

T.C.

Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

**HİPOKSİK-İSKEMİK ENSEFALOPATİ
MODELİ OLUŞTURULAN YENİDOĞAN
SIÇANLARDA SODYUM HİDROSÜLFİTİN
(NaHS) ANTIOKSİDAN ETKİNLİĞİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

DR. BERKE CEBECİ

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

DR. ÖĞR. ÜYE. E. ESİN YALINBAŞ

KÜTAHYA-2018

TEŞEKKÜR

KSBÜ Tıp Fakóltesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum uzmanlık eğitimim boyunca sürekli desteklerini gördüğüm, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, tez danışmanım, değerli hocam Dr. Öğr. Üye. Emine Esin YALINBAŞ'a; uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, her zaman desteğini gördüğüm değerli hocam Dr. Öğr. Üye. Saime ERGEN DİBEKLİOğLU'na, en içten saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamın biyokimyasal analizlerini yapan ve istatistiklerin yapımında yardımlarını ve değerli bilgilerini esirgemeyen Doç. Dr. Raziye AKCILAR'a, tezimin patolojik değerlendirilmelerinde tecrübesi ve bilgisiyle destek olan Doç. Dr. Mehmet Hüseyin METİNEREN'e teşekkür ederim. Asistanlık dönemim boyunca sağladıkları destek ve dostluk için birlikte çalıştığım bütün asistan arkadaşlarıma; iyi ve kötü günümde daima yanımda olup, destek olan eşime ve aileme teşekkür ederim.

Dr. Berke CEBECİ
Kütahya 2018

ÖZET

Hipoksik-İskemik Ensefalopati Modeli Oluşturulan Yenidoğan Sıçanlarda Sodyum Hidrosülfid (NaHS) Antioksidan Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Perinatal dönemde oluşan hipoksik iskemik beyin hasarı (HİBH) yenidoğan ölümlerinin ve engellilik hallerinin önde gelen nedenlerinden biridir. Hipoksi-iskemi ve reperfüzyon sırasında oluşan reaktif oksijen radikallerinin (ROS) oluşturduğu hasar sonucu gerçekleşen hücre ölümü HİBH'nin başlıca nedenidir. Bu döneme geçmeden önce verilecek tedaviler ile hasarı önlemek ya da azaltmak mümkün olabilir. Hidrojen sülfid (H₂S)'in, kalp, karaciğer, beyin gibi birçok dokuda reperfüzyon dönemindeki ROS hasarına karşı koruma sağladığı gösterilmiştir. Bir H₂S vericisi olan sodyum hidrosülfid (NaHS) apoptozisi, nitrik oksit ve serbest radikal üretimini azaltarak etkin olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada hipoksik-iskemik ensefalopati modeli oluşturulan sıçanlarda NaHS'nin antioksidan etkinliğinin ve nöronal apoptozis üzerine etkisinin histopatolojik ve biyokimyasal testlerle, değerlendirilmesi planlandı.

Çalışmamız yedi günlük sprague-dawley cinsi kırk adet sıçan üzerinde yapıldı. Levine-Rice metoduna göre hipoksik iskemi oluşturulan yedi günlük sıçanlar rastgele dört gruba ayrıldı. Grup 1 (n:10) sıçanlara arter ligasyonu ve hipoksi uygulanmadı. Grup 2 (n:10) sıçanlara hipoksik-iskemiden sonra serum fizyolojik (SF) intraperitoneal (ip) yolla verildi. Grup 3 (n: 10) sıçanlara hipoksik-iskemiden yarım saat sonra tek doz 50 µmol/kg NaHS ip yolla verildi. Grup 4 (n:10) sıçanlara hipoksik-iskemiden yarım saat sonra tek doz 100 µmol/kg NaHS ip yolla verildi. Sıçanlar uygulamanın 5. saatinde dekapitasyonla beyin dokuları, histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirme için ayrıldı. Elde edilen verilerin analizinde SPSS-23 programı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyini için p<0.05 anlamlı kabul edildi.

Dokular histopatolojik olarak hemotoksilen-eozin (H&E) ve TUNEL yöntemleriyle değerlendirdik. Her iki yöntemde de Grup 2'ye göre, Grup 3 ve Grup 4'de bulunan sıçanların beyin dokusundaki apoptotik hücre sayıları azalmış olarak bulduk (p=0.00).

Ayrılan dokulardan TNF-α, IL-6, iNOS, NGF, Total Antioksidan Status (TAS), Total Oksidan Status (TOS), Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) düzeyleri çalışıldı.

Yapılan değerlendirilmede Grup 2 ye göre Grup 3 ve 4 de TNF- α , IL-6, iNOS düzeylerinde azalma, NGF de artma saptandı. (p=0.34, p=0.24, p=0.26, p=0.110). TOS, TAS, OSİ düzeyleri karşılaştırıldığında ise Grup 2 ye göre Grup 3 ve 4 TAS ve OSİ de artma, TOS da azalma olduğunu gördük (p=0.04, p=0.00, p=0.032).

Sonuç olarak bu çalışmada hipoksik-iskemik ensefalopati modeli oluşturduğumuz yenidoğan sıçanlarda verilen NaHS'nin antioksidan etkisiyle, nronlardaki apopitozu anlamlı Şekilde azalttığını saptadık.

Anahtar Kelimeler: Hipoksik-iskemik ensefalopati, yenidoğan, NaHS, antioksidan



ABSTRACT

Evaluation of Sodium Hydrosulfite (NaHS) Antioxidant Activity in Newborn Rats with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy

Hypoxic ischemic brain injury (HIBD) in the perinatal period consists of neonatal deaths and major causes of disability. Damage caused by reactive oxygen radicals (ROS) for hypoxia-ischemia and reperfusion is as much the cause of death as the cause of death. It can be given before proceeding with this period. Any disease can be appropriate. In hydrogen sulfide (H₂S), it provides protection against ROS damage during reperfusion period such as heart, liver, brain. The aim of this study is to evaluate the effects of hypoxic-ischemic encephalopathy model on neuronal apoptosis with histopathological and biochemical tests.

Our study was carried out on forty rats of sprague-dawley species for seven days. According to the Levine-Rice method, seven-day-old rats with hypoxic ischemia were randomly divided into four groups. Arterial ligation and hypoxia were not applied to rats in Group 1 (n:10). Group 2 (n:10) was given to the rats after hypoxic-ischemia in a physiological saline (SF). Group 3 (n: 10) rats were given a single dose of 50 µmol/kg NaHS ip half an hour after hypocytic-ischemia. Group 4 (n:10) rats were given a single dose of 100 µmol/kg NaHS ip half an hour after hypoxic-ischemia. Rats were disengaged for brain tissue, histopathological and biochemical evaluation by decapitation at the 5th hour of administration. The data were analyzed by using SPSS-23 program. For statistical significance, $p < 0.05$ was considered as significant.

The tissues were histopathologically evaluated with hematoxylin-eosin (H & E) and TUNEL methods. In both methods, the rats in Group 3 and Group 4 had decreased apoptotic cell numbers in the brain tissue ($p = 0.00$).

TNF- α , IL-6, iNOS, NGF, Total Antioxidant Status (TAS), Total Oxidant Status (TOS), Oxidative Stress Index (OSI) levels were determined. According to Group 2, TNF- α , IL-6, iNOS levels were decreased and NGF levels increased in Group 3 and 4 groups. ($p = 0.34$, $p = 0.24$, $p = 0.26$, $p = 0.110$). When TOS, TAS and OSI levels were compared, it was seen that Group 3 and 4 TAS and OSI increased and TOS decreased according to Group 2 ($p = 0.04$, $p = 0.00$, $p = 0.032$).

In conclusion, we found that NaHS in hypoxic-ischemic encephalopathy model decreased the apoptosis in neurons with antioxidant effect of NaHS.

Keywords: Hypoxic-ischemic encephalopathy, newborn, NaHS, antioxidant



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ii
İNGİLİZCE ÖZET.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMA VE SİMGELER.....	ix
ŞEKİLLER.....	xii
TABLOLAR.....	xiv
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
1. GENEL BİLGİLER.....	3
1.1.Tanımlar.....	3
1.1.1.Hipoksik İskemik Ensefalopati.....	3
1.1.2.Hipoksi ve Anoksi.....	3
1.1.3. İskemi.....	3
1.1.4.Perinatal Asfiksi.....	3
1.2. Epidemiyoloji.....	4
1.3. Patofizyoloji.....	4
1.3.1.Hipoksik- İskemik Hasarda Sistemik Adaptasyon.....	4
1.3.2.Ön Koşullanma.....	5
1.3.3.Perinatal Hipoksik- İskemik Beyin Hasarı Patogenezi.....	5
1.3.4.Sekonder Nöron Hasarı.....	7
1.3.5.İnsan Çalışmaları.....	10
1.3.6.Seçici Duyarlılık.....	10
1.3.7.Hücreyel Duyarlılık.....	11
1.3.8.Matürite.....	11
1.3.9.Vasküler Değişikliklere Bağlı Hasar.....	11

1.3.10. Bölgesel Duyarlılık.....	11
1.4. Hipoksik- İskemik Hasarın Tipleri.....	12
1.4.1. Nöropatoloji	12
1.5. Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Tanı Yöntemleri	14
1.5.1. Klinik Değerlendirme.....	14
1.5.2. Nörofizyoloji	17
1.6. Tedavi.....	22
1.6.1. Multisistemik Yaklaşım	23
1.6.2. Nöroprotektif Yaklaşım.....	25
1.6.3. Nöbetlerin Kontrol Altına Alınması.....	26
1.6.4. Serebral Ödem.....	27
1.6.5. Spesifik Nöroprotektif Tedavi.....	28
1.6.6. Diğer Tedavi Stratejileri.....	29
1.6.7. H ₂ S	30
1.7. Prognositik Faktörler	31
1.7.1. Doğumdaki Apgar Skoru	31
1.7.2. Asidoz.....	32
1.7.3. Ensefalopatinin Şiddeti	32
2. HIPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI HAYVAN MODELİ	33
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	34
3.1. Hipoksik İskemik Beyin Hasarının Oluşturulması.....	34
3.2. Deney Planı	35
3.3. İlaç Uygulama Yöntemi	35
3.4. Örneklerin Toplanması.....	35
3.5. Histopatolojik değerlendirme	36
3.5.1. TdT-dUTP Nick-End-Labeling (TUNEL) Yöntemi	36
3.5.2. Apoptozisin Değerlendirilmesi	36
3.5.3. Doku Örneklerinin Hazırlanması	37

3.6.	Biyokimyasal Ölçüm Yöntemleri.....	37
3.6.1.	Total Oksidan Status (TOS) Ölçümü	37
3.6.2.	Total Antioksidan Status (TAS) Ölçümü	38
3.6.3.	Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)	40
3.6.4.	Beyin Dokularından Total RNA İzolasyonu ve Komplementer DNA (cDNA) Sentezi.....	40
3.7.	İstatiksel Analiz:.....	45
4.	BULGULAR.....	46
4.1.	Histopatolojik Bulgular	47
4.1.1.	H&E Yöntemiyle Beyindeki Apoptotik Hücrelerin Değerlendirilmesi.	47
4.1.2.	TUNEL Yöntemiyle Beyindeki Apoptotik Hücrelerin Değerlendirilmesi	49
4.2.	Biyokimyasal Bulgular.....	51
4.2.1.	Beyin dokusunda TNF- α , IL-6, NGF ve iNOS geni mRNA ekspresyon düzeyleri.....	51
4.2.2.	Beyin Doku TAS, TOS ve OSİ Konsantrasyonları.....	54
5.	TARTIŞMA	59
6.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	66
7.	KAYNAKLAR	69

KISALTMA VE SİMGELER

- aEEG:**Amplütüd Elektroensefalografi
AU:Arbitrary Unit
BAEPs: Brainstem Auditory Evoked Potentials
BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor
BOS:Beyin Omurilik Sıvısı
BT:Bilgisayarlı Tomografi
Ca:Kalsiyum
CD-68:Cluster of Diffentiation-68
cDNA: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
CO₂:Karbondioksit
Ct:Threshold Cycle
DNA: Deoksiribo Nükleik Asid
EEG: Elektroensefalografi
EFM:Elektronik Fetal Monitörizasyon
ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
eNOS: Endothelial Nitric Oxide Synthase
EPO:Eritropoetin
FVEP: Flash Visual Evoked Potential.
GFAP:Glial Fibrin Asidik Protein
H&E: Hemotoksilen Eozin
H₂S: Hidrojen Sülfür
HIF-1 α :Hipoksi İndüklenebilir Faktör-1 α
HİBH: Hipoksik- İskemik Beyin Hasarı
HİE:Hipoksik-iskemik Ensefalopati
HsCRP: High Sensitivity C-Reactive Protein
ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1
IL-18: İnterlökin-18
IL-1 β :İnterlökin 1- β
IL-6: Intelökin 6

IL-8: İnterlökin-8
İ.P. : İntraperitonel
iNOS: Inducible Nitric Oxide Synthase
LDH:Laktat Dehidrogenaz
MBP: Myelin Basic Protein
MDA:Malondialdehit
MgSO₄:Magnezyum Sülfat
MMP:Matrix Metalloproteinaz
MRG: Manyetik Rezonans Göüntüleme
mRNA:Messenger Ribonükleik Asit
MRS:Manyetik Rezonans Spektroskopisi
N⁺/K⁺ ATPaz:Sodyum Potasyum Adenin Trifosfataz
NAD⁺/NADH: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NaHS: Sodyum Hidrosülfid
NGF: Nerve Growth Factor
NMDA: N-methyl-D-aspartate
nNOS: Neuronal Nitric Oxide Synthase
NO:Nitrit Oksit
NOS: Nitrik Oksid Sentaz
NOX: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oksidaz
NSE:Nöron Spesifik Enolaz
OGD:Oksijen-glukoz Determinasyon
OSİ: Oksidatif Stres İndeksi
PaCO₂: Parsiyel Karbondioksit Basıncı
PAF: Platelet-Activating Factor
PaO₂: Parsiyel Oksijen Basıncı
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA:Ribonükleik Asit
ROS: Reactive Oxygen Species
SEP: Somatosensory Evoked Potential
SGOT:Serum Glutamik Oksaloasetik Transaminaz

SOD:Süper Oksid Dismutaz

SOR: Serbest Oksijen Radikali

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

TAS: Total Antioksidan Status

TNF: Tümör Nekrozis Faktör

TOS: Total Oksidan Status

TUNEL: TdT-dUTP nick-end-labelling

UCH-L1: Ubiquitin Carboxy-Terminal Hydrolase L1

VEGF:Vasküler Endotelyal Growth Faktör

VEPs: Visual Evoked Potentials



ŞEKİLLER

Şekil 1-1: Hipoksik-İskemi Beyin Hasarı Patogenezi.....	7
Şekil 1-2 Sodyum hidrosülfid molekül yapısı.....	31
Şekil 4-1 H&E Yöntemi Kontrol Grubu	48
Şekil 4-2 H&E Yöntemi Hİ Oluşturulan Grup	48
Şekil 4-3 H&E Yöntemi 50 µmol/kg NaHS	48
Şekil 4-4 H&E Yöntemi 100 µmol/kg NaHS	48
Şekil 4-5 H&E yöntemi ile beyin dokusunda saptanan apoptotik nöronların gruplara göre dağılımı.	48
Şekil 4-6 TUNEL Yöntemi Kontrol Grubu	50
Şekil 4-7 TUNEL Yöntemi Hİ Oluşturulan Grup.....	50
Şekil 4-8 TUNEL Yöntemi 50 µmol/kg NaHS.....	50
Şekil 4-9 TUNEL Yöntemi 100 µmol/kg NaHS.....	50
Şekil 4-10 TUNEL yöntemi ile beyin dokusunda saptanan apoptotik nöronların gruplara göre dağılımı.	50
Şekil 4-11 Çalışma gruplarında ölçülen TNF-α gen mRNA ekspresyon konsantrasyonları	51
Şekil 4-12 Çalışma gruplarında ölçülen IL-6 gen mRNA ekspresyon konsantrasyonları	52
Şekil 4-13 Çalışma gruplarında ölçülen NGF gen mRNA ekspresyon konsantrasyonları	53
Şekil 4-14 Çalışma gruplarında ölçülen iNOS gen mRNA ekspresyon konsantrasyonları	54
Şekil 4-15 Çalışma gruplarında ölçülen Total Antioksidan Status (TAS) konsantrasyonları	56
Şekil 4-16 Çalışma gruplarında ölçülen Total Oksidan Status (TOS) konsantrasyonları	57
Şekil 4-17 Çalışma gruplarında ölçülen Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) konsantrasyonları	58

TABLULAR

Tablo 1-1 Modifiye Sarnat Sınıflaması.....	16
Tablo 1-2 Thompson Skorlama Sistemi.....	17
Tablo 3-1 TOS için Ölçüm Prosedürü	38
Tablo 3-2 TAS için Ölçüm Prosedürü	39
Tablo 3-3 TNF-alfa, IL-6, NGF, iNOS ve β -aktin mRNA ekspresyon analizinde kullanılan özgün problrarının ve primer setlerinin dizilimleri (5'→3').....	43
Tablo 3-4 TNF-alfa, IL-6, NGF, iNOS ve β -aktin genlerinin mRNA düzeyinde kantitasyonu amacı ile hazırlanan reaksiyon karışımı	44
Tablo 3-5 TNF-alfa, IL-6, NGF, iNOS ve β -aktin genlerinin mRNA düzeyinde kantitasyonu amacı ile uygulanan gerçek-zamanlı PCR protokolü	44
Tablo 4-1 Çalışma gruplarında ölçülen Total Antioksidan Status (TAS), Total Oksidan Status (TOS) ve Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) konsantrasyonları	55

GİRİŞ VE AMAÇ

Perinatal asfiksi, plasenta yoluyla fetüse giden oksijen miktarının azalması sonucu doku zedelenmesine yol açması durumunu tanımlamak için kullanılır. Bu durum fetüste hiperkapni ve hipoksinin birlikte oluşmasına neden olur. Perinatal asfiksi sonrası hipoksik-iskemik ensefalopati (HİE) (literatürde de perinatal hipoksi-iskemi veya asfiksi neonatorum olarak da tanımlanmıştır.) 1000 canlı doğumda 2-9'dur(1). Türkiye'de, Türk Neonatoloji Derneği Hipoksik İskemik Ensefalopati Çalışma Grubu'nun 2008 yılında yayımladığı verilere göre binde 2.6, yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalar içinde %1.2 olarak saptanmıştır (2). HİE, yenidoğan döneminde meydana gelen ölümlerin, yenidoğan dönemi sonrası gelişen serebral palsi, mental retardasyon ve epilepsinin önde gelen nedenlerinden biridir.

Perinatal asfiksiyi takiben gelişen irreversibl hasar ve ölüm insidansı yüksektir, bu nedenle oluşan hasarı önlemek amacıyla nöroprotektif stratejiler üzerinde durulmaktadır. Terapötik hipotermi, çeşitli çalışmalarca da kanıtlandığı gibi nöroprotektiftir, perinatal asfiksi ve ensefalopatisi olan term ve geç preterm yenidoğanlarda standart tedavidir (3). Devam eden çalışmalarda, hipotermimin nöroprotektif etkisini arttırmak için ilave stratejiler hedeflenmektedir (4). Serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşumunun engellenmesi, serbest oksijen radikallerini ortadan kaldıran ajanlar (Selenyum, E vitamini, N-Asetilsistein, Askorbik asit), kök hücre nakli, deksametazon, kalsiyum kanal blokörleri uygulanması, magnezyum sülfat ve antiepileptik ilaçlar bunlara örnek olarak verilebilir (5).

Hayvanlarda yapılan çalışmalarda, preterm bir yenidoğanın beyninin, term bir yenidoğanın beynine göre hipoksi-iskemiye daha dirençli olduğu gösterilmiştir. Daha düşük bir serebral metabolik hız; potansiyel nörotoksositeye sahip nörotransmitterlere daha düşük hassasiyet ve immatür santral sinir sisteminin daha fazla olan plastisitesinin preterm yenidoğanlarda daha az hasar oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir.

Hidrojen Sülfür (H_2S); yeni bir gaz molekülü olarak sinir sistemi ve kardiyovasküler aktivitenin düzenlenmesinde önemli bir rol almaktadır (6). Endojen H_2S direkt merkezi sinir sisteminde rol almakla birlikte ayrıca serebral vasküler duvarın düz kas kontraktilitesini düzenleyerek beyne kan gitmesini sağlamakla dolaylı olarak da merkezi sinir sistemini etkilemektedir (7). Beyindeki endojen H_2S , sisteinin sistation β -sentez katalizi sonucunda oluşur. Fizyolojik konsantrasyondaki H_2S , sinir sistemi içindeki çeşitli oksitleyici maddelerin oluşumunun engellenmesi ve temizlenmesinde; oksidatif stres kaynaklı hücre hasarının azaltılmasında ve nöronal korumada etkilidir (8). Sodyum Hidrosülfür ($NaHS$), ekzojen H_2S 'in vericisi olup kan emiliminden sonra direkt hidrojen sülfüre dönüşebilir. Yapılan araştırmalarda; $NaHS$ 'nin miyokardiyal, böbrek, karaciğer, kalın barsakda iskemi-reperfüzyon hasarı sırasında hedef organda oluşabilecek hasarı azaltabildiği, antiinflamatuvar, antiapoptotik ve antioksidan olarak önemli bir rol oynadığı saptanmıştır (9, 10). Son yıllarda yapılan birçok araştırmalarda (8, 9) $NaHS$ 'ün serebral iskemi hasarında nöroprotektif ve antioksidan etkinliğinin olduğu farkedilmiş ancak tam olarak netleştirilememiştir. Bu çalışmada, HİBH oluşturulan yenidoğan sıçanlarda nöroprotektif olarak $NaHS$ 'in, nöronal apoptozis üzerine etkisinin histopatolojik ve biyokimyasal testlerle, değerlendirilmesi amaçlandı.

1. GENEL BİLGİLER

1.1.Tanımlar

1.1.1. Hipoksik İskemik Ensefalopati

Neonatal ensefalopati, 35. gebelik haftası ve sonrasında doğmuş, erken yenidoğan döneminde ortaya çıkan, bilinç bozukluğu veya konvülsiyonlarla kendini gösteren, solunum depresyonu ve hipotoni ile karakterize heterojen klinik bir sendrom olarak tanımlanmıştır (2). Daha önce, asfiksiyal ensefalopati terimi de kullanılmıştır. HİE klinik bulgulara bağlı olarak hafif, orta ve ağır olmak üzere sınıflandırılmıştır. Literatürde en yaygın olarak Sarnat ve Sarnat sınıflandırılması kullanılmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, klinik şiddeti değerlendirmek için de Thompson puanlama sistemi geliştirilmiştir.

1.1.2. Hipoksi ve Anoksi

Kanda ve beyin dokusunda oksijenin normalden az olması hipoksi, oksijenin tam yokluğu ise anoksi olarak tanımlanır (11).

1.1.3. İskemi

İskemi, bir doku veya organdaki kan akımının azalması veya kesilmesini ifade eder. İskemi oluştuğunda dokuya yeterli oksijen ve glukoz sağlanamadığı ve toksik metabolitler uzaklaştırılamadığı için hipoksiye göre daha ağır bir hasara neden olur (12).

1.1.4. Perinatal Asfiksi

Yunanca boğulma kelimesinden gelen asfiksi terimi, plasenta yoluyla fetüse giden oksijen miktarının azalmasını tanımlamak için kullanılır. Bu durum fetüste hiperkapni ve hipoksinin birlikte oluşmasına neden olur. Beraberinde dakikalar içinde anaerobik glikoliz ve sonucunda laktik asidin ortaya çıkmasıyla da metabolik asidoz tablosu oluşur. Ek olarak, bu duruma iskeminin de eşlik etmesiyle fetal bradikardi oluşur, bu da hipoksi ve hiperkapniyi artırır.

1.2. Epidemiyoloji

Obstetrik ve yenidoğan bakımındaki önemli gelişmelere rağmen, HİE insidansı, 1000 canlı doğumda 2-9'dur. Türkiye'de, Türk Neonatoloji Derneği Hipoksik İskemik Ensefalopati Çalışma Grubu'nun 2008 yılında yayımladığı veriye göre, 19857 canlı doğumda 93 bebek HİE tanısı altında incelenmiş, sıklık binde 2.6, yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalar içinde %1.2 olarak saptanmıştır (2). Her ne kadar HİE, sadece perinatal dönemde devam eden beyin hasarından kaynaklandığı düşünülse de son veriler, neonatal beyin hasarının sadece %10'unun perinatal veya intrapartum olaylarla ilişkili olduğunu göstermektedir.

1.3. Patofizyoloji

1.3.1. Hipoksik- İskemik Hasarda Sistemik Adaptasyon

Ciddi fetal hipoksik iskemik hasar tüm organizmayı etkiler ve bu etkiler hayvan modellerinde de gösterilmiştir (12, 13). Hipoksik-iskemik hasar perinatal, natal veya postnatal herhangi bir zamanda ortaya çıkabilir. Bu durum maternal, uteroplental veya fetal problemlerden kaynaklanabilir.

