kemirgenlerde postnatal ilk birkaç haftada görülürken, insanlarda prenatal dönemde gebeliğin ortalarından başlayarak doğum sonrası birkaç yıla kadar devam etmektedir (10, 22).

İleri derecede preterm bebeklerde 23-26.GH'da hızlı gelişen germinal matriks içeren serebellum ve periventriküler bölgedeki değişiklikler dikkat çeker. Bu bebeklerde diğer risk faktörleri ve bu bölgelerdeki yoğun damarsal ağa bağlı hassasiyet sonucu serebellar ve intraventriküler hemoraji riski artmıştır (16). 26-34.GH'daki preterm bebeklerde beyin hasarı özellikle periventriküler bölgedeki beyaz madde gelişimi ile ilişkilidir (23). Bu bölgedeki perfüzyon bozuklukları ve oligodendrosit immatüritesi oksidatif strese karşı duyarlılığa sebep olmaktadır (24, 25). Geç preterm bebeklerde bazal ganglionlar ve talamus metabolik olarak aktif görülmektedir. Benzer şekilde maternal ve neonatal risk faktörleriyle birlikte oligodendrosit immatüritesine bağlı eksitotoksisite ve oksidatif strese duyarlılık temel hasar mekanizmasını oluşturmaktadır (16).

Oligodendroglial seri hücreleri miyelin üreten oligodendrosit haline gelebilmek için belirli maturasyon aşamalarından geçmektedir (26, 27);

1. Oligodendrosit progenitör hücreler (OPC),
2. Preoligodendrositler (pre-OL),

3. İmmatür/premyelinizan oligodendrositler,
4. Matür miyelin üreten oligodendrositler.

İnsan beyinde beyaz cevherde 24-40.haftalar arasında görülen hücreler pre-OL ve immatür oligodendrositler iken, matür miyelin üreten oligodendrositler ancak term dönemde ortaya çıkmaktadır (10, 28).

Antioksidan enzim seviyeleri ve apoptotik proteinlerin ekspresyonundaki farklılığa bağlı olarak matür oligodendrositler oksidatif strese dirençli iken, preoligodendrositler duyarlıdır (26, 29-32). Preoligodendrositlerde süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz gelişiminin gecikmiş olduğu, glutatyon peroksidaz (GPO) ve katalazın hidrojen peroksit (H_2O_2) yakalamasında defekt olduğu gösterilmiştir (32-35). Pre-OL ve immatür oligodendrositlerin dış etkenlere daha hassas olmasının diğer bir sebebi iyonotropik alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolepropionik asit (AMPA)-kainat ve N-metil-D-aspartat (NMDA) tip glutamat reseptörlerinin oligodendrosit prekürsörlerinde matür oligodendrositlere göre daha fazla eksprese olmasıdır. Hipoksi, iskemi, enfeksiyon, enflamasyon gibi zarar verici etkiler sonucu AMPA-kainat reseptörleri aktivasyonu hücre ölümüne yol açarken, NMDA reseptörlerinin aktivasyonu hücre maturasyonunun durmasına ve hipomyelinizasyona sebep olmaktadır (10, 25, 32, 36, 37). Preoligodendrositlerin nitrik oksit (NO) toksisitesine de matür oligodendrositlerden daha hassas olduğu hücre kültürü çalışmalarında gösterilmiştir (38).

Antioksidan enzimlerin aktiviteleri ve oksidatif strese cevapları matür ve immatür beyinde farklılık göstermektedir. Sıçanlarda SOD, katalaz ve GPO enzimlerinin embriyonik olarak düşük olduğu ve yenidoğan döneminde veya erişkin dönemde artarak maksimuma ulaştığı gösterilmiştir (25, 39). İmmatür beyinde immüniteden sorumlu çok sayıda yerleşik mikroglia varlığı da beyaz madde hasarında suçlanmaktadır. Risk faktörlerinin sebep olduğu

mikroglial aktivasyon sitokin ve glutamat salınımı ve serbest radikal üretimi ile nöronal hasarda rol almaktadır (16, 32). Sonuç olarak preterm bebeklerdeki bu süreçler erken gelişim evrelerindeki hücrelerin ölümü, oligodendroglia dismatüritesi ve myelinizasyonun bozulmasına sebep olmaktadır (10, 16).

2.3. İmmatür Beyinde Hiperoksinin Etkileri

Ekstrauterin hayat oksijen tedavisi verilme bile yenidoğanlar için anne karnına göre hiperoksik bir durum oluşturmaktadır. İn utero umbilikal ven parsiyel oksijen basıncı (PO_2) 32 mmHg civarında iken, inen aortada PO_2 24-28 mmHg civarındadır (40). Bu relatif hipoksik duruma fetal hemoglobin ve diğer adaptif mekanizmalar ile iyi uyum sağlanmaktadır. Terme ulaşan fetus intrauterin hayatın son günlerinde antioksidanların düzeyini %100-200 arttırarak dış dünyaya hazırlanır (41). Doğumla birlikte PaO_2 3-4 kat artarak 65-80 mm Hg seviyesine ulaşır (2, 27). Prematür doğumla birlikte erken maruz kalınan relatif hiperoksik duruma etkin cevap verecek mekanizmalardan yoksun olan bebekler için bu durum organ hasarı ile sonuçlanabilmektedir. Prematüre bebeklere pulmoner, kardiyak veya nörolojik sebeplerden ötürü oksijen tedavisi verilmesi gerektiği durumlarda bu hiperoksik durum ağırlaşabilir.

Hiperoksi gelişmekte olan immatür beyne çeşitli mekanizmalarla zarar vermektedir.

Yapılan çalışmalarda hiperoksinin immatür sıçan ve fare beyinde diffüz apoptoza sebep olduğu, beyin hücrelerindeki bu hassasiyetin gelişimin erken aşamalarında, özellikle postnatal 0-14 günler arasında olduğu gösterilmiştir (31, 42-44). Hiperoksiye bağlı apoptozda iki temel mekanizma olan intrensek ve ekstrensek mekanizmaların aktive olması hücreyi parçalanmaya götüren kaspaz-3 aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. İntrensek yolda oksidatif stres, DNA hasarı gibi intrensek sinyallerle mitokondriden sitokrom C salınımı ile kaspaz yolakları aktive olmaktadır. Altı günlük sıçanlarda yapılan çalışmada hiperoksi sonrası sistozolik sitokrom C artarken, mitokondrial sitokrom C'nin azalması intrensek yolun aktive

olduğunu göstermektedir (45). Ekstresek yol plazma membranındaki tümör nekroz faktörü (TNF) ailesine mensup Fas (CD95), TNF reseptörü, TNF ilişkili apopitoz indükleyici ligand (TRAIL) reseptörleri gibi spesifik ölüm reseptörlerinin aktive olmasıyla tetiklenir (45, 46). Birçok beyin hasarı modelinde apopitoz ile ilişkili olan Fas reseptör mekanizmasının oksijen toksisitesinde de major rol aldığı gösterilmiştir. Hiperoksiye belirli sürelerde maruz bırakılan 6 günlük sıçanlarda talamus ve kortekste Fas ve Fas ligand mRNA ve protein düzeylerinde, Fas-ilişkili ölüm parçası (FADD: Fas-associated death domain), kaspaz-3 ve kaspaz-8 oluşumunda artış tespit edilmiştir. Bu modelde hiperoksi öncesi kaspaz-8 inhibitörü uygulanması kaspaz-3 oluşumu ve apopitozu azaltmıştır (46). Altı günlük farelerde yapılan çalışmada hiperoksi uygulanan vahşi tip farelerde beyinde diffüz apopitoz görülürken, Fas mutant farelerin hiperoksi ile ilişkili apopitozdan büyük oranda korunduğu görülmüştür (46). Başka bir çalışmada immatür beyinde hiperoksiye bağlı hasarın pankaspaz inhibitörü ile azaldığı gösterilmiştir (31). Bu bulgular hiperoksiye bağlı hasarda fonksiyonel Fas reseptörü ve kaspaz yolağının rolünü doğrulamaktadır. İmmatür beyinde hiperoksi hasarına sebep olan diğer bir reseptör de doğal immüitenin bir parçası olan patojen ilişkili moleküler reseptör; TOLL benzeri reseptör-4 (Toll-like receptor-4: TLR-4)'tür. Üç günlük farelerde yapılan çalışmada 48 saat hiperoksi sonrası TLR-4 knock-out fareler vahşi tip farelere göre beyin hücrelerinde daha az apopitoz ve davranışsal testlerde daha az kognitif defisit göstermişlerdir. Ayrıca vahşi tip farelerde hiperoksi maruziyeti ile TLR-4 ekspresyonunda artış olmuş, bu da proinflamatuvar sitokin salınımı ve nöronal eksitotoksisiteye sebep olmuştur (47). İmmatür beyinde hiperoksiye bağlı apopitozun diğer bir mekanizması Ras gibi sağkalım (protoonkogen) sinyal proteinlerinin inaktivasyonudur. Altı günlük fareler üzerinde yapılan çalışmada hiperoksi ile vahşi tip farelerde Ras aktivitesinin %50 azaldığı görülürken , yapısal olarak aktive olmuş Ras eksprese eden transgenik farelerde Ras aktivitesinin azalmadığı ve vahşi tip farelere göre daha az nörodejenerasyon olduğu görülmüştür (42).

Hiperoksi, gelişmekte olan sıçan beyinde beyaz madde hasarına ve beyaz madde olgunlaşmasının gecikmesine sebep olmaktadır (27, 31, 42). Gelişmekte olan beyaz maddedeki oligodendrosit prekürsörlerinin oksidatif strese duyarlılığı sebebiyle, hiperoksi bu hücrelerde apoptozu arttırmakta ve proliferasyonlarını azaltmaktadır (27, 48). Hiperoksiye maruz kalan astrositlerde de oligodendrosit progenitör hücrelerini glutamat toksisitesine karşı koruma kapasitesi azalmaktadır. Böylece miyelin üreten matür oligodendrosit sayısı azalmaktadır (27). Hiperoksi yenidoğan sıçanlarda ve farelerde miyelin basic protein (MBP) dahil miyelin proteinlerinin ekspresyonunda da maturasyon düzeyine bağlı azalmaya sebep olmuştur (27, 31, 49). Neonatal dönemde hiperoksiye maruz kalmış farelerde beyin hücrelerinde miyelin kalınlığında azalma, anormal miyelin kıvrımları, aksonal çapta azalma görülmüştür (49). Bu bulgular hiperoksinin beyin gelişiminde miyelin oluşumuna negatif etkisi olduğunu göstermektedir. Hiperoksi sonrası iyileşme döneminde oligodendrosit sayısı ve MBP ekspresyonunda meydana gelen kompensatuar değişikliklere rağmen beyaz madde organizasyon, hacim ve yoğunluğundaki etkilenmenin erişkin döneme kadar taşındığı gösterilmiştir (27). Postnatal hiperoksi, oligodendrosit dismatüritesi ve miyelinizasyon gecikmesine tek başına sebep olduğu gibi antenatal hipoksiye bağlı beyaz madde hasarını da arttırmaktadır (48).

Hiperoksiye bağlı serbest oksijen radikalleri enzimleri inaktive eder, membran fonksiyonlarını bozar ve genetik yapıya zarar verir. Beyin gelişimi çalışmalarında hiperoksi gruplarında reaktif oksijen ürünlerine bağlı okside glutatyon, okside glutatyon/redükte glutatyon oranlarında, lipid peroksidasyonunda ve hücre büyümesi, nöronal migrasyon-morfoloji ve sinaptik aktiviteyi yöneten proteinlerde protein karbonil oranlarında anlamlı artış tespit edilmiştir (42, 43, 50, 51). İmmatür beyinde hiperoksinin SOD gibi antioksidan enzim düzeylerinde azalmaya sebep olduğu, antioksidan mekanizmalardan biri olan tioredoksin-peroksiredoksin dengesini değiştirdiği gösterilmiştir (50, 52). SOD geninden fazla kopya

taşıyan transgenik yenidoğan farelerde yapılan çalışmada hiperoksi sonrası transgenik farelerde apopitozun ve inflamatuvar markerların hiperoksiye maruz kalmış vahşi tip farelere göre daha az olduğu görülmüştür (53). Bu bulgular immatür beyinde apopitoza sebep olan mekanizmalardan birinin reaktif oksijen ürünleri ve oksidatif stres olduğunu göstermektedir.

Hiperoksi immatür beynin çeşitli bölgelerinde indüklenebilir nitrik oksit sentetaz (iNOS) mRNA upregülasyonu ile mikroglyal hücrelerde iNOS sentezini arttırarak hasar verici potansiyeli olan peroksinitrit oluşumunu arttırır (54). Hiperoksinin serebral kapillerlerde endotelyal nitrik oksit sentetaz (eNOS) upregülasyonu ve nitratif stresle ilişkili olarak vasoprotektif etkili vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) reseptörlerinde azalma ile serebral mikrovasküler dejenerasyon ve beyin kitlesinde azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (52). İnflamatuvar süreçlerin etkisi immatür sıçan beyinde oksijene bağlı apopitotik nörodejenerasyonda proinflamatuvar sitokinler olan interlökin (IL)-1 ve IL-18 artışı ile gösterilmiştir (55).

Hiperoksi, transkripsiyon faktörlerinin down regülasyonu ile nöronal progenitör hücrelerin proliferasyonu ve maturasyonunu olumsuz etkilemektedir (56). Nörotrofinler sinir sisteminin büyüme, farklılaşma ve gelişimini uyarıcı ve destekleyen bir protein ailesidir (57, 58). Yapılan bir çalışmada, immatür beyinde hiperoksiye bağlı singulat/retrosplenial korteks, kaudat nükleus ve talamusta beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), sinir büyüme faktörü (NGF), nörotrofin-3 (NT-3), nörotrofin-4 (NT-4) mRNA düzeylerinde anlamlı azalma tespit edilmiştir (42). Bir başka çalışmada, immatür beyinde hiperoksi sonrası BDNF ve glia kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF) gen ekspresyonlarında bölgesel değişiklikler olduğu, BDNF mRNA düzeyinin dikkat, davranış ve çalışma belleği ile ilişkili prefrontal kortekste azalırken, motor ve duyu alanları içeren izokortekste arttığı, GDNF mRNA ekspresyonunun her ikisinde de arttığı görülmüştür (59). Nörotrofik faktörlerin ekspresyonunda artış genellikle nöroprotektif olarak düşünülse de, GDNF ekspresyonunda

artışın nöronal hasar ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (60, 61). Bu bulgular trofik faktörlerin ekspresyonundaki değişikliklerin de hücre ölümünde etkili olabileceğini göstermektedir.

Otuzikinci GH'nın altında doğan bebeklerde yapılan çalışmada hiperoksi ile ilişkili olarak serebral kan akım hızında artış olduğu ve bunun erken mortalite ve intaserebral kanama için prediktif değeri olduğu tespit edilmiştir (62).

Yenidoğan döneminde maruz kalınan kronik hiperoksinin nörogelişim üzerine etkilerini araştıran bir çalışmada, 2-14.günler arasında hiperoksi uygulanan farelerde 12-14.haftalarda yapılan davranışsal testlerde erişkin farelerde mekansal öğrenme, hafıza, yeni nesnelere tanıma ve keşif yeteneğinin azaldığı, bunun manyetik rezonans (MR) görüntülemelerde normoksi grubuna göre azalmış hipokampus ve serebellum volümü ile korele olduğu gösterilmiştir (63).

Bu bulgular hiperoksinin, nörolojik gelişime olumsuz etkilerini çeşitli yönleriyle ortaya koymaktadır.

2.4. Prematüre Yenidoğanlarda Nöroprotektif Önlemler

Prematüre doğuma bağlı nörolojik sekellerin, sosyal ve ekonomik sonuçlarının iyileştirilmesi için, prematüre doğumları ve beyin hasarını azaltacak antenatal, perinatal ve postnatal girişimler önem arz etmektedir.

Randomize kontrollü çalışmalarda preterm doğum öncesi annelere verilen magnezyum sülfat ($MgSO_4$) tedavisinin bebeklerdeki nörolojik sekelleri anlamlı ölçüde azalttığı gösterilmiştir (64-67). Magnezyum iyonları beyni NMDA reseptörü ile ilişkili hasardan korur, konvulziyonları baskılar, NO salınımını azaltarak oksijen radikali üretimini azaltır,

vazodilatatör özellik gösterir. Bu özelliklerin Mg iyonunun nöroprotektif etki mekanizmalarını oluşturduğu düşünülmektedir (64).

Randomize kontrollü çalışmalarda bebek plasenta seviyesi veya altında iken 30-60 sn geciktirilmiş umbilikal kord klemplenmesinin, prematüre bebeklerde intrakranial kanama ve sepsis riskini azalttığı gösterilmiştir (68, 69). Muhtemel nöroprotektif etkilerini kök hücre ve koagülasyon faktörlerini arttırarak, beyin perfüzyon ve oksijenasyonunu iyileştirerek gösterdiği düşünülmektedir (64).