Gebeliğin ilk trimesterinde oluşan uteroplental hipoksi nedeniyle fetüste ağır beyin hasarı oluşurken, sağ kalım oranı yüksektir, bu durum gebeliğin 2. trimesterinde meydana gelirse sağ kalım oranı daha düşüktür. Serebral hipoksi-iskeminin nedeni ne olursa olsun, nöropatolojik sonuç genellikle yıkıcıdır.

Term bir yenidoğanda, hafif ile orta derecede hipoksemi periyodu, tutarlı bir tepki modeli oluşturur. Başlangıçta kan basıncında ani bir yükselme ile birlikte fetal bradikardi ve özellikle de vücudun geri kalan kısmına oranla beyin ve diğer hayati organlara perfüzyonda artış olur. Devam eden hipoksemi ile birlikte, fetal bradikardi daha da artar, sonrasında apne oluşur. Takip eden 10 ile 15 dakika içinde kalıcı beyin hasarı meydana gelir. Bu da yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Fetus hafif hipoksemiye çok daha dirençlidir. Parsiyel oksijen basıncı (PaO₂) 15 mm Hg olduğunda bile normal kardiyovasküler fonksiyonun bir saate kadar korunduğu gösterilmiştir. (Normal fetal PaO₂ 25 mm Hg'dir). Uzamış hipoksiye bağlı olarak serebral perfüzyon normal kalır, asimetric büyüme geriliği ortaya çıkar. Hipoksinin şiddeti arttıkça, bölgesel serebral kan akımında değişiklikler meydana gelir. Çok düşük PaO₂'de bile, metabolizmayı sürdürmek için beyin parankimi oksijensiz bırakılarak beyin sapı oksijenizasyonu sağlanır. Miyokardiyal fonksiyonun yetersiz olması kardiyak outputta düşmeye neden olabilir ve bu durum en çok serebral hemisferleri etkiler.

1.3.2. Ön Koşullanma

Hiposik- iskemik hasar tam olarak meydana gelmeden birkaç saat önce hipoksiye maruz kalmaya başlayan beyin hücrelerinde bir duyarsızlaşma başlar. Bu durum immatür beyin parankiminin hipoksiye olan direncini açıklamamızı sağlar. Bu durum ön koşullanma olarak tanımlanmaktadır (1). Ön koşullanma bu durumu hipoksi sırasında aktifleşen hipoksi-indüklenebilir faktör-1 α (HIF-1 α)'in eritropoezi, anjiyopoezi ve antiapoptozu kodlayan genleri uyarması yoluyla yapar.

1.3.3. Perinatal Hipoksik- İskemik Beyin Hasarı Patogenezi

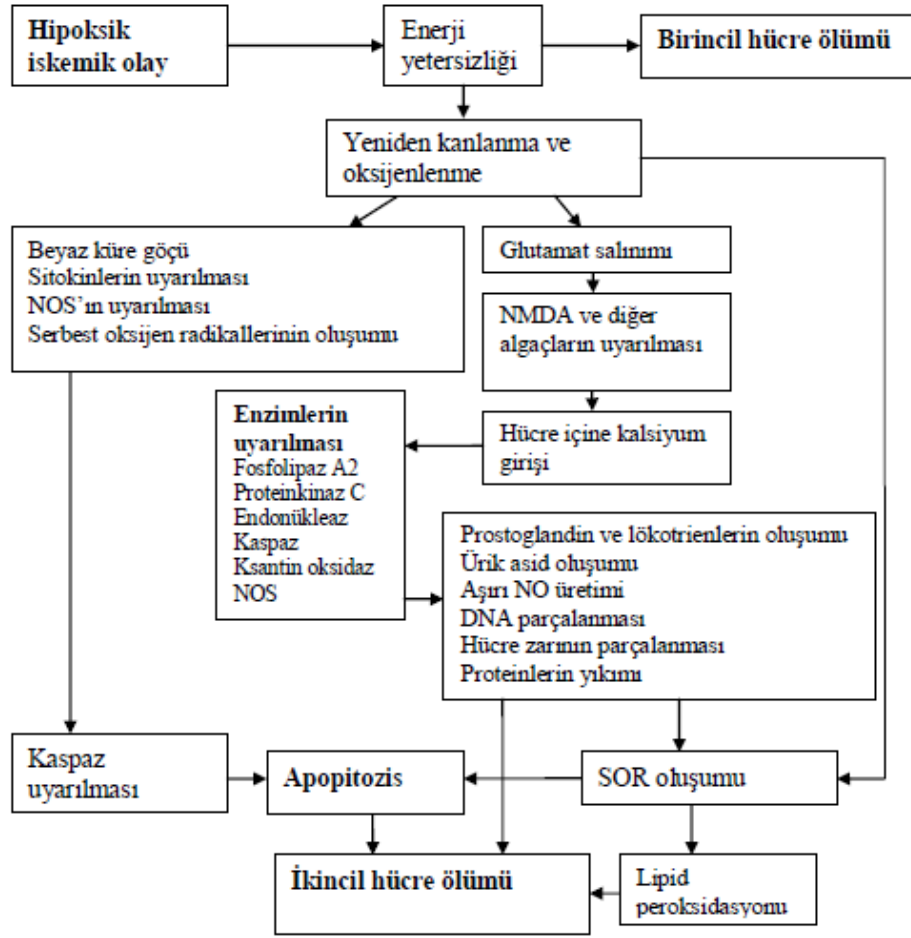
Son yıllarda yapılan çalışmalarda, yenidoğanlarda nöron kaybına yol açan süreçler daha detaylı olarak açıklanabilmektedir. Yetişkinlerin aksine, neonatal hipoksemi, serebral hipoksi (ve bradikardi sırasında iskemi), ardından takip eden reperfüzyon ve reoksijenizasyonun bir kombinasyonu ile karakterizedir. Reperfüzyonun serebral hasara olan katkısı daha iyi anlaşılabilirdi için, yenidoğan resüsitasyonu sırasında kullanılan oksijen miktarı da azaltılmıştır (1). Akut hipoksik-iskemik hasar, primer ve sekonder nöron hasarı olarak sınıflandırılabilir. Primer nöronal hasar, mikrodolaşım bozukluğu ve enerji üreten moleküler süreçlerin inhibisyonunun neden olduğu sitotoksik değişikliklerin bir sonucu olarak ortaya çıkar. Hücre içi asidozun artması ve Na⁺/K⁺- Adenozin trifosfataz(ATPaz) membran

pompasının devre dışı kalması, sitotoksik ödem ile birlikte hücrenin içine Na^+ ve Cl^- birikmesi ile sonuçlanır

Bununla birlikte serbest radikal üretimi başlar. Bu akut süreç nöronları nekroza götürür. Resüsitasyon sonrasında meydana gelen reperfüzyon, geç (ikincil) nöronal hasarın başlamasına neden olur. Bu akut süreç hücrenin enerji üretimindeki aksamaya bağlı olarak ortaya çıkar ve 72 saate kadar uzayabilir (1).

Hücre içi enerji üretim mekanizmasının bozulması ve bunun sonucu oluşan primer ve sekonder enerji yetmezliği, oluşan hasarın ana patogenezinin sorumludur. Bununla birlikte başlayan hücre ölümüne, moleküler ve hücre düzeyinde bakıldığında iki farklı faz tanımlanmıştır (2).

Birinci faz; reperfüzyon ve reoksijenasyon sırasında oluşur; ikinci faz ise saatler sonra başlar, bu süre 72 saati bulabilir. Birinci faz esnasında asfiksi, Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+)'ın hızlı bir şekilde NADH 'a indirgenmesine sebep olur. Hücre enerji ihtiyacı karşılanamayınca aerobikten yoldan anaerobik enerji üretimine doğru yönelir, bu da daha fazla glikoliz anlamına gelir ki, bu da laktat üretimindeki artışı açıklar (2). Artan laktik asit ve hidrojen iyonu hücre içi ve hücre dışı pH'nın düşmesine neden olur. Bununla birlikte hücrede üretilen ATP'nin azalması sonucu hücre membranında bulunan Na^+/K^+ ATPaz pompasının fonksiyonu bozulur. Hücre zarı iyon pompa işlevinde aksama hücre içinde sodyum, kalsiyum ve su birikimine neden olur ve nöronal hasar daha da artar (11). Bu durumda sinir hücrelerinin membran potansiyeli ortadan kalkar hücreler depolarize duruma geçer. Hipoksik-iskemik esfalopati patogenezi Şekil 1-1 de özetlenmiştir(11).



Şekil 1-1: Hipoksik-İskemi Beyin Hasarı Patogenezi

(NOS:Nitrik Oksit Sentaz,NMDA:N-metil D-aspartat,DNA: Deoksiribonükleik Asit)

1.3.4. Sekonder Nöron Hasarı

Hücre nekrozu veya apoptoz ile sonuçlanan, ilk hipoksik-iskemik hasar sonucunda kamaşık bir hücre içi olaylar zinciri tetiklenir.

1.3.4.1. Glutamat Hasarı

Hipoksi esnasında ekstrasellüler glutamattaki artma, NMDA reseptörlerini aktive eder ve hücre ölümüne neden olur. Glutamata bağlı iyon kanalları ile fazla miktarda Na^+ hücre içine girer, beraberinde Cl^- ve su hücre içine girerek osmotik lizise neden olur. İntrasellüler Ca^{2+} 'daki sürekli artış toksik kaskadı uyarır, bu da nekrotik

hücre ölümüne neden olur (2). Ca^{2+} 'nın hücre içindeki yüksek konsantrasyonu lipazları, proteazları, endonükleazları ve fosfolipaz C'yi aktive eder ve bu enzimler de organel membranlarını parçalar. Bu durum nitrik oksit(NO) dahil birçok serbest radikalın ortaya çıkmasına neden olur. Sonuçta, nihai son olan DNA fragmentasyonuna yol açar (1). Yapılan çalışmalar bu sürecin hayvanlarda insanlarınkinden farklı olduğunu göstermiştir. Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalar bu sürecin dişi ve erkek cinsiyet arasında farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Fakat insanlarda yapılan çalışmalar bu konuda yeterli değildir.

1.3.4.2. Serbest Radikal Formasyonu

Serbest radikaller hücrelerde yağ asitlerinin peroksidasyonuna neden olurlar. Özellikle fosfolipitten zengin beyin dokusu serbest radikal saldırısına oldukça duyarlıdır. Beyinde bulunan oksijen radikallerini yok etmekte görevli mekanizmalar immatür beyinde yeterince gelişmemiştir. Beyin arteriyol endoteli, ksantin oksidazın etkisiyle serbest radikal üretiminin ana kaynağıdır, bununla birlikte aktif nötrofiller, mikrogliya ve intranöronal yapılar tarafından da üretilir. Reperfüzyon sırasında arteriyol endoteli tarafından üretilen serbest radikaller platelet-aktive edici faktörün (PAF) aktifleşmesine, bu da trombosit adezyonuna ve nötrofil yığılmasına neden olur. Bununla birlikte serbest demir de serbest radikal hasarına neden olur (1). Yapılan rat çalışmalarında, immatür sıçanların transferrin seviyelerinin düşük olması dokularda serbest demir konsantrasyonunun artmasına neden olduğu gösterilmiştir. Serbest demirin daha az reaktif olan oksijen radikallerini daha reaktif serbest oksijen radikallerine çevirdiği gösterilmiştir (1). Hipoksik- iskemik olayların başlamasıyla birlikte birkaç saat içinde serbest demirin nöronlarda yükseldiği ve bu artışın haftalar boyunca devam ettiği gösterilmiştir.

Serbest radikal oluşumuna yol açan bir diğer önemli mekanizma da nöronlarda NO üretiminin artmasıdır. Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz (NOS) 'un tarafından üç yol ile üretilir: nöronal (nNOS), endotelial (eNOS) ve indüklenebilir (iNOS). NO üretimi, hücre içi Ca^{2+} akışı ile hızlanır ve yüksek konsantrasyonlarda nörotoksiktir (1). Nitrik oksit vasküler endoteldeki Ca^{2+} 'a bağlı K^+ kanalı üzerinden vasküler dilatasyon

yapar. Yüksek konsantrsyondaki NO, DNA da hasar ile birlikte, kaspaz-3 aktivasyonu ile aracılık edilen nöronal apoptoza neden olur. Bununla birlikte, endotelial hücrelerden (eNOS) gelen NO, serebral perfüzyonun sürdürülmesi için esastır.

1.3.4.3. Apoptoz

Apoptoz, hipoksi-iskemik ensefalopti patogeneğinde yeni doğanlarda belki de en önemli nöronal ölüm nedenidir. Apoptotik hücrede DNA yıkımı gelişir, bu da jel elektroforezinde karakteristik bir merdiven görünümü verir. Apoptoz öncelikli olarak kaspaz ailesi tarafından yürütülür ve kaspaz-3, ana proteini olarak tanımlanır. Kaspaz ailesi (spesifik proteazlar) öncü enzimler ile aktive olduktan sonra, nükleus, hücre iskeleti ve hücre içi sitozolik organelleri parçalamaya başlar. Apoptoza hücre zarında bulunan özel reseptörlerce başlatılır. Tümör nekrozis faktör reseptör ailesi ölüm reseptörleri olarak da bilinir. Fas ligandların TNF ailesinden bir üye tarafından bağlanması ile Fas aktivasyonuna neden olur (14). Aktifleşen p53 apoptozu kaskadını başlatır. Bu yolağın kaspas inhibitörleri ile apoptozu engelleyerek, hasarı azaltabileceği gösterilmiştir.

Nekroz ise, hücrenin akut gelişen hasar sonrası hemostazı sürdürememesi ile sonuçlanan hücre ölümüdür. Nekroz süreci hücre membranı hasarı sonrası, hücre içi iyon ve su oranının artması sonucu hücre parçalanmasıyla sonlanır. Nekroz apoptozdan farklı olarak programlanmış bir olay olmayıp ani oluşan olaylar sonucu meydana gelir (15). Çalışılan hayvan modelleri ile hipoksik iskemik ensefalopati sonrası gelişen apoptoz ve nekroz için nöroprotektif stratejiler geliştirilebilir. Bu tedaviler apoptotik enzimlerin inhibisyonu, hücre membrandaki reseptörlerin inhibisyonu, nöronal hasar sürecinde ortaya çıkan serbest oksijen radikallerin üretiminin önlenmesini sağlayan ilaçların bulunmasıyla bu sürecin engellenebileceği düşünülmektedir.

1.3.4.4. Sitokinler

Yapılan hayvan çalışmalarında bazı proinflamatuvar sitokinlerin (tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), interlökin (IL) -1 β ve IL-18) hipoksik iskemik ensefalopati de

özelliğe immatür beyinlerde nörotoksik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. HİE hasar sonrasında mikrogiallarda IL-8 ve kaspas-1 aktivasyonunun yaygın olduğu saptanmıştır. Elimizdeki bu bulgular hipoksi- iskeminin yol açtığı inflamatuvar sürecin nöronal hasara neden olabileceğidir (1).

Hayvanlarda ve insanlarda yapılan çalışmalarda gram negatif bakterilere bağlı koryoamnionitte de nöronal hasarın arttığı gösterilmiştir (1).

1.3.5. İnsan Çalışmaları

Yenidoğanlarda yapılan çalışmalar perinatal asfiksi sonrası sekonder enerji yetmezliğinin varlığını doğrulamıştır (16). Etkilenen infantlarda manyetik rezonans spektroskopisi (MRS) doğumdan sonraki ilk 6 saat içinde normal olduğunu bu da resüsitasyonun başlangıçta nöron fonksiyonlarını koruduğunu gösterdi. 8 saat sonra hücre düzeyinde ATP sentezinde düşüş başladığı gösterilmiş. En şiddetli etkilenmenin 48 ile 72 saat arasında olduğu gösterilmiştir. Doğumdan 12-24 saat sonra yapılan transfontanel doppler ultrason çalışmalarında diyastolik kan akımında artma ve karbondioksit (CO₂) reaktivitesinde azalma belirtilmiştir (1).

1.3.6. Seçici Duyarlılık

Yenidoğanlarda ve yapılan hayvan çalışmalarında gösterilmiştir ki, hipoksi iskeminin şiddetine, süresine ve fetüsün beyin gelişimine bağlı olarak farklı beyin hasarı paternleri gösterilmiştir (1).

Hipoksi- İskemi sonrası Beyin Hasarını Etkileyen Faktörler (1):

- Hücresel Duyarlılık
- Matürite
- Vasküler Yapılanma
- Bölgesel Duyarlılık
- Hipoksik- İskemik Hasarın Tipi
- Genetik Predispozisyon ve Plesental Faktörler

1.3.7. Hücresel Duyarlılık

Yenidoğanda, nöron, hipoksik-iskemik hasara en hassas hücredir. Preterm yenidoğanda nöronlar ve oligodendrositlerin prekürsörleri en hassas hücre tipleri olarak bilinir (1).

1.3.8. Matürite

Gestasyonel yaş, serebral yapıların hipoksik iskemiye karşı değişen duyarlılığında önemli rol oynar. Nöron gelişiminde hızlı değişiklikler, volüm değişiklikleri, eksitator ve inhibitör mekanizmalardaki değişkenler nöron matüritesinde rol oynayan faktörlerdir (1).

20. gebelik haftasından önce ortaya çıkan hipoksik-iskemik hasar çoğunlukla maternal kaynaklıdır. 21. gebelik haftasında nöronal migrasyon tamamlanacağından, bu haftadan önce hipoksi-iskemiye maruz kalması durumunda nöronal heterotopiye veya polimikroglie yol açabilir. Hasarın 26 ila 36 haftalarda meydana gelmesi durumunda, kistik periventriküler lökomalazi'ye yol açabilir. 35 haftadan sonra meydana geldiğinde ise gri cevher hasarına yol açtığı bilinmektedir (1).

1.3.9. Vasküler Değişikliklere Bağlı Hasar

Vasküler alandaki kan basıncının azalmasına bağlı olarak, o damar bölgesinin suladığı alanda da iskeminin başlamasıdır. Kardiyak outputta düşme sonucunda beynin vasküler anastomozlarına en uzak bölgeleri iskemiye en hassas bölgelerdir. Yenidoğanlarda pozitron emisyon tomografisi ile yapılan çalışmalarda beyin hemisferlerinde özellikle parasagittal bölgedeki kan akışında azalma olduğu saptanmıştır (17).

1.3.10. Bölgesel Duyarlılık

Yapılan çalışmalarda beynin metabolik olarak daha aktif olan nükleusların hipoksi-iskemiye daha duyarlı olduğu gösterilmiştir. Bu da yenidoğanda posterior ve lateral talamik nükleus ve lentiform nükleusların akut total asfiksi sonrası hasara duyarlılığı açıklanabilir (1).

1.4. Hipoksik- İskemik Hasarın Tipleri

Yapılan hayvan çalışmaları, iki farklı hipoksik-iskemik modeli ortaya koymuş ve türüne bağlı olarak farklı nöronal hasar paternleri göstermiştir (13). Maymunlarda yapılan bir çalışmada umbilikal kordun klemplesiyile oluşturulan total asfiksi modelinde talamus, beyin sapı ve spinal kordda hasar saptanmıştır. Süre uzadıkça bu bölgelerdeki hasarın arttığı belirlenmiştir.

Yapılan bir diğer hayvan deneyinde 1 ile 5 saat süren uzamış asfiksi modellenmiş, beyin hemisferleri ile beraber beyin sapı, hipokampus ve temporal ve oksipital loblarda hasara yol açtığı görülmüştür (1).

1.4.1. Nöropatoloji

Hipoksik-iskemik hasarın nöropatolojik özellikleri, hasarın türüne, süresine ve gebelik haftasına bağlı olarak değişir.

1.4.1.1. Serebral Ödem

Beyin ödemi, ağır serebral hipoksik-iskemik hasar oluşan yenidoğanlarda sık görüldüğü yapılan otopsi çalışmalarında gösterilmiştir. Hücresel ödem hızla gelişir ve başlangıcından yedi gün sonra düzelmeye başlar, ancak görüntüleme yöntemleriyle tespit edilmesi yenidoğan döneminde hücrelerin içerdiği yüksek su oranından dolayı olaydan 24 saat sonrasına kadar güvenilir bir şekilde tespit edemez. Beyin hasarı yaygın ve şiddetliyse, ventriküllerin genişlemesi, serebral sulkusun silinmesi, serebral girusların düzleşmesi ve hippokampal yapıların herniasyonu görülebilir (1).

1.4.1.2. Hücre Cevabı

Beyindeki farklı hücre tipleri akut hipoksik-iskemik zarara değişik şekillerde tepki gösterir. Aynı hasra bazı hücreler apoptozise uğrarken bazıları ise nekroz ile cevap verir. Nekrozda, H&E ile boyanan bölümler hasardan 5 ila 6 saat sonra değişmeye başlar. Nükleer membranlar, nükleer kromatinin dışarı salınması ve ikincil inflamatuvar reaksiyonla birlikte dejenere olur (18).

Aktif mikroglialar, bir dizi sitotoksik sitokin eksprese etmeye başlar. Her ne kadar mikroglial hücreler hipoksik-iskemik bir hasar sonrası hızla tepki gösterdiği düşünülse de şiddetli perinatal asfiksi sonrası ölen 22 term yenidoğanda yapılan çalışmada hipoksik-iskemik nekroz sonrası kalanları lizis eden, aktif mikroglia ve makrofajları gösteren cluster of differentiation (CD) 68-pozitif hücreler, hasardan en az 24 saat sonra tespit edildiği bildirilmiştir(19). Yapılan aynı çalışmada 24 saat içinde kaspas aktivitesi gösterilebilmiştir. Ayrıca, NO toksisitesinin ürünü olarak kabul edilen nitrotirozin boyaması, beyin ve omurilik dokusunda gösterilebilmiştir(20). Dentat girusta bulunan mikroglial hücreler, 9 aylıktan küçük bebeklerde daha önceki hipoksik-iskemik hasarın güvenilir bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Glial yanıt, 17. gestasyonel haftadan itibaren görülmeye başlandığı saptanmıştır(21).

1.4.1.3. Kalsifikasyon

Zarar görmüş nöronlarda kalsiyum birikmesi sıklıkla hipoksik-iskemik hasardan sonra görülür ve eğer hasar yeterince genişse, beyin görüntüleme yöntemleriyle belirlenebilir. Hipoksi- iskemi dışındaki beyin hasarlarına neden olan durumlarda da kalsifikasyon gözlenebilir (1).

1.4.1.4. Kronik Lezyonlar

Serebral atrofi, beyindeki hücresel kayıpların son aşaması olarak görülebilir. Atrofi beyin özellikle hassas bölgelerini etkiler.

Status marmoratus, bazal gangliya ve talamusun düz, mermer benzeri bir görünümünü tanımlar ve şiddetli perinatal hipoksik-iskemik hasardan yaklaşık 6 ay sonra gelişir. Yapılan histolojik çalışmalarda nöronlardan ziyade glial demetlerde anormal miyelinasyon tespit edilmiştir. Bu sürecin kronik fazı, sulkusta derin gri cevher kaybı nedeniyle mantar benzeri gyrusların ortaya çıkmasını sağlar(22).

Parasagittal serebral hasar, daha çok beyin korteksi ve subkortikal beyaz cevheri tutar. Oluşan hasar genellikle bilateral ve simetriktir, lezyonlardan çoğunlukla hemoraji değil, infarktlar sorumludur. Yaygın nöron kaybı ile sonuçlanabilir(23).

Periventriküler lökomalazi (PVL), özellikle lateral ventriküllerin dorsal ve laterallerinde serebral beyaz cevherin hipoksik-iskemik nekrozu olarak tanımlanır. Daha çok prematüre bebeklerde gözlenir ve oluşan hasar, koagülasyon nekrozu ve periventriküler beyaz maddenin infarktı ile sonuçlanır(24).Beraberinde intraventriküler hemoraji görülebilir.

Periventriküler hemorajik infarkt (PVHI),çoğunlukla prematürelde görülür ve intraventriküler hemoraji ile birlikte ortaya çıkabilir. Genellikle venöz kaynaklıdır. Venöz infarkt medüller ve terminal venlerin geniş subependimal germinal matriks hemorajisi ile tıkanması sonucu oluşur(25).

Selektif nöronal nekroz, miad yenidoğanlarda en sık rastlanan nöronal nekroz tipidir. Sıklıkla beyin korteksi ve talamusu tutar. Bu durum nöronal kayıp ve multikistik ensefalomalazi ile sonuçlanabilir(26).

Fokal nekroz, asfiktik bebeklerde görülebilen ana serebral arterin tıkanması sonucu gelişen iskemik beyin hasarı olarak tanımlanır.Çoğunlukla terme yakın yenidoğanlarda görülür. Prematürelde ise daha çok multipl küçük damarların tıkanması sonucu oluşan çok sayıda infarkt alanları görülür. Lezyonlar, genellikle orta serebral arterin sulama alanlarında gözlenir (23, 24). İnfarktlara bağlı kistik kaviter lezyonlar oluşur. Bu lezyonlar yenidoğan döneminde asemptomatik olabildiği gibi fokal konvülsiyonlara ve hemipareziye sebep olabilir(2).

1.5. Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Tanı Yöntemleri

Hipoksik- iskemik hasara maruz kalan term yenidoğanlarda nörogelişimsel sonuçların daha kesin tahmin edilmesine yardımcı olmak için birçok farklı araç kullanıma sunulmuştur.

1.5.1. Klinik Değerlendirme

Daha önce yapılan çalışmalar, ensefalopati dönemdeki yenidoğanda klinik değişiklikleri ayrıntılı olarak tanımlamıştır (27, 28).

Sarnat sınıflaması Sarnat kardeşler (Sarnat HB & Sarnat MS) tarafından ilk defa 1976 yılında tanımlanmıştır. Bu klinik nörolojik durum diğer araştırmacılar tarafından tekrar gözden geçirilerek, asfiktik yenidoğanların başlangıçta

değerlendirilmesinde ve prognoz tahmin edilmesinde yardımcı olabileceği konusunda fikir birliğine varılmıştır (29). Sarnat sınıflaması temel olarak hasardan 24 saat sonraki klinik ve elektroensefalografiye (EEG) bulgularına dayanarak oluşturulmuştur. Bu sınıflama yenidoğanların hipoksi-iskemiye maruz kalmasından kısa bir süre sonra hipotermi tedavisine uygun olup olmadığını belirlemek amacıyla modifiye edilmiştir. Modifiye Sarnat Sınıflaması Tablo 1-1'de gösterilmiştir.

Thompson skoru ise Thompson CM tarafından 1997 yılında geliştirilen birkaç klinik maddeye dayanan ve nicel bir skorla sonuçlanan bir klasifikasyon sistemidir (30). Hafif ve şiddetli ensefalopatinin uzun dönem nörogelişmesi için öngörü değeri iyi olsa da orta derecede ensefalopati için prediktif değeri zayıftır (31). Thompson sınıflaması Tablo 1-2'de gösterilmiştir.

Tablo 1-1 Modifiye Sarnat Sınıflaması

Bulgular	Evre- I (Hafif)	Evre- II (Orta)	Evre- III (Ağır)
Bilinç düzeyi	Uyanık	Uykuya eğilimli	Stupor, Koma
Kas tonusu	Normal	Hipotonik	Gevşek
Tendon refleksleri	Artmış	Artmış	Azalmış
Miyoklonus	Var	Var	Yok
Nöbet	Yok	Sık	Sık
Karmaşık refleksler			
Emme refleksi	İyi	Zayıf	Yok
Moro refleksi	Abartılı	Zayıf	Yok
Yakalama refleksi	Normal/abartılı	Abartılı	Yok
Okülosefalik refleks	Normal	Aşırı aktif	Azalmış/ yok
Otonom işlevler			
Pupiller	Geniş, reaktif	Dar, reaktif	Anizokorik, nonreaktif
Solunum	Düzenli	Düzensiz	Düzensiz, apneik
Kalp hızı	Normal/taşikardi	Bradikardi	Bradikardi
EEG	Normal	Değişen oranda düşük voltaj	İzoelektrik veya patlama-baskılanma görüntüsü
Semptomların süresi	<24 saat	2-14 gün	Günler-haftalar
Sonuç	Yaklaşık %100 normal	% 80 normal, 5-7 günden sonra anormal	Yaklaşık %50'si ölür, yaşayanlarda yüksek oranda sekel

Tablo 1-2 Thompson Skorlama Sistemi

Thompson Skoru				
Belirti	0	1	2	3
Tonus	Normal	Hipertonik	Hipotonik	Flasit
Bilinç	Normal	Hiperalert	Letharjik	Komatöz
Nöbet	Yok	<3 günde	>2 günde	
Postür	Normal	Fisting, Çevirme	Distal Fleksiyon	Deserebre
Moro	Normal	Parsiyel	Yok	
Yakalama	Normal	Az	Yok	
Emme	Normal	Az	Yok	
Solunum	Normal	Hiperventilasyon	Apne	Solunum Desteği
Fontanel	Normal	Gergin	Bombe	

1.5.2. Nörofizyoloji

1.5.2.1. Elektroensefalografi (EEG)

Neonatal EEG hipoksik iskemik ensefalopatiye neden olan hipoksi-iskemiden sonra beyin bütününe değerlendirmek için bilinen iyi bir yöntemdir. Yenidoğanlarda 16 derivasyonlu EEG kullanılır ve ayrıntılı bilgi sağlar ve eşzamanlı video kaydı ile yapıldığında klinik ve subklinik nöbetler arasında bir ayırım yapılmasına yardımcı olur. EEG'de normal ve ciddi anormal sonuçlar önemli prediktif değerler oluştururlar. Hafif ve orta derecede EEG anormalliği olan çocuklarda tahmin daha az güvenilirdir ve sıralı kayıtlar gerektirir. Term yenidoğanlarda EEG aktivitesi tamamen farklıdır. Uyanıklıkta, EEG düşük voltaj karışık tetra-delta aktivitesi ile karakterizedir. Aktif uykuda, karışık bir orta voltaj delta-teta aktivitesi görülür. EEG'deki anormallikler, arka plan anormallikleri, iktal anormallikler ve diğer anormallikler olarak sınıflandırılabilir. Hafif düzeydeki HİBH'nda EEG genellikle normal iken, orta düzeydeki HİBH'nda voltaj baskılanması veya elektriksel nöbet aktivitesi sık olarak gözlenmektedir. Ağır düzeydeki HİBH'nda ise başlangıçta keskin ve yavaş dalga boşalmaları ve ara ara voltaj baskılanması olur. İlerleyen günlerde ise diken yavaş dalga boşalmalarını takiben voltaj baskılanma periyotları izlenir. Buna patlama-baskılanma görüntüsü (supresyon-burst paterni) denir. Bu görüntünün izlendiği yenidoğanlarda prognozun kötü olduğu bildirilmiştir (1, 32).

1.5.2.2. Amplitüd-Entegre Elektroensefalogram (aEEG)

Son yıllarda daha sık kullanılmaya başlanan aEEG'nin geleneksel EEG'den farkı daha az sayıda elektrotla ve hasta başında sürekli olarak beyin elektriksel aktivitesinin izlenebilmesidir (33). Subklinik nöbetlerin varlığı bu yöntem kullanılarak daha iyi değerlendirilebilir. Yapılan bir çalışmada ise aEEG ile takip edilen yenidoğanlarda status epileptikusun görülme oranının %18 olduğu gösterilmiştir (34). Aynı çalışmada arka plan paternleri iyi ve kötü olan yenidoğanlar arasında status epileptikus süreleri arasında fark olduğu gösterilmiştir (34).

Yapılan hayvan çalışmaları, yenidoğan nöbetlerinin nöronal gelişmeyi kalıcı olarak bozabileceğini göstermiştir (35, 36). Hipoksik iskemik hasar oluşturulan yavru sıçanlarda gözlenen nöbetlerin beyin hasarını arttırdığı gözlenmiştir(37). 2002 yılında yapılan bir diğer çalışmada yeterli plazma konsantrasyonlarındaki antiepileptiklerin nörodejenerasyona yol açtığı belirlenmiştir (10).

Hipoksi iskemiye bağlı konvülsiyon gelişen vakalarda postneonatal epilepsi gelişme oranının %8-9 arasında olduğu belirlenmiştir.

1.5.2.3. Uyarılmış Elektriksel Potansiyeller

Uyarılmış potansiyeller, hipoksik iskemik ensafalopatili term yenidoğanlarda nörogelişimsel sonuçlarını öngörmeye yardımcı olabilir(38, 39). Beyin sapı işitsel uyarılmış potansiyelleri (BAEPs) veya beyin sapı uyarılmış yanıt ve görsel uyarılmış potansiyeller (VEPs) somatosensoriyel uyarılmış potansiyellere (SEP'ler) göre teknik olarak daha kolaydır.

BAEPs, bir akustik uyarının ardından işitsel beyin sapı yolunda üretilen yanıtlardır. Hem çevresel duyarlılığı hem de işitsel yolun nörolojik bütünlüğünü değerlendirmek için kullanılırlar. BAEPs yenidoğanda periferik işitsel fonksiyonun değerlendirilmesinde en objektif ve güvenilir yöntem olarak kabul edilmektedir. Çünkü perinatal asfiksi, sensorinöral işitme kaybına yol açtığı bilinen bir risk faktörüdür. Yapılan bir çalışmada Hipoksi- iskemik hasara maruz kalan çocuklar 4 ile 12 yıl arasında tekrar değerlendirildiğinde, sonraki nörogelişimsel sonuçlar için neonatal BAEP'lerin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değeri ve yanlış negatif oranı sırasıyla % 40.5,% 87.8,% 75.0 ve% 59.5 olduğu görülmüştür. HİBH'li

yenidoğanlarda yapılan çalışmalarda normal dalga yapısının bozulduğu veya latansın belirgin olarak uzadığı durumlarda prognozun iyi olmadığı bildirilmiştir (32).

VEP görsel bir uyarana cevap olarak korteksin oksipital alanı tarafından üretilen bir brüt elektrik sinyalidir. Uyarın, yaygın bir yanıp sönen ışık ya da herhangi desenli bir görsel uyarın olabilir. Flaş VEP'ler (FVEP'ler), perinatal asfiksi sonrası serebral görme bozukluğunun iyi belirleyicileridir. VEP'lerin semptomatik hipoglisemi ve oksipital görme korteksine zarar veren term yenidoğanlarda serebral görme bozukluğunu öngördüğü gösterilmiştir. Normal dalga yapısının bozulduğu veya dalga latansının belirgin olarak uzadığı durumlarda prognozun iyi olmadığı bildirilmiştir. Özellikle görsel uyarılmış potansiyelin alınmadığı durumlarda prognozun daha kötü olduğu gösterilmiştir (32).

Teknik olarak, SEP'ler gerçekleştirilmesi en zor olan ve en çok zaman alan olan uyarılmış elektriksel potansiyeldir. Median sinir genellikle uyarılır çünkü tibial sinirin uyarılmasından daha iyi tolere edildiği gözlenmiştir. HİBH geliştikten sonraki ilk 24 saat içinde median sinir kullanılarak yapılan somato-sensoriyel uyarılmış potansiyellerin normal bulunmasının iyi prognozu önceden belirlemede %94 duyarlı olduğu gösterilmiştir (32).

FVEP'leri ve VEP'leri karşılaştırırken, yapılan bazı çalışmalarda SEP'ler nörogelişimsel sonuçların tahmininde üstündür (38).

Genel olarak, uyarılmış potansiyellerin predikif gücü ve nörogelişimsel sonuçlar daha iyi gösteren ve ulaşılabilir olması nedeniyle aEEG kullanımı daha yaygındır (39).

1.5.2.4. Nörogörüntüleme

Tanı için farklı görüntüleme yöntemleri kullanılsa da, son veriler Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG)'nin ultrasonografi ve bilgisayarlı tomografi (BT) ile karşılaştırıldığında daha üstün olduğunu göstermiştir.

Kraniyal ultrasonografinin, HİE'li term yenidoğanlar da erken perinatal olayların özellikle yaygın kanama ve anormal gelişimin tespit edilmesi için erken dönemde ilk gün içinde yapılması ve daha sonra hastabaşı değerlendirmesi kolay olduğu için uygun aralıklarla tekrar edilmesi yararlıdır. Ultrasonografik inceleme sırasında, anterior veya tercihen orta serebral arter seviyesinde bir doppler sinyali elde

edilebilir. Yapılan birçok çalışmada diyastolik akımda bir artışa neden olduğunu gösterilmiştir. Bununla birlikte serebral kan akım hızındaki artışın, zayıf nörogelişimi işaret ettiği de belirtilmiştir. Değişiklikler genellikle doğumdan sonraki ilk 24 saat sonra gelişir (19). Sagittal sinüs boyunca renkli doppler akışı, bir sinovenöz trombozun teşhisi veya dışlanması için kullanılabilir.

BT, ciddi asfiktik olaydan sonra birkaç hafta sonra yaygın kortikal nöronal hasarın değerlendirilmesinde yararlıdır. Merkezi gri nükleuslardaki değişiklikleri saptamak için MRG'den daha az duyarlıdır; ki bu durum HİE'li term yenidoğanlarda en sık görülen problemdir (40). Özellikle antepartum etkilenmeyi gösteren beyin kalsifikasyonlarının veya doğum travması ya da perinatal inmeye bağlı hemorajik lezyonların saptanmasında değerlidir. Bununla birlikte BT'nin MRG'den daha kolay ulaşılabilmesi ve acil cerrahi gerektiren durumlarda çekim süresinin kısa olması avantajlarındandır.

MRG, HİE bağlı hasarı tespitite kullanılacak en uygun görüntüleme yöntemidir (41, 42). Nöbet sırasında bazal gangliya ve talamus en sık etkilenen bölgelerdir. Difüzyon ağırlıklı MRG kullanımı ile talamus ve bazal gangliyondaki anormallikler genellikle doğumdan sonraki günlerde görülebilir, ancak sinyal yoğunluğundaki değişiklikler ilk haftadan sonra daha da belirgin olduğu saptanmıştır. Bazal ganglionlardaki anormallikler sıklıkla sentral giyrustaki değişikliklerle beraber gözlenebilir ve bu birliktelik kötü prognozun göstergesidir. Beyaz cevherdeki ve serebral arterlerin sulama bölgelerindeki hasarlanan alanlar en iyi difüzyon ağırlıklı MRG ile saptanabilir (41, 42). Beyaz madde anormalliklerinin şiddeti odaktan odağa farklılık göstermektedir. Lezyonlar, sıklıkla punktatik beyaz cevher lezyonları ile birlikte görülmekte ve özellikle hafif ensefalopatisi olan ve düşük gebelik yaşı olan bebeklerde özellikle yaygın olduğu belirtilmiştir (43). MRG ve EEG deki erken dönem değişiklikleri, sonraki dönem MRG bulguları ve nörogelişim ile korelasyon göstermektedir. Yapılan bazı çalışmalarda bazal ganglionların tutulumu olmaksızın yaygın beyin parankimi tutulumu olan bebeklerde erken bilişsel ve motor sonuçlar genellikle beklenenden daha olumlu olduğu gösterilmiştir, ancak bu çocukların okul çağına kadar sıkı takip gerektirdiği de eklenmiştir (44, 45).

MRG özellikle fokal iskemik lezyonların gösterilmesinde faydalıdır. Özellikle orta serebral arterin çoğunlukla sol dalının sulama alanında gözlenir.

Difüzyon ağırlıklı MRG, konvansiyonel MRG'dan çok daha güvenilir olarak bölgenin saptanmasına izin verir.

Manyetik rezonans anjiyografi, bir emboli veya diseksiyon durumunda bulunan arter boyunca anormal akımın görüntülenmesine yardımcı olabilir. HİE bağlı olarak sagittal sinüs, sinüs rektus veya bazal gangliyonun derin venleri etkilenebilir. Sinovenöz trombüsler her ne kadar nadir görülseler de MRG ve venöz MRG kullanılması ile birlikte daha sık olarak görüldüğü belirtilmiştir (46). Sinovenöz trombüslerle birlikte tek taraflı talamusta hemoraji saptanabilir. Böyle vakalarda kanama faktörleri mutlaka kontrol edilmelidir. Pozitron emisyon tomografisi ise seyrek olarak kullanılmıştır (47, 48).

1.5.2.5. Kimyasal Biyobelirteçler

Neonatal HİE süreci başladığı andan itibaren doku ve organlardan kan ve beyin omurilik sıvısı (BOS)'a salınan ürünlerdir. Bu biyo-belirteçlerin düzeyleri oluşan hasarla doğru orantılı olarak değişmeli, görüntüleme ve nörofizyolojik yöntemlerden daha erken tanıya yardımcı olmalı, ayırıcı tanıya elverişli olmalıdırlar (49). Nörogelişimsel sonuçların biyobelirteçleri olarak kullanılmak üzere çok sayıda biyomarker kullanılmaktadır. Serum glutamik oksaloasetik transaminaz (SGOT), eritropoetin, hipoksantin, kreatin kinaz, laktat, ürik asit, kreatinin, laktat dehidrogenaz (LDH), hidroksibutirat dehidrogenaz, fibrin yıkım ürünleri, askorbik asid, nöron spesifik enolaz bunlar arasında gösterilebilir. Gelecekte neonatal HİE'de kullanılacak biyo-belirteçler ise şöyle sıralanabilir (50);

1. Sinir dokusu hasarına ilişkin belirteçler: NSE, Miyelin Proteini (MBP), ProteinS-100 β , Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP), Ubikutin(UCH-L1), Beyin Nörotofik Faktör, Tau Protein(BDNF), MiRNA-21, Aktivin-A
2. Beyin vasküler ve kan-beyin bariyerine ilişkin belirteçler: Matrix Metaloproteinaz(MMP-9), VEGF
3. Oksidatif stres belirteçleri: Süperoksid Dismutaz(SOD), MDA
4. İnflamasyon belirteçleri: HsCRP, IL-1 β , IL6, IL8, IL10; TNF- α , ICAM-1, Selektinler

Test sonuçlarını etkileyebilecek değişik durumlar nedeniyle iki veya daha fazla biyo-belirteçin birlikte kullanımı önerilmektedir. LDH/ CK-BB /S100-β; LDH/ CK-BB/ Aktivin-A; IL6 ve IL16 / EEG; Apgar (10) / IL16; MR / GFAP / UCH-L1 (prognozu belirlemede daha etkin); Tau (sadece beyin kaynaklı)(50, 51). Nörogelişimsel sonuçların biyobelirteçleri olarak kullanılmak üzere çok sayıda bileşik test edilmiştir. Bu bileşikler hipoksi iskemiyeye bağlı hasarın şiddetini yansıtabilir, fakat uzun vadede nörogelişimin öngörülmesinde kısıtlı bir değere sahiptir.

1.6. Tedavi

Öncelikli olarak doğum eylemi ve doğum sırasında hipoksik-iskemik etkilenme yaşama ihtimali yüksek olan veya yaşamış olan fetuslar saptanmalıdır. Olumsuz bir intrauterin ortamın sona erdirilmesi HİE'yi azaltma veya önlemenin en etkin yoludur (52).

Elektronik fetal izleme (EFM) hipoksik bebekleri tanımlamak için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Yapılan randomize kontrollü çalışmalarda EFM ile izlenen fetuslarda nöbet sayısında belirgin azalma olduğu gösterilmiştir (53). Aynı çalışmada fetal ölüm hızında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Şiddetli hipoksinin intrapartum değerlendirmesi, doğumda iyileşme ile sonuçlanabilir ve hipoksik-iskemik ensefalopati riskini azaltabilir, ancak hipoksik-iskemik beyin hasarının önlenebileceği fikrini destekleyen çok az kanıt vardır (1).

Tedavide amaç yeterli oksijenasyonunu ve perfüzyonunu sağlamaktır. İntrapartum asfiksi sonucu gelişen sistemik asidoz kardiyak kontraktileteye zarar verir, ancak serebral fonksiyon üzerindeki etkisi daha az anlaşılabilir. Bu yenidoğanlar beklenmedik derecede kötü durumda doğabilir ve acil resüsitasyon gerektirebilir. Doğum öncesi ve doğum esnasında oluşabilecek asfiksini önlenmesine yönelik olarak yüksek riskli fetüsün gebelik ve doğum esnasında yakından takibi, anneye ait risk faktörlerinin belirlenmesi ve yenidoğan resüsitasyonu konusunda eğitimli personelin doğumda mutlaka uygun ekipmanla doğum odasında bulunması önemlidir (45). Müdahale sırasında yüksek konsantrasyonda oksijen kullanımı beyinde serbest oksijen radikallerinin yol açacağı hasarı arttıracığından kaçınılması gereklidir. Bu

durumu engellemek amacıyla oksijen miktarını düzenleyen mikserler kullanılması ve yenidoğanın monitörize edilmesi son derece önemlidir(1).

Hipoksik iskemik ensefalopati gelişme riski olan bebekte solunum yetmezliğini önlemek oldukça önemlidir. PaCO₂ düzeyi serebral kan akımını etkilediği için, normal sınırlarda tutulmalıdır. Bu nedenle yenidoğan stabilize edildikten hemen sonra kan gazı kontrolü gereklidir(54).

Bunula birlikte yenidoğanı hipertermi ve hipoglisemiden korumak önemlidir. Asfiksi geliştiği düşünülen ve riskli olduğu öngörülen bebeklerin radyant ısıtıcıları kapatılarak müdahaleye devam edilmelidir(2).

Erken dönemde ortaya çıkan nöbetler genellikle kötü prognoz ile ilişkilidir, bu nedenle, kontrol altına alınmaları çok önemlidir(2).

Canlandırma işlemlerini takiben, sistemik ve serebral fonksiyonların monitörize edilebileceği bir merkezde izlenmeleri sağlanmalıdır. Term ve terme yakın yenidoğanlarda teropatik hipotermi etkinliğinin günümüzde kanıtlanmış tedavi yöntemi olduğu bilinmektedir. Teropatik hipotermimin teknik donanımı olan merkezlerde uygulanması tedavinin etkinliği açısından oldukça önemlidir. Bu teknik donanımın olmadığı merkezlerden en kısa sürede, tedavinin uygulanabileceği bir merkeze sevk edilmesinin mortalite ve morbiditenin düşürülmesi açısından önemli olduğu unutulmamalıdır (2).

1.6.1. Multisistemik Yaklaşım

Dalış refleksi, daha az hayati organ fonksiyonlarının kaybı pahasına beyin gibi hayati organlara kan akışını korumak için deneysel asfiksi sırasında ortaya çıkan bir durumdur. Klinik olarak anlamlı bir hipoksik iskemik hasar sonrası kalp, böbrekler ve karaciğer en savunmasız organlardır.

Doğumda hipoksik-iskemik olaydan sonra klinik seyir öngörülemez, bu nedenle beklenen bütün problemlere karşı klinikte eğitilmiş personel tarafından uygun şekilde gözlemlenmelidir.

1.6.1.1. Renal Sistem

Asfiksiye maruz kalan yenidoğanların % 23 ila % 70'inde böbrek yetmezliği geliştiği bildirilmiştir (55). Yapılan bir diğer çalışmada 33. gestasyonel haftanın altında asfiksiye maruz kalan yenidoğanların %19'unda böbrek yetmezliği geliştiği raporlanmıştır (55). Böbrek yetmezliği ve aşırı sıvı yüklenmesi korkusu nedeniyle, birçok klinisyen asfiksili yenidoğan bebeklerde sıvı kısıtlaması politikasını benimsemiştir. Uygunsuz ADH salınımı halinde sıvı kısıtlaması gereklidir. Oligoüri serum, idrar elektrolitleri ve günlük tartı alımına göre yönetilmelidir. Kronik böbrek yetmezliği ve diyaliz ihtiyacı oldukça nadirdir.

1.6.1.2. Kardiyovasküler Sistem

Hipoksik iskemik hasardan sonra miyokardiyal kontraktilite bozulur, bu da kardiyak output, hipotansiyon ve serebral kan akımının daha da bozulması ve diğer organların perfüzyonunda belirgin bir azalmaya neden olur. Ağır hipoksik-iskemik bir hasar sonrası ortaya çıkan diğer kardiyak patolojik süreçler, fonksiyonel triküspit kapak yetersizliği, miyokardiyal iskemi, papiller kasın iskemik nekrozu olarak sıralanabilir. Hipotansiyon, şiddetli hipoksik-iskemik hasardan sonra sık görülen bir komplikasyondur ve volüm desteği, tansiyonu düzeltmede sıklıkla etkisizdir (55). İnotrop desteğinin tansiyonu yükseltmede daha etkili olduğu gösterilmiştir (1).

1.6.1.3. Hepatik- Gastrointestinal Sistem

Asfiksiye maruz kalan yenidoğanlarda yaşamın özellikle ilk haftasında %80 ila 85 oranında karaciğer enzimlerinde yükselme saptanabilir (55). Geri dönüşümsüz karaciğer hasarı oldukça nadirdir.

Nekrotizan enterokolit, asfiktik bebeklerde iyi bilinen bir komplikasyondur, ancak bu sebepten dolayı nispeten nadir görülür.

1.6.1.4. Hematopoetik Sistem

Şiddetli hipoksik-iskemik ensefalopatiye bağlı koagülasyon bozukluğu yaygın görülen bir sorundur (1). Kemik iliğindeki hasara bağlı olarak geçici trombositopeni ortaya çıkabilir. Şiddetli hipoksik-iskemik ensefalopatiye maruz kalan tüm yenidoğanlar pıhtılaşma bozukluğuna karışı mutlaka taranmalıdır. Trombosit desteği, k vit., spesifik faktörlerle destek tedavileri uygulanabilir (1). Hipoterminin pıhtılaşma sistemi üzerinde hiçbir etkisi yoktur, ancak hipotermi sırasında trombosit sayıları daha düşük bulunabilir (1). Bununla birlikte yenidoğanda polisitemi tablosu da trombositopeninin olmaksızın saptanabilir. (56)

1.6.2. Nöroprotektif Yaklaşım

Şiddetli bir hipoksik-iskemik hasardan sonra serebral homeostazisin korunabilmesi için beyin işlevinde doğrudan ya da dolaylı etki yaratabilecek komplikasyonların önceden tahmin edilmesi oldukça önem taşımaktadır.