Prematüre yenidoğanlarda görülen beyin hasarına yönelik gelecek vadeden diğer bir yaklaşım mezenkimal kök hücre tedavisidir. Mezenkimal kök hücreler kemik iliği, umbilikal kord ve plasenta gibi ekstraembriyonik dokulardan elde edilebilmektedir. Hayvan çalışmalarında görülmüştür ki mezenkimal kök hücreler hasarlı bölgeye yerleşerek salgıladıkları maddelerle nöronal kök hücrelerin migrasyon ve formasyonunu, dendritik ve aksonal yayılımını indüklemekte, enflamasyonu baskılamaktadır. Nörotransmitter salınımı ile apoptoz, nörogenez, anjiogenez ve sinaptogenezi düzenlemektedir. Büyüme faktörlerinin ekspresyonunu arttırarak progenitör hücrelerin hasarlı bölgeye göçünü, çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlamaktadır (64, 70-77).

Estradiol ve progesteronun maternal serum konsantrasyonu gebeliğin 3.trimesterinde artış göstererek normalin 100 katına kadar çıkmaktadır (78, 79). Preterm doğum ile yenidoğan bebekler bu hormonal etkiden yoksun kalmaktadır. Hayvan çalışmalarında estradiol ve progesteronun immatür fetal beyinde nöroprotektif etkileri olduğu gösterilmiştir (80, 81). Ancak bu konuda preterm bebeklerde tedavi yaklaşımını etkileyecek yeterli klinik kanıt bulunmamaktadır (82).

İmmatür beynin oksidatif hasara duyarlılığı sebebiyle antioksidanlar, beyni korumada kritik rol almaktadır. İmmatür hücre sayısının fazlalığı, yüksek oranda doymamış yağ asidi

içermesi, SOD, katalaz, GPO gibi enzimatik ve vitamin A, vitamin E, vitamin C gibi nonenzimatik antioksidanların azlığı, oksijen tüketiminin yüksek olması, serbest radikal oluşumunu katalize eden metal içeriğinin fazlalığı bu hassasiyetin bileşenlerini oluşturmaktadır (25, 40, 83-85).

İmmatür beyinde hiperoksiye bağlı hasara karşı antioksidan, antiinflamatuvar veya nöroprotektif özellikleri bilinen asetilkolinesteraz inhibitörleri, eritropoetin, topiramet, kafein, dekstrometorfan, minosiklin, zonisamid, deksmedetomidin gibi maddelerle deneysel çalışmalar yapılmıştır (56, 86-95).

2.5. Yenidoğanlarda Kullanılan Antiepileptik İlaçlar

Yenidoğanlarda nöbet kontrolünde seçilecek ilaçların etki mekanizması, nöbet kontrolünden bağımsız olarak gelişecek hasarlara karşı nöroprotektif etki gösterme potansiyelleri sebebiyle kritik önem taşımaktadır (96).

Yenidoğan nöbetlerinin görülme sıklığı miadında doğanlar için %2-3, prematüre bebekler için %10-15 civarındadır (97). Yenidoğan nöbetlerinin sık görülen sebepleri hipoksik iskemik ensefalopati, intrakranial kanama, santral sinir sistemi enfeksiyonları, serebral enfarktlar ve metabolik bozukluklardır. Yenidoğan nöbetlerinin farmakolojik tedavisi ile ilgili A sınıfı kanıta dayalı kılavuzlar mevcut değildir (98-101). DSÖ'nün yenidoğan nöbetlerinin yönetimi ile ilgili son yayınlanan kılavuzunda, tavsiyeler kanıt düzeylerine göre, fayda ve zarar dengesi gözetilerek, sağlık politikaları, aile ve sağlık çalışanlarının tercihleri, kaynaklar gözetilerek oluşturulmuştur. Öneriler kuvvetli ve zayıf olarak sınıflandırılmıştır. Bu önerilerin çoğunluğunun kanıt düzeyi düşüktür ve sadece birkaç tanesi kuvvetli öneri olarak sunulmuştur (102, 103). Bu kılavuzda hipoglisemi, hipokalsemi ve merkezi sinir sistemi enfeksiyonu ekarte edildikten sonra yenidoğan nöbetlerinin tedavisinde 1.seçenek ilaç olarak fenobarbital, maksimum doza rağmen devam eden nöbetlerde ise 2.seçenek olarak fenitoin,

benzodiazepin veya lidokain kullanılması önerilmektedir (103). Günümüzde yenidoğanlarda Amerikan Gıda ve İlaç Cemiyeti (FDA) onayı olan fenobarbital ve fenitoinin nöbet kontrolündeki etkinliği %50 nin altındadır ve birbirlerine üstünlükleri gösterilememiştir (104-106). Bu ilaçların yenidoğan nöbetlerini yeterli oranda kontrol altına alamaması, sistemik ve nörokognitif istenmeyen yan etkilerinin olması alternatif ilaç arayışlarına yol açmaktadır.

Bebeklerde ve küçük çocuklarda nöbetlerin tedavisinde kullanılan antiepileptik ilaçların insan zekası üzerinde olumsuz etkileri olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu ilaçların nörotoksik etkileri 1970'lerden beri tanımlanmakla birlikte altta yatan mekanizmalar hala araştırılmaktadır. Yenidoğan sıçanlarda kullanılan proapopitotik ilaçların sonuçları uzun döneme uzanan davranışsal yan etkiler gösterdiği saptanmıştır (20, 107). Bu antiepileptik ilaçların -özellikle fenobarbital- insanlarda da inutero ve erken postnatal etkilenme sonucu erişkin döneme uzanan davranışsal ve kognitif bozukluklara yol açtığı yönünde veriler mevcuttur (108-112).

Fenitoin voltaj kapılı sodyum kanallarını bloke ederek nöronal aktivasyonu azaltırken, barbitüratlar ve benzodiazepinler gamma aminobütirik asit (GABA) A reseptörünün inhibe edici etkisini bu reseptöre bağlı klor kanalı geçirgenliğini allosterik olarak düzenleyerek arttırır. Vigabatrin, GABA transaminaz enzimini bloke ederek GABA yıkımını azaltır. Valproat, GABA sentez ve yıkımını etkileyerek beyinde GABA konsantrasyonunun artmasına sebep olur. İmmatür beyinde nörotoksisiteye sebep olan önemli faktörlerden biri çoğu antiepileptiğin etki mekanizmasında olan sinaptik iletimin baskılanması ile nöron gelişiminde kritik görevi olan nörotrofinlerin sentez ve sinyal iletiminin azalmasıdır (21, 113, 114). NMDA reseptör blokajı ve GABA_A reseptör aktivasyonu ile oluşan güçlü proapopitotik sinyaller de antikonvülzanların immatür beyinde nörotoksik etki mekanizmalarındandır (18, 19). Yapılan çalışmalarda fenitoin, fenobarbital, diazepam, klonazepam, vigabatrin valproat ve sultiamın nöbet kontrolü sağlayan plazma konsantrasyonlarında immatür sıçan beyinde

apoptotik nörodejenerasyona sebep olduğu gösterilmiştir, klasik antiepileptiklerin aksine levetirasetam (LEV) gelişmekte olan beyinde apoptoza sebep olmamaktadır (21, 113-115). İmmatür beyinde nöroprotektif özelliği bilinen antiepileptiklerden biri olan topiramet kullanım bağımlı sodyum kanallarını ve AMPA/kainat reseptörlerini bloke eder (116, 117). Ancak hayvanlarda yüksek dozda veya kombine kullanımda apoptozu arttırdığı gösterilmiştir (117, 118). Valproatın, hipoksik iskemik beyin hasarında protektif özellikleri olabileceği öne sürülmüştür (119). Ancak nöbet kontrolü sağlayan plazma konsantrasyonlarında immatür beyinde yaygın apoptotik nörodejenerasyona sebep olmaktadır (21, 114, 115).

2.6. Levetirasetam

LEV 1999 yılında kullanıma sunulan ve son dönemde yaygınlaşan yeni nesil bir antiepileptik ilaçtır (120). FDA tarafından LEV'in intravenöz (IV) formunun 2006'da 16 yaş üstünde , oral formunun 2012'de parsiyel başlangıçlı nöbetler için 1 aydan büyük çocuklarda kullanımı onaylanmıştır (106). Geniş spektrumlu antiepileptik etkisi, yüksek oral biyoyararlanımı, plazma proteinlerine düşük afinitesi, lineer kinetikleri, renal eliminasyonu ve ilaç etkileşiminin azlığı gibi özellikleriyle yenidoğanlar için güvenli bir seçenek oluşturmaktadır (118, 121, 122). Epilepsi hayvan modellerinde geniş spektrumlu antikonvülzan etki ve terapötik indeks göstermektedir (123-130). Kronik kullanımda tolerans, ilaç kesilmesinden sonra çekilme belirtileri görülmez (131). Hayvan çalışmalarında kan beyin bariyerini kolayca geçerek beyin-omurilik sıvısı ve ekstrasellüler sıvıya dağıldığı gösterilmiştir (132, 133).

LEV, (S)-alfa-ethyl-2-oxo-1-pyrrolidine acetamide, etil analogu olan pirasetamın S enantiomeri ve pirolidon türevidir (134). Yapısal olarak diğer antiepileptiklere benzemez ve prelinik profili farklıdır (131). Etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte, LEV'in beyin hücrelerinin sinaptik plazma membranlarına geri dönüşümlü,

doyurulabilir, stereoseçici şekilde bağlandığı, periferik dokularda reseptörü olmadığı gösterilmiştir (135). Beyinde ekzositozu kontrol eden sinaptik veziküler protein SV2A aracılığı ile etki gösterdiğini öne süren çalışmalar mevcuttur (136-139). LEV normal beyin dokusunun ve nöronların elektrofizyolojisini ve nörotransmitter salınımını etkilemez (129, 140). LEV'in fizyolojik nörotransmisyonu etkilemeden sadece patolojik durumlarda SV2A'nin fonksiyonunu değiştirerek etki gösterdiği öne sürülmüştür (136). SV2A'nin bağlanması farklı parsiyel ve jeneralize epilepsi hayvan modellerinde benzer güçte geniş spektrumlu antiepileptik etki sağlar (122, 141).

LEV, klasik antiepileptiklerin etki ettiği hücre içine akışı sağlayan voltaj kapılı sodyum kanallarına ve düşük voltaj kapılı T-tip kalsiyum kanallarına etkisizdir (142, 143). Deneysel çalışmalarda epileptik sıçanlarda hipokampal CA3 nöronlarda yüksek voltaj kapılı L-tip kalsiyum kanallarını, nonepileptik sıçanlarda hipokampal piramidal nöronlarda yüksek voltaj kapılı N-tip kalsiyum kanallarını inhibe ederek hücreye kalsiyum akışını engellediği gösterilmiştir (144-146). Hipokampüsteki dentat girus hücrelerinde presinaptik P/Q-tip voltaj kapılı kalsiyum kanallarını modüle ederek glutamat salınımını azalttığı, eksitatör postsinaptik akımın amplitüdünü inhibe ettiği, AMPA ve NMDA reseptörlerine bağlı eksitatör sinaptik iletimi regüle ettiği saptanmıştır (147). Başka bir çalışmada LEV'in sıçan hipokampusunda nöbetlerin aminoasit konsantrasyonları üzerine etkisini geri çevirdiği, normal nöronal uyarılabilirliği etkilemeden, nöronal hipereksitabilite ve senkronizasyonu baskıladığı gösterilmiştir (148). Ayrıca temporal lob epilepsi modelinde, sinaptik plastisite, transkripsiyon faktörleri, nörotrofik faktörler, sinaptik remodülasyonu etkileyen proteinlerle ilgili gen ekspresyonlarındaki nöbet ilişkili değişiklikleri azalttığı yönünde veriler mevcuttur (149). Bu etkilerin LEV'in antiepileptik mekanizmasının parçası olduğu düşünülmektedir.

LEV'in GABA'erjik sisteme etkilerini araştıran çalışmaların sonuçları çelişkilidir. GABA, glutamat, glutamin düzeyleri ve GABA transaminaz ve glutamik asit dekarboksilaz

enzimatik aktiviteleri üzerine etkisi olmadığı fare beyinde yapılan bir nörokimyasal çalışmada ortaya konmuştur (150). Farmakolojik çalışmalarda da LEV'in GABA_A/benzodiazepin reseptör kompleksi ile direkt etkileşime girmediği gösterilmiştir (151). Ancak sistemik yüksek doz LEV'in bazı beyin bölgelerinde GABA metabolizması ve döngüsünde kısa süreli değişiklikleri indüklediğini gösteren bir çalışmada sıçanlarda 170 mg/kg intraperitoneal (IP) LEV injeksiyonu ile striatumda GABA aminotransferaz aktivitesinde anlamlı artış, glutamikasit dekarboksilaz aktivitesinde anlamlı azalma görülmüştür (152). Bir başka çalışmada ise LEV'in GABA_A ve glisin reseptörlerinin negatif allosterik düzenleyicileri olan çinko ve beta-karbolinlerin inhibitör etkisini potent bir şekilde tersine çevirdiği gösterilmiştir (153). Bu sonuçlar LEV'in GABA'erjik sisteme direkt olmasa da dolaylı yoldan etkileri olabileceğini göstermektedir.

LEV'in çeşitli epileptik ve nonpileptik beyin hasarı ve nörodejeneratif hastalık prototiplerinde nöroprotektif etkisi gösterilmiştir (154). LEV'in yenidoğan sıçanlarda hipoksik iskemik beyin hasarı modelinde nöronal apoptozu azalttığı, yenidoğan epilepsi modelinde ise yüksek ve tekrarlayan dozlara rağmen hiçbir beyin bölgesinde apoptozu artırmadığı görülmüştür (115, 155, 156). Postnatal 10. gündeki sıçanlarda LEV 25 mg/kg ve 50 mg/kg IP tedavisi ile hipoksi ilişkili klinik ve elektrografik nöbet sürelerinde, aynı hayvanlarda postnatal 40. günde kainik asit ilişkili nöbetlerde ve nöronal kayıpta anlamlı azalma görülmüştür (157). Erişkin sıçanlarda pilokarpin ile indüklenen status epileptikus modelinde hipokampal nöronlarda dejenerasyon ve hücre ölümünü azaltmaktadır. Bu etki doz arttıkça artmaktadır (158). Erişkin sıçanlarda orta serebral arter oklüzyon modelinde infarkt boyutlarını vücut ısısından bağımsız olarak anlamlı ölçüde azalttığı görülmüştür. Bu çalışmada IP LEV sonrası test edilen maksimum dozda (44 mg/kg) infarkt boyutlarında %33 azalma tespit edilmiştir (159). Bir başka çalışmada erişkin sıçanlara 50 mg/kg IP LEV uygulamasının kainik asit ile indüklenen NMDA reseptör aktivasyonuna bağlı nörotoksisiteye

karşı koruyucu olduğu, nöbet aktivitesini, korteks ve diaensefalonda lipit peroksidasyon ürünü olan malonildialdehit (MDA) düzeyini, antioksidan glutatyon kaybını ve beyin hasarını indükleyen enflamatuar sitokinlerden olan IL-1 β düzeyini, histolojik incelemede ise nöron hasarını anlamlı ölçüde azalttığı gösterilmiştir (160). Epilepsi ve travmatik beyin hasarı modelinde IL-1 β ekspresyonunu ve reaktif gliozisi baskılayarak antienflamatuar etki gösterdiğini destekleyen başka çalışmalar da mevcuttur (161, 162). Erişkin farelerde kapalı kafa travması modelinde travmadan sonra uygulanan tek doz LEV'in doz bağımlı olarak fonksiyonel işlevleri iyileştirdiği ve nörodejenerasyonu azalttığı ve bu etkinin nöbet önlenmesinden bağımsız olduğu, subaraknoidal kanama (SAK) modelinde de fonksiyonel sonuçları iyileştirdiği ve vazospazmı azalttığı görülmüştür (163). LEV'in vazospazmı azaltıcı etkisi, yüksek konsantrasyonlarda sıçan kortikal astrosit kültürlerinde iNOS üretimini ve sıçan serebellar nükleuslarında NO üretimini arttırdığını gösteren çalışmalar ile açıklanabilmektedir (164, 165). LEV'in uzun dönem kullanımda iNOS ekspresyonunu azalttığını gösteren çalışmalarla birlikte değerlendirilince bu etki akut döneme ait olarak düşünülebilir (166). NO serbest radikali, sinir sisteminde fizyolojik süreçlerde kompleks rolü olan bir moleküldür. Travma, iskemi, nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli sebeplere bağlı sinir hasarının patofizyolojisinde rol aldığını gösteren çalışmalar mevcuttur (167). Ancak BDNF gibi trofik faktörlerin varlığında nöronların yaşamlarını sürdürebilmesi için NO gereklidir (168). Trofik faktörlerin yokluğunda NO peroksinitrit oluşumunu sağlayarak toksik hale gelir (169). LEV'in sıçan astrosit kültürlerinde BDNF ekspresyonunu düşük konsantrasyonlarda bile stimüle etmesi, nörotrofik faktörleri indüklemesinin nöroprotektif etkisine katkı sağladığını düşündürmektedir (164). Bir başka travmatik beyin hasarı modelinde erişkin sıçanlara hasar sonrası 20 gün 50 mg/kg/gün LEV IP uygulaması ile kontüzyon volümlerinin azaldığı, nöroplastisite markerlarında ve glutamat taşıyıcılarında hasarla ilişkili azalmanın geri çevrildiği, bazı motor ve kognitif fonksiyonlarda iyileşme sağlandığı görülmüştür (162).