Şiddetli bir hipoksik-iskemik hasara bağlı oluşan hipogliseminin beyin fonksiyonlarını oldukça olumsuz etkilediği bilinen bir durumdur (57). Yapılan hayvan deneylerinde hipoksiye maruz bırakılan hayvaların hipoglisemik olan deneklerde nomoglisemik olanlara göre mortalitenin artmış olduğu raporlanmıştır. Asfiksi başlangıçta glikozun serebral metabolik oranını artırır ve hipoksik-iskemik hasar sırasında glukoz tüketimi intraserebral glikozun azalmasına neden olur. Çalışmalar, matür ve immatür beynin glukoz infüzyonuna yönelik davranışında büyük farklılıklar olduğunu göstermiştir(1). Yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalarda immatür beyinlere verilen glukoz infüzyonunun verilmeyen deneklere göre koruyucu etkinliğinin olduğu gösterilmiştir. Fakat hipoksik-iskemik hasardan sonra glikoz infüzyonunun yapılması halen tartışmalıdır. Yenidoğanda hipoksik-iskemik hasardan sonra yüksek konsantrasyonda glikoz kullanımı önerilmemesine rağmen, hipoglisemiden kaçınılması gerektiği belirtilmiştir.

1.6.3. Nöbetlerin Kontrol Altına Alınması

Nöbet, orta ve şiddetli hipoksik-iskemik ensefalopatide yaygın olarak gözlenen bir semptomdur. Özellikle uzamış ve şiddetli hipoksizde nöbet sayısının daha fazla olduğu gözlenmiştir. Hipoksik-iskemik hasar sonrası nöbet aktivitesinin, olumsuz nörogelişimsel takibi açısından bebek üzerinde ek bir risk faktörü oluşturup oluşturmadığı konusunda önemli tartışmalar olmuştur. Yakın zamandaki çalışmalar, tekrarlayan nöbetlerin gelişen beyin üzerindeki olumsuz etkilerini göstermiştir ve bunların, subklinik olsa bile EEG ile kanıtlanması gerektiği vurgulanmıştır.(34, 58). Başlayan hipoksik-iskemik hasar, hücre ölümüne yol açabilecek intranöronal olaylar zincirini başlatır. Hayvan çalışmalarında, yaşamın ilk günlerinde birçok kısa nöbetin indüklenmesi, nöronal kayıp ile sonuçlanmadığı, fakat beyin yetişkin yaşamında incelendiğinde kortikal aktivasyon ve hücre yoğunluğunu içeren morfolojik değişikliklere yol açtığı görülmüştür (1). Çalışılan deneklerin devam eden takiplerinde bozulmuş öğrenme ve düşük nöbet eşiği olduğu saptanmıştır. Yenidoğanlarda ise, klinik olarak belirgin nöbetler ile EEG monitorizasyonu üzerinde tanınan nöbetler arasındaki sıklıkta farklılıklar vardır, hipoksik-iskemik bir hasar sonrası nöbet aktivitesinin sıklığı klinik izlem sırasında tespit edilemeyebilir. Hipoksik-iskemik zedelenmeden sonra geri dönüşü olmayan nöronal hasarın çoğunluğunun, bu durumun altında yatan nedene bağlı olmasına rağmen, ek fonksiyonel hasarın nöbet yüküne sekonder olabileceğine dair kanıtlar sunulmuştur. Bu nedenle nöbetlerin etkin bir şekilde durdurulması, hipoksik iskemik hasarın yönetiminde büyük öneme sahiptir (1).

Yenidoğan döneminde tam etkili antikonvülzan tedavi zordur, ancak ek tedavi olarak lidokain gibi yeni ilaçlar hem klinik hem de sadece elektrografik olarak tespit edilebilen nöbetlerin kontrolünde etkilidir (22). Fenobarbital hala ilk tercih edilen antiepileptiktir. EEG ile tanısı konan nöbetlerin tedavisinde fenobarbitalin fenitoine karşı etkinliğini karşılaştıran bir çalışmada, her iki ilacı da alan bebeklerin % 50'sinden azında tam bir nöbet kontrolünün olduğu gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, yüksek doz fenobarbitalin, ciddi nörogelişimsel yetersizlikte anlamlı bir azalma ile ilişkili olduğu bulunmuştur (59). Bugün birçok klinikte fenobarbital nöbetler başlamadan önce verilmektedir. Bununla birlikte yapılan hayvan deneylerinde fenobarbitalin, prematür deneklerde beyin gelişimi, nöronal toksisite ve olumsuz bilişsel ve

davranışsal etkileri üzerinde olumlu etkileri olduğu da gösterilmiştir (60). Hipoksik-iskemik bir hasar sonrası ortaya çıkan nöbetlerin tedavisinde kullanılan diğer antikonvülsanlar arasında fenitoin (fenobarbitalden daha fazla etkinliği yoktur), benzodiazepinler (klonazepam, midazolam, lorazepam), lidokain, tiopental, sodyum valproat, lamotrijin ve levetirasetam bulunmaktadır.

Avrupa'da, lidokain ikinci veya üçüncü sıra antikonvülzan olarak daha sık kullanılır, ancak fenitoin uygulandığında kullanılmamalıdır, çünkü kardiyotoksisite meydana getirebilir. Lidokain, hem fenobarbital hem de midazolam tedavisinden sonra nöbet geçirmeye devam eden yenidoğanların % 76'sında elektrokonvülsif nöbetlerin ortadan kaldırılmasında etkili olduğu gösterilmiştir (22, 61).

Antiepileptik ilaçların apopitoz, beyin gelişiminin inhibisyonu ve ilaçların genç hayvan deneklerine uygulandığında yetişkin dönemlerinde olumsuz davranışsal ve bilişsel etkileri olduğuna dair kanıtlar elde edilmiştir (57). Yapılan bazı çalışmalarda da hipotermi uygulanan bazı yenidoğanlarda nöbetlerin azaldığı belirtilmiştir (1). Fakat bu azalmanın şiddetli hipoksik-iskemik hasarda olmadığı gözlenmiştir .Bu da bize hipotermi uygulamasının orta derecede HİE deki terapötik etkinliğini açıklayabilir (62, 63).

Uzun süreli kullanımın olası yan etkilerini önlemek için antikonvülsan süresi minimize edilmelidir. Antikonvülzanların optimum kullanım süresi hakkında varılmış ortak bir görüş yoktur (1). MRG ile kanıtlanmış nöronal hasar durumunda antikonvülzan tedaviyi 2-3 ay sürdüren klinik yaklaşımlar da mevcuttur.

1.6.4. Serebral Ödem

Genellikle şiddetli HİE sonrası serebral ödem olduğu bilinmektedir. Kafa içi basıncın rutin olarak izlenmesinin yenidoğana fayda sağladığına dair bir kanıt yoktur. Artmış intrakraniyal basınç büyük olasılıkla hipoksik-iskemik hasar sonrası ortaya çıkan anormal patofizyolojik süreçlerin bir sonucudur ve kendi başına bir sebep olmaktan ziyade bir hasar göstergesi olarak kabul edilir (1).

1.6.5. Spesifik Nöroprotektif Tedavi

Hipoksik-iskemik hasara maruz kalan sinir hücrelerini korumak amacıyla bir çok araştırma yapılmıştır, ancak şu ana kadar yararlılığı kanıtlanmış klinik veri oldukça azdır. Orta derecede hipotermi, rutin bakımın bir parçası olan tek spesifik nöroprotektif tedavi olarak geçerliliğini korumaktadır.

1.6.5.1. Hipotermi

Yapılan hayvan ve insan çalışmalarında hipoterminin nöroprotektif etkinliği gösterilmiştir. Özellikle birden fazla hayvan türünde yapılan çalışmalarda 3 ila 72 saat arasında değişen derecelerde hafif hipoterminin (2 ila 5°C), beyin fonksiyonunun korunmasında etkili olduğunu göstermiştir. Hipoterminin, serebral metabolizmayı ve ATP tüketimini azaltarak ve erken gen aktivasyonunun hızlı sentezlenmesiyle ilişkili birçok intraserebral metabolik süreci yavaşlatacak bir etkiye sahip olduğu öne sürülmüştür.

Jacobs ve arkadaşlarının hipoksiye maruz kalan yenidoğanlarda yapılan randomize kontrollü çalışmanın ardından gelen veriler sonrasında, perinatal asfiksiye bağlı ensefalopati izlenen yenidoğanlarda hipotermi uygulaması standart haline gelmiştir (3). O zamandan beri sıklıkla güncellenen Cochrane analizinde, kafa soğutması ya da tüm vücut hipotermisi arasında hiçbir farklılık gösterilmemiştir (3). Tüm vücut hipotermisi ile rektal sıcaklık 72 saat 33.0 ila 34.0°C'ye düşürülürken, soğutma başlığı 10 °C'de bir soğutucu solüsyon ile perfüze edilir ve vücut sıcaklığı 34 ila 35°C arasında tutulur. Yapılan randomize kontrollü çalışmalarda hipoterminin morbidite ve ölüm oranı azalttığı, nörogelişimsel hasar olmaksızın sağ kalım oranını arttırdığı gösterilmiştir. Nöroprotektif etkinliğinin ise, orta şiddetli ensefalopatilerde şiddetli ensefalopatilere göre daha etkili olduğu gösterilmiştir. Hipoterminin en bilinen komplikasyonlarının hipotermi ve sinüs bradikardisi olduğu gösterilmiştir(64). Bununla birlikte aritmi, hipotansiyon, koagülopati, trombositopeni, böbrek yetmezliği, infeksiyonlar ve pulmoner hipertansiyon görülebilir. Hipotermik bebeklerin sıcaklığının önceden belirlenmiş sınırlar içinde tutulması çok önemlidir, çünkü daha şiddetli hipotermi (<33°C) kardiyak aritmeye yol açabilir.

Terapötik hipotermiminin 35 haftanın altına uygulanması önerilmez. Yapılan çalışmalarda daha prematür olan yenidoğanlarda uygulandığında mortalite oranının arttığını göstermiştir (1).

1.6.6. Diğer Tedavi Stratejileri

Yapılan birçok klinik çalışma sonucunu hipoksik-iskemik hasar sonrası yararlılığı kanıtlanmış birkaç klinik veri mevcuttur.

Bir kalsiyum kanal blokörü olan nifedipin, hipoksik-iskemik hasara maruz kalan dört yenidoğana verildiğinde üçünde ortalama arteriyel kan akımı ile birlikte serebral kan akımında da azalma görüldüğü belirtilmiştir. Fakat kalsiyum kanal blokörlerinin sistemik yan etkileri hakkında çok sınırlı bilgi mevcuttur (1).

Magnezyum sülfat (MgSO₄) bir NMDA reseptör antagonistidir ve beyin koruması için etkili bir madde olduğu ileri sürülmektedir. Fakat yapılan çalışmalarda herhangi bir yarar sağladığı gösterilememiştir. Yüksek dozda kullanılmasının hipotansiyona yol açtığı bildirilmiştir (65).

Yapılan çalışmalarda birçok nöroprotektif ajan değerlendirilmiştir (4). Bunlar arasında melatonin, eritropoetin (EPO), N-asetilsistein, allopurinol ve ksenon ilk sırada bulunan ajanlar arasındadır (4).

Melatonin epifiz bezi tarafından üretilen, çeşitli biyolojik fonksiyonların ve sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde yer alır. Melatonin aynı zamanda bir antioksidan işlevi görür ve anti-apoptotik etkilere sahip olduğuna yönelik çalışmalar mevcuttur (1). Potansiyel yararlı çalışmalar olmasına rağmen, farmakokinetik ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

EPO ekspresyonu hipoksiye yanıt olarak serebral doku nöronlarında belirgin bir şekilde arttığı görülmüştür. Nöroprotektif etkilerinin, vasküler endotelial büyüme faktörü sekresyonu ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör dahil olmak üzere büyüme faktörlerinin üretiminin uyarılması üzerinden yaptığı düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada hipotermi almadan EPO verilen yenidoğanlarda nörolojik sonuçları iyileştirdiği görülmüştür (66).

N-asetilsistein, glutasyonun öncüsüdür aynı zamanda serbest oksijen radikallerini temizleyen bir antioksidandır. Hayvan deneylerinde, hipotermi ile birlikte kullanılmıştır, ancak insanlarda yapılan klinik çalışmalar henüz yeterli değildir(1).

Allopurinol bir ksantin oksidaz inhibitörüdür ve serbest radikalleri uzaklaştırma etkisine sahiptir. Serbest oksijen radikallerinin oluşumunda önemli rol oynayan ksantin oksidaz enziminin baskılayıcısı olarak allopurinolün kullanımıyla ilgili çok sayıda araştırma bulunmaktadır (1).

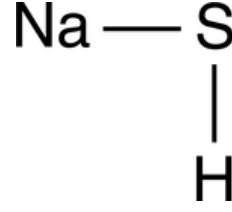
Bir soy gaz olan Ksenon'un çok güvenli bir anestetik ve güçlü bir nöroprotektan olduğu gösterilmiştir. Ksenon, glutamat reseptörünün NMDA alt tipinin non-kompetatif antagonistidir, bununla birlikte etkili farklı mekanizmalar da rapor edilmiştir. Halen, hipotermiye ek olarak ksenonun nöroprotektif etkilerinin incelendiği klinik çalışmalar yapılmaktadır (67).

Kök hücreler veya progenitör hücreler, klinik öncesi çalışmalarda gösterildiği gibi, hipoksik iskemik hasar sonrası sonuç üzerinde çok sayıda faydalı etkiye sahip olabilirler. Bununla birlikte, randomize kontrollü çalışmalar dikkate alınmadan önce, translasyonel hayvan modellerinde daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır(1).

1.6.7. H₂S

H₂S; yeni bir gaz molekülü olarak sinir sistemi ve kardiyovasküler aktivitenin düzenlenmesinde önemli bir rol almaktadır (6). Endojen H₂S direkt merkezi sinir sisteminde rol almakla birlikte ayrıca serebral vasküler duvarın düz kas kontraktilitesini düzenleyerek beyne kan gitmesini sağlamakla dolaylı olarak merkezi sinir sistemini etkilemektedir (7). Beyindeki endojen H₂S, sisteinin sistation βsentez katalizi sonucunda oluşur. Fizyolojik konsantrasyondaki H₂S, sinir sistemi içindeki çeşitli oksitleyici maddelerin oluşumunun engellenmesi ve temizlenmesinde; oksidatif stres kaynaklı hücre hasarının azaltılmasında ve nöronal korumada etkilidir (8). Sodyum Hidrosülfür (NaHS), ekzojen H₂S'ün vericisi olup kan emiliminden sonra direkt hidrojen sülfüre dönüşebilir. Araştırma da; NaHS'nin miyokardiyal, böbrek, karaciğer, kalın barsakda iskemi-reperfüzyon hasarı sırasında hedef organda oluşabilecek hasarı azaltabildiği, antiinflamatuvar, antiapoptotik ve antioksidan olarak

önemli bir rol oynadığı kanıtlanmaktadır (9, 10). NaHS'nin molekül yapısı Şekil 1-2 de gösterilmiştir.



Şekil 1-2 Sodyum hidrosülfid molekül yapısı

1.7. Prognositik Faktörler

Serebral hipoksi-iskemi perinatal asfiksi, neonatal mortalite ve morbiditenin en önemli nedenlerinden biridir. Serebral hipoksiye maruz kalan yenidoğan beyni, hasar süresi ve şiddeti dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden etkilenir. Bunlar gebelik yaşı; nöbetlerin varlığı; ve ilişkili enfeksiyöz ve metabolik hastalıklar, travma olarak sayılabilir. Perinatal asfiksiye maruz kalan bir yenidoğanın prognozunun sıklıkla tahmin edilmesi zor olsa da, perinatal serebral hipoksi-iskemi ile birlikte bazı klinik ve laboratuvar anormallikleri yüksek nörolojik morbidite riski ile ilişkilidir (1).

Perinatal asfiksiye maruz kalan yenidoğanda mortalitenin en önemli belirleyicisi beynin immatüritesidir. Prematürlerde mortalite oranı daha yüksek bulunurken, term yenidoğanlarda serebral palsy riskinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (68). Pretemlerdeki morbiditenin termlere göre daha düşük olmasının nedeni olarak ise, pretemlerde hayatta kalma oranının daha düşük olması gösterilmiştir.

1.7.1. Doğumdaki Apgar Skoru

Yapılan birçok çalışma, uzun süreli nörolojik sonuçları öngörmeye 1. -5. dakika Apgar skorlarının düşük duyarlılıkta olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte yapılan bir diğer çalışmada, 5. dakika Apgar skoru 3 ve altında olan 39 yenidoğan incelendiğinde yaşayan 14 vakanın 8'inde serebral palsy olduğu gösterilmiştir (69).

1.7.2. Asidoz

Klinisyenler intrauterin asidozu tespit edebilmek için kan gazını kullanmışlardır. Yapılan çalışmalarda ağır derecede asidotik yeni doğanların önemli ölçüde umbilikal arter pH değeri daha yüksek olan bebeklere kıyasla daha düşük Apgar skoru ile doğduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada asidozu olan grupta mortalite oranı daha yüksek saptanmıştır. Yapılan bir diğer çalışmada doğumda umbilikal arterden bakılan kan gazında asidozu olmayan yenidoğanlarda ensefalopati dahil tüm komplikasyonların daha az görüldüğü saptanmıştır (70). Bununla birlikte kord kanının terapötik hipotermi tedavisinin prediktif değeri hala tartışmalıdır.

1.7.3. Ensefalopatinin Şiddeti

Yenidoğanın ilk nörolojik muayenesi özellikle term yenidoğanlarda daha sonraki gelişimsel sonuçları öngörmeye oldukça yararlı olduğu gösterilmiştir. Takip eden çalışmalar sadece hafif HİE olarak değerlendirilen bebeklerin hemen hemen hiç majör nörogelişimsel sekel kalma riski taşımadığını ve orta derecede HİE'li bebeklerde % 75'inin majör nörolojik defisit olmaksızın sağ kaldığını göstermiştir. Şiddetli HİE'li yenidoğanlarda mortalitenin %50 ile %100 oranında olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte sağ kalan yenidoğanlarda %65 ile %75 oranında morbidite olduğu saptanmıştır (1).

2. HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI HAYVAN MODELİ

Perinatal hipoksik-iskemik beyin hasarının patogenezinin anlaşılması ve yeni tedavi yaklaşımlarının belirlenmesi amacıyla immatür sıçan modelleri kullanılmaktadır. Sıçanların ortalama ömrü 2,5-3,5 yıl arasında değişmektedir. Yenidoğan bir sıçanın ortalama ağırlığı 5-6 gramdır. Doğum sonrası 20-24. günlere kadar anne sütü ile beslenmeleri gerekmektedir. Yenidoğan sıçanların beyin gelişimi daha geç olduğu için insan fetüs beyninin yaklaşık 15. haftasına karşılık gelmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda yedi günlük sıçanların histolojik olarak beyin gelişimleri 34-37. gebelik haftasındaki insan yenidoğan beynine benzerdir. Sıçanların beyin korteksinde nöron tabakaları oluşmuş, germinal matriks değişime uğramaya başlamış ve beyaz cevherde kısmen miyelinizasyon tamamlanmış olduğu görülmektedir (71). Sıçanlarda beyin gelişimi doğum sonrası ilk 3 haftada çok hızlı olmaktadır. İnsanlarda ise bu dönemin karşılığı gebeliğin ikinci trimestirinden başlayarak doğum sonrası yaşamın 2. yılına kadardır. Sıçan beyninin hızlı büyüme zamanının postnatal dönemde gerçekleşmesi, onları postnatal dönemde sinir sisteminin gelişimini araştırmak için deney hayvan modeli oluşturmada avantaj sağlamaktadır (72, 73).

Yenidoğan sıçanlarındaki hipoksi iskemi modeli Rice ve ark. tarafından Levin yönteminin modifiye edilmesi ile oluşturulmuştur (74). İskemi tek taraflı ana karotis arter bağlanmasıyla, hipoksi ise %92 azot ile %8 oksijen karışımının solutulması ile oluşturulmaktadır. Ana karotis arter bağlanmasıyla aynı taraf beyin hemisferinde, serebral korteks, subkortikal ve periventriküler beyaz cevher, striatum, talamus (bazal gangliyonlar) ve hipokampüsde iskemik lezyonlar gözlenmektedir (71, 74).

İşlemede kullanılan NaHS dozları, veriliş zamanı ve sıçanların dekapite edilmesine kadar geçen süre daha önce sıçanlarda oluşturulan iskemi- reperfüzyon hasarı modelleri baz alınarak uygulanmıştır (75, 76).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma için Dumlupınar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan onay alındı. Tüm deney hayvanları Dumlupınar Üniversitesi deney hayvanları merkezinde on iki saat aydınlık, on iki saat karanlık ortamın ve optimum ısı ve nem olan odada sıçan yavruları yedi günlük olana kadar anne yanında bekletildi.

Deney sırasında mikroskop, deri ve deri altı dokuların açılması ve dekapitasyonu için pens, bistüri, sağ karotid arterin bağlanması ve derinin kapatılması için 5-0 ipek ve portegü, ilaç ve sıvı uygulamaları için 1 cc'lik insülin enjektörü, hipoksi odacığı, % 8 oksijen % 92 azot karışımının bulunduğu gaz tankı, oksijen ölçer, hava iletimi için bağlantı hortumları, sıçan yavrularının ısıtılması için ısıtılıcı masa, hipoksi odacığı sıcaklığının sürekli izlemi için elektronik termometre, çıkarılan beyinlerin saklanması için saklama kapları, ağırlık ölçümleri için hassas terazi, steril örtü ve eldiven kullanıldı.

3.1. Hipoksik İskemik Beyin Hasarının Oluşturulması

Çalışmaya alınan tüm 7 günlük yavru erkek sıçanlara isofluran emdirilmiş pamuk ile 30-45 saniye inhalasyon anestezisi uygulandı. Sıçanlar uyandıkça doz tekrarlandı. Sıçanlar işlem yapılacak masaya dört ekstremitesi flasterle sırt üstü sabitlendi. Kontrol grubu hariç tüm sıçanların boynunda orta hattan kesi yapılarak künt diseksiyonlarla mikroskop altında sol karotid arter bulunarak 5-0 ipek ile bağlandı ve karotis arter pulsasyonunun durduğu gözlemlendi. İskemi oluşturulan tüm sıçanlar hipoksi odacığına alındı. Hipoksi odacığının sıcaklığı termometre ile oksijen oranı ise "oksimetri" ile sürekli olarak izlendi. Odacık sıcaklığının $33,5 \pm 0,5$ °C ve oksijen düzeyinin ise % 8 olması sağlandı. Cerrahi işlem esnasında ve hipoksidede iken her 3 dakikada bir solunum hareketleri ve cilt rengi yakından takip edildi. İki saatlik hipoksi süreci sonrasında sıçanlar odacıktan çıkarılarak derlenme sürecine alındı.

3.2. Deney Planı

40 adet erkek Sprague-Dawley cinsi yedi günlük yavru sıçanlar rastlantısal olarak dört gruba ayrıldı. Grup 1 dışındaki tüm sıçanlara hipoksik iskemik beyin hasarı işlemi uygulandı.

Grup 1 (Kontrol), (n:10): Anestezi sonrası sadece boyun diseksiyonu yapılarak sol karotid arteri bulunan ancak bağlanmayan, hipoksi uygulanmayan grup.

Grup 2 (Hİ), (n:10): hipoksik iskemik ensefalopati modeli oluşturulduktan 30 dk sonra (77) SF verildi. (15 ml/kg).

Grup 3 (Hİ + 50 µmol/kg NaHS), (n:10): hipoksik iskemik ensefalopati modeli oluşturulduktan 30 dk sonra (77) düşük doz NaHS (50 µmol/kg) (75) verildi.

Grup 4 (Hİ + 100 µmol/kg NaHS), (n:10): hipoksik iskemik ensefalopati modeli oluşturulduktan 30 dk sonra (77) yüksek doz NaHS (100 µmol/kg) (75) verildi.

3.3. İlaç Uygulama Yöntemi

NaHS grup 3'deki sıçanlara 50 µmol/kg ve grup 4'deki sıçanlara ise 100 µmol/kg dozunda ip insülin enjektörü ile 20 µl SF içerisinde verildi. Grup 2'deki sıçanlara ise yine ip olarak 15ml/kg (77) sadece SF uygulandı.

3.4. Örneklerin Toplanması

Tüm deneysel periyodun sonundan 5 saat sonra(76) her gruptaki 10'ar sıçan servikal dislokasyon ile sakrifiye edilerek her bir sıçanın beyin dokusu etrafındaki bağ ve yağ dokuları temizlenerek, standart bir şekilde total olarak çıkarıldı(76). %10'luk formaldehit içeren kaplara koyuldu. Çıkarılan bu doku örnekleri histopatolojik, immunohistokimyasal değerlendirmeler ve mRNA analizinde kullanıldı.

3.5. Histopatolojik değerlendirme

Doğumu takiben yedinci gününde hipoksik iskemik beyin hasarı işlemi sonunda çıkarılan beyinlerde H&E yöntemi ile apopitozis değerlendirildi. Beyin dokularının değerlendirilmesi sıçanların hangi gruptan olduğunu bilmeyen bir patolog tarafından yapıldı. Formaldehit tespit işleminin ardından beyin dokularının sağ yarısı doku boyası ile işaretlenerek koronal seri kesitler alındı. Hipoksik-iskemik hasara daha duyarlı olan subtalamik nükleuslar, hipokampüs ve pariyetal korteksi temsil eden bir veya iki örnek rutin takip işlemine sokuldu. Rutin takip işleminde beyin dokuları alkol, ksilol ve parafin solüsyonlarında bekletildi. Hazırlanan parafin bloklardan elde edilen beş mikron kalınlığındaki kesitler rutin hematoksilen eozin histokimyasal boyası ile boyandı. Preparatlar ışık mikroskopik düzeyde incelendi. Koronal kesitlerde rutin boya ile nöronal morfolojik değişiklikler not edildi.

3.5.1. TdT-dUTP Nick-End-Labeling (TUNEL) Yöntemi

Nöronlardaki DNA parçalanmasını göstermek için “Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP end labeling” (TUNEL) yöntemi (in situ apopitosis detection kit, Biogen, katalog no S7101) seçildi. Bu işlem, elde edilen 5 mikron kalınlığındaki koronal beyin kesitlerinin, deparafinizasyon ve alkol takip işlemlerinin ardından proteinaz K ile 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi (10µl/2.5 ml, fosfat tampon solüsyonu). Fosfat tampon solüsyonunda yıkandıktan sonra kesitler, buharlı kabin içerisine yerleştirildi ve üzerlerine terminal deoksi transferaz reaksiyon karışımı damlatılarak 37⁰C de etüv içerisinde bir saat inkübe edildi. Kromojen olarak 3,3-diaminobenzidin tetrahidroklorid, zemin boyası için metil yeşili kullanıldı. Kesitler kapama maddesi ile kapatıldı. Pozitif kontrol olarak germinal merkezleri belirgin tonsil kesitleri kullanıldı.

3.5.2. Apopitozisin Değerlendirilmesi

Sağ yarısı doku boyası ile işaretlenen koronal beyin kesitleri TUNEL yöntemi ile immünohistokimyasal boyama işlemlerinden sonra ışık mikroskopunda değerlendirildi. Her iki beyin yarısı ayrı ayrı olacak şekilde subtalamik çekirdekler, hipokampüs ve pariyetal korteksteki TUNEL ile immünreaktivite gösteren hücreler

sayıldı. Sayım için kesitler ışık mikroskopik düzeyde önce küçük büyütmede ve 40 büyütme alanında tarandı. Sayım için uygun beş alan 400 büyütme (her büyük büyütme =152 μm^2 , toplam alan 760 μm^2) tarandı. TUNEL ile boyanan toplam nöronlar sayıldı.

3.5.3. Doku Örneklerinin Hazırlanması

Deney prosedürleri sonunda sıçanlardan çıkartılan beyin dokuları buz soğukluğunda serum fizyolojikle iyice yıkanarak kanlı kısımları temizlendi ve kurutma kâğıdı ile ıslaklığı giderildi. TAS ve TOS ölçümleri için alınan beyin dokuları PBS tampon çözelti içerisinde homojenizatör aracılığı (WiseTis, HG-15A, Korea) ile homojenize edildi. Doku homojenatları 4°C`de 7800 x g`de 15 dakika santrifüj edildi ve supernatantları alınarak -80°C`de çalışma anına kadar saklandı.

3.6. Biyokimyasal Ölçüm Yöntemleri

3.6.1. Total Oksidan Status (TOS) Ölçümü

TOS ölçümü ticari olarak üretilen ölçüm kiti (Total Oxidant Status Assay Kit, Ürün Kodu: RL0024, Rel Assay Diagnostics® Mega Tıp Ltd., Gaziantep, Türkiye) kullanılarak ELISA mikropate reader (Thermo Multiscan GO, 1510, Finland) analizöründe yapıldı. Kullanılan bu kitte; Örnekte bulunan oksidanlar ferro iyon (Fe^{+2})-o-dianisidine kompleksini ferrik iyon (Fe^{+3}) haline getirir. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyon xyleneol orange ile asidik ortamda renkli bileşik oluşturur. Renk yoğunluğu örnekte bulunan oksidan moleküllerinin miktarı ile ilişkilidir. Ölçüm hidrojen peroksit (H_2O_2) ile kalibre edilir. Sonuçlar litre başına mikromolar hidrojen peroksit equivalent olarak ifade edilir. ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L)(76).TOS için ölçüm prosedürü Tablo 3-1 de gösterilmiştir.

Tablo 3-1 TOS için Ölçüm Prosedürü

	Numuneler	Standart
Standart	-	75 µl
Numune (Doku supernatantı)	75 µl	-
Buffer solüsyon	500 µl	500 µl
Karıştırıldı, 30 saniye sonra 530 nm’de birinci absorbanslar okundu ve değerler kaydedildi. Aşağıdaki işlemlere devam edildi.		
Prokromojen çözelti	25 µl	25 µl
Karıştırıldı, oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. 530 nm’de ikinci absorbanslar okundu ve değerler kaydedildi		

TOS Sonuçlarının Hesaplanması: Yukardaki tabloda belirtilen işlemler yapıldıktan sonra aşağıdaki formül kullanılarak TOS için sonuçlar hesaplandı. Sonuçlar ‘µmol H₂O₂ Eq/L’ olarak ifade edildi.

$$\text{Sonuç (µmol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L)} = (\Delta A_N / \Delta A_S) \times C_S$$

ΔA_N = Numunenin ikinci absorbansı – Numunenin ilk absorbansı

ΔA_S = Standart’ın ikinci absorbansı – Standart’ın ilk absorbansı

C_S = Standart konsantrasyonu (10 µmol H₂O₂ Eq/L)

3.6.2. Total Antioksidan Status (TAS) Ölçümü

TAS ölçümü ticari olarak üretilen ölçüm kiti (Total Antioxidant Status Assay Kit, Ürün Kodu: RL0017, Rel Assay Diagnostics® Mega Tıp Ltd., Gaziantep, Türkiye) kullanılarak Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) mikroplate reader (Thermo Multiscan GO, 1510, Finland) analizöründe yapıldı. Erel (68) tarafından geliştirilen tam otomatik bir yöntem olup, güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bir metoddur. Bu yöntemin çalışma prensibi; Fe²⁺-o-dianisidin kompleksi hidrojen peroksit ile Fenton tipi reaksiyon oluşturarak OH radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen turu indirgenerek düşük

pH'da renksiz o-dianisidin molekülüyle reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidil radikallerini oluşturur. Dianisidil radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumunu artırır. Ancak örneklerdeki antioksidanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu durdurmaktadırlar. Ölçüm sonuçları mmol Trolox equivalent/L olarak ifade edilir (78). TAS için ölçüm prosedürü Tablo 3-2 de gösterilmiştir.

Tablo 3-2 TAS için Ölçüm Prosedürü

	Numuneler	Standart 1	Standart 2
Standart	-	30 µl	30 µl
Numune (Doku supernatantı)	30 µl	-	-
Buffer solüsyon	500 µl	500 µl	500 µl
Karıştırıldı, 30 saniye sonra 660 nm'de birinci absorbanslar okundu ve değerler kaydedildi. Aşağıdaki işlemlere devam edildi.			
Prokromojen çözelti	75 µl	75 µl	75 µl
Karıştırıldı, oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. 660 nm'de ikinci absorbanslar okundu ve değerler kaydedildi			

TAS Sonuçlarının Hesaplanması: Yukardaki tabloda belirtilen işlemler yapıldıktan sonra aşağıdaki formül kullanılarak TAS için sonuçlar hesaplandı. Sonuçlar 'mmol Trolox Eq/L' olarak ifade edildi.

$$\text{Sonuç (mmol Trolox Eq/L)} = (\Delta AS_1 - \Delta A_N) / (\Delta AS_1 - \Delta AS_2)$$

ΔAS_1 = Standart 1'in ikinci absorbansı – Standart 1'in ilk absorbansı

ΔAS_2 = Standart 2'nin ikinci absorbansı – Standart 2'nin ilk absorbansı

ΔA_N = Numunenin ikinci absorbansı - Numunenin ilk absorbansı

3.6.3. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

TOS düzeylerinin TAS düzeylerine oranının yüzde derecesi olarak ifade edilen OSİ hesaplanırken, TAS testinin birimindeki mmol değeri TOS testindeki gibi µmol birimine çevrildi (78). Sonuçlar “arbitrary unit” (AU) olarak ifade edildi ve aşağıdaki formüle göre hesaplandı (79).

$$OSİ = [(TOS, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equivalent/L}) / (TAS, \mu\text{mol Trolox equivalent/L}) \times 100]$$

3.6.4. Beyin Dokularından Total RNA İzolasyonu ve Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

3.6.4.1. Beyin Dokularından Total RNA İzolasyonu

Çalışmaya dâhil edilen beyin doku örneklerinden total RNA izolasyonu ticari kit (GeneJET RNA Purification Kit, Thermo, Cat No: # K0732) yardımı ile yapıldı. Total RNA izolasyonu için uygulanan protokolda temel basamaklar aşağıda verilmiştir:

1. Doku örnekleri (her biri en fazla 30 mg) alındıktan hemen sonra, kitle birlikte sağlanan 300 µl “Lysis Buffer (β-merkaptöetanol eklenmiş) tampon çözelti içinde homojenizatör (rotor-stator homojenizer, WiseTis, HG-15A, Korea) yardımı ile maksimum hızda 90-120 sn lize ve homojenize edilerek, steril, RNaz-free ependorf tüplerine aktarıldı.
2. Homojenize olmuş doku örneklerinin üzerine 600 µl dilue Proteinaz K ilave edilerek, 15-25°C’de 10 dk inkübe edildi. (Dilue Proteinaz K= 10 µl proteinaz K + 590 µl TE buffer) (TE Buffer = 10 mM Tris HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA).
3. Ependorf tüpündeki bu karışım 12.000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi ve üsteki sıvı pipetle alınıp, yeni bir steril ependorf tüpe aktarıldı.
4. Bu tüpe, toplam hacim kadar %96-100’lük etanol ilave edildi ve mikropipet yardımı ile homojenize edildi.

5. Bu karışımdan 700 µl alındı ve 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş olan spin kolona aktarıldı ve 12.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildikten sonra toplama tüpü değiştirildi.
6. Spin kolona 700 µl "Wash Buffer 1 (% 96-100 ethanol eklenmiş)" ilave edildi ve 12.000 rpm'de 1 dk. satrifuj edildikten sonra toplama tüpü yeniden değiştirildi.
7. Spin kolona 600 µl "Wash Buffer 2 (% 96-100 ethanol eklenmiş)" ilave edildi ve 12.000 rpm'de 1 dk. satrifuj edildikten sonra toplama tüpü yeniden değiştirildi.
8. Spin kolona 250 µl "Wash Buffer 2 (% 96-100 ethanol eklenmiş)" ilave edildi ve 12.000 rpm'de 2 dk. satrifuj edildikten sonra toplama tüpü yeniden değiştirildi.
9. Her bir spin kolon steril, RNaz-free 1.5 ml'lik ependorf tüpüne yerleştirildi ve üzerine 100 µl Water nuclease-free eklenerek, 12.000 rpm'de 1 dk. santrifuj edildi.
10. Elde edilen total RNA örnekleri kullanılacağı zamana kadar -20 veya -70°C'de saklandı.

3.6.4.2. Total RNA Konsantrasyonlarının ve Saflık Derecelerinin Belirlenmesi

Çalışma grubuna ait 40 adet beyin dokusundan izole edilen total RNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflıkları, spektrofotometrik yöntemle (Maestro Nano Micro-Volume spectrophotometer, Maestrogen Inc., Las Vegas, NV) belirlendi. Ölçümler sırasında disposable spektrofotometre küvetleri (Eppendorf) kullanıldı. Konsantrasyon ölçümü yapılmadan önce, 0.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinde total RNA örneklerinin 1/50 oranında sulandırmaları hazırlandı. Daha sonra, 1/50 oranında sulandırılan RNA örnekleri, disposable spektrofotometre küvetlerine aktarıldı ve spektrofotometrenin ssRNA programında konsantrasyon ve saflık dereceleri belirlendi. Tüm örneklerin "Konsantrasyon, A260, A280, A260/280 oranı" değerleri kaydedildi ve her bir örneğin "stok konsantrasyonları" hesaplandı.

3.6.4.3. Total RNA Örneklerinden cDNA Sentezi

İzole edilen total RNA örneklerinden cDNA sentezi, ticari kit (EasyScript™ cDNA Synthesis Kit, abm) yardımı ile yapıldı. cDNA sentezi için uygulanan protokolde temel basamaklar aşağıda verildi:

1. Genomik DNA'nın eliminasyonu amacıyla, her örnek için aşağıdaki Template RNA reaksiyon karışımı hazırlandı.

Komponent	Miktar
Oligo (dT) (10 µM)	1 µl
dNTP Mix (10 mM each)	1 µl
Nuclease-free H ₂ O	14.5 µl
Total RNA	3.5 µl
Toplam hacim	20 µl

2. Hazırlanan reaksiyon karışımı 65 °C'de 5 dk karıştırıldı ve 1 dk buzda inkübe edildi.
3. Reverse transkripsiyon amacıyla, her örnek için aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı:

Komponent	Miktar
5XRT Buffer	4 µl
RNaseOFF Ribonuclease inhibitör (40 U/ µl)	0.5 µl
EasyScript Plustm RTase (200 U/ µl)	1 µl

4. Bu karışım, bir önceki basamaktan elde edilen Template RNA reaksiyon karışımına (20 µl) ilave edildi.
5. Reverse transkriptazı inaktive etmek için, örnekler 50 °C'de 50 dk inkübe edildi.
6. Stop reaksiyon için 85 °C'de 5 dk inkübe edildi ve buzda bekletildi.
7. Bu aşamaların sonunda 20 µl miktarında cDNA elde edildi.
8. Örnekler, gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile analiz edilmek üzere -20 °C'de saklandı.

3.6.4.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Gen Ekspresyonu

Tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α), intelökin (IL-6), nöron growth faktör (NGF), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) (hedef gen), ve β -aktin (referans gen) için relatif kantitasyon analizi, gerçek-zamanlı PCR sistemi (LightCycler 480 Gerçek-zamanlı PCR Sistemi, Roche Diagnostics) kullanılarak yapıldı. Hedef genlerin mRNA düzeyinde ekspresyon analizi için kullanılan primer setlerinin dizaynı yapıldı ve sentezletildi. Gerçek-zamanlı kantitatif PCR analizinde kullanılan hedef ve referans genlere özgün primer setlerinin dizilimleri Tablo 3-3'de verilmiştir.

Tablo 3-3 TNF-alfa, IL-6, NGF, iNOS ve β -aktin mRNA ekspresyon analizinde kullanılan özgün problemlerin ve primer setlerinin dizilimleri (5'→3')

TNF-alfa	
Primer seti	Sense: 5'-CCA CCA CGC TCT TCT GTC TAC-3' Anti-sense: 5'-GCT ACG GGC TTG TCA CTC G-3'
IL-6	
Primer seti	Sense: 5'-CTT CCA GCC AGT TGC CTT CTT G-3' Anti-sense: 5'-TGG TCT GTT GTG GGT GGT ATC C-3'
NGF	
Primer seti	Sense: 5'-CCA AGG ACG CAG CTT TCT AT-3' Anti-sense: 5'-CTC CGG TGA GTC CTG TTG AA-3'
iNOS	
Primer seti	Sense: 5'-TGT TGT AGC GCT GTG TGT CA-3' Anti-sense: 5'-CAC CTT GGA GTT CAC CCA GT-3'
β-Aktin	
Primer seti	Sense: 5'-AGG CCA ACC GTG AAA AGA TG-3' Anti-sense: 5'-ACC AGA GGC ATA CAG GGA CAA-3'

TNF-alfa, IL-6, NGF, iNOS mRNA düzeyinde ekspresyonlarını kantite etmek için, her bir hedef gen için ve aynı zamanda referans gen için de optimize edilen gerçek-zamanlı PCR karışımı ve protokolü uygulandı (Tablo 3-4 ve 3-5).

Tablo 3-4 TNF-alfa, IL-6, NGF, iNOS ve β -aktin genlerinin mRNA düzeyinde kantitasyonu amacı ile hazırlanan reaksiyon karışımı

Karışım	Hacim (μ l)	Final konsantrasyon
2xmaster mix	10 μ l	1X
Forward Primer	0,6 μ l	300 nM
Revers Primer	0,6 μ l	300 nM
cDNA örneği	5 μ l	-
PCR-grade su	3.8 μ l	-
Toplam	20 μl	

Tablo 3-5 TNF-alfa, IL-6, NGF, iNOS ve β -aktin genlerinin mRNA düzeyinde kantitasyonu amacı ile uygulanan gerçek-zamanlı PCR protokolü*

Analiz Modu	Döngü	Segment	Isı	Süre
Pre-inkübasyon				
	1		95°C	30 sn
Amplifikasyon				
	35-40	Denatürasyon	95°C	15 sn
		Annealing / Ekstensiyon	60°C	60 sn

* **Gerçek-zamanlı PCR Protokolü**; Pre-inkübasyon: Enzim aktivasyonu ve kalıp cDNA'nın denatürasyonu, **Amplifikasyon**: Hedef bölgenin primerler yardımı ile çoğaltılması basamaklarını içermektedir.

Optimize edilen protokollerle örneklerin gerçek-zamanlı PCR aşamaları tamamlandı ve "relatif kantitatif" olarak örneklerin ekspresyon düzeyleri belirlendi. Kontrol gen ekspresyonu olarak β -aktin (housekeeping gene, eksternal standart) kullanıldı. β -aktin gen ekspresyonu internal kontrol olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda gerçek-zamanlı PCR ile kantitasyon sırasında hedef ve referans cDNA miktarları arasındaki farklılığı, örnek yüklemedeki varyasyonları ve PCR

inhibitörlerinin etkisini dengelemede yardımcı olması amacı ile de seçildi. Bu amaçla, her bir örneğin hedef gene ait mRNA ekspresyon düzeyinin ortalama Ct değerleri, aynı örneğin referans gen olan β -aktin için ayrı ayrı hesaplandı. Sonuçlar Comperative Ct yöntemi ile hesaplandı. “Ct (threshold cycle) değışkeni; tespit edilen floresan ışınım eşik değerinin aşıldığı döngü sayısını belirtir.”

3.7. İstatiksel Analiz

İstatiksel değerlendirmeler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 23.0 paket programı kullanarak yapılmıştır. Bütün değerler ortalama \pm standart error şeklinde verilmiştir. İki den fazla gruplar arası karşılaştırmalar Kruskal-Wallis testi ile, ikili grupların karşılaştırılması ise Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır, $p \leq 0,05$ ' den küçük değerler istatiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

HİBH oluşturulmak üzere çalışmaya alınan 40 adet erkek yedi günlük yenidoğan sıçan rastgele 10'ar lı 4 gruba ayrıldı.

Grup 1'deki (Kontrol grubu): 10 sıçanın deney başlangıcında (7. gün) ortalama ağırlıkları $10,84 \pm 0,92$ gr idi. Bu sıçanların boyun diseksiyonu ile sol karotis arterleri bulunduktan sonra bağlanmadan boyun katları kapatıldı ve apoptotik nöron sayımı için beyin dokuları çıkarılarak dekapite edildi.

Grup 2'deki (Hipoksi iskemik beyin hasarı sonrası SF uygulanan): 10 sıçanın deney başlangıcında (7. gün) ortalama ağırlıkları $12,93 \pm 0,89$ gr idi. Bu sıçanlara uygulanan anestezi sonrası boyun orta hattan künt diseksiyonlarla sol karotis arter bağlandıktan sonra hipoksi odacığına alınarak 2 saat boyunca hipoksiye maruz bırakılmasının ardından 30 dk sonra (77) 15 ml/kg dozundan SF uygulamasından 5 saat sonra (76)nöron sayımı için beyin dokuları çıkarılarak dekapite edildi.

Grup 3'te (hipoksik iskemik beyin hasarı sonrası 50 µmol/kg NaHS uygulanan): 10 sıçanın deney başlangıcında (7. gün) ortalama ağırlıkları $13,01 \pm 0,74$ gr idi. Bu sıçanlara uygulanan anestezi sonrası boyun orta hattan künt diseksiyonlarla sol karotis arter bağlandıktan sonra hipoksi odacığına alınarak 2 saat boyunca hipoksiye maruz bırakılmasının ardından 30 dk sonra 50 µmol/kg ip NaHS uygulandı (77). Denekler uygulamadan 5 saat sonra (76) nöron sayımı için beyin dokuları çıkarılarak dekapite edildi.

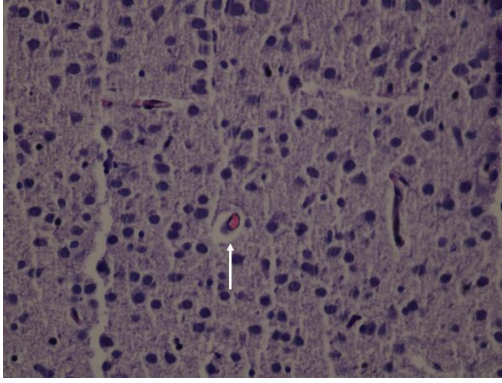
Grup 4'te (hipoksik iskemik beyin hasarı sonrası 100 µmol/kg NaHS uygulanan): 10 sıçanın deney başlangıcında (7. gün) ortalama ağırlıkları $11,95 \pm 0,54$ gr idi. Bu sıçanlara uygulanan anestezi sonrası boyun orta hattan künt diseksiyonlarla sol karotis arter bağlandıktan sonra hipoksi odacığına alınarak 2 saat boyunca hipoksiye maruz bırakılmasının ardından 30 dk sonra 100 µmol/kg ip NaHS uygulandı (77). Denekler uygulamadan 5 saat sonra (76) nöron sayımı için beyin dokuları çıkarılarak dekapite edildi.

4.1. Histopatolojik Bulgular

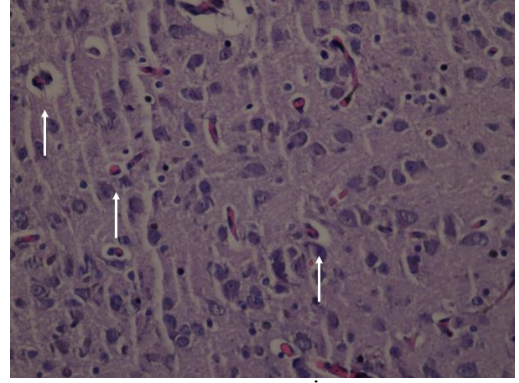
Hipoksi-iskemi uygulamasını takiben dekapite edilen yedi günlük sıçanların beyinlerinin her iki yarısı da makroskopik olarak normal görünümdeydi. Ayrıca yapılan koronal kesitler makroskopik olarak normal idi ve kanama, ödem ve enfarkt alanı saptanmadı. Rutin hematoksiyen eozin boyası ile apoptotik nöronlar normal morfolojideki nöronlara göre yuvarlak sınırlı, nükleer kondansasyon ve sitoplazmik büzüşme göstermekteydi. Normal görünümlü nöronlarda TUNEL ve ile pozitif boyanma izlenmezken, apoptotik hücrelerin çoğu TUNEL ile nükleer pozitif boyanmaktaydı.

4.1.1. H&E Yöntemiyle Beyindeki Apoptotik Hücrelerin Değerlendirilmesi

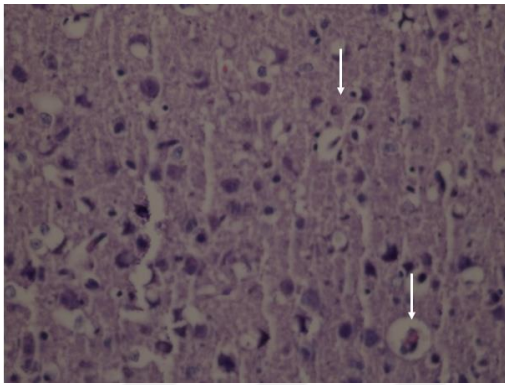
Hipoksi iskemi uygulanan sıçanların beyinde, H&E yöntemiyle boyanan apoptotik hücre sayılarında artış gözlemlendi. Hipoksi iskemi sonrası grup 2, 3 ve 4'teki yavru sıçanların ortalama apoptotik hücre sayıları sırasıyla $10 \pm 0,21$, $5,9 \pm 0,45$ ve $6,9 \pm 0,34$ iken; Grup 1'deki sıçanlarda ortalama apoptotik hücre sayısı $2,5 \pm 0,16$ olarak bulundu. Kontrol, Hİ, 50 $\mu\text{mol/kg}$ NaHS ve 100 $\mu\text{mol/kg}$ NaHS gruplarının beyin dokusundaki apoptotik hücre sayıları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p=0,00$). Ayrıca ikili karşılaştırmalarda, 100 $\mu\text{mol/kg}$ NaHS grubunda 50 $\mu\text{mol/kg}$ NaHS grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmezken ($p=0,19$), Hİ ile 50 $\mu\text{mol/kg}$ NaHS ve Hİ ile 100 $\mu\text{mol/kg}$ NaHS grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur (p değeri her ikisi için de 0,00). H&E yöntemi ile boyanan apoptotik hücreler Şekil 4-1, 4-2, 4-3 ve 4-4'de gösterilmiştir. Bu yöntemle çalışılan apoptotik hücre sayıları Şekil 4-5'de verilmiştir.