LEV'in oksidatif strese etkisini araştıran bir çalışmada erişkin farelerde pilokarpinle status epileptikus indüksiyonu sonrası lipit peroksidasyonunda, nitrit-nitrat formasyonunda ve katalaz aktivitesinde anlamlı artış, glutatyonda azalma olmuştur. Pilokarpin ncesi verilen 200 mg/kg IP LEV ile lipit peroksidasyonu, nitrit-nitrat formasyonu, katalaz aktivitesindeki artışın ve glutasyon kaybının önlendiği görülmüştür (170). Bu çalışmada pilokarpinle katalaz artışı serbest radikal artışına kompanseuar bir değişiklik olarak yorumlanmıştır. Katalazın normal değerlere inmesi ve glutasyon kaybı olmaması LEV'in beyin hücrelerinin pilokarpin ilişkili reaktif oksijen ürünleri üretimi ve oksidatif hasarın üstesinden gelmesine yardımcı olduğunu gösterir (170). Bir başka çalışmada yenidoğan hipoksik iskemik beyin hasarı modelinde yüksek doz (200 mg/kg) LEV IP uygulaması ile antioksidan SOD ve GPO enzim düzeylerinde anlamlı artış tespit edilmiştir (156). LEV'in antioksidan etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada erişkin ratlarda 14 gün 54 mg/kg/gün IP LEV kullanımı ile hipokampüste prooksidan iNOS ekspresyonunda azalma, hücre içi glutasyon yapımı için gerekli olan sistin kaynağı antioksidan sistin/glutamat değiştiricisinde artış ve NO radikalinin yarı mrnnde azalma görülmüştür. LEV'in hipokampüste askorbik asit ve alfa-tokoferol ile sinerjistik olarak bazal endojen antioksidan etkiyi güçlendirdiği görülmüştür (166).

İmmatür beyinde antiepileptiklere bağlı hasarı araştıran çalışmalarda yenidoğan sıçanlarda valproat, fenitoin, fenobarbital, diazepam, klonazepam, vigabatrin, karbamazepin, sulthiame, MK-801, lamotrijin gibi antiepileptiklerin apopitozu indükledikleri ancak LEV'in terapötik dozun çok üzerinde dahi böyle bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (21, 113, 115, 118, 171). Bu çalışmalardan birinde immatür beyinde karbamazepin yüksek dozda tekli ve fenitoin ile kombine kullanımda apopitoza sebep olurken, topiramet sadece kombine kullanımda fenitoine bağlı apopitozu artırmış, LEV yüksek dozlarda dahi ne tek başına apopitoza sebep olmuş ne de fenitoine bağlı apopitozu artırmıştır (118). Ayrıca bu

Çalışmalardan birinde LEV'in davranışsal yan etkilere veya büyüme geriliğine sebep olmadığı gösterilmiştir (115).

Ancak insan çalışmalarında LEV'e bağlı en sık grlen yan etkiler somnolans ve davranış problemleri olarak belirlenmiştir. Davranış problemleri tipik olarak erken dönemde ve düşük dozlarda ortaya çıkmakta ve geri dönüşümlü olmaktadır (122, 172-176). Diğer antiepileptiklerin aksine kardiyopulmoner depresyon, aritmi, koagülopati gibi ciddi sistemik yan etkilere yol açmaz (120).

Retrospektif serilerde 4 yaş altında da etkili ve güvenilir olabileceğini gösteren bulgular mevcuttur (175, 177, 178). Daha az hasta grubu ile yapılan infant ve küçük çocukları içeren prospektif çalışmalarda da benzer sonuçlara ulaşılmıştır (179). Yenidoğanlarda ise vaka bildirimleri, prospektif ve retrospektif çalışmalarda tekli ve kombine kullanımda etkin, güvenilir ve tolere edilebilir olduğuna dair veriler artmaktadır. Bu çalışmalarda term ve preterm yenidoğanlarda belirgin bir yan etkiye rastlanmamıştır (106, 120, 176, 180-183). LEV yenidoğanlarda FDA onaylı olmamasına rağmen daha önce belirtilen sebeplerden ötürü endikasyon dışı olarak kullanılmaktadır (105, 106, 181).

3. AMAÇLAR

Oksijen toksisitesi preterm doğan bebekler için nörolojik gelişimi olumsuz etkileyen bir faktör olarak tanımlanmaktadır. Yapılan hayvan çalışmalarında hiperoksinin immatür beyinde çeşitli mekanizmalarla hasar ve apopitoza sebep olduğu gösterilmiştir. LEV günümüzde prematüre yenidoğanlarda kullanımı ile ilgili yeterli çalışma olmayan yeni nesil bir antiepileptik ilaçtır. Bu çalışma ile literatürde daha önce çalışılmamış olan immatür beyinde hiperoksiye bağlı nörodejenerasyon, apopitoz ve oksidatif strese karşı LEV'in etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmanın prematüre yenidoğanlar için yeni antiepileptik seçeneklerden biri olan LEV'in, primer nöbet kontrolü dışında diğer nöroprotektif özellikleri açısından literatüre katkı sağlaması hedeflenmiştir.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Çalışma Ekibi

Bu çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Tıbbi Patoloji ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalları, Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı işbirliği ile yürütülmüştür.

4.2. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma protokolü Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 26.02.2016 tarih ve 2016/104 numaralı kararı ile onanmıştır. Çalışma bütçesi Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

4.3. Gereçler

Tablo 1: Çalışmada Kullanılan Gereç Listesi

SmartO ₂ 830® Oxygen Analyser	Medical Point, India
Pleksiglas şeffaf kafes	Pas Dizayn, İstanbul, Türkiye
Ortam ısı ve nem ölçer, Nimomed®	Kingyiled Co., China
Oksijen Kaynağı	
Ara bağlantı Hortumları	
UltraView Universal DAB Detection Kit®	Ventana/Roche, Swiss
Mikrotom Bıçağı, Feather A35®	Feather Co., Japan
Lam, SuperFrost Plus	Menzel, İstanbul, Türkiye
Lamel	Menzel, İstanbul, Türkiye
Pens, Bistüri, Makas, Penset	
0.5 ml Süper İnsülin Enjektörü	Ayset, Adana, Türkiye
Architect C8000® Otoanalizör	Abbott, USA
BenchMark Ultra® Immunboyama cihazı	Ventana/Roche, Swiss
Eclipse Ci® Light Microscope	Nikon, Japan
Zen 2 ® (Blue edition) Digital Imaging for Light Microscopy	Zeiss, Germany

Tablo 2: Çalışmada Kullanılan Kimyasal Madde Listesi

Caspaz 3 (CPP32)Ab-4(Poliklonal) 0.1ml	Labvision/ThermoScientific, USA
VEGF antibody (VG1)	GeneTex, USA
Catalase Assay Kit ®	Rel Assay, Gaziantep, Türkiye
Thiol Assay Kit ®	Rel Assay, Gaziantep, Türkiye
Levetirasetam 500 mg/5 ml flk, Levetam®	Polifarma, İstanbul, Türkiye
Xylazin, Rompun 2% ®	Bayer, Germany
Ketamin, Ketalar®	Padeko, İstanbul, Türkiye
CO ₂ Absorbantı, Soda Lime®	Denge, Malatya, Türkiye
Entellan®	Merck Millipore, USA
Hematoksilen	
Eosin	
Bluing Reagent	
Alkol	
Ksilen	
%10 Formaldehit	

4.4. Çalışma Grupları

Bu çalışma, hiperoksi modeli oluşturulan 6 günlük Wistar-albino sıçan yavruları üzerinde yapıldı. Kaspaz-3 ve VEGF değişkenleri dikkate alınarak alfa=0.05, power (1-beta)= 0.8 olacak şekilde power analiz yapıldığında her bir grupta en az 8 adet sıçan olması gerektiği hesaplandı.

Tablo 3: Çalışma Grupları

Grup Adı	Hayvan Adedi
1.Grup: Kontrol: Normooksi ve %0.9 NaCl intraperitoneal (IP)	8
2.Grup: Hiperoksi: Hiperoksi ve %0.9 NaCl IP	8
3.Grup: Hiperoksi+LEV: Hiperoksi ve levetirasetam 200 mg/kg IP	8

4.5. Hiperoksi Hayvan Modeli Oluşturulması ve Levetirasetam Tedavisi

İnsan yavrularında gebeliğın 3.trimesterında görölen beynin nörotoksik etkilere açık olduğu hızlı beyin gelişimi dönemi sıçanlarda postnatal ilk 10-14 günde görölmektedir. Yapılan çalışmalarda 12-13.günlük sıçan yavrusunun beyin gelişiminin insan beyinde terme ulaşmış bir bebeğinki ile uyumlu olduğu görölmüştür. Bu sebeple yenidoğan sıçanlar beyin gelişimi araştırmaları için uygun bir model oluşturmaktadır. (22, 184, 185)

Yapılan çalışmalarda hiperoksinin immatür sıçan ve fare beyinde diffüz apopitoza sebep olduğu, beyin hücrelerindeki bu hassasiyetin gelişimin erken aşamalarında, özellikle postnatal 0-10 günler arasında olduğu gösterilmiştir (31, 42-44). Literatürde immatür beyinde hiperoksi maruziyetinin etkilerini bu dönem içindeki çeşitli günlerde araştıran çalışmalar bulunmaktadır.

Doğum tarihi belirlenmiş gebe Wistar-albino sıçanlar farklı kafeslerde ad libitum beslenerek takip edildiler. Toplam 24 yenidoğan sıçan kullanıldı, üç gruba ayrılan yavru sıçanlara 6.günden 10.güne kadar řu işlemler uygulandı:

- 1.grup normooksii ve %0.9 NaCl IP enjeksiyon,
- 2.grup hiperoksi ve %0.9 NaCl IP enjeksiyon,
- 3.grup hiperoksi ve LEV 200 mg/kg IP enjeksiyon.

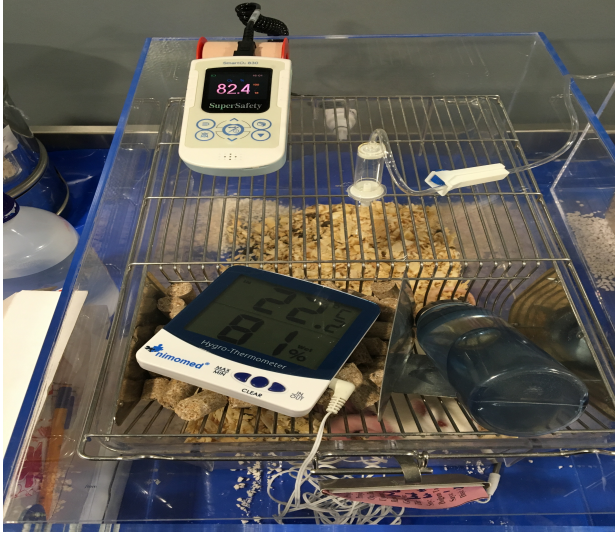
Yavru sıçanlar anneleri tarafından bakıldı ve anne sütü ile beslendi. Altıncı günden 10.güne kadar kontrol grubu oda havasında %21 oksijen (O₂) konsantrasyonunda kalırken, hiperoksi gruplarına pleksiglas kafeste (Pas Dizayn, İstanbul, Türkiye) aynı oksijen kaynağından gelen oksijen ile %80-90 arasında O₂ uygulandı ve kafeslerdeki O₂ konsantrasyonu sürekli monitörize (SmartO₂ 830® Oxygen Analyser, Medical Point, India)

edilerek günde iki kez kaydedildi. Kafes içindeki CO₂, soda lime absorpsiyonu ile uzaklaştırıldı. Kafes sıcaklığı 21-23 °C'de, nem oranı %60-80 arasında tutuldu. Oniki saat gündüz, 12 saat gece ortamı sağlandı. Anne sıçanlar akciğer hasarını önlemek için 24 saatte bir kafes dışına çıkarıldı. (94) Çalışmada hayvan kaybı yaşanmadı. Yavrular günlük tartılarak 6.günden 10.güne kadar hiperoksi+LEV grubuna LEV (Levetirasetam 500 mg/5 ml flk, Levetam®, Polifarma, İstanbul, Türkiye) 200 mg/kg/gün IP tedavisi verilirken diğer gruplara eş hacimde %0,9 NaCl IP uygulandı.

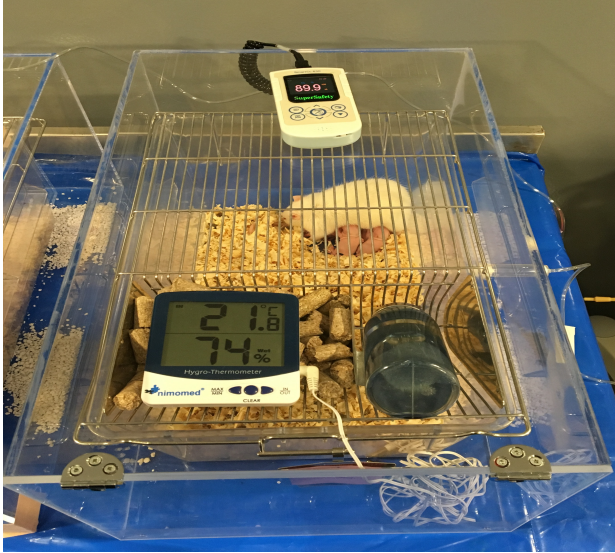
Uygulanan LEV dozu daha önce yenidoğan ratlarda deneysel hipoksi modelinde antioksidan enzimleri arttırdığı gösterilen ve nöroprotektif olarak daha etkili bulunan dozdur (156). Hiperoksiye (FiO₂:%80) maruz kalan hayvanlarda, normooksidkilere göre oksijen parsiyel basıncında 2.32 kat artış olduğu ve kangazındaki diğer metabolik değerlerde değişiklik olmadığı daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (27). Postnatal 6-10.günler arasındaki sıçan yavrularının kullanılmasının sebebi bu dönemdeki beyin gelişimlerinin yaklaşık olarak 24-31.GH'lar arasındaki prematüre bebeğin beyin gelişimine benzerlik göstermesidir (40, 184).