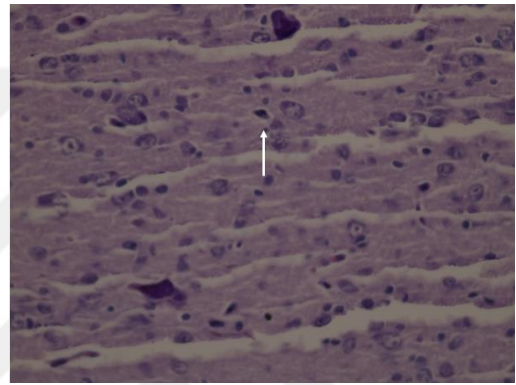
Şekil 4-1 H&E Yöntemi Kontrol Grubu



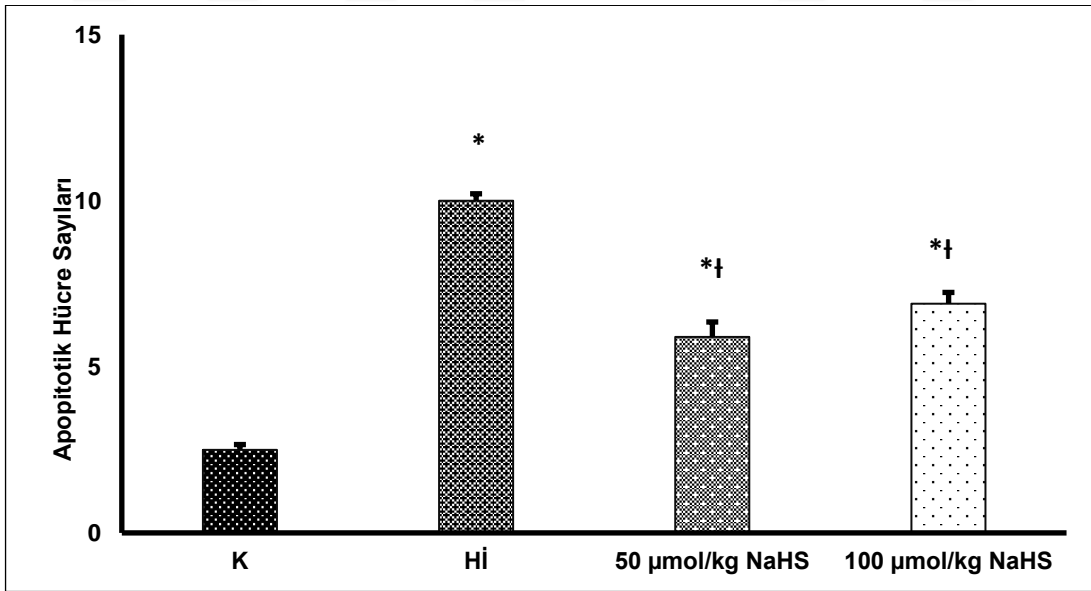
Şekil 4-2 H&E Yöntemi Hİ Oluşturulan Grup



Şekil 4-3 H&E Yöntemi 50 µmol/kg NaHS



Şekil 4-4 H&E Yöntemi 100 µmol/kg NaHS



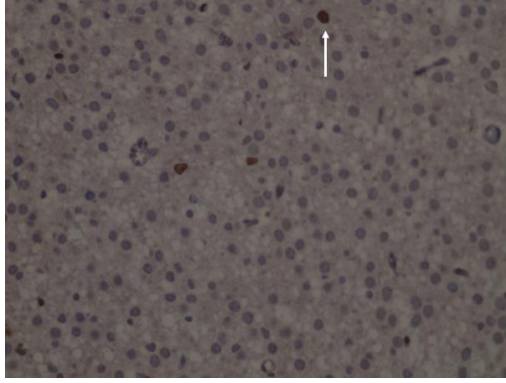
Şekil 4-5 H&E yöntemi ile beyin dokusunda saptanan apoptotik nöronların gruplara göre dağılımı.

*; K ile Hİ, 50 µmol/kg NaHS , 100 µmol/kg NaHS grupları arasındaki anlamlılığı ($p \leq 0.05$) ifade eder (Mann Whitney U test).

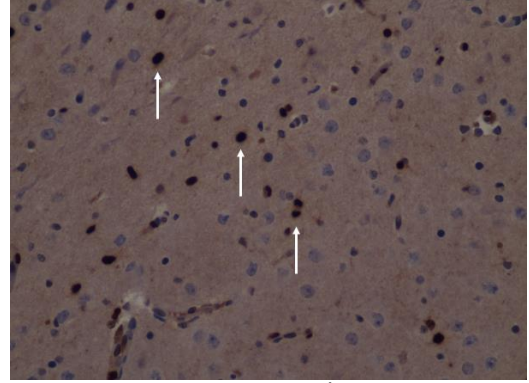
†; Hİ ile 50 µmol/kg NaHS, 100 µmol/kg NaHS grupları arasındaki anlamlılığı ($p \leq 0.05$) ifade eder (Mann Whitney U test).

4.1.2. TUNEL Yöntemiyle Beyindeki Apoptotik Hücrelerin Değerlendirilmesi

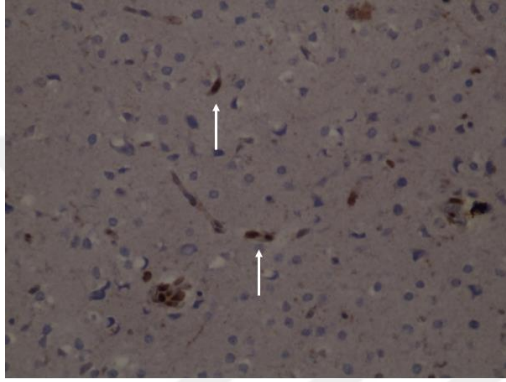
Tüm sıçan gruplarının beyin dokuları TUNEL yöntemiyle boyandı. Hipoksi iskemi modeli oluşturulan sıçan gruplarının beyin dokularındaki apoptotik nöronlarda artış olduğu gözlemlendi. Grup 2, 3 ve 4'teki yavru sıçanların ortalama apoptotik hücre sayıları sırasıyla $13,2 \pm 0,72$, $13,2 \pm 0,72$ ve $6,9 \pm 0,43$ iken; Grup 1'deki sıçanlarda ortalama apoptotik hücre sayısı $2,6 \pm 0,16$ olarak bulundu. Kontrol, Hİ, 50 $\mu\text{mol/kg}$ NaHS ve 100 $\mu\text{mol/kg}$ NaHS gruplarının beyin dokusundaki apoptotik hücre sayıları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p=0,00$). Ayrıca ikili karşılaştırmalarda, 100 $\mu\text{mol/kg}$ NaHS grubunda 50 $\mu\text{mol/kg}$ NaHS grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmezken ($p=0,43$), Hİ ile 50 $\mu\text{mol/kg}$ NaHS ve Hİ ile 100 $\mu\text{mol/kg}$ NaHS grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur (p değeri her ikisi için de 0,00). H&E yöntemi ile boyanan apoptotik hücreler Şekil 4-6, 4-7, 4-8 ve 4-9 de gösterilmiştir. Bu yöntemle çalışılan apoptotik hücre sayıları Şekil 4-10'da verilmiştir.



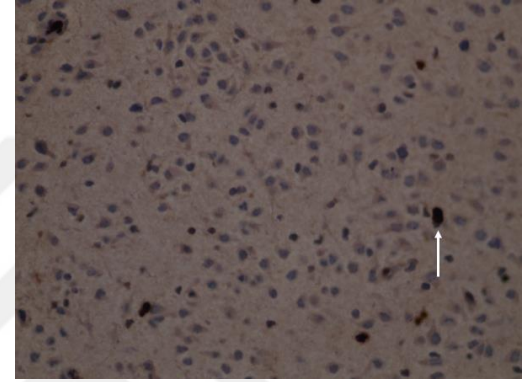
Şekil 4-6 TUNEL Yöntemi Kontrol Grubu



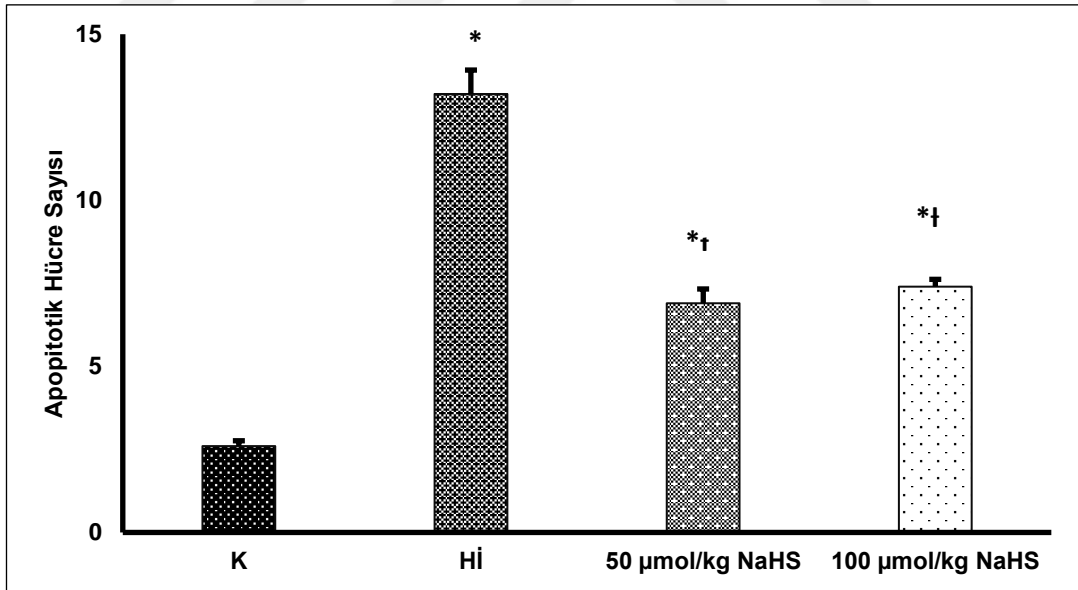
Şekil 4-7 TUNEL Yöntemi Hİ Oluşturulan Grup



Şekil 4-8 TUNEL Yöntemi 50 µmol/kg NaHS



Şekil 4-9 TUNEL Yöntemi 100 µmol/kg NaHS



Şekil 4-10 TUNEL yöntemi ile beyin dokusunda saptanan apoptotik nöronların gruplara göre dağılımı.

*; K ile Hİ, 50 mmol/kg NaHS , 100 mmol/kg NaHS grupları arasındaki anlamlılığı ($p \leq 0.05$) ifade eder (Mann Whitney U test).

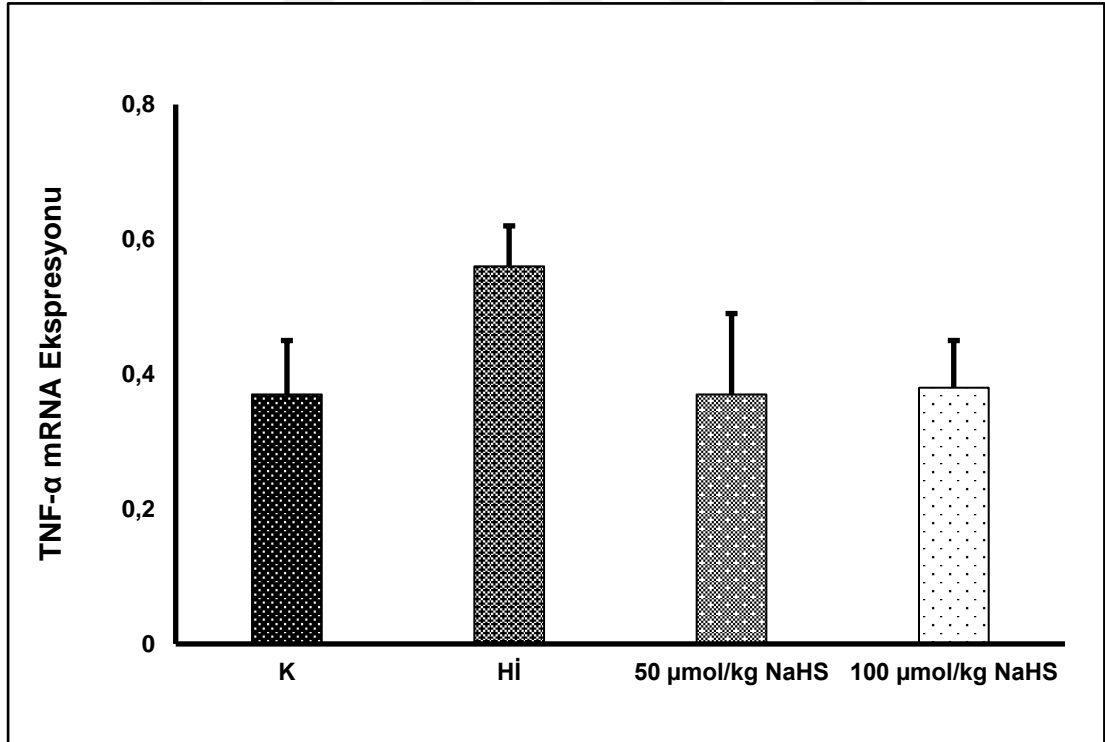
†; Hİ ile 50 mmol/kg NaHS, 100 mmol/kg NaHS grupları arasındaki anlamlılığı ($p \leq 0.05$) ifade eder (Mann Whitney U test).

4.2. Biyokimyasal Bulgular

4.2.1. Beyin dokusunda TNF- α , IL-6, NGF ve iNOS geni mRNA ekspresyon düzeyleri

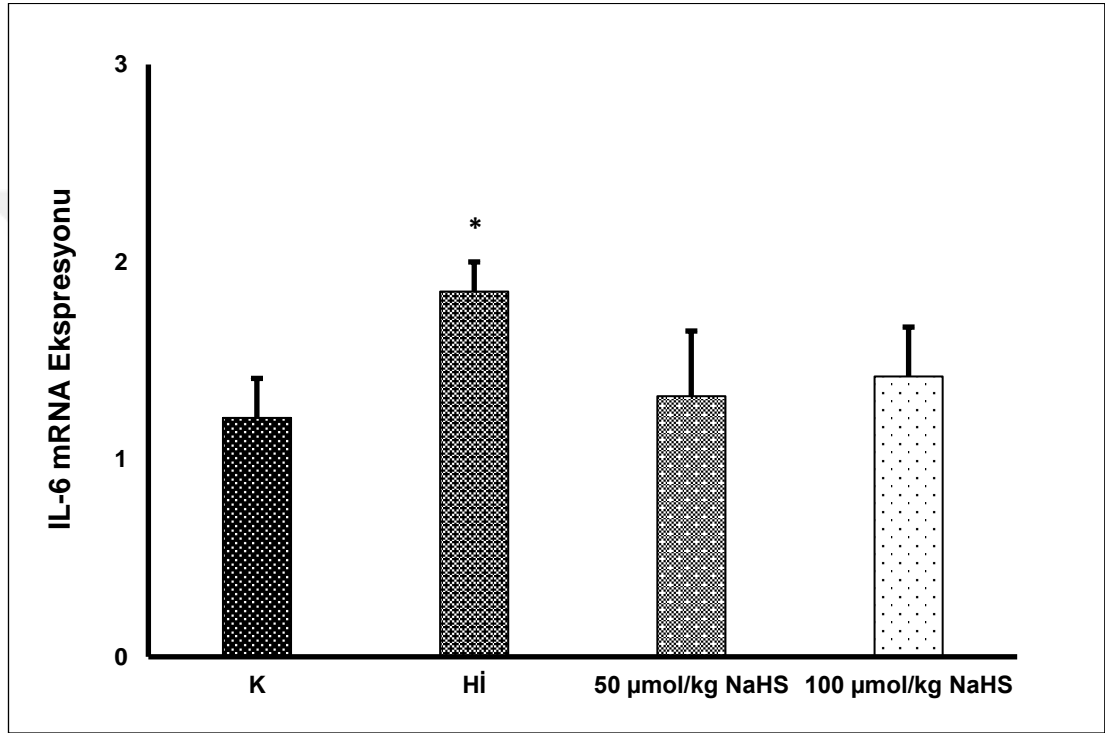
Çalışmaya dahil edilen gruplara ait beyin doku örneklerinde TNF- α , IL-6, nöral NGF ve iNOS geni mRNA ekspresyon düzeyleri β -aktin geni mRNA düzeyine göre relatif olarak belirlendi.

Kontrol (0.37 ± 0.08), Hİ (0.56 ± 0.06), 50 $\mu\text{mol/kg}$ NaHS (0.37 ± 0.12) ve 100 $\mu\text{mol/kg}$ NaHS (0.38 ± 0.07) grupların beyin dokusunda TNF- α gen mRNA düzeylerinin karşılaştırılmasında anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p=0.341$). İkili karşılaştırmalarda, 50 $\mu\text{mol/kg}$ NaHS ve 100 $\mu\text{mol/kg}$ NaHS gruplarında Hİ grubuna göre TNF- α gen mRNA ekspresyon düzeyindeki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi. Gruplardaki TNF- α gen mRNA ekspresyon düzeyleri Şekil 4-11’de gösterilmiştir.



Şekil 4-11 Çalışma gruplarında ölçülen TNF- α gen mRNA ekspresyon konsantrasyonları

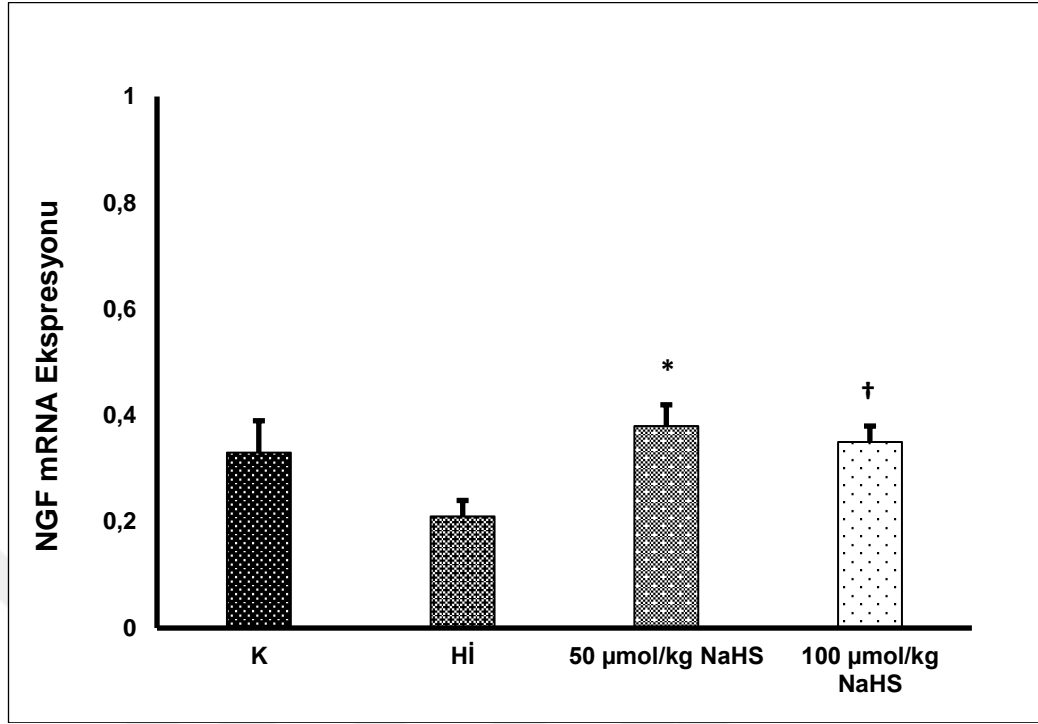
Kontrol (1.21 ± 0.20), Hİ (1.85 ± 0.15), 50 $\mu\text{mol/kg}$ NaHS (1.32 ± 0.33) ve 100 $\mu\text{mol/kg}$ NaHS (1.42 ± 0.25) beyin dokusu IL-6 gen mRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında gruplar arasındaki farkın anlamlı olmadığı görüldü ($p=0.245$). İkili karşılaştırmalarda ise Hİ grubunda, kontrol grubuna göre IL-6 gen mRNA ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı ($p= 0.017$). Gruplardaki IL-6 gen mRNA ekspresyon düzeyleri Şekil 4-12’de gösterilmiştir.



Şekil 4-12 Çalışma gruplarında ölçülen IL-6 gen mRNA ekspresyon konsantrasyonları

*; K ile Hİ grupları arasındaki anlamlılığı ($p \leq 0.05$) ifade eder (Mann Whitney U test).

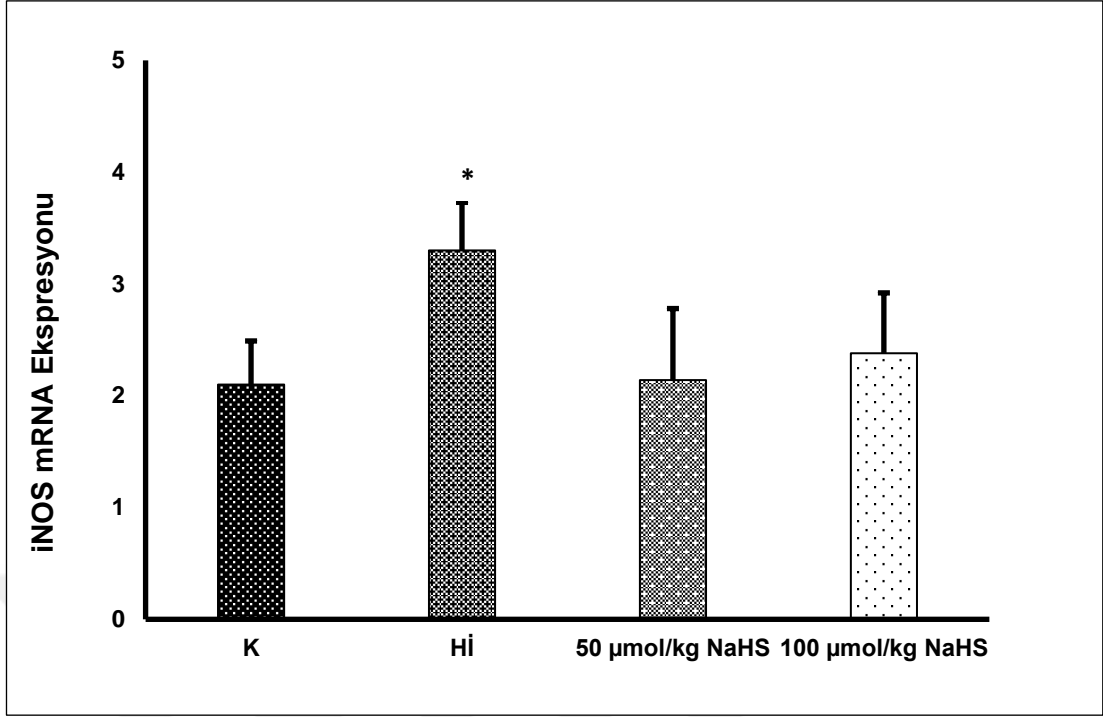
Kontrol (0.33 ± 0.06), Hİ (0.21 ± 0.03), 50 $\mu\text{mol/kg}$ NaHS (0.38 ± 0.04) ve 100 $\mu\text{mol/kg}$ NaHS (0.35 ± 0.03) beyin dokusu NGF gen mRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında gruplar arasındaki farkın anlamlı olmadığı görüldü ($p=0.110$). İkili karşılaştırmalarda Hİ grubunda, 50 $\mu\text{mol/kg}$ NaHS ve 100 $\mu\text{mol/kg}$ NaHS gruplarına göre NGF gen mRNA ekspresyon seviyesinde anlamlı bir şekilde düşüş gözlemlendi (sırasıyla $p=0.026$, $p=0.017$). Gruplardaki NGF gen mRNA ekspresyon düzeyleri Şekil 4-13’de gösterilmiştir.



Şekil 4-13 Çalışma gruplarında ölçülen NGF gen mRNA ekspresyon konsantrasyonları

*; Hİ ile 50 µmol/kg NaHS grupları arasındaki anlamlılığı ($p \leq 0.05$) ifade eder (Mann Whitney U test).
 †; Hİ ile 100 µmol/kg NaHS grupları arasındaki anlamlılığı ($p \leq 0.05$) ifade eder (Mann Whitney U test).