Şekil 1: Kontrol grubu



Şekil 2: Hiperoksi grubu



Şekil 3: Hiperoksi+ LEV grubu



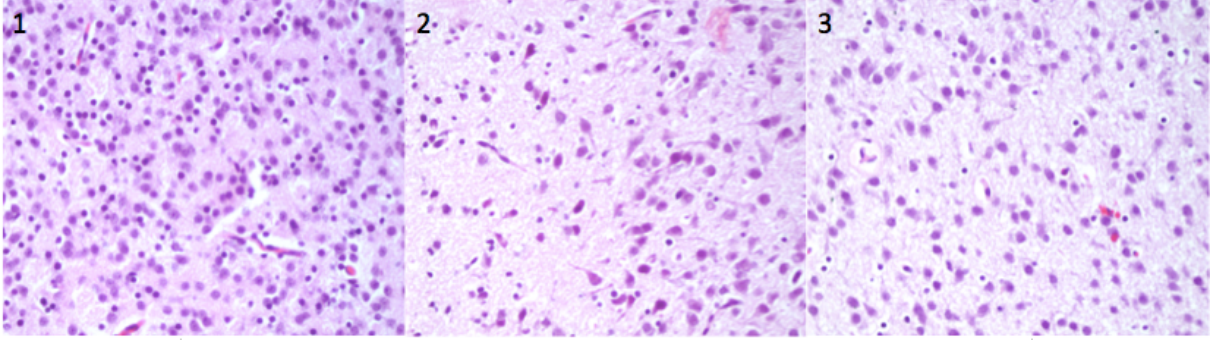
Şekil 4: Hiperoksi Grupları

4.6. Beyin Dokusu ve Kan Örneklerinin Alınması

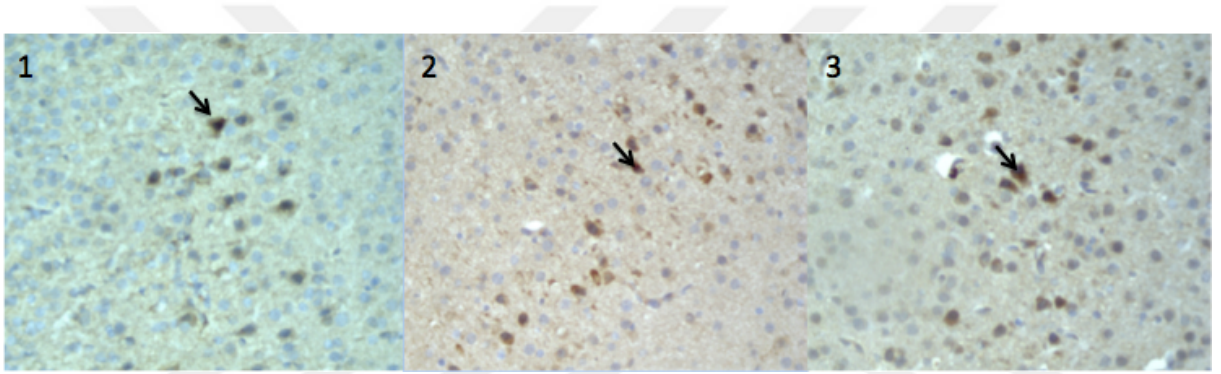
Postnatal 10.günde tüm yavru sıçanlardan 50 mg/kg IP ketamine (Ketalar®, Padeko, İstanbul, Türkiye) ve 10 mg/kg IP ksilazin (Rompun 2%®, Bayer, Germany) anestezisi ile antioksidan katalaz ve tiyol çalışılmak üzere intrakardiyak girişim ile kan örnekleri alındı (186, 187). Servikal dislokasyon sonrası sıçanlar dekapite edilerek histopatolojik inceleme için beyin dokusu çıkarıldı. Beyin dokusu %10 formaldehit ile tespit edildi.

4.7. Patolojik ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme

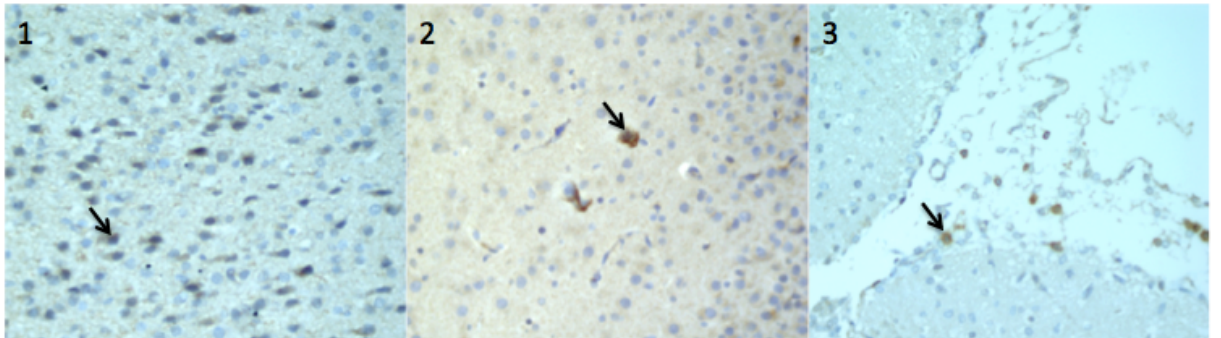
Fosfat tamponlu %10' luk formalin içinde 3 gün fikse edilen beyin dokularından koronal kesitler alındı. Örneklenen dokulardan rutin doku takip işleminin ardından 4 µm kalınlığında alınan kesitler hematoksilin-eozin (H-E) ile boyanarak ışık mikroskopunda (Eclipse Ci®, Nikon, Japan) incelendi. İmmünohistokimyasal boyama ile bilateral frontal, parietal ve oksipital kortekste apopitoz değerlendirmek üzere kaspaz-3 (Caspaz 3 (CPP32)Ab-4(Poliklonal) 0.1ml, Labvision/ThermoScientific, USA), anjiogenezi değerlendirmek üzere VEGF (VEGF antibody ,VG1, GeneTex, USA) çalışıldı. İki µm kalınlıkta kesitlere deparafinizasyon işleminin ardından 64 dakika EDTA (CC1) ile antijen retrieval yapıldı. Yıkamadan sonra kaspaz-3 antikoru ile 28 dakika ve VEGF antikoru ile 2 saat süre ile inkübe edildi. Tekrar yıkamanın ardından zemin boyası için 16 dakika hematoksilin, 4 dakika bluing reagent'de bekletildi. Ardından kesitler entellan (Merck Millipore, USA) ile kaplanarak kapatıldı. Apopitozun ve anjiogenezin kantitatif değerlendirmesi için parietal, frontal ve oksipital kesitlerde 1000 hücrede boyanan hücreler ışık mikroskopunda (Eclipse Ci®, Nikon, Japan) sayılarak apopitotik ve anjiogenetik hücre yüzdesi hesaplandı. Histolojik görüntülerin elde edilmesinde Zen 2 ® (Zeiss, Germany) ışık mikroskopi için dijital görüntüleme sistemi kullanıldı. Histolojik bulgular hayvanların gruplarına kör olarak bir patoloji uzmanı tarafından değerlendirildi.



Şekil 5: Hematoksilen-Eozin Boyama (x400): 1- Normooksi, 2-Hiperoksi, 3-Hiperoksi+LEV grupları. Hiperoksi gruplarında ödem ve vakuoler dejenerasyon görülmektedir.



Şekil 6: Kaspaz-3 Boyama (x400): 1- Normooksi, 2-Hiperoksi, 3-Hiperoksi+LEV grupları. İşaretler apopitotik hücreleri göstermektedir.



Şekil 7: VEGF Boyama (x400); 1- Normooksi, 2-Hiperoksi, 3-Hiperoksi+LEV grupları. İşaretler VEGF eksprese eden hücreleri göstermektedir.

4.8. Biyokimyasal Çalışmalar

Kan örnekleri sıçanlardan postnatal 10.günde intrakardiyak girişim ile alındı ve 3000x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Örneklerde antioksidatif durumun bir göstergesi olan katalaz aktivitesi; hidrojen peroksitin (H_2O_2) parçalanarak azalmasına dayanan yöntem ile üretici firmanın yönergelerine göre katalaz kiti (Rel Assay, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak otoanalizörde (Architect C8000®, Abbott, USA) ölçüldü (IU/mL) (188). Katalaz enzimi reaktif oksijen ürünleri ile oluşan H_2O_2 molekülünü oksijen ve suya çevirerek dokular için zararsız hale getirir. Aynı zamanda katalaz enzimi peroksidatik aktiviteye sahiptir. Kullanılan bu kit peroksidatik aktiviteyi kullanarak katalaz enzim aktivitesini ölçmekte, H_2O_2 yokluğunda katalaz enziminin metanol ile reaksiyona girmesi sonucu ortaya çıkan formaldehite bağlı pembe rengin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Antioksidatif durumun diğer bir göstergesi olan tiyol düzeyleri; Hu ve ark tarafından modifiye edilen Ellman metodu ile üretici firma önerilerine göre otoanalizörde tiyol kiti (Rel Assay, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak ölçüldü ($\mu\text{mol/L}$) (189, 190). Bu yöntem tüm indirgenmiş tiyol (-SH) gruplarının bazik ortamda Ellman reaktifi (DTNB) ile sarı renkli bir bileşik oluşturması ve bu bileşiğin renginin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.

Biyokimyasal çalışmalar hayvanların gruplarına kör olarak bir biyokimya uzmanı tarafından yürütülmüştür.

4.9. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 (Kaysville, Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodlar (ortalama, standart sapma, medyan, frekans, oran, minimum, maksimum) kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen değişkenlerin karşılaştırmalarında MannWhitney-U testi

kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen üç ve üzeri grupların karşılaştırmalarında ise Kruskal-Wallis testi ve farklılığa neden olan grubun tespitinde MannWhitney-U testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak değerlendirildi.



5. BULGULAR

5.1. İmmünohistokimyasal Çalışmalar

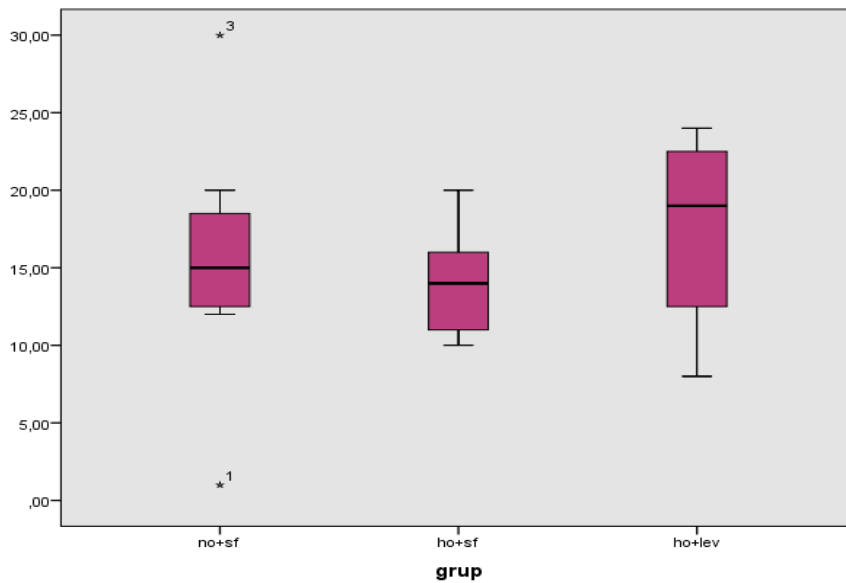
5.1.1. Kaspaz-3

Tablo 4: Gruplara Göre Kaspaz-3 Frontal Bölge Dağılımları

Çalışma Grupları	Kaspaz-3 Frontal	
	Min-Mak (Medyan)	Ort±Ss
Kontrol (n=8)	1-30 (15)	15.43±8.77
Hiperoksi (n=8)	10-20 (14)	14,00±3.46
Hiperoksi+LEV (n=8)	8-24 (19)	17.50±6.05
		^a p
Kontrol - Hiperoksi		0.560
Kontrol - Hiperoksi+LEV		0.486
Hiperoksi - Hiperoksi+LEV		0.186

^aMann Whitney U Test

Kaspaz-3 frontal bölge ölçümlerine bakıldığında hiperoksi+LEV grubunda kaspaz-3 düzeyi diğer gruplardan fazla olmakla birlikte, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).



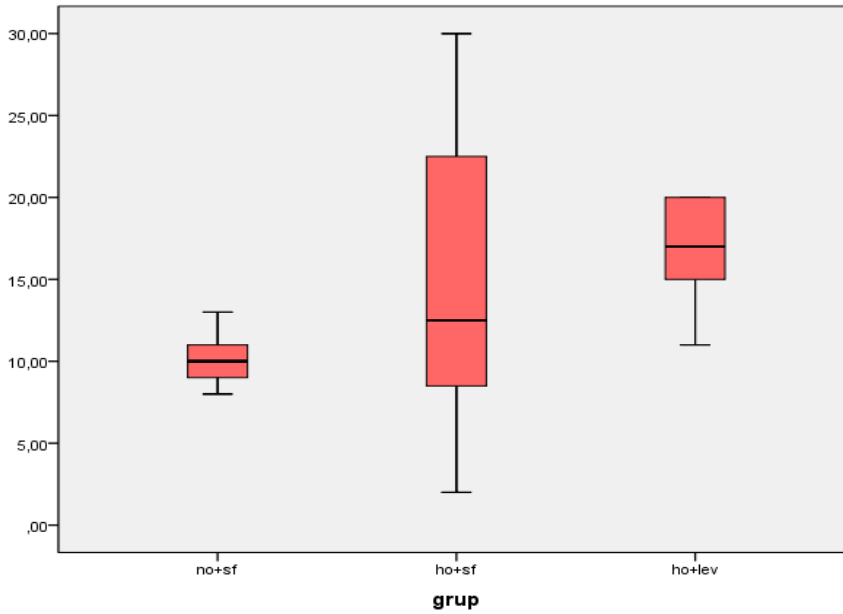
Şekil 8: Kaspaz-3 Frontal Bölge Ölçümler

Tablo 5: Gruplara Göre Kaspaz-3 Parietal Bölge Dağılımları

Çalışma Grupları	Kaspaz-3 Parietal Bölge	
	Min-Mak (Medyan)	Ort±Ss
Kontrol (n=8)	8-13 (10)	10.14±1.77
Hiperoksi (n=8)	2-30 (12.5)	14.88±9.48
Hiperoksi+LEV (n=8)	11-20 (17)	16.88±3.18
		^a p
Kontrol - Hiperoksi	0.448	
Kontrol - Hiperoksi+LEV	0.002**	
Hiperoksi - Hiperoksi+LEV	0.426	

^aMann Whitney U Test **p<0.01

Kaspaz-3 parietal bölge ölçümlerinde, ikili karşılaştırmalar yapıldığında, hiperoksi+LEV grubu kaspaz-3 parietal bölge ölçümleri kontrol ve hiperoksi grubundan, hiperoksi grubu ölçümleri ise kontrol grubundan yüksek bulunmuştur. Kontrol grubu ile Hiperoksi+LEV grubu arasındaki fark anlamlı düzeydedir (p=0,002). Diğer ikili karşılaştırmalar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmamıştır (p>0,05).

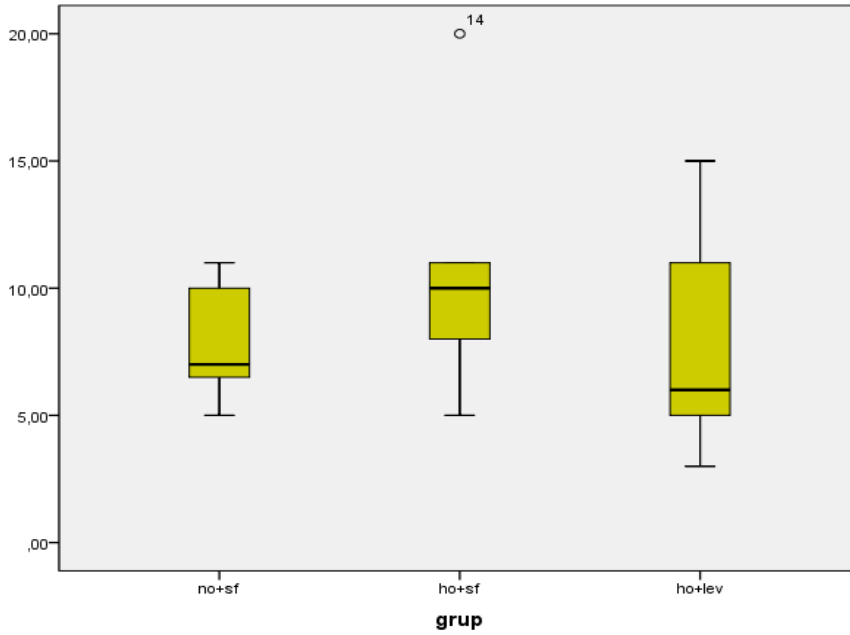
**Şekil 9:** Kaspaz-3 Parietal Bölge Ölçümler

Tablo 6: Gruplara Göre Kaspaz-3 Oksipital Bölge Dağılımları

Çalışma Grupları	Kaspaz-3 Oksipital Bölge	
	Min-Mak (Medyan)	Ort±Ss
Kontrol (n=8)	5-11 (7)	8.00±2.31
Hiperoksi (n=8)	5-20 (10)	10.38±4.50
Hiperoksi+LEV (n=8)	3-15 (6)	7.75±4.17
		<i>^ap</i>
Kontrol – Hiperoksi		0.286
Kontrol - Hiperoksi+LEV		0.597
Hiperoksi - Hiperoksi+LEV		0.241

^aMann Whitney U Test

İkili karşılaştırmalar yapıldığında, hiperoksi grubu kaspaz-3 oksipital bölge ölçümleri, kontrol ve hiperoksi+LEV gruplarından yüksek saptanmış, en düşük kaspaz-3 düzeyleri hiperoksi+LEV grubunda saptanmıştır. Ancak bu farklar istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmamıştır ($p>0,05$).