Kontrol (2.10 ± 0.39), Hİ (3.30 ± 0.43), 50 µmol/kg NaHS (2.14 ± 0.64) ve 100 µmol/kg NaHS (2.38 ± 0.54) beyin dokusu iNOS gen mRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında gruplar arasındaki farkın anlamlı olmadığı görüldü ($p=0.268$). İkili karşılaştırmalarda kontrol grubuna göre Hİ grubunun iNOS gen mRNA ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış gözlemlendi (sırasıyla $p=0.05$). Gruplardaki iNOS gen mRNA ekspresyon düzeyleri Şekil 4-14'te gösterilmiştir.



Şekil 4-14 Çalışma gruplarında ölçülen iNOS gen mRNA ekspresyon konsantrasyonları

*; K ile Hİ grupları arasındaki anlamlılığı ($p \leq 0.05$) ifade eder (Mann Whitney U test).

4.2.2. Beyin Doku TAS, TOS ve OSİ Konsantrasyonları

Hipoksik iskemik ensefalopatili yeni doğan sıçanlarda Sodyum hidrosülfid'in (NaHS) etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada, grupların beyin dokusundaki Total Antioksidan Status, Total Oksidan Status ve Oksidatif Stres İndeksi konsantrasyon düzeyleri arasındaki farklılıklar karşılaştırıldı. Kontrol, Hİ, 50 µmol/kg NaHS ve 100 µmol/kg NaHS gruplarına ait sonuçlar Tablo 4-1'de verildi.

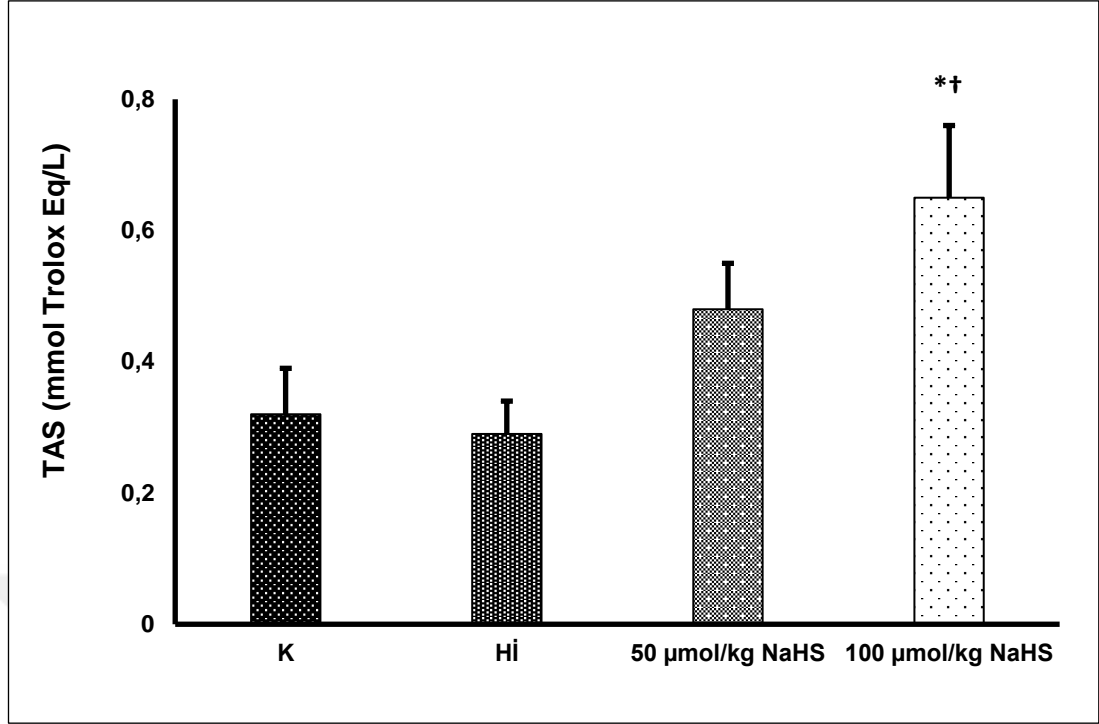
Tablo 4-1 Çalışma gruplarında ölçülen Total Antioksidan Status (TAS), Total Oksidan Status (TOS) ve Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) konsantrasyonları

Gruplar	K (n=9)	Hİ (n=9)	50 µmol/kg NaHS (n=9)	100 µmol/kg NaHS (n=9)	p
TAS mmol/L	0.32 ± 0.07 ^a	0.29 ± 0.05 ^b	0.48 ± 0.07	0.65 ± 0.11 ^{ab}	0.041
TOS µmol/L	14.4 ± 0.77 ^{ab}	25.9 ± 3.28 ^{ac}	20.7 ± 0.80 ^b	17.5 ± 1.77 ^c	0.000
OSİ	4.78 ± 0.97 ^a	15.9 ± 4.08 ^{abc}	4.63 ± 0.90 ^b	4.28 ± 1.05 ^c	0.032

p: Gruplar arasındaki anlamlılığı ifade eder (Kruskal Wallis).

a,b,c; Aynı satırda, aynı harfi taşıyanlar arasındaki istatistiksel olarak anlamlılık $p \leq 0.05$ düzeyinde anlamlıdır (Mann Whitney U test).

Kontrol, Hİ, 50 µmol/kg NaHS ve 100 µmol/kg NaHS gruplarının beyin dokusu TAS konsantrasyonları karşılaştırıldığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p=0.041$) TAS konsantrasyonları arasındaki farklılık Tablo 4-1 de gösterilmiştir. Ayrıca ikili karşılaştırmalarda, 100 µmol/kg NaHS grubunda 50 µmol/kg NaHS grubuna göre TAS konsantrasyonlarında anlamlı bir değişim gözlenmezken, 100 mmol/kg NaHS grubunda kontrol ve Hİ gruplarına göre TAS konsantrasyonları istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü ($p=0.014$, $p= 0.04$). Gruplardaki TAS konsantrasyonları Şekil 4-15’de gösterilmiştir.

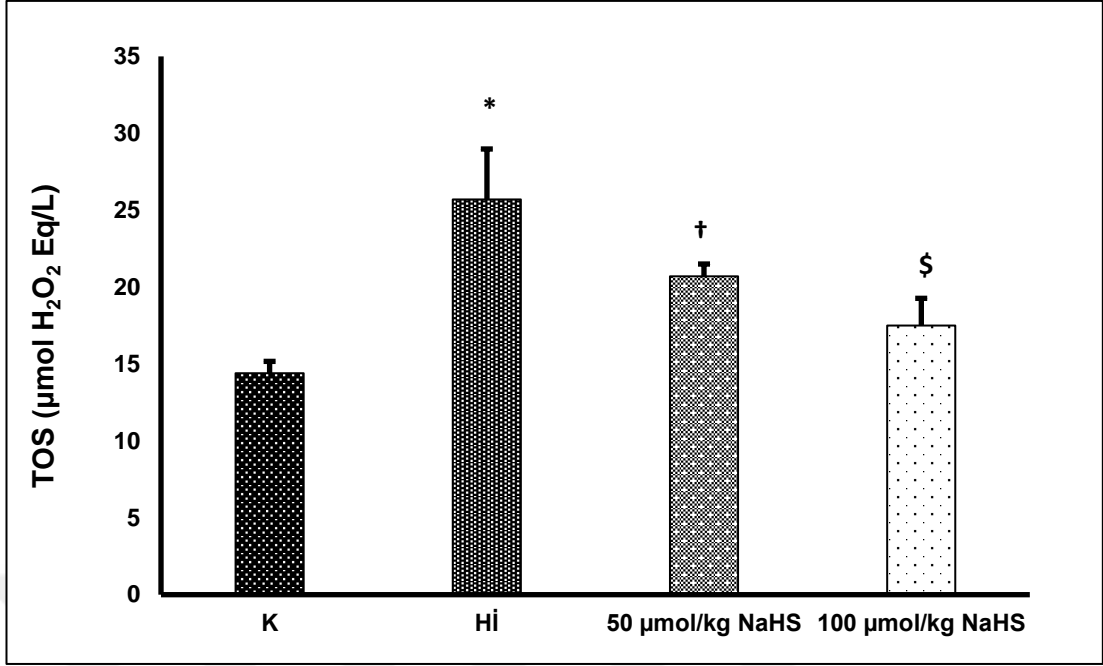


Şekil 4-15 Çalışma gruplarında ölçülen Total Antioksidan Status (TAS) konsantrasyonları

*; K ile 100 µmol/kg NaHS grupları arasındaki anlamlılığı ($p \leq 0.05$) ifade eder (Mann Whitney U test).

†; Hİ ile 100 µmol/kg NaHS grupları arasındaki anlamlılığı ($p \leq 0.05$) ifade eder (Mann Whitney U test).

Kontrol, Hİ, 50 µmol/kg NaHS ve 100 µmol/kg NaHS grupları, beyin dokusu TOS düzeyleri bakımından birbirleriyle karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı bir fark bulundu ($p=0.000$). TOS konsantrasyonları arasındaki farklılık Tablo 4-1 de gösterilmiştir. TOS düzeyleri bakımından gruplar ikili olarak karşılaştırıldığında, Hİ ve 50 µmol/kg NaHS gruplarında kontrol grubuna göre TOS düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu, bu anlamlılıklar sırasıyla ($p=0.000$ ve $p=0.000$) şeklindedir. Bunun yanında Hİ grubuna göre, 100 µmol/kg NaHS grubunun TOS düzeylerinin anlamlı olarak düşük olduğu görüldü ($p=0.021$). Gruplardaki TOS konsantrasyonları Şekil 4-16'da gösterilmiştir.



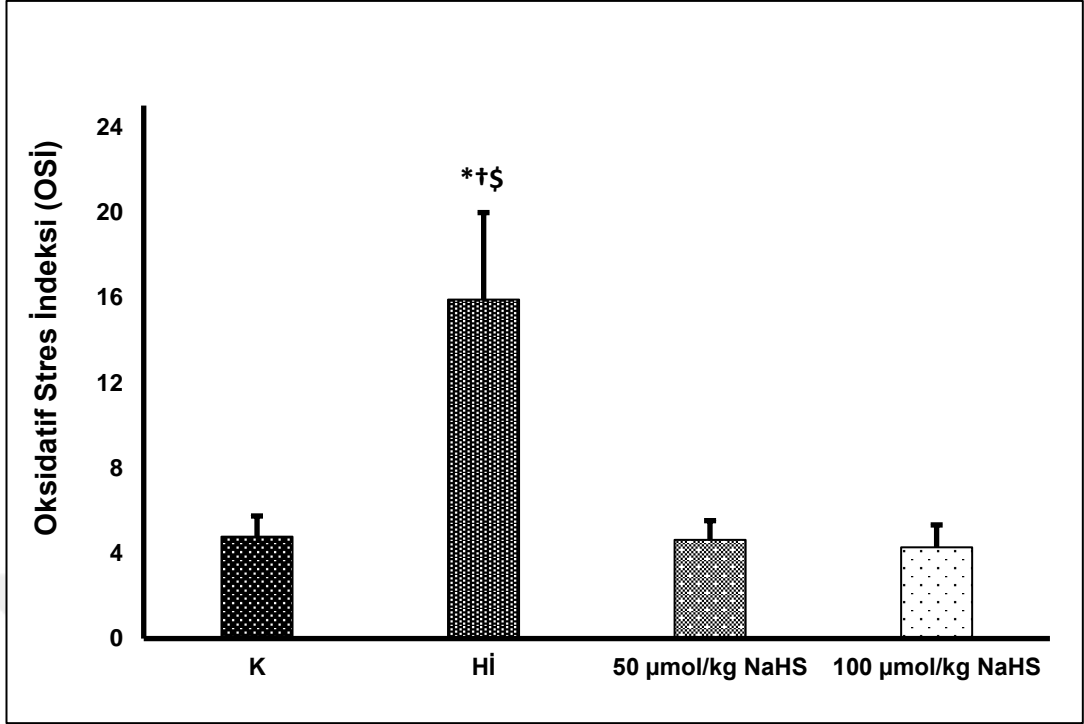
Şekil 4-16 Çalışma gruplarında ölçülen Total Oksidan Status (TOS) konsantrasyonları

*; K ile Hİ grupları arasındaki anlamlılığı ($p \leq 0.05$) ifade eder (Mann Whitney U test).

†; K ile 50 µmol/kg NaHS grupları arasındaki anlamlılığı ($p \leq 0.05$) ifade eder (Mann Whitney U test).

§; Hİ ile 100 µmol/kg NaHS grupları arasındaki anlamlılığı ($p \leq 0.05$) ifade eder (Mann Whitney U test).

Kontrol, Hİ, 50 µmol/kg NaHS ve 100 µmol/kg NaHS gruplarının OSİ düzeyleri karşılaştırıldığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p=0.032$). OSİ konsantrasyonları arasındaki farklılık Tablo 4-1 de gösterilmiştir. Hİ grubunu kontrol, 50 µmol/kg NaHS ve 100 µmol/kg NaHS gruplarıyla karşılaştırıldığında Hİ grubunda OSİ düzeyindeki artış istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı, bu anlamlılıklar sırasıyla ($p=0.027$, $p=0.024$ ve $p=0.011$) şeklindedir. Gruplardaki OSİ konsantrasyonları Şekil 4-17’de gösterilmiştir.



Şekil 4-17 Çalışma gruplarında ölçülen Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) konsantrasyonları

*; K ile Hİ grupları arasındaki anlamlılığı ($p \leq 0.05$) ifade eder (Mann Whitney U test).

†; Hİ ile 50 µmol/kg NaHS grupları arasındaki anlamlılığı ($p \leq 0.05$) ifade eder (Mann Whitney U test).

§; Hİ ile 100 µmol/kg NaHS grupları arasındaki anlamlılığı ($p \leq 0.05$) ifade eder (Mann Whitney U test).

5. TARTIŞMA

HİE, yenidoğan döneminde meydana gelen ölümlerin, yenidoğan dönemi sonrasında ise serebral palsy, zeka geriliği ve epilepsinin önde gelen nedenlerinden biridir. Bu çalışmada, HİBH oluşturulan yenidoğan sıçan modelinde NaHS antioksidan etkileri, histopatolojik ve biyokimyasal testlerle değerlendirildi.

H₂S, anjiyogenez indüksiyonu (80), vazodilatasyon, nöronal aktivitenin ve (81), glukoz metabolizmasının düzenlenmesi aracılığıyla; kalp, karaciğer, böbrek, akciğer ve beyin dokusunda iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu rol oynadığı bilinen bir moleküldür (82). Sodyum Hidrosülfid (NaHS), ekzojen H₂S'ün vericisi olup serumda direkt H₂S'e dönüşebilir. Çalışmamızda hipoksik-iskemik ensefalopati oluşturduğumuz sıçanlarda ip yol ile 50 µmol/kg ve 100 µmmol/kg dozlarında NaHS uygulayarak H₂S'nin antioksidan etkinliğini değerlendirdik.

Yapılan çalışmalarda hipoksi iskemi sonrasında oluşan reperfüzyon döneminde TNF- α , gibi enflamatuvar sitokinlerin yoğun olarak salındığı tespit edilmiştir. Salınan bu sitokinlerin HİBH'yi arttırdığı gösterilmiştir (83, 84). Bu nedenle inflamasyonu arttıran sitokinlerin baskılanmasının oluşacak beyin hasarını azaltabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda hipoksik iskemik beyin hasarı oluşturulan sıçanlarda ölçülen TNF- α gen mRNA ekspresyon düzeyinde artış olduğu saptanmıştır. HİBH oluşturulduktan sonra 50 µmol/kg ve NaHS ve 100 µmol/kg NaHS verilen gruplarda, HİBH oluşturulup sadece SF verilen gruba göre TNF- α gen mRNA ekspresyon düzeyinde düşüş saptanmıştır. Bununla birlikte 50 µmol/kg ve NaHS ve 100 µmol/kg NaHS grupları karşılaştırıldığında 50 µmol/kg verilen gruptaki TNF- α gen mRNA ekspresyon düzeyindeki azalmanın 100 µmol/kg verilen gruptaki TNF- α düzeyindeki azalmadan daha fazla olduğu saptandı. Bu veriler karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü. NaHS'nin nöroprotektif etkilerinin incelendiği Yin Jun ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sıçan beyininde oluşturulan iskemi- reperfüzyon hasarında 50 µmol/kg uygulanan gruba göre 100 µmol/kg uygulanan grupta TNF- α düzeyinde benzer olarak belirgin bir düşüş saptamışlardır(75).

Yine Li Fang Hu ve arkadaşlarının yaptıkları mikroglial hücre kültürlerinde lipopolisakkarid ile indüklenen inflamasyon üzerinde NaHS'nin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, NaHS'nin TNF- α ekspresyonunu azalttığını tespit etmişlerdir(85). Bizim çalışmamızda da bu çalışma ile paralellik gösterir biçimde NaHS verilen gruplarda TNF- α mRNA gen ekspresyon düzeyinde azalma görülmüş fakat bu sayısal azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır.

Sıçanlar üzerinde Di Chen ve arkadaşlarının sepsise bağlı ensefalopati modeli oluşturdukları çalışmalarında endojen üretilen NaHS'nin inflamatuvar kaskadın başlatılmasında önemli rolü olan TNF- α 'nın etkinliğinin arttırarak doku hasarına neden olduğunu göstermiştir. Yapılan bu çalışmada etkininin endojen H₂S'in proinflamatuvar etkinliğini arttırılmasına bağlanmıştır. Aynı çalışmada ekzojen yolla verilen H₂S vericisinin (NaHS) H₂S sentezinde görev alan 2 enzimden biri olan sistasyonin β sentaz enzim inhibisyonu yaparak antiinflamatur etkinlik gösterdiği düşünülmüştür. Bu antiinflamatur etkinliğini de TNF- α düzeyini azaltmasına bağlanmıştır(86). Biz de yaptığımız çalışmada ekzojen yolla verilen NaHS'nin TNF- α düzeyini azalttığını gösterdik.

Beyin dokusu dışında yapılan çalışmalarda NaHS'nin TNF- α gen ekspresyonunu azalttığını göstermiştir. Bo Li ve arkadaşlarının anne sütünden kesilen sıçanların bağırsak epitel hücrelerinde meydana gelen hasara karşı koruyucu etkilerinin araştırıldığı çalışmalarında, ekzojen verilen NaHS'nin TNF- α mRNA ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir(87).

Astrositler için, IL-6 üretilen ana inflamatuvar mediatördür (88). Çalışmamızda hipoksik iskemik beyin hasarı oluşturulan sıçanlarda ölçülen IL-6 gen mRNA ekspresyon düzeyinde artış olduğu saptanmıştır. 50 μ mol/kg NaHS ve 100 μ mol/kg NaHS verilen gruplarda HİBH oluşturulan gruba göre IL-6 gen mRNA ekspresyon düzeyinde düşüş saptanmıştır. Bununla birlikte 50 μ mol/kg NaHS ve 100 μ mol/kg NaHS grupları karşılaştırıldığında 50 μ mol/kg verilen gruptaki IL-6 gen mRNA ekspresyon düzeyindeki azalmanın 100 μ mol/kg verilen gruptaki IL-6 düzeyindeki azalmadan daha fazla olmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptandı.

Moonhee Lee ve arkadaşlarının hücre kültürlerinde yaptıkları dejeneratif nörolojik hastalıklarda glia aracılı nöroinflamasyona karşı olan etkinliğinin çalışıldığı modelde ekzojen verilen H₂S'in IL-6 ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir(88).Bizim çalışmamızda HİBH oluşturulup sadece SF verilen grup ile 50 µmol/kg ve NaHS ve 100 µmol/kg NaHS verilen gruba göre IL-6 düzeyinde düşüş saptanırken bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü.

Nöroglial hücreler dışında yapılan çalışmalarda da NaHS'nin proinflamatuvar bir sitokin olan IL-6 üzerindeki etkinliğini çalışılmıştır. Runmin Guo ve arkadaşlarının yaptığı ekzojen NaHS'nin doxorubisin ile indüklenen inflamasyonun miyokard hücrelerindeki koruyucu etkinliğine baktıkları çalışmalarında inflamasyonda öncü sitokinlerden biri olan IL-6 düzeyinin azaldığını göstermişlerdir (89).

Yapılan birçok çalışmada NaHS'nin etkinliği araştırılırken antiinflamatuvar ve antioksidan etkinliğinin birçok mekanizması henüz aydınlatılmamış olsa da en önemli etkilerinden biri de NO düzeyini azaltarak antioksidan etki yapmasıdır. Bunu da iNOS aktivitesini azaltarak yaptığı gösterilmiştir. Perinatal asfiksiye maruz bırakılan sıçanların serebrospinal sıvılarında NO seviyesinin arttığı saptanmıştır(90). Bizim çalışmamızda kontrol grubuna göre Hİ grubunun iNOS gen mRNA ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış gözlemlendi (sırasıyla p=0.05). NaHS verilen grupta ise iNOS gen mRNA ekspresyon düzeylerinde azalma saptandı. Ancak istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü (p=0.268). Zhen Wanga ve arkadaşlarının neonatal sıçanlarda hipoksinin indüklediği ensefalopati modelinde NaHS'nin hem nöronal hem de indüklenbilir nitrik oksit sentaz mRNA ekspresyonunu azalttığını göstermiştir. Bizim çalışmamızda HİBH oluşturulup sadece SF verilen grup ile 50 µmol/kg ve NaHS ve 100 µmol/kg NaHS verilen gruba göre iNOS düzeyinde düşüş saptanırken, 50 µmol/kg ve NaHS ve 100 µmol/kg NaHS verilen iki grup karşılaştırıldığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda reaktif oksijen radikallerinin (ROS) reperfüzyon hasarı sırasında beyin hücrelerine doğrudan zarar verdiği gösterilmiştir. TOS otomatik kolorimetrik bir yöntemdir. TAS ise Erel (78, 79) tarafından geliştirilen

tam otomatik bir yöntem olup, güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bir metoddur.

Biz de yaptığımız çalışmada kontrol, Hİ, 50 µmol/kg NaHS ve 100 µmol/kg NaHS grupları, beyin dokusu TOS düzeyleri bakımından birbirleriyle karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı fark bulduk. TOS düzeyleri bakımından gruplar ikili olarak karşılaştırıldığında, Hİ ve 50 µmol/kg NaHS gruplarında kontrol grubuna göre TOS düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu. Bununla birlikte Hİ grubuna göre, 100 µmol/kg NaHS grubunun TOS düzeylerinin anlamlı olarak düşük olduğu görüldü.

Yaptığımız çalışmada kontrol, Hİ, 50 µmol/kg NaHS ve 100 µmol/kg NaHS gruplarının beyin dokusu TAS konsantrasyonları karşılaştırıldığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. Hİ grubu ile 50 µmol/kg NaHS ve 100 µmol/kg NaHS verilen gruplar karşılaştırıldığında NaHS verilen gruplarda TAS düzeylerine belirgin bir artış saptandı. Bununla birlikte 50 µmol/kg NaHS ve 100 µmol/kg NaHS verilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Oksidatif Stres İndeksi (OSİ), TOS düzeylerinin TAS düzeylerine oranının yüzde derecesi olarak ifade edilir. Kontrol, Hİ, 50 µmol/kg NaHS ve 100 µmol/kg NaHS gruplarının OSİ düzeyleri karşılaştırıldığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. Hİ grubu; kontrol, 50 µmol/kg NaHS ve 100 µmol/kg NaHS gruplarıyla karşılaştırıldığında, OSİ düzeyindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı.

Yapılan çalışmalarda NaHS'nin antioksidan özelliğini araştırmak amacıyla reperfüzyon döneminde superoksit dismutaz (SOD), malondialdehit (MDA), hidrojen peroksit seviyeleri ölçülmüştür. Qian Yu ve arkadaşlarının yaptıkları NaHS'nin nöroprotektif etkinliğine baktıkları çalışmalarında NaHS'nin oksidatif stresi azaltarak iyi bir antioksidan olduğunu göstermiştir. Oksijen- Glukoz Determinasyonuna (OGD) bağlı nöron hasarı oluşturulan sıçanlarda verilen NaHS'nin MDA, NO, hidrojen peroksiti inhibe ettiğini göstermiştir(91). Hİ oluşturulan gruba göre, 50 µmol/kg NaHS ve 100 µmol/kg verdiğimiz gruplarda TAS da artma, TOS ve OSİ seviyesinde ise azalma olduğunu saptadık.