**Şekil 10:** Kaspaz-3 Oksipital Bölge Ölçümleri

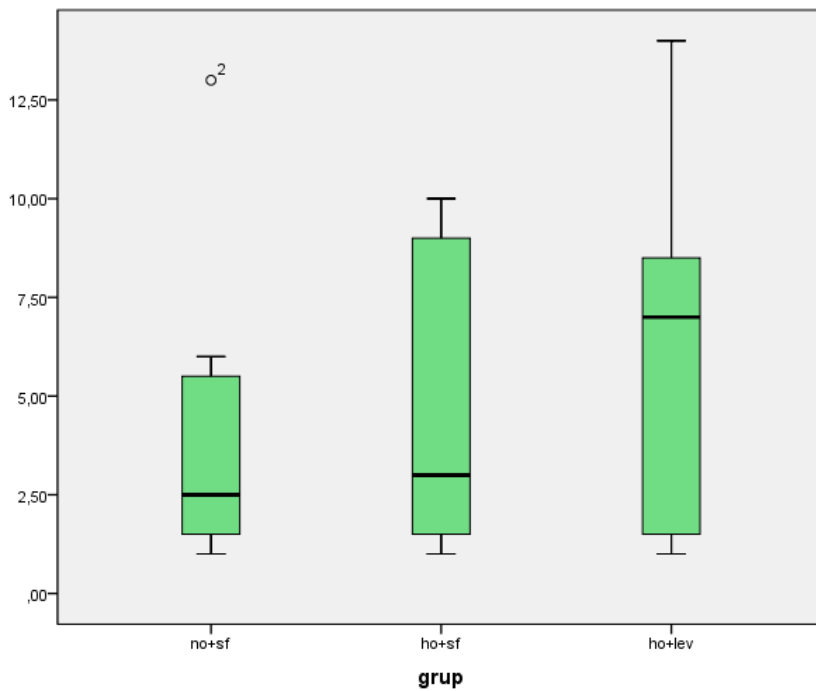
5.1.2. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)

Tablo 7: Gruplara Göre VEGF Frontal Bölge Dağılımları

Çalışma Grupları	VEGF Frontal Bölge	
	Min-Mak (Medyan)	Ort±Ss
Kontrol (n=8)	1-13 (2.5)	4.13±4.02
Hiperoksi (n=8)	1-10 (3)	4.75±3.92
Hiperoksi+LEV (n=8)	1-14 (7)	6.00±4.97
		^ap
Kontrol - Hiperoksi		0.749
Kontrol - Hiperoksi+LEV		0.482
Hiperoksi - Hiperoksi+LEV		0.860

^aMann Whitney U Test

Gruplara göre VEGF frontal bölge ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0,05$). İkili karşılaştırmalar yapıldığında hiperoksi+LEV grubunda VEGF frontal bölge ölçümleri diğer gruplara göre artmıştır, ancak bu fark anlamlı düzeye ulaşmamıştır.



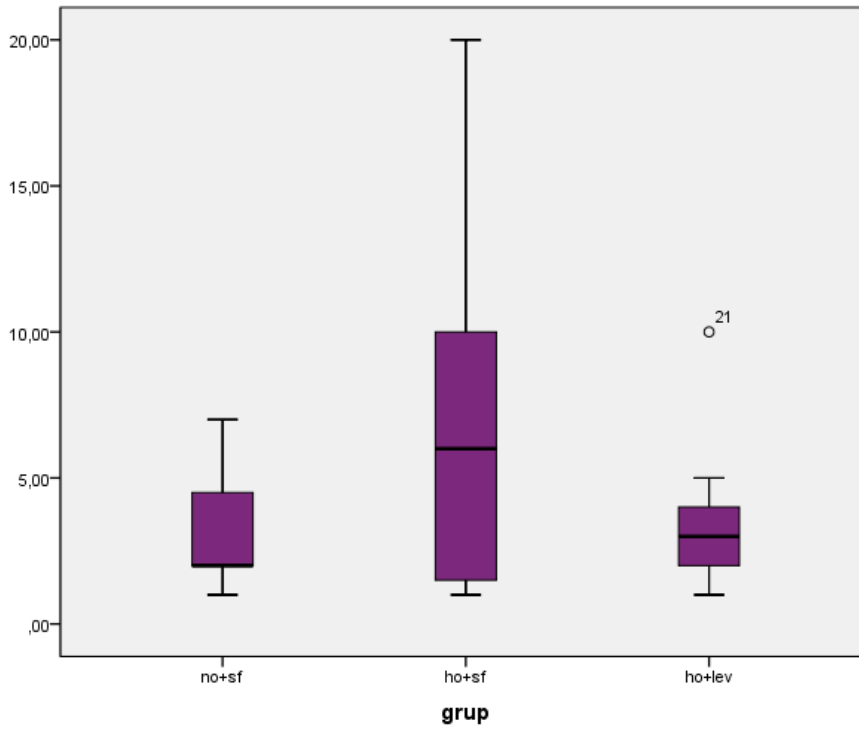
Şekil 11: VEGF Frontal Bölge Ölçümleri

Tablo 8: Gruplara Göre VEGF Parietal Bölge Dağılımları

Çalışma Grupları	VEGF Parietal Bölge	
	Min-Mak (Medyan)	Ort±Ss
Kontrol (n=8)	1-7 (2)	3.13±2.17
Hiperoksi (n=8)	1-20 (6)	7.00±6.48
Hiperoksi+LEV (n=8)	1-10 (3)	3.71±3.09
		<i>^ap</i>
Kontrol - Hiperoksi		0.285
Kontrol - Hiperoksi+LEV		0.679
Hiperoksi - Hiperoksi+LEV		0.410

^aMann Whitney U Test

Gruplara göre VEGF parietal bölge ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0,05$). İkili karşılaştırmalar yapıldığında hiperoksi grubu VEGF parietal bölge ölçümleri diğer gruplara göre artmış, hiperoksi+LEV grubunda kontrol grubuna yaklaşmıştır, ancak bu farklar anlamlı düzeye ulaşmamıştır.

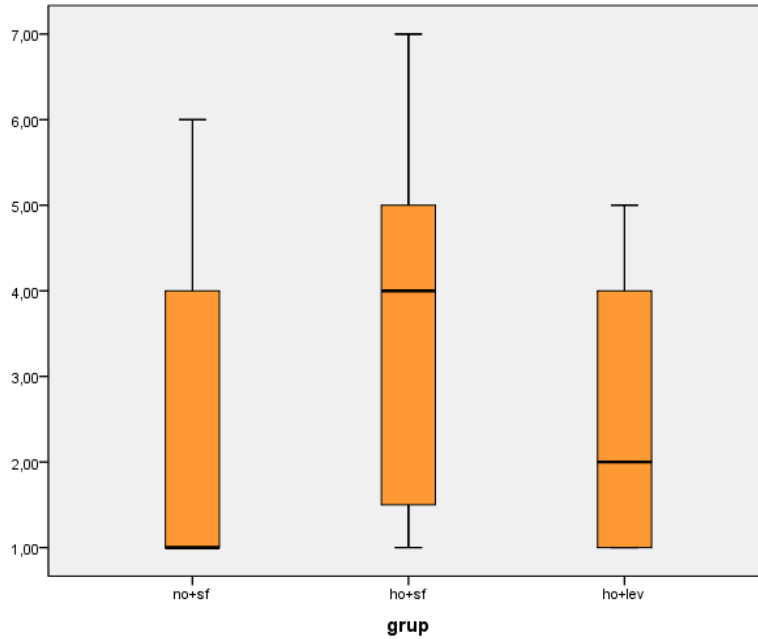
**Şekil 12:** VEGF Parietal Bölge Ölçümleri

Tablo 9: Gruplara Göre VEGF Oksipital Bölge Dağılımları

Çalışma Grupları	VEGF Oksipital Bölge	
	Min-Mak (Medyan)	Ort±Ss
Kontrol (n=8)	1-6 (1)	2.38±2.07
Hiperoksi (n=8)	1-7 (4)	3.63±2.13
Hiperoksi+LEV (n=8)	1-5 (2)	2.57±1.81
		^a <i>p</i>
Kontrol - Hiperoksi		0.226
Kontrol - Hiperoksi+LEV		0.705
Hiperoksi - Hiperoksi+LEV		0.371

^aMann Whitney U Test

Gruplara göre VEGF oksipital bölge ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0,05$). İkili karşılaştırmalar yapıldığında hiperoksi gruplarında VEGF oksipital bölge ölçümleri kontrol grubuna göre artmış, hiperoksi+LEV grubunda azalarak kontrol grubuna yaklaşmıştır, ancak bu farklar istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmamıştır.

**Şekil 13:** VEGF Oksipital Bölge Ölçümleri

5.2. Biyokimyasal Çalışmalar

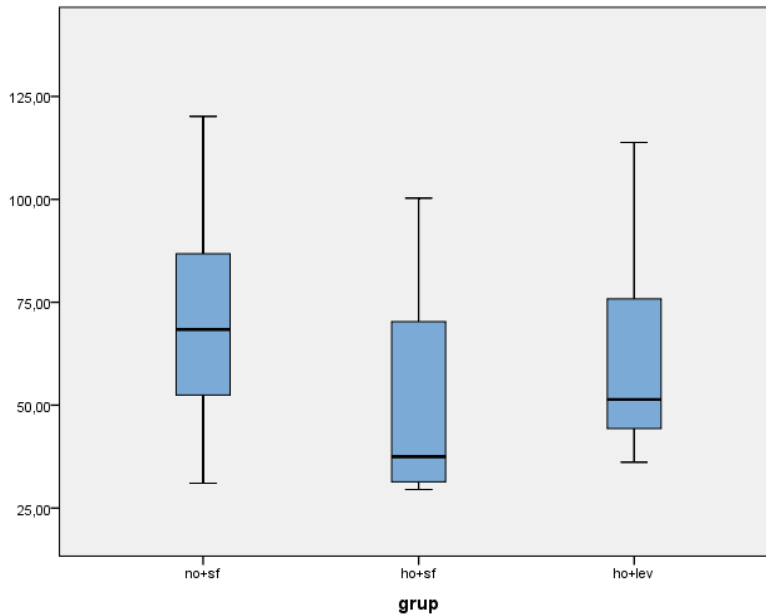
5.2.1. Katalaz

Tablo 10: Gruplara Göre Katalaz Dağılımları

Çalışma Grupları	KATALAZ	
	Min-Mak (Medyan)	Ort±Ss
Kontrol (n=8)	31-120.1 (68.3)	70.81±28.11
Hiperoksi (n=8)	29.5-100.2 (37.4)	51.02±30.59
Hiperoksi+LEV (n=8)	36.1-113.8 (51.3)	63.08±28.62
		<i>^ap</i>
Kontrol - Hiperoksi		0.161
Kontrol - Hiperoksi+LEV		0.463
Hiperoksi - Hiperoksi+LEV		0.152

^aMann Whitney U Test

Gruplara göre katalaz ölçümleri arasında ikili karşılaştırmalar yapıldığında katalaz, hiperoksi grubunda diğer gruplara göre azalmış, hiperoksi+LEV grubunda artarak kontrol grubuna yaklaşmıştır. Ancak gruplar arasındaki bu farklar istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 14: Katalaz Ölçümleri

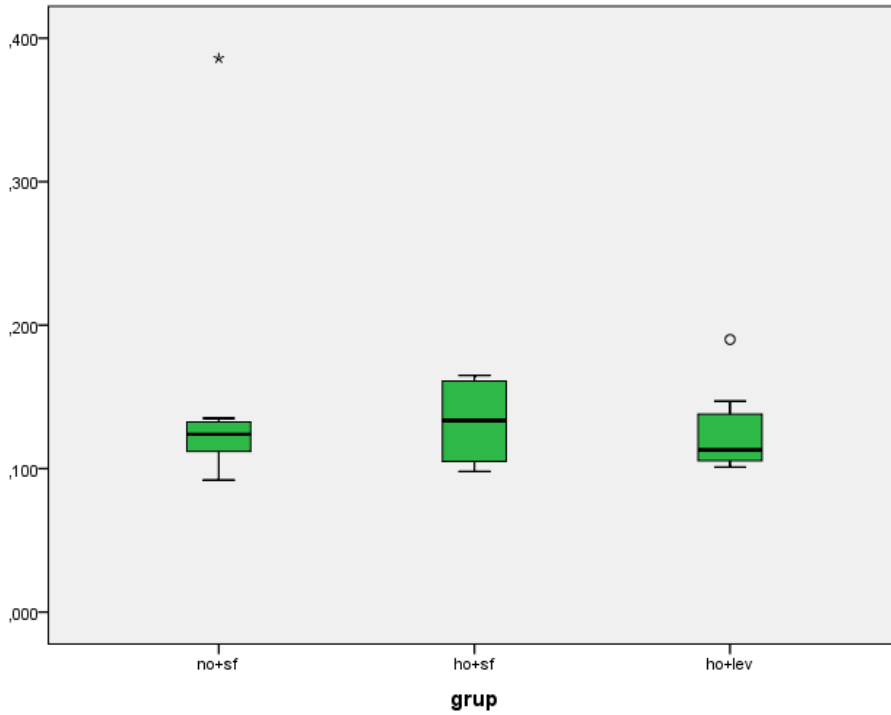
5.2.2. Tiyol

Tablo 11: Gruplara Göre Tiyol Dağılımları

Çalışma Grupları	Tiyol	
	Min-Mak (Medyan)	Ort±Ss
Kontrol (n=8)	0-0.3 (0.1)	0.15±0.09
Hiperoksi (n=8)	0-0.1 (0.1)	0.13±0.03
Hiperoksi+LEV (n=8)	0.10-0.19 (0.11)	0.13±0.03
		^a <i>p</i>
Kontrol - Hiperoksi		0.798
Kontrol - Hiperoksi+LEV		0.694
Hiperoksi - Hiperoksi+LEV		0.779

^aMann Whitney U Test

Gruplara göre tiyol ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0,05$).



Şekil 15: Tiyol Ölçümleri

6. TARTIŞMA

Yenidoğan Yoğun Bakım Üniteleri'nde resüsütasyon ve neonatal kalp, akciğer hastalıklarında kaçınılmaz olarak kullanılmakta olan oksijenin beyin gelişimi üzerinde olumsuz etkisi olduğu yönünde deliller artmaktadır (31, 42, 52, 63). İmmatür antioksidan savunma sistemleri sebebiyle oksijen toksisitesi preterm doğan bebekler için nörolojik gelişimi olumsuz etkileyen bir faktör olarak tanımlanmaktadır (25, 40, 83). Hiperoksinin immatür beyin üzerindeki etkileri ve buna yönelik önlemler literatürde çeşitli yönleri ile araştırılmıştır (56, 86-95).

Hiperoksinin immatür sıçan beyninde yaygın apoptotik nörodejenerasyona sebep olduğu deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (31, 42, 44). Oksijen, immatür beyinde intrinsik ve ekstrinsik mekanizmaları aktive ederek apoptoza sebep olur (46,47). Serbest oksijen radikallerine bağlı DNA ve mitokondriyal membran hasarına bağlı kaspaz aktivasyonu veya Ras gibi sağkalım sinyal proteinlerinin inaktivasyonuna bağlı apoptoz meydana gelmekte ayrıca hiperoksiye bağlı nörotrofik faktörlerin m-RNA sayısında azalma ile nörotrofinlerde down regülasyon olmaktadır (43, 59). Proinflamatuvar sitokin salınımı, oksidatif stres ve oligodendrosit dismatüritesi ile miyelin üretiminde bozulma oksijenin immatür beyinde görülen diğer olumsuz etkileridir (28, 48, 49, 50). Hiperoksiye bağlı bu etkiler immatür beyin derecesi ile doğru orantılı olarak artmaktadır (31, 42, 43).

Bu çalışmada 6 günlük sıçanlarda 96 saat hiperoksi maruziyeti sonrası postnatal 10.günde bakılan kaspaz-3 ile işaretli apoptotik hücre sayısı frontal ve parietal bölgede hiperoksi+LEV grubunda diğer gruplardan fazla iken, oksipital bölgede apoptotik hücrelerin hiperoksi grubunda arttığı ve hiperoksi+LEV grubunda kontrol grubuna benzer şekilde azaldığı görülmektedir. Parietal bölgede LEV tedavisi ile kontrol grubuna göre apoptoz artışı istatistiksel olarak anlamlı iken diğer farklar istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmamıştır. LEV tedavisi ile parietal ve frontal bölgedeki apoptoz artışı, LEV'in literatürdeki diğer beyin

hasarı modellerinde apoptoza sebep olmadığını gösteren veriler ile çelişmektedir (21, 113, 115, 118, 155, 156, 157, 158, 171). Antiepileptiklerin nöroprotektif özelliğini araştıran bir başka çalışmada da LEV oksijen-glukoz yoksunluğuna maruz bırakılan hipokampal hücre kültüründe 300 µM konsantrasyonlara kadar nöroprotektif özellik göstermemiştir (191).

VEGF endotel hücrelerindeki tirozin kinaz reseptörleri ile etkileşerek anjiogenezi stimüle eden bir proteindir. VEGF, hipoksi ile indüklenen factor (HIF) ve VEGF reseptör sistemi anjiogenezi sağlayan VEGF sinyal sistemini oluşturmaktadır (192). Bu sistem normooksik şartlarda da çalışmakla birlikte hipoksi ile indüklenmektedir. Hücre kültürü ve hayvan çalışmaları VEGF'in anjiogenezi stimüle ettiği gibi direkt olarak nörotrofik ve nöroprotektif etkileri olduğunu göstermektedir (193-195). Yapılan bir çalışmada yenidoğan normooksik sıçan akciğerlerinde normal şartlarda 4-14.günlerde görülen VEGF mRNA ve VEGF protein düzeylerindeki artış hiperoksi maruziyetinden etkilenmiştir. Postnatal 4-14.günlerde hiperoksi maruziyeti ile VEGF mRNA düzeylerindeki baskılanma 12-14.günlerde anlamlı düzeye ulaşırken, VEGF protein 4-9.günler arasında artmış, sonrasında azalarak 12.günde fark anlamlı düzeye ulaşmıştır. Bu çalışmada oksijen maruziyeti ile sıçan akciğerinde VEGF reseptörlerinde de azalma gözlenmiştir (192). Bir başka çalışmada immatür beyinde hiperoksinin VEGF reseptörlerinin down regülasyonu ile mikrovasküler dejenerasyon ve vasoobliterasyona sebep olduğu bunun sonucunda beyin kitlesinde azalma olduğu gösterilmiştir (52). Bir başka çalışmada hipoksik yenidoğan farelerde koruyucu adaptif mekanizmalardan biri olan HIF-1 birikimi ve hedef genlerin aktivasyonu ile serebral VEGF mRNA miktarının postnatal 7.günde 9.1 kata kadar arttığı ancak LEV'in hipoksik ve normooksik yenidoğan farelerde HIF-1 ve VEGF mRNA düzeyini etkilemediği görülmüştür (196).

Bu çalışmada yenidoğan sıçanlarda 10.günde ölçülen VEGF düzeyi her üç bölgede hiperoksi ile artmış ve LEV tedavisi ile VEGF düzeyi frontal bölgede artarken parietal ve

oksipital bölgede normooksik kontrol grubuna yaklaşmıştır. Bu farklardan hiçbiri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. VEGF düzeyinin hiperoksi gruplarında kontrol grubuna göre fazla ölçülmesi literatürdeki yenidoğan sıçan akciğerlerinde hiperoksi ile erken dönemdeki VEGF artışı ile benzerlik gösterebilir. LEV tedavisi ile VEGF düzeyinde anlamlı değişiklik olmaması da literatür ile uyumludur.

Serbest oksijen radikalleri veya reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif nitrojen türleri (RNS) gibi normal hücre metabolizmasının ürünleridir. ROS ve RNS canlı sistemlerde hem faydalı hem zararlı etkileri sebebiyle ikili rol oynamaktadır. Faydalı etkileri düşük konsantrasyonlarda görülen enfeksiyöz ajanlara karşı savunma ve hücrel sinyal sistemlerindeki görevleri gibi fonksiyonlardır. Serbest radikallerin zararlı etkileri oksidatif ve nitrozatif stres denilen biyolojik hasara sebep olur. Bu biyolojik sistemlerde ROS/RNS üretiminin artması veya enzimatik veya nonenzimatik antioksidanlardaki eksiklik ile olur (197). Enzimatik antioksidanlar primer (glutasyon peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz, peroksiredoksinler) veya sekonder (glutasyon redüktaz, glukoz-6-fosfat dehidrojenaz) olarak ikiye ayrılır. Nonenzimatik antioksidanlar metabolik veya gıdasal antioksidanlardır. Tiyol içeren metabolik antioksidanlar glutasyon, tiyoredoksin, glutaredoksin, lipoik asit iken diğerleri melatonin, koenzim Q10, ürik asit, bilirubin gibi moleküllerdir. Gıdasal antioksidanlar örnekleri ise vitamin C, vitamin E, karotenoidler, selenyum, bakır gibi eser elementlerdir (198).

Tiyoller antioksidan sistem içinde major rolü olan hücre içi veya hücre dışında redükte glutasyon veya tiyoredoksin, peroksiredoksin gibi proteinlere bağlı olarak fonksiyon gören sülfhidril grubu içeren organik bileşiklerdir. Sistein fonksiyonel tiyol grubu sebebiyle hücreleri oksidatif hasardan korumada yaşamsal öneme sahiptir. Tiyoredoksin, glutaredoksin, peroksiredoksin gibi proteinlerin aktif bölgelerindeki sistein rezidüleri ROS ve RNS'yi detoksifiye eder (199). Tiyoller hücre yüzeyine bağlı olarak hücreler arasında etkili olduğu

gibi proteinlere bağı olarak hücre içinde çözülmüş halde endojen antioksidan savunma sistemlerinde de görev almaktadır. Çeşitli tıbbi bozukluklarda azalmış tiyol düzeyleri gözlenmektedir (187).

Sıçanlarda SOD ve katalaz düzeyi embriyonik olarak düşük olmakla birlikte yenidoğan döneminde (yaklaşık postnatal 7.günde) maksimum dereceye ulaşırken GPO erişkin dönemde normale ulaşır (25).

Hiperoksi immatür beyinde peroksinitrit oluşumunu, okside/redükte glutatyon oranını, lipit peroksidasyonunu, protein karbonil oranlarını, peroksiredoksin, tiyoredoksin düzeylerini arttırır, SOD ekspresyonunu akut dönemde azaltır, serebral kapillerlerde eNOS upregülasyonu ile oksidatif ve nitratif strese sebep olur (42, 43, 50, 52, 54, 90).

LEV'in oksidatif strese etkisini araştıran bir çalışmada erişkin farelerde status epileptikus modelinde lipit peroksidasyonunda, nitrit-nitrat formasyonunda ve katalaz aktivitesinde anlamlı artış, glutatyonda azalma olmuştur. Bu çalışmada nöbet öncesi verilen 200 mg/kg IP LEV tedavisi ile bu değişikliklerin önlendiği görülmüştür (170). Bu çalışmada nöbet indüksiyonu ile katalaz artışı serbest radikal artışına kompensatuar bir değişiklik olarak yorumlanmıştır. Bir başka çalışmada yenidoğan hipoksik iskemik beyin hasarı modelinde yüksek doz (200 mg/kg) LEV IP uygulaması ile antioksidan SOD ve GPO enzim düzeylerinde anlamlı artış tespit edilmiştir (156). LEV'in antioksidan etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada erişkin ratlarda 14 gün 54 mg/kg/gün IP LEV kullanımı ile hipokampüste prooksidan iNOS ekspresyonunda azalma, hücre içi glutatyon yapımı için gerekli olan sistin kaynağı antioksidan sistin/glutamat değiştiricisinde artış ve NO radikalinin yarı ömründe azalma görülmüştür (166). LEV'in hipokampüste askorbikasit ve alfa-tokoferol ile sinerjistik olarak bazal endojen antioksidan etkiyi güçlendirdiği görülmüştür (166).

Bizim çalışmamızda ise yenidoğan sıçanlarda 96 saat hiperoksi sonrası 10.günde ölçülen antioksidan katalaz düzeyi hiperoksi gruplarında, kontrol normooksi grubuna göre

azalmış iken, LEV ile tedavi edilen grupta artarak kontrol grubuna yaklaşmaktadır. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmamakla birlikte, bu sonuçlar LEV'in antioksidan katalaz düzeyinde hiperoksiye bağlı düşüşü azalttığı şeklinde yorumlanabilir.

Antioksidan tiyol düzeyinde ise gruplar arasında belirgin ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır.

Çalışmanın Kısıtlılıkları

1. Histopatolojik incelemenin hızlı beyin gelişiminin nispeten geç bir döneminde yapılmış olması hiperoksik hasara bağlı tüm apoptotik hücrelerin görülememesine sebep olmuş olabilir.

2. Beyin kesitlerinde nöronal yoğunluk hesaplanamaması nedeni ile kümülatif hücre kaybı yerine, yakın dönemde apoptoza giden hücreler değerlendirilebilmiştir.

3. Mikrodiseksiyon imkanı olmaması sebebiyle hipokampus gibi gelişimini diğer bölgelere göre nispeten geç tamamlayan bölgeler değerlendirilememiştir.

Daha geniş hayvan grupları ile yapılan çalışmaların istatistiksel olarak anlamlı sonuçları artıracağı düşünülmektedir.

7. SONUÇ

Oksijen, Yenidoğan Yoğun Bakım Üniteleri'nde yenidoğan bebeklerin tedavilerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Beyin gelişiminin kritik ve dış etkenlere hassas döneminde olmaları ve immatür savunma sistemleri sebebiyle prematüre bebeklerde oksijenin toksik etkileri olduğu yönünde deliller artmaktadır. Bu çalışmada, immatür beyinde hiperoksiye bağlı hasara karşı LEV'in nöroprotektif etkisine dair kesin veri elde edilememiştir. Prematüre bebeklerin kısa ve uzun dönemde nörokognitif fonksiyonlarını iyileştirecek girişimler açısından daha fazla prelinik ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

8. KAYNAKLAR

1. Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, Shankaran S, Laptook AR, Walsh MC, et al. Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*. 2010;126(3):443-56.
2. Castillo A, Sola A, Baquero H, Neira F, Alvis R, Deulofeut R, et al. Pulse oxygen saturation levels and arterial oxygen tension values in newborns receiving oxygen therapy in the neonatal intensive care unit: is 85% to 93% an acceptable range? *Pediatrics*. 2008;121(5):882-9.
3. Deulofeut R, Critz A, Adams-Chapman I, Sola A. Avoiding hyperoxia in infants \leq 1250 g is associated with improved short- and long-term outcomes. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association*. 2006;26(11):700-5.
4. World Health Organization. International statistical classification of diseases and related health problems. - 10th revision, Fifth edition, 2016. Chapter XVI. Geneva 2016. p. 178-9.
5. Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller AB, Narwal R, et al. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet (London, England)*. 2012;379(9832):2162-72.
6. Blencowe H, Cousens S, Chou D, Oestergaard M, Say L, Moller AB, et al. Born Too Soon: The global epidemiology of 15 million preterm births. *Reproductive Health*. 2013;10(Suppl 1):S2.
7. Can G, Çoban A, İnce Z. Yenidoğan ve Hastalıkları. Neyzi O, Ertuğrul T, editors. İstanbul: İstanbul Tıp Fakültesi Vakfı; 2002. 296-431 p.
8. Platt MJ, Cans C, Johnson A, Surman G, Topp M, Torrioli MG, et al. Trends in cerebral palsy among infants of very low birthweight (<1500 g) or born prematurely (<32 weeks) in 16 European centres: a database study. *Lancet (London, England)*. 2007;369(9555):43-50.
9. (SCPE) SoCPiE. Surveillance of cerebral palsy in Europe: a collaboration of cerebral palsy surveys and registers. *Surveillance of Cerebral Palsy in Europe (SCPE). Developmental medicine and child neurology*. 2000;42(12):816-24.

10. Volpe JJ. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *The Lancet Neurology*. 2009;8(1):110-24.
11. Aarnoudse-Moens CS, Weisglas-Kuperus N, van Goudoever JB, Oosterlaan J. Meta-analysis of neurobehavioral outcomes in very preterm and/or very low birth weight children. *Pediatrics*. 2009;124(2):717-28.
12. Morse SB, Zheng H, Tang Y, Roth J. Early school-age outcomes of late preterm infants. *Pediatrics*. 2009;123(4):e622-9.
13. Ajayi-Obe M, Saeed N, Cowan FM, Rutherford MA, Edwards AD. Reduced development of cerebral cortex in extremely preterm infants. *Lancet (London, England)*. 2000;356(9236):1162-3.
14. Abernethy LJ, Palaniappan M, Cooke RW. Quantitative magnetic resonance imaging of the brain in survivors of very low birth weight. *Archives of disease in childhood*. 2002;87(4):279-83.
15. Nosarti C, Al-Asady MH, Frangou S, Stewart AL, Rifkin L, Murray RM. Adolescents who were born very preterm have decreased brain volumes. *Brain : a journal of neurology*. 2002;125(Pt 7):1616-23.
16. Sannia A, Natalizia AR, Parodi A, Malova M, Fumagalli M, Rossi A, et al. Different gestational ages and changing vulnerability of the premature brain. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*. 2015;28 Suppl 1:2268-72.
17. Duerden EG, Taylor MJ, Miller SP. Brain development in infants born preterm: looking beyond injury. *Seminars in pediatric neurology*. 2013;20(2):65-74.
18. Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vockler J, Dikranian K, et al. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science (New York, NY)*. 1999;283(5398):70-4.
19. Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, Wozniak DF, Koch C, Genz K, et al. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science (New York, NY)*. 2000;287(5455):1056-60.
20. Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, Benshoff ND, Dikranian K, Zorumski CF, et al. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *The*

- Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2003;23(3):876-82.
21. Bittigau P, Sifringer M, Genz K, Reith E, Pospischil D, Govindarajalu S, et al. Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(23):15089-94.
 22. Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. Early human development. 1979;3(1):79-83.
 23. Rutherford MA, Supramaniam V, Ederies A, Chew A, Bassi L, Groppo M, et al. Magnetic resonance imaging of white matter diseases of prematurity. *Neuroradiology*. 2010;52(6):505-21.
 24. Haynes RL, Folkerth RD, Keefe RJ, Sung I, Swzeda LI, Rosenberg PA, et al. Nitrosative and oxidative injury to premyelinating oligodendrocytes in periventricular leukomalacia. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2003;62(5):441-50.
 25. McQuillen PS, Ferriero DM. Selective vulnerability in the developing central nervous system. *Pediatric neurology*. 2004;30(4):227-35.
 26. Back SA, Riddle A, McClure MM. Maturation-dependent vulnerability of perinatal white matter in premature birth. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2007;38(2 Suppl):724-30.
 27. Schmitz T, Ritter J, Mueller S, Felderhoff-Mueser U, Chew LJ, Gallo V. Cellular changes underlying hyperoxia-induced delay of white matter development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(11):4327-44.
 28. Volpe JJ. The encephalopathy of prematurity--brain injury and impaired brain development inextricably intertwined. *Seminars in pediatric neurology*. 2009;16(4):167-78.
 29. Back SA, Gan X, Li Y, Rosenberg PA, Volpe JJ. Maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1998;18(16):6241-53.

30. Bernardo A, Greco A, Levi G, Minghetti L. Differential lipid peroxidation, Mn superoxide, and bcl-2 expression contribute to the maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2003;62(5):509-19.
31. Gerstner B, DeSilva TM, Genz K, Armstrong A, Brehmer F, Neve RL, et al. Hyperoxia causes maturation-dependent cell death in the developing white matter. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008;28(5):1236-45.
32. Volpe JJ, Kinney HC, Jensen FE, Rosenberg PA. The developing oligodendrocyte: key cellular target in brain injury in the premature infant. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 2011;29(4):423-40.
33. Baud O, Greene AE, Li J, Wang H, Volpe JJ, Rosenberg PA. Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(7):1531-40.
34. Baud O, Haynes RF, Wang H, Folkerth RD, Li J, Volpe JJ, et al. Developmental up-regulation of MnSOD in rat oligodendrocytes confers protection against oxidative injury. *The European journal of neuroscience*. 2004;20(1):29-40.
35. Folkerth RD, Haynes RL, Borenstein NS, Belliveau RA, Trachtenberg F, Rosenberg PA, et al. Developmental lag in superoxide dismutases relative to other antioxidant enzymes in premyelinated human telencephalic white matter. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2004;63(9):990-9.
36. Deng W, Wang H, Rosenberg PA, Volpe JJ, Jensen FE. Role of metabotropic glutamate receptors in oligodendrocyte excitotoxicity and oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(20):7751-6.
37. Khwaja O, Volpe JJ. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. *Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition*. 2008;93(2):F153-61.
38. Baud O, Li J, Zhang Y, Neve RL, Volpe JJ, Rosenberg PA. Nitric oxide-induced cell death in developing oligodendrocytes is associated with mitochondrial dysfunction and apoptosis-inducing factor translocation. *The European journal of neuroscience*. 2004;20(7):1713-26.

39. Khan JY, Black SM. Developmental changes in murine brain antioxidant enzymes. *Pediatric research*. 2003;54(1):77-82.
40. Ikonomidou C, Kaindl AM. Neuronal death and oxidative stress in the developing brain. *Antioxidants & redox signaling*. 2011;14(8):1535-50.
41. Solberg R, Perrone S, Saugstad OD, Buonocore G. Risks and benefits of oxygen in the delivery room. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*. 2012;25 Suppl 1:41-4.
42. Felderhoff-Mueser U, Bittigau P, Sifringer M, Jarosz B, Korobowicz E, Mahler L, et al. Oxygen causes cell death in the developing brain. *Neurobiology of disease*. 2004;17(2):273-82.
43. Kaindl AM, Sifringer M, Zabel C, Nebrich G, Wacker MA, Felderhoff-Mueser U, et al. Acute and long-term proteome changes induced by oxidative stress in the developing brain. *Cell death and differentiation*. 2006;13(7):1097-109.
44. Yis U, Kurul SH, Kumral A, Cilaker S, Tugyan K, Genc S, et al. Hyperoxic exposure leads to cell death in the developing brain. *Brain & development*. 2008;30(9):556-62.
45. Sifringer M, Bendix I, Borner C, Endesfelder S, von Haefen C, Kalb A, et al. Prevention of neonatal oxygen-induced brain damage by reduction of intrinsic apoptosis. *Cell death & disease*. 2012;3:e250.
46. Dzierko M, Boos V, Sifringer M, Polley O, Gerstner B, Genz K, et al. A critical role for Fas/CD-95 dependent signaling pathways in the pathogenesis of hyperoxia-induced brain injury. *Annals of neurology*. 2008;64(6):664-73.
47. Liu Y, Jiang P, Du M, Chen K, Chen A, Wang Y, et al. Hyperoxia-induced immature brain injury through the TLR4 signaling pathway in newborn mice. *Brain research*. 2015;1610:51-60.
48. Vottier G, Pham H, Pansiot J, Biran V, Gressens P, Charriaut-Marlangue C, et al. Deleterious effect of hyperoxia at birth on white matter damage in the newborn rat. *Developmental neuroscience*. 2011;33(3-4):261-9.
49. Ritter J, Schmitz T, Chew LJ, Buhner C, Mobius W, Zonouzi M, et al. Neonatal hyperoxia exposure disrupts axon-oligodendrocyte integrity in the subcortical white matter. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2013;33(21):8990-9002.

50. Bendix I, Weichelt U, Strasser K, Serdar M, Endesfelder S, von Haefen C, et al. Hyperoxia changes the balance of the thioredoxin/peroxiredoxin system in the neonatal rat brain. *Brain research*. 2012;1484:68-75.
51. Kwak DJ, Kwak SD, Gauda EB. The effect of hyperoxia on reactive oxygen species (ROS) in rat petrosal ganglion neurons during development using organotypic slices. *Pediatric research*. 2006;60(4):371-6.
52. Sirinyan M, Sennlaub F, Dorfman A, Sapieha P, Gobeil F, Jr., Hardy P, et al. Hyperoxic exposure leads to nitrative stress and ensuing microvascular degeneration and diminished brain mass and function in the immature subject. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2006;37(11):2807-15.
53. Zaghloul N, Nasim M, Patel H, Codipilly C, Marambaud P, Dewey S, et al. Overexpression of extracellular superoxide dismutase has a protective role against hyperoxia-induced brain injury in neonatal mice. *The FEBS journal*. 2012;279(5):871-81.
54. Hoehn T, Felderhoff-Mueser U, Maschewski K, Stadelmann C, Sifringer M, Bittigau P, et al. Hyperoxia causes inducible nitric oxide synthase-mediated cellular damage to the immature rat brain. *Pediatric research*. 2003;54(2):179-84.
55. Felderhoff-Mueser U, Sifringer M, Polley O, Dzierko M, Leineweber B, Mahler L, et al. Caspase-1-processed interleukins in hyperoxia-induced cell death in the developing brain. *Annals of neurology*. 2005;57(1):50-9.
56. Endesfelder S, Zaak I, Weichelt U, Buhner C, Schmitz T. Caffeine protects neuronal cells against injury caused by hyperoxia in the immature brain. *Free radical biology & medicine*. 2014;67:221-34.
57. Cohen-Cory S, Kidane AH, Shirkey NJ, Marshak S. Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. *Developmental Neurobiology*. 2010;70(5):271-88.
58. Horch HW. Local effects of BDNF on dendritic growth. *Reviews in the Neurosciences*. 2004;15(2):117-29.
59. Sengoku T, Murray KM, Wilson ME. Neonatal hyperoxia induces alterations in neurotrophin gene expression. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 2016;48:31-7.

60. Bonde C, Sarup A, Schousboe A, Gegelashvili G, Noraberg J, Zimmer J. GDNF pre-treatment aggravates neuronal cell loss in oxygen–glucose deprived hippocampal slice cultures: a possible effect of glutamate transporter up-regulation. *Neurochemistry International*. 2003;43(4–5):381-8.
61. Ikeda T, Koo H, Xia YX, Ikenoue T, Choi BH. Bimodal upregulation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in the neonatal rat brain following ischemic/hypoxic injury. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2002;20(7):555-62.
62. Basu S, Barman S, Shukla R, Kumar A. Effect of oxygen inhalation on cerebral blood flow velocity in premature neonates. *Pediatric research*. 2014;75(2):328-35.
63. Ramani M, van Groen T, Kadish I, Bulger A, Ambalavanan N. Neurodevelopmental impairment following neonatal hyperoxia in the mouse. *Neurobiology of disease*. 2013;50:69-75.
64. Berger R, Soder S. Neuroprotection in preterm infants. *BioMed research international*. 2015;2015:257139.
65. Crowther CA, Hiller JE, Doyle LW, Haslam RR. Effect of magnesium sulfate given for neuroprotection before preterm birth: a randomized controlled trial. *Jama*. 2003;290(20):2669-76.
66. Marret S, Marpeau L, Follet-Bouhamed C, Cambonie G, Astruc D, Delaporte B, et al. [Effect of magnesium sulphate on mortality and neurologic morbidity of the very-preterm newborn (of less than 33 weeks) with two-year neurological outcome: results of the prospective PREMAG trial]. *Gynecologie, obstetrique & fertilite*. 2008;36(3):278-88.
67. Doyle LW, Crowther CA, Middleton P, Marret S, Rouse D. Magnesium sulphate for women at risk of preterm birth for neuroprotection of the fetus. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2009(1):Cd004661.
68. American College of Obstetricians and Gynecologists. Committee Opinion No.543: Timing of umbilical cord clamping after birth. *Obstetrics and gynecology*. 2012;120(6):1522-6.
69. Mercer JS, Vohr BR, McGrath MM, Padbury JF, Wallach M, Oh W. Delayed cord clamping in very preterm infants reduces the incidence of intraventricular hemorrhage and late-onset sepsis: a randomized, controlled trial. *Pediatrics*. 2006;117(4):1235-42.

70. Gheorghe CP, Bhandari V. Stem Cell Therapy in Neonatal Diseases. *Indian journal of pediatrics*. 2015;82(7):637-41.
71. Yoshimoto M, Koenig JM. Stem Cells: Potential Therapy for Neonatal Injury? *Clinics in perinatology*. 2015;42(3):597-612.
72. Drobyshevsky A, Cotten CM, Shi Z, Luo K, Jiang R, Derrick M, et al. Human Umbilical Cord Blood Cells Ameliorate Motor Deficits in Rabbits in a Cerebral Palsy Model. *Developmental neuroscience*. 2015;37(4-5):349-62.
73. Zhu LH, Bai X, Zhang N, Wang SY, Li W, Jiang L. Improvement of human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation on glial cell and behavioral function in a neonatal model of periventricular white matter damage. *Brain research*. 2014;1563:13-21.
74. Zhang DS, Bai XH, Chen DP, Mu DZ, Chen J. [Intracerebral transplantation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain damage: protective effect to injured brain]. *Zhongguo dang dai er ke za zhi = Chinese journal of contemporary pediatrics*. 2014;16(9):927-32.
75. Li J, McDonald CA, Fahey MC, Jenkin G, Miller SL. Could cord blood cell therapy reduce preterm brain injury? *Frontiers in neurology*. 2014;5:200.
76. Kim ES, Ahn SY, Im GH, Sung DK, Park YR, Choi SH, et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell transplantation attenuates severe brain injury by permanent middle cerebral artery occlusion in newborn rats. *Pediatric research*. 2012;72(3):277-84.
77. van Velthoven CT, Kavelaars A, van Bel F, Heijnen CJ. Regeneration of the ischemic brain by engineered stem cells: fuelling endogenous repair processes. *Brain research reviews*. 2009;61(1):1-13.
78. Wood CE. Estrogen/hypothalamus-pituitary-adrenal axis interactions in the fetus: The interplay between placenta and fetal brain. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2005;12(2):67-76.
79. Tulchinsky D, Hobel CJ, Yeager E, Marshall JR. Plasma estradiol, estriol, and progesterone in human pregnancy. II. Clinical applications in Rh-immunization disease. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1972;113(6):766-70.

80. Muller MM, Middelanis J, Meier C, Surbek D, Berger R. 17beta-estradiol protects 7-day old rats from acute brain injury and reduces the number of apoptotic cells. *Reproductive sciences* (Thousand Oaks, Calif). 2013;20(3):253-61.
81. Deutsch ER, Espinoza TR, Atif F, Woodall E, Kaylor J, Wright DW. Progesterone's role in neuroprotection, a review of the evidence. *Brain research*. 2013;1530:82-105.
82. Hunt R, Davis PG, Inder T. Replacement of estrogens and progestins to prevent morbidity and mortality in preterm infants. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2004(4):Cd003848.
83. Siddappa AJ, Rao RB, Wobken JD, Leibold EA, Connor JR, Georgieff MK. Developmental changes in the expression of iron regulatory proteins and iron transport proteins in the perinatal rat brain. *Journal of neuroscience research*. 2002;68(6):761-75.
84. Baydas G, Karatas F, Gursu MF, Bozkurt HA, Ilhan N, Yasar A, et al. Antioxidant vitamin levels in term and preterm infants and their relation to maternal vitamin status. *Archives of medical research*. 2002;33(3):276-80.
85. Gerdin E, Tyden O, Eriksson UJ. The development of antioxidant enzymatic defense in the perinatal rat lung: activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase. *Pediatric research*. 1985;19(7):687-91.
86. Yis U, Kurul SH, Kumral A, Tugyan K, Cilaker S, Yilmaz O, et al. Effect of erythropoietin on oxygen-induced brain injury in the newborn rat. *Neuroscience letters*. 2008;448(3):245-9.
87. Kaindl AM, Sifringer M, Koppelstaetter A, Genz K, Loeber R, Boerner C, et al. Erythropoietin protects the developing brain from hyperoxia-induced cell death and proteome changes. *Annals of neurology*. 2008;64(5):523-34.
88. Sifringer M, Genz K, Brait D, Brehmer F, Lober R, Weichelt U, et al. Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced cell death by modulation of inflammatory mediators and matrix metalloproteinases. *Developmental neuroscience*. 2009;31(5):394-402.
89. Kurul SH, Yis U, Kumral A, Tugyan K, Cilaker S, Kolatan E, et al. Protective effects of topiramate against hyperoxic brain injury in the developing brain. *Neuropediatrics*. 2009;40(1):22-7.
90. Sifringer M, Brait D, Weichelt U, Zimmerman G, Endesfelder S, Brehmer F, et al. Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced oxidative stress in the developing rat brain. *Brain, behavior, and immunity*. 2010;24(5):792-9.

91. Sifringer M, Bendix I, von Haefen C, Endesfelder S, Kalb A, Buhner C, et al. Oxygen toxicity is reduced by acetylcholinesterase inhibition in the developing rat brain. *Developmental neuroscience*. 2013;35(2-3):255-64.
92. Posod A, Pinzer K, Urbanek M, Wegleiter K, Keller M, Kiechl-Kohlendorfer U, et al. The common antitussive agent dextromethorphan protects against hyperoxia-induced cell death in established in vivo and in vitro models of neonatal brain injury. *Neuroscience*. 2014;274:260-72.
93. Schmitz T, Krabbe G, Weikert G, Scheuer T, Matheus F, Wang Y, et al. Minocycline protects the immature white matter against hyperoxia. *Experimental neurology*. 2014;254:153-65.
94. Topcu Y, Bayram E, Ozbal S, Yis U, Tugyan K, Karaoglu P, et al. Zonisamide attenuates hyperoxia-induced apoptosis in the developing rat brain. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. 2014;35(11):1769-75.
95. Sifringer M, von Haefen C, Krain M, Paeschke N, Bendix I, Buhner C, et al. Neuroprotective effect of dexmedetomidine on hyperoxia-induced toxicity in the neonatal rat brain. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015;2015:530371.
96. Calabresi P, Cupini LM, Centonze D, Pisani F, Bernardi G. Antiepileptic drugs as a possible neuroprotective strategy in brain ischemia. *Annals of neurology*. 2003;53(6):693-702.
97. Yalçınkaya C, Benbir G. Yenidoğan Nöbetleri. *Epilepsi*. 2014;20(Ek-1):1-5.
98. Glass HC, Sullivan JE. Neonatal seizures. *Current treatment options in neurology*. 2009;11(6):405-13.
99. Silverstein FS, Jensen FE. Neonatal seizures. *Annals of neurology*. 2007;62(2):112-20.
100. Clancy RR. Summary proceedings from the neurology group on neonatal seizures. *Pediatrics*. 2006;117(3 Pt 2):S23-7.
101. Glass HC, Wirrell E. Controversies in neonatal seizure management. *Journal of child neurology*. 2009;24(5):591-9.
102. Pressler RM, Mangum B. Newly emerging therapies for neonatal seizures. *Seminars in fetal & neonatal medicine*. 2013;18(4):216-23.

103. World Health Organization. Guidelines on neonatal seizures. Geneva: WHO. 2011.
104. Painter MJ, Scher MS, Stein AD, Armatti S, Wang Z, Gardiner JC, et al. Phenobarbital compared with phenytoin for the treatment of neonatal seizures. *The New England journal of medicine*. 1999;341(7):485-9.
105. Silverstein FS, Ferriero DM. Off-label use of antiepileptic drugs for the treatment of neonatal seizures. *Pediatric neurology*. 2008;39(2):77-9.
106. Khan O, Cipriani C, Wright C, Crisp E, Kirmani B. Role of intravenous levetiracetam for acute seizure management in preterm neonates. *Pediatric neurology*. 2013;49(5):340-3.
107. Harris LW, Sharp T, Gartlon J, Jones DN, Harrison PJ. Long-term behavioural, molecular and morphological effects of neonatal NMDA receptor antagonism. *The European journal of neuroscience*. 2003;18(6):1706-10.
108. Farwell JR, Lee YJ, Hirtz DG, Sulzbacher SI, Ellenberg JH, Nelson KB. Phenobarbital for febrile seizures--effects on intelligence and on seizure recurrence. *The New England journal of medicine*. 1990;322(6):364-9.
109. Reinisch JM, Sanders SA, Mortensen EL, Rubin DB. In utero exposure to phenobarbital and intelligence deficits in adult men. *Jama*. 1995;274(19):1518-25.
110. Sulzbacher S, Farwell JR, Temkin N, Lu AS, Hirtz DG. Late cognitive effects of early treatment with phenobarbital. *Clinical pediatrics*. 1999;38(7):387-94.
111. Thorp JA, O'Connor M, Jones AM, Hoffman EL, Belden B. Does perinatal phenobarbital exposure affect developmental outcome at age 2? *American journal of perinatology*. 1999;16(2):51-60.
112. Adab N, Kini U, Vinten J, Ayres J, Baker G, Clayton-Smith J, et al. The longer term outcome of children born to mothers with epilepsy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2004;75(11):1575-83.
113. Manthey D, Asimiadou S, Stefovaska V, Kaindl AM, Fassbender J, Ikonomidou C, et al. Sulthiame but not levetiracetam exerts neurotoxic effect in the developing rat brain. *Experimental neurology*. 2005;193(2):497-503.
114. Bittigau P, Sifringer M, Ikonomidou C. Antiepileptic drugs and apoptosis in the developing brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003;993:103-14; discussion 23-4.

115. Kim JS, Kondratyev A, Tomita Y, Gale K. Neurodevelopmental impact of antiepileptic drugs and seizures in the immature brain. *Epilepsia*. 2007;48 Suppl 5:19-26.
116. Noh MR, Kim SK, Sun W, Park SK, Choi HC, Lim JH, et al. Neuroprotective effect of topiramate on hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Experimental neurology*. 2006;201(2):470-8.
117. Schubert S, Brandl U, Brodhun M, Ulrich C, Spaltmann J, Fiedler N, et al. Neuroprotective effects of topiramate after hypoxia-ischemia in newborn piglets. *Brain research*. 2005;1058(1-2):129-36.
118. Kim J, Kondratyev A, Gale K. Antiepileptic drug-induced neuronal cell death in the immature brain: effects of carbamazepine, topiramate, and levetiracetam as monotherapy versus polytherapy. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2007;323(1):165-73.
119. Kabakus N, Ay I, Aysun S, Soylemezoglu F, Ozcan A, Celasun B. Protective effects of valproic acid against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Journal of child neurology*. 2005;20(7):582-7.
120. Abend NS, Gutierrez-Colina AM, Monk HM, Dlugos DJ, Clancy RR. Levetiracetam for treatment of neonatal seizures. *Journal of child neurology*. 2011;26(4):465-70.
121. Perucca E, Johannessen SI. The ideal pharmacokinetic properties of an antiepileptic drug: how close does levetiracetam come? *Epileptic disorders : international epilepsy journal with videotape*. 2003;5 Suppl 1:S17-26.
122. Verrotti A, D'Adamo E, Parisi P, Chiarelli F, Curatolo P. Levetiracetam in childhood epilepsy. *Paediatric drugs*. 2010;12(3):177-86.
123. Loscher W, Honack D, Rundfeldt C. Antiepileptogenic effects of the novel anticonvulsant levetiracetam (ucb L059) in the kindling model of temporal lobe epilepsy. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1998;284(2):474-9.
124. Loscher W, Honack D. Profile of ucb L059, a novel anticonvulsant drug, in models of partial and generalized epilepsy in mice and rats. *European journal of pharmacology*. 1993;232(2-3):147-58.
125. Gower AJ, Hirsch E, Boehrer A, Noyer M, Marescaux C. Effects of levetiracetam, a novel antiepileptic drug, on convulsant activity in two genetic rat models of epilepsy. *Epilepsy research*. 1995;22(3):207-13.

126. Doheny HC, Whittington MA, Jefferys JG, Patsalos PN. A comparison of the efficacy of carbamazepine and the novel anti-epileptic drug levetiracetam in the tetanus toxin model of focal complex partial epilepsy. *Br J Pharmacol*. 2002;135(6):1425-34.
127. Glien M, Brandt C, Potschka H, Loscher W. Effects of the novel antiepileptic drug levetiracetam on spontaneous recurrent seizures in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2002;43(4):350-7.
128. Klitgaard H, Matagne A, Gobert J, Wulfert E. Evidence for a unique profile of levetiracetam in rodent models of seizures and epilepsy. *European journal of pharmacology*. 1998;353(2-3):191-206.
129. Klitgaard H. Levetiracetam: the preclinical profile of a new class of antiepileptic drugs? *Epilepsia*. 2001;42 Suppl 4:13-8.
130. Mazarati AM, Baldwin R, Klitgaard H, Matagne A, Wasterlain CG. Anticonvulsant effects of levetiracetam and levetiracetam-diazepam combinations in experimental status epilepticus. *Epilepsy research*. 2004;58(2-3):167-74.
131. Patsalos PN. Pharmacokinetic profile of levetiracetam: toward ideal characteristics. *Pharmacology & therapeutics*. 2000;85(2):77-85.
132. Doheny HC, Ratnaraj N, Whittington MA, Jefferys JG, Patsalos PN. Blood and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of the novel anticonvulsant levetiracetam (ucb L059) in the rat. *Epilepsy research*. 1999;34(2-3):161-8.
133. Tong X, Patsalos PN. A microdialysis study of the novel antiepileptic drug levetiracetam: extracellular pharmacokinetics and effect on taurine in rat brain. *British Journal of Pharmacology*. 2001;133(6):867-74.
134. Patsalos PN. Clinical pharmacokinetics of levetiracetam. *Clinical pharmacokinetics*. 2004;43(11):707-24.
135. Noyer M, Gillard M, Matagne A, Henichart JP, Wulfert E. The novel antiepileptic drug levetiracetam (ucb L059) appears to act via a specific binding site in CNS membranes. *European journal of pharmacology*. 1995;286(2):137-46.
136. Lynch BA, Lambeng N, Nocka K, Kensel-Hammes P, Bajjalieh SM, Matagne A, et al. The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(26):9861-6.

137. Crowder KM, Gunther JM, Jones TA, Hale BD, Zhang HZ, Peterson MR, et al. Abnormal neurotransmission in mice lacking synaptic vesicle protein 2A (SV2A). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(26):15268-73.
138. Gillard M, Chatelain P, Fuks B. Binding characteristics of levetiracetam to synaptic vesicle protein 2A (SV2A) in human brain and in CHO cells expressing the human recombinant protein. *European journal of pharmacology*. 2006;536(1-2):102-8.
139. Fuks B, Gillard M, Michel P, Lynch B, Vertongen P, Leprince P, et al. Localization and photoaffinity labelling of the levetiracetam binding site in rat brain and certain cell lines. *European journal of pharmacology*. 2003;478(1):11-9.
140. Birnstiel S, Wulfert E, Beck SG. Levetiracetam (ucb LO59) affects in vitro models of epilepsy in CA3 pyramidal neurons without altering normal synaptic transmission. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 1997;356(5):611-8.
141. Kaminski RM, Matagne A, Leclercq K, Gillard M, Michel P, Kenda B, et al. SV2A protein is a broad-spectrum anticonvulsant target: functional correlation between protein binding and seizure protection in models of both partial and generalized epilepsy. *Neuropharmacology*. 2008;54(4):715-20.
142. Zona C, Niespodziany I, Marchetti C, Klitgaard H, Bernardi G, Margineanu DG. Levetiracetam does not modulate neuronal voltage-gated Na⁺ and T-type Ca²⁺ currents. *Seizure*. 2001;10(4):279-86.
143. Macdonald RL, Kelly KM. Antiepileptic drug mechanisms of action. *Epilepsia*. 1995;36 Suppl 2:S2-12.
144. Lukyanetz EA, Shkryl VM, Kostyuk PG. Selective blockade of N-type calcium channels by levetiracetam. *Epilepsia*. 2002;43(1):9-18.
145. Niespodziany I, Klitgaard H, Margineanu DG. Levetiracetam inhibits the high-voltage-activated Ca(2+) current in pyramidal neurones of rat hippocampal slices. *Neuroscience letters*. 2001;306(1-2):5-8.
146. Yan HD, Ishihara K, Seki T, Hanaya R, Kurisu K, Arita K, et al. Inhibitory effects of levetiracetam on the high-voltage-activated L-type Ca(2)(+) channels in hippocampal CA3 neurons of spontaneously epileptic rat (SER). *Brain research bulletin*. 2013;90:142-8.

147. Lee CY, Chen CC, Liou HH. Levetiracetam inhibits glutamate transmission through presynaptic P/Q-type calcium channels on the granule cells of the dentate gyrus. *Br J Pharmacol.* 2009;158(7):1753-62.
148. Klitgaard H, Matagne A, Grimee R, Vanneste-Goemaere J, Margineanu DG. Electrophysiological, neurochemical and regional effects of levetiracetam in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Seizure.* 2003;12(2):92-100.
149. Christensen KV, Leffers H, Watson WP, Sanchez C, Kallunki P, Egebjerg J. Levetiracetam attenuates hippocampal expression of synaptic plasticity-related immediate early and late response genes in amygdala-kindled rats. *BMC neuroscience.* 2010;11:9.
150. Sills GJ, Leach JP, Fraser CM, Forrest G, Patsalos PN, Brodie MJ. Neurochemical studies with the novel anticonvulsant levetiracetam in mouse brain. *European journal of pharmacology.* 1997;325(1):35-40.
151. Gower AJ, Noyer M, Verloes R, Gobert J, Wulfert E. ucb L059, a novel anti-convulsant drug: pharmacological profile in animals. *European journal of pharmacology.* 1992;222(2-3):193-203.
152. Loscher W, Honack D, Bloms-Funke P. The novel antiepileptic drug levetiracetam (ucb L059) induces alterations in GABA metabolism and turnover in discrete areas of rat brain and reduces neuronal activity in substantia nigra pars reticulata. *Brain research.* 1996;735(2):208-16.
153. Rigo JM, Hans G, Nguyen L, Rocher V, Belachew S, Malgrange B, et al. The anti-epileptic drug levetiracetam reverses the inhibition by negative allosteric modulators of neuronal GABA- and glycine-gated currents. *Br J Pharmacol.* 2002;136(5):659-72.
154. Shetty AK. Prospects of levetiracetam as a neuroprotective drug against status epilepticus, traumatic brain injury, and stroke. *Frontiers in neurology.* 2013;4:172.
155. Kilicdag H, Daglioglu K, Erdogan S, Guzel A, Sencar L, Polat S, et al. The effect of levetiracetam on neuronal apoptosis in neonatal rat model of hypoxic ischemic brain injury. *Early human development.* 2013;89(5):355-60.
156. Komur M, Okuyaz C, Celik Y, Resitoglu B, Polat A, Balci S, et al. Neuroprotective effect of levetiracetam on hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery.* 2014;30(6):1001-9.

157. Talos DM, Chang M, Kosaras B, Fitzgerald E, Murphy A, Folkerth RD, et al. Antiepileptic effects of levetiracetam in a rodent neonatal seizure model. *Pediatric research*. 2013;73(1):24-30.
158. Lee DS, Ryu HJ, Kim JE, Choi HC, Kim YI, Song HK, et al. The effect of levetiracetam on status epilepticus-induced neuronal death in the rat hippocampus. *Seizure*. 2013;22(5):368-77.
159. Hanon E, Klitgaard H. Neuroprotective properties of the novel antiepileptic drug levetiracetam in the rat middle cerebral artery occlusion model of focal cerebral ischemia. *Seizure*. 2001;10(4):287-93.
160. Marini H, Costa C, Passaniti M, Esposito M, Campo GM, Ientile R, et al. Levetiracetam protects against kainic acid-induced toxicity. *Life sciences*. 2004;74(10):1253-64.
161. Kim JE, Choi HC, Song HK, Jo SM, Kim DS, Choi SY, et al. Levetiracetam inhibits interleukin-1 beta inflammatory responses in the hippocampus and piriform cortex of epileptic rats. *Neuroscience letters*. 2010;471(2):94-9.
162. Zou H, Brayer SW, Hurwitz M, Niyonkuru C, Fowler LE, Wagner AK. Neuroprotective, neuroplastic, and neurobehavioral effects of daily treatment with levetiracetam in experimental traumatic brain injury. *Neurorehabilitation and neural repair*. 2013;27(9):878-88.
163. Wang H, Gao J, Lassiter TF, McDonagh DL, Sheng H, Warner DS, et al. Levetiracetam is neuroprotective in murine models of closed head injury and subarachnoid hemorrhage. *Neurocritical care*. 2006;5(1):71-8.
164. Cardile V, Pavone A, Gulino R, Renis M, Scifo C, Perciavalle V. Expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in rat astrocyte cultures treated with Levetiracetam. *Brain research*. 2003;976(2):227-33.
165. Dagonnier M, Laute MA, Pandolfo M, Manto M. Effects of levetiracetam on the production of nitric oxide--an in vivo study. *Journal of neurology*. 2005;252(6):727-30.
166. Ueda Y, Doi T, Takaki M, Nagatomo K, Nakajima A, Willmore LJ. Levetiracetam enhances endogenous antioxidant in the hippocampus of rats: in vivo evaluation by brain microdialysis combined with ESR spectroscopy. *Brain research*. 2009;1266:1-7.
167. Estevez AG, Spear N, Manuel SM, Radi R, Henderson CE, Barbeito L, et al. Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor

- deprivation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1998;18(3):923-31.
168. Estevez AG, Kamaid A, Thompson JA, Cornwell TL, Radi R, Barbeito L, et al. Cyclic guanosine 5' monophosphate (GMP) prevents expression of neuronal nitric oxide synthase and apoptosis in motor neurons deprived of trophic factors in rats. *Neuroscience letters*. 2002;326(3):201-5.
 169. Estevez AG, Spear N, Manuel SM, Barbeito L, Radi R, Beckman JS. Role of endogenous nitric oxide and peroxynitrite formation in the survival and death of motor neurons in culture. *Progress in brain research*. 1998;118:269-80.
 170. Oliveira AA, Almeida JP, Freitas RM, Nascimento VS, Aguiar LM, Junior HV, et al. Effects of levetiracetam in lipid peroxidation level, nitrite-nitrate formation and antioxidant enzymatic activity in mice brain after pilocarpine-induced seizures. *Cellular and molecular neurobiology*. 2007;27(3):395-406.
 171. Katz I, Kim J, Gale K, Kondratyev A. Effects of lamotrigine alone and in combination with MK-801, phenobarbital, or phenytoin on cell death in the neonatal rat brain. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2007;322(2):494-500.
 172. Glauser TA, Ayala R, Elterman RD, Mitchell WG, Van Orman CB, Gauer LJ, et al. Double-blind placebo-controlled trial of adjunctive levetiracetam in pediatric partial seizures. *Neurology*. 2006;66(11):1654-60.
 173. Privitera M. Efficacy of levetiracetam: a review of three pivotal clinical trials. *Epilepsia*. 2001;42 Suppl 4:31-5.
 174. Opp J, Tuxhorn I, May T, Kluger G, Wiemer-Kruel A, Kurlemann G, et al. Levetiracetam in children with refractory epilepsy: a multicenter open label study in Germany. *Seizure*. 2005;14(7):476-84.
 175. Perry MS, Benatar M. Efficacy and tolerability of levetiracetam in children younger than 4 years: a retrospective review. *Epilepsia*. 2007;48(6):1123-7.
 176. Furwentsches A, Bussmann C, Ramantani G, Ebinger F, Philippi H, Poschl J, et al. Levetiracetam in the treatment of neonatal seizures: a pilot study. *Seizure*. 2010;19(3):185-9.
 177. Grosso S, Franzoni E, Coppola G, Iannetti P, Verrotti A, Cordelli DM, et al. Efficacy and safety of levetiracetam: an add-on trial in children with refractory epilepsy. *Seizure*. 2005;14(4):248-53.

178. Krief P, Li K, Maytal J. Efficacy of levetiracetam in children with epilepsy younger than 2 years of age. *Journal of child neurology*. 2008;23(5):582-4.
179. Striano P, Coppola A, Pezzella M, Ciampa C, Specchio N, Ragona F, et al. An open-label trial of levetiracetam in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Neurology*. 2007;69(3):250-4.
180. Shoemaker MT, Rotenberg JS. Levetiracetam for the treatment of neonatal seizures. *Journal of child neurology*. 2007;22(1):95-8.
181. Khan O, Chang E, Cipriani C, Wright C, Crisp E, Kirmani B. Use of intravenous levetiracetam for management of acute seizures in neonates. *Pediatric neurology*. 2011;44(4):265-9.
182. Merhar SL, Schibler KR, Sherwin CM, Meinzen-Derr J, Shi J, Balmakund T, et al. Pharmacokinetics of levetiracetam in neonates with seizures. *The Journal of pediatrics*. 2011;159(1):152-4.e3.
183. Ramantani G, Ikonomidou C, Walter B, Rating D, Dinger J. Levetiracetam: safety and efficacy in neonatal seizures. *European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society*. 2011;15(1):1-7.
184. Romijn HJ, Hofman MA, Gramsbergen A. At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby? *Early human development*. 1991;26(1):61-7.
185. Dobbing J. The later growth of the brain and its vulnerability. *Pediatrics*. 1974;53(1):2-6.
186. Eken A. Rat Kan ve Doku Örneklerinde Oksidatif Stres Parametreleri. In: Yücel O, Genç O, editors. *Küçük Deney Hayvanlarından Rat*. Ankara: Derman Tıbbi Yayıncılık; 2012. p. 69-73.
187. Chianeh YRP, K. Protein Thiols as an Indicator of Oxidative Stress. *Archives Medical Review Journal*. 2014;23(3):443-56.
188. Aebi H. [13] Catalase in vitro. *Methods in enzymology*. 1984;105:121-6.
189. Hu ML, Louie S, Cross CE, Motchnik P, Halliwell B. Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1993;121(2):257-62.

190. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1959;82(1):70-7.
191. Rekling JC. Neuroprotective effects of anticonvulsants in rat hippocampal slice cultures exposed to oxygen/glucose deprivation. *Neuroscience letters*. 2003;335(3):167-70.
192. Hosford GE, Olson DM. Effects of hyperoxia on VEGF, its receptors, and HIF-2alpha in the newborn rat lung. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2003;285(1):L161-8.
193. Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(18):11946-50.
194. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1999;19(14):5731-40.
195. Jin KL, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(18):10242-7.
196. Trollmann R, Schneider J, Keller S, Strasser K, Wenzel D, Rascher W, et al. HIF-1-regulated vasoactive systems are differentially involved in acute hypoxic stress responses of the developing brain of newborn mice and are not affected by levetiracetam. *Brain research*. 2008;1199:27-36.
197. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007;39(1):44-84.
198. Amir Aslani B, Ghobadi S. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life sciences*. 2016;146:163-73.
199. Thomas JA, Poland B, Honzatko R. Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1995;319(1):1-9.