Yine nöronlar üzerinde yapılan çalışmalarda da NaHS'nin antioksidan etkinliği çalışılmıştır. Yali Wang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; orta serebral arter oklüzyonu ile serebral iskemi oluşturulan farelerde Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) Oxidase (NOX) aktivitesi ile antioksidan etkinliğini değerlendirmişlerdir. NaHS'nin bir ROS türevidir olan NOX enzim aktivitesini baskıladığını, bu yolla kan-beyin bariyeri bütünlüğünü güçlü bir şekilde koruduğunu göstererek NaHS'nin antioksidan etkinliğini kanıtlamışlardır(92). Hipoksik iskemik beyin hasarı oluşturduğumuz sıçanlarda NaHS'nin antioksidan etkinliğini kanıtlamak amacıyla TOS, TAS ve OSI düzeylerini çalıştık. Bizim bulgularımızda, Yali Wang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya paralel olarak, 50 µmol/kg NaHS ve 100 µmol/kg NaHS verilen gruplarda kontrol grubuna göre TAS artma, TOS ve OSI düzeylerinde azalma saptadık.

NaHS'nin antioksidan özelliğinin yanı sıra antiapoptotik etkinliği olduğu bilinmektedir. Xiao-Hui Li ve arkadaşlarının 2015 yılında, sıçanlar üzerinde yaptıkları β-amiloid peptit tarafından indüklenen nörotoksositeye karşı NaHS'nin nöroprotektif etkilerini inceledikleri çalışmalarında he birinde 14 sıçan bulunan 3 grupta β-amiloid verilen grup ile β-amiloid ile beraber NaHS verilen grup arasında TUNEL yöntemiyle apoptotik nöron sayıları karşılaştırılmıştır. Yapılan bu çalışmada NaHS verilen gruptaki TUNEL pozitif boyalı apoptotik nöron sayısında anlamlı düşüş saptamışlardır (93). Biz de çalışmamızda hem TUNEL yöntemiyle hem de H&E yöntemiyle boyanan kesitlerde kontrol, Hİ, 50 µmol/kg NaHS ve 100 µmol/kg NaHS gruplarının beyin dokusundaki apoptotik hücre sayıları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. 100 µmol/kg NaHS grubunda 50 µmol/kg NaHS grubuna göre anlamlı bir fark bulunmazken, Hİ ile 50 µmol/kg NaHS ve Hİ ile 100 µmol/kg NaHS grupları arasındaki farkın anlamlı olduğu saptanmıştır. Aldığımız bu verilerle NaHS uygulanan gruplarda, Hİ grubuna göre apoptotik hücre sayısında anlamlı olarak azalma olduğunu saptadık.

NaHS'nin antiapoptotik etkinliği henüz tam olarak açıklanamamış olsa da Eizo Marutani ve arkadaşlarının 2015 yılında hücre kültüründe yaptıkları çalışmalarında H₂S'in hücre apoptozunun mitokondriyal yolu üzerindeki caspase-3'ü inhibe ederek antiapoptotik etkilerine aracılık ettiğini göstermişlerdir (76). Biz de

çalışmamızda NaHS verilen iki grubun kontrol grubuna göre apoptotik hücre sayısını azaltarak antiapoptotik etkinlik gösterdiğini saptadık.

Yaptığımız çalışmada nöroprotektif etkinliği olduğu bilinen NaHS'nin bu etkisini araştırmak amacıyla nöron growth faktör (NGF) düzeylerini ölçtük. NGF; nöroblast çoğalması, periferel uyarıma karşı reaksiyon gösteren doku ile bu dokuyu uyaran sinirler arasında mesaj alıcı rolü olan bir protein olarak tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda NGF'nin angiogenesis üzerinde etkinliği olduğu ve NGF ile uyarılan retina hücrelerinin retina sinir hücrelerini çoğalmaya teşvik ettiği bildirilmiştir (94). Çalışmamızda NGF düzeyi ile hipoksik iskemik beyin hasarı oluşturulan sıçanlarda ölçülen NGF gen mRNA ekspresyon düzeyinde kontrol grubuna göre artış olduğu saptanmıştır. 50 µmol/kg ve NaHS ve 100 µmol/kg NaHS verilen gruplarda HİBH oluşturulan gruba göre NGF gen mRNA ekspresyon düzeyinde düşüş saptanmıştır. Bununla birlikte 50 µmol/kg ve NaHS ve 100 µmol/kg NaHS grupları karşılaştırıldığında 50 µmol/kg verilen gruptaki NGF gen mRNA ekspresyon düzeyindeki azalmanın 100 µmol/kg verilen gruptaki NGF düzeyindeki azalmadan daha fazla olduğu saptandı. Bu veriler karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü.

Yapılan çalışmalar, H₂S'nin sadece nöromodülatör olarak işlev görmediğini, aynı zamanda merkezi sinir sisteminde bir nöroprotektan olarak da çalıştığını göstermektedir(95). Serebral iskemi-reperfüzyon hasarının in vivo modelinde, düşük H₂S konsantrasyonu ile tedavi enfarktüs boyutunu azalttığı ve anti apoptotik etki yoluyla nörolojik fonksiyonu iyileştirdiği, bu da H₂S'nin serebral iskemik olaylarda terapötik bir rol oynadığı gösterilmiştir(96).

Sonuç olarak bu çalışmamızda NaHS'nin, hipoksik-iskemik ensefalopati oluşturulan yenidoğan ratlarda antioksidan özelliğini gösterip apoptozu azaltarak nöroprotektif etkinliği olduğunu saptadık. Yakın zamanda, hayvan deneyleri kullanılarak, bir H₂S vericisi olan NaHS'nin moleküler mekanizmasına yönelik araştırmalar da bazı ilerlemeler kaydedilmiş olmasına rağmen özellikle reperfüzyon dönemindeki hasarlarda H₂S'nin rolünün daha iyi anlaşılması için klinik kanıta dayalı daha fazla sayıda araştırmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz. Buna ek olarak, H₂S

tedavisinin HİE'deki etkinliğinin uzun süreli morbidite ve mortaliteyi azaltıp azaltmadığını belirlemek için daha uzun süreli çalışmalara ihtiyaç vardır.



6. SONUÇLAR

1. Beyin dokusundaki TNF- α gen mRNA ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna göre , Hİ , 50 μ mol/kg NaHS ve 100 μ mol/kg NaHS verilen gruplar arasında karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farklılık bulunmadı (p=0.341).
2. TNF- α gen mRNA ekspresyon düzeyi 50 μ mol/kg NaHS ve 100 μ mol/kg NaHS grupları ile Hİ grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi.
3. Beyin dokusu IL-6 gen mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol , Hİ, 50 μ mol/kg NaHS ve 100 μ mol/kg NaHS grupları arasında karşılaştırıldığında, aralarındaki farkın anlamlı olmadığı görüldü (p=0.245).
4. IL-6 gen mRNA ekspresyon düzeyleri gruplar arasında karşılaştırıldığında Hİ grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı (p= 0.017).
5. Beyin dokusu NGF gen mRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırıldığında kontrol, Hİ, 50 μ mol/kg NaHS ve 100 μ mol/kg NaHS grupları arasındaki farkın anlamlı olmadığı görüldü (p=0.110).
6. NGF gen mRNA ekspresyon düzeyinin Hİ grubunda, 50 μ mol/kg NaHS ve 100 μ mol/kg NaHS gruplarına göre seviyesinde anlamlı bir şekilde düşük olduğu saptandı. (sırasıyla p=0.026, p=0.017).
7. Beyin dokusu iNOS gen mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol, Hİ, 50 μ mol/kg NaHS ve 100 μ mol/kg NaHS grupları arasında yapılan karşılaştırılmasında, gruplar arasındaki farkın anlamlı olmadığı görüldü (p=0.268).
8. iNOS gen mRNA ekspresyon seviyesinde kontrol grubuna göre Hİ grubunda anlamlı bir artış gözlemlendi (sırasıyla p=0.05).
9. Beyin dokusu TAS konsantrasyonları karşılaştırıldığında Kontrol, Hİ, 50 μ mol/kg NaHS ve 100 μ mol/kg NaHS gruplarının aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (p=0.041).
10. TAS konsantrasyonları gruplar arasında karşılaştırıldığında, 100 μ mol/kg NaHS grubunda 50 μ mol/kg NaHS grubuna göre anlamlı bir değişim

gözlenmezken, 100 mmol/kg NaHS grubunda kontrol ve Hİ gruplarına göre TAS konsantrasyonları istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu saptandı (p=0.014, p= 0.04) .

11. Beyin dokusu TOS düzeyleri bakımından gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında kontrol, Hİ, 50 µmol/kg NaHS ve 100 µmol/kg NaHS grupları arasında anlamlı fark olduğu bulundu (p=0.000).
12. TOS düzeyleri bakımından gruplar değerlendirildiğinde, Hİ ve 50 µmol/kg NaHS gruplarında kontrol grubuna göre TOS düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu. Bununla birlikte Hİ grubuna göre, 100 µmol/kg NaHS grubunun TOS düzeylerinin anlamlı olarak düşük olduğu saptandı (p=0.021).
13. OSİ düzeyleri karşılaştırıldığında; kontrol, Hİ, 50 µmol/kg NaHS ve 100 µmol/kg NaHS gruplarının aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (p=0.032). Hİ grubunu kontrol, 50 µmol/kg NaHS ve 100 µmol/kg NaHS gruplarıyla karşılaştırıldığında, Hİ grubunda OSİ düzeyindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı.
14. TUNEL yöntemiyle belirlenen apoptotik nöron sayısının kontrol, Hİ, 50 µmol/kg NaHS ve 100 µmol/kg NaHS grupları arasında karşılaştırıldığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (p=0,00). Bununla beraber, 100 µmol/kg NaHS grubunda 50 µmol/kg NaHS grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmezken, Hİ ile 50 µmol/kg NaHS ve Hİ ile 100 µmol/kg NaHS grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur.
15. H&E yöntemiyle belirlenen apoptotik nöron kontrol, Hİ, 50 µmol/kg NaHS ve 100 µmol/kg NaHS gruplarının beyin dokusundaki apoptotik hücre sayıları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (p=0.00).Gruplar arası yapılan karşıştırmalarda ise, 100 µmol/kg NaHS grubunda 50 µmol/kg NaHS grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmezken (p=0.19), Hİ ile 50 µmol/kg NaHS ve Hİ ile 100 µmol/kg NaHS grupları arasında anlamlı fark olduğu saptanmıştır.
16. Sonuç olarak bu çalışma ile NaHS'nin HİBH oluşturulmuş yenidoğan sıçanlarda beyin dokusunda TAS düzeyi arttırıp, TOS düzeyini azaltarak antioksidan ve nöron koruyucu etkide bulunduğu histopatolojik olarak

gösterilmiştir. NaHS'nin nöron koruyucu etkilerinin bir kısmını ise NGF ekspresyonunu indükleyerek yapabileceği gösterilmiştir.



7. KAYNAKLAR

1. Richard J.Martin AAF, Michele C. Walsh. Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. Fanaroff and Martin's Neonatal-Perinatal Medicine. 10th Edition ed. Philadelphia: Elsevier; 2015. p. 904-27.
2. Akısü M KA, Canpolat E. Nenotal Ensafalopati Tanı Ve Tedavi Rehberi. Türk Neonatoloji Derneği 2018:1-39.
3. Jacobs SE BM, et al. Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2013.
4. Robertson NJ TS, Groenendaal F, et al. Which neuroprotective agents are ready for bench to bedside translation in the newborn infant? J Pediatr 2012;160.
5. Kelen D RN. Experimental treatments for hypoxic ischaemic encephalopathy. Early Hum Dev. 2010.
6. Zhong G CF, Cheng Y, et al. . The role of hydrogen sulfide generation in the pathogenesis of hypertension in rats induced by inhibition of nitric oxide synthase. j Hypertens. 2003:1879-85.
7. Geng Bin DJB, Tang Chao Shu Endojen H2S, bir çeşit yeni bir gaz molekülü. Fiziyojik Bilimlerin Gelişmesi 2002:255-8.
8. Liu Yang Qin YY. Nörolojik Sistemde Endojen H2S'nin araştırılması ve geliştirilmesi. 2007:177-80.
9. Qipshidze N MN, Mishra PK, et al. Hydrogen sulfide mitigates cardiac remodeling during myocardial infarction via improvement of angiogenesis. . Int J Biol Sci. 2012:430-41.
10. Biermann J LW, Schallner N, et al. . Inhalative preconditioning with hydrogen sulfide attenuated apoptosis after retinal ischemia/reperfusion injury. Mol Vis. 2011;17:1275-86.
11. Mustafa K. Hipoksik İskemik Beyin Hasarı Oluşturulmuş Yenidoğan Sıçanlarda Levetirasetam Uygulamasının Nöronal Apoptozis ve Motor Yetiler Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi Mersin Üniversitesi tıp fakültesi,Yandal Uzmanlık Tezi, 2012,Mersin(Danışman:Çetin Okuyaz)

12. Geoffrey S. Dawes. Birth asphyxia, resuscitation, and brain damage. In: GS D, editor. Foetal and neonatal physiology: a comparative study of the changes at birth. Chicago: Year Book Medical Publishers Inc.; 1969. p. 141-59.
13. RE M. Two patterns of perinatal brain damage and their conditions of occurrence. *Am J Obstet Gynecol.* 1972;112:246-76.
14. LJ. M. Neuronal cell death in nervous system devolepment, disease, and injury. *Int J Mol Med.* 2001;7:455-78.
15. Brambrink AM PA, Kaiser A et all. Neuronal death in newborn striatum after hypoxia-ischemia is necrosis and evolves with oxidative stress. . *Neurobiol Dis.* 2000;7:169-91.
16. Fan X HC, van der Kooij MA, et al. The role and regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha expression in brain development and neonatal hypoxic-ischemic brain injury. . *Brain Res Rev.* 2009;62:99-108.
17. Volpe JJ HP, Perlman JM, et al. Positron emission tomography in the asphyxiated term newborn: parasagittal impairment of cerebral blood flow. *Ann Neurol.* 1985;17:287-96.
18. Northington FJ FD, Graham EM, et al. Early neurodegeneration after hypoxia-ischemia in neonatal rat is necrosis while delayed neuronal death is apoptosis. *Neurobiol Dis.* 2001;8:207-19.
19. Groenendaal F LH, Smit D, et al. Nitrotyrosine in brain tissue of neonates after perinatal asphyxia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2006;91:F429-F33.
20. Groenendaal F VJ, Lammers H, et al. . Nitrotyrosine in human neonatal spinal cord after perinatal asphyxia. . *Neonatology.* 2008;93:1-6.
21. W S. Acquired damage to the developing brain: timing and causation. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2003;74:552.
22. van den Broek MP HA, van Hasselt JG, et al. . Lidocaine (lignocaine) dosing regimen based upon a population pharmacokinetic model for preterm and term neonates with seizures. *Clin Pharmacokinet.* 2011;50:461-9.
23. Evans DJ LM. Hypoxic-ischaemic injury. In: Eds RJ, Robertson NRC, editor. *Textbook of Neonatology,*. 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1999. p. 1235–51.

24. JJ. V. Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: Neuropathology and pathogenesis. . 4rd ed ed. Volpe J e, editor. Philadelphia: WB Saunders; 2000; .
25. Hill A VJ. Hypoxic-ischemic Cerebral Injury in the Newborn. 3rd ed. ed. Swaimann KF AS, editor. St. Louis: Mosby Inc; 1999.
26. Feet BA GE, Groenedaal F et all. . OD: Cerebral excitatory aminoacids and Na, K-ATP ase activity during resuscitation of severely hypoxic newborn piglets. Acta Pediatr. 1998;87:889-95.
27. Sarnat HB SM. Neonatal encephalopathy following fetal distress; a clinical and electroencephalographic study. Arch Neurol. 1976;33:696-705.
28. Thompson CM PA, Linley LL, et al. The value of a scoring system for hypoxic ischaemic encephalopathy in predicting neurodevelopmental outcome. Acta Paediatr. 1997;86:757-61.
29. Küçükködük Ş. Hipoksik-iskemik ensefalopatide klinik, laboratuvar yaklaşım ve tedavi yöntemleri. JNeonatology. 1997;4(2):70-5.
30. Thompson CM PA, Linley LL. The value of a scoring system for hypoxic ischaemic encephalopathy in predicting neurodevelopmental outcome. Acta Paediatr. 1997;86(7):757-61.
31. van Handel M SH, de Vries LS, et al. Long-term cognitive and behavioral consequences of neonatal encephalopathy following perinatal asphyxia: a review. Eur J Pediatr. 2007;166:645-54.
32. Ç. O. Çocuk Nörolojisinde Nörofizyolojik Tanı Yöntemleri. Gökçay E SF, Topaloğlu H, Tekgül H, Gürer YKY editor. Ankara: Anıl Matbaacılık; 2010.
33. Spitzmiller RE PT, Meinzen-Derr J, Hoath SB. Amplitude- integrated EEG is useful in predicting neurodevelopmental outcome in full-term infants with hypoxic–ischemic encephalopathy: a meta-analysis. J Child Neurol 2007;22:1069-78.
34. Van Rooij LG TM, van Huffelen AC, et al. Effect of treatment of subclinical neonatal seizures detected with aEEG: randomized, controlled trial. Pediatrics. 2010;125:e358-e66.
35. GL H. Seizure-induced neuronal injury: animal data. Neurol. 2002;59:S3-S6.
36. Liu Z YY, Silveira DC, et al. Consequences of recurrent seizures during early brain development. Neuroscience. 1999;92:1443-54.

37. Vento M SO. Resuscitation of the term and preterm infant. . Semin Fetal Neonatal Med. 2010;15.
38. Eken P TM, Groenendaal F, et al. Predictive value of early neuroimaging, pulsed Doppler and neurophysiology in full term infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 1995;73:F75-F80.
39. van Laerhoven H dHT, Offringa M, et al. . Prognostic tests in term neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: a systematic review. Pediatrics. 2013;131:88-98.
40. Chau V PK, Sargent MA, et al. Comparison of computer tomography and magnetic resonance imaging scans on the third day of life in term newborns with neonatal encephalopathy. Pediatrics. 2009;123:319-26.
41. Goldaber KG GLI, Leveno KJ, et al. Pathologic fetal acidemia. Obstet Gynecol. 1991;78:1103-7.
42. Miller SP RV, Michelson D, et al. Patterns of brain injury in term neonatal encephalopathy. J Pediatr. 2005;146:453-60.
43. Li AM CV, Poskitt KJ, et al. White matter injury in term newborns with neonatal encephalopathy. Pediatr Res. 2009;65:85-9.
44. Harteman JC GF, Toet MC, et al. Diffusion-weighted imaging changes in cerebral watershed distribution following neonatal encephalopathy are not invariably associated with an adverse outcome. Dev Med Child Neurol. 2013;55:642-53.
45. Hrbek A KP, Kjellmer I, et al. Clinical application of evoked electroencephalographic responses in newborn infants. I:Perinatal asphyxia. Dev Med Child Neurol. 1977;19:34-44.
46. Berfelo FJ KK, van Ommen CH, et al. Neonatal cerebral sinovenous thrombosis from symptom to outcome. Stroke. 2010;41:1382-8.
47. Blennow M IM, Lagercrantz H, et al. Early [18F]FDG positron emission tomography in infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy shows hypermetabolism during the postasphyctic period. Acta Paediatr. 1995;84:1289-95.
48. Thorngren-Jerneck K OT, Sandell A, et al. . Cerebral glucose metabolism measured by positron emission tomography in term newborn infants with hypoxic ischemic encephalopathy. Pediatr Res. 2001;49:495-501.

49. Beken S AB, Dilli D. et all. Can biochemical markers predict the severity of hypoxicischemic encephalopathy? *The Turkish Journal of Pediatrics*. 2014;56:62-8.
50. Hongyan Lv QW, Sujing W. Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy-related biomarkers in serum and cerebrospinal fluid. *Clinica Chimica Acta*. 2015;450:282-97.
51. Walsh BHMB, Geraldine B. PhD; Livingstone, Vicki PhD. Cord Blood Proteins and Multichannel-Electroencephalography in Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Pediatric Critical Care Medicine* 2013;14(6):621-30.
52. Tricia Gomella MC. Lange Neonatoloji. Asuman Çoban Zİ, editor. İstanbul: İstanbul Tıp Kitapevi; 2017.
53. Alfirevic Z DD, Gyte GM. . Continuous cardiotocography (CTG) as a form of electronic fetal monitoring (EFM) for fetal assessment during labour. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;5.
54. Perlman JM WJ, Kattwinkel J, et al. . neonatal resuscitation: 2015 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science With Treatment Recommendations. *Circulation*. 2015;132(suppl 1):204-41.
55. Shah P RS, Beyene J, et al. Multiorgan dysfunction in infants with post-asphyxial hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2004;89:F152-F5.
56. Tekin N. Perinatal Asfiksiniin Önlenmesi ve Yönetimi. *Perinatoloji Dergisi* 2011;19:36-9.
57. Bittigau P SM, Genz K, et al. . Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:15089-94.
58. Glass HC GD, Jeremy RJ, et al. Clinical neonatal seizures are independently associated with outcome in infants at risk for hypoxic-ischemic brain injury. *J Pediatr* 2009;155:318-23.
59. Hall RT HF, Daily DK. . High-dose phenobarbital therapy in term newborn infants with severe perinatal asphyxia: a randomized, prospective study with three-year follow-up. *J Pediatr*. 1998;132:345-8.

60. Evans DJ LMTM. Anticonvulsants for preventing mortality and morbidity in full term newborns with perinatal asphyxia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007;CD001240.
61. Malingre MM VRL, Rademaker CM, et al. . Development of an optimal lidocaine infusion strategy for neonatal seizures. *Eur J Pediatr* 2006;165:598-604.
62. Low E BG, Mathieson SR, et al. . Cooling and seizure burden in term neonates: an observational study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2012;97:F267-F72.
63. Srinivasakumar P ZJ, Wallendorf M, et al. 2013. Therapeutic hypothermia in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: electrographic seizures and magnetic resonance imaging evidence of injury. . *J Pediatr.* 2013.
64. PS. S. Hypothermia: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2010;15:238-46.
65. Levene M BM, Whitelaw A, et al. . Acute effects of two different doses of magnesium sulphate in infants with birth asphyxia. *Arch Dis Child.* 1995;73:F174-F7.
66. Zhu C KW, Xu F, et al. Erythropoietin improved neurologic outcomes in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics.* 2009;124:e218-e26.
67. Chakkarapani E DJ, Liu X, et al. Xenon enhances hypothermic neuroprotection in asphyxiated newborn pigs. *Ann Neurol.* 2010;68:330-41.
68. Nelson KB EJ. Neonatal signs as predictors of cerebral palsy. *Pediatrics.* 1979;64:225-32.
69. Casey BM MD, Leveno KJ. The continuing value of the Apgar score for the assessment of newborn infants. . *N Engl J Med.* 2001;344:467-71.
70. Low JA PC, Derrick EJ. Newborn complications after intrapartum asphyxia with metabolic acidosis in the term fetus. . *Am J Obstet Gynecol.* 1994;170:1081-7.
71. Vannucci RC CJ, Mauger DT, et al. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. . *J Neurosci Res.* 1999;55:158-63.
72. Dobbing J. The later development of the brain and its vulnerability. In: Davis JA DJ, editor. *Scientific Foundations of Pediatrics* (2nd ed). London: Heinemann 1981. p. 744-59.
73. Yücel F ÜN, Erçakır M, Güven G. . Rat beynindeki yasa bağlı hacim değişikliklerinin Cavalieri yöntemi ile saptanması. . *Erciyes Tıp Dergisi.* 2003;25.

74. Rice JE VR, Brierley JB. . The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in rat. *Ann Neurol.* 1981;9:131-41.
75. Yin J ZQ, Shen Q, Yang XS. . Neuroprotective mechanism of hydrogen sulfide after cerebral ischemia-reperfusion in rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2013;93(11):868-72.
76. Eizo Marutani MMY, PhD; Tomoaki Ida,. Thiosulfate Mediates Cytoprotective Effects of Hydrogen Sulfide Against Neuronal Ischemia,. *J Am Heart Assoc.* 2015;4.
77. Mard SA AH, Neisi N, Veisi A. Antisecretory effect of hydrogen sulfide on gastric acid secretion and the involvement of nitric oxide. *Bio Med Res Int.* 2014;2014.
78. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. . *Clin Biochem.* 2004;37:112-9.
79. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. . *Clinical Biochemistry.* 2005;38(12):1103-11.
80. A.Papapetropoulos AP, Z. Altaany et al. . Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009.;vol. 106(no. 51):pp. 21972–7.
81. Kimura H. Nitric Oxide -“The physiological role of hydrogen sulfide and beyond,” *Biology and Chemistry.* 2014;vol. 41:pp. 4–10.
82. G.Yang LW, B. Jiang et al. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine γ -lyase,. *Science.* 2008;vol. 322(no. 5901):pp. 587–90.
83. Saliba E RC, Potin J, et al. Inflammation, cytokines and perinatal brain injury. *Biol Neonate.* 2002;82:291-302.
84. Oygür N SÖ, Saka O, Yeğin O. . Predictive value of plasma and cerebrospinal fluid TNF-alpha and IL-1 Beta concentrations on outcome of fullterm infants with hypoxic-ischemic encephalopathy.*Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.*1998;79:F190-3.
85. Li-Fang Hu PT-HW, Philip K. Moore,Jin-Song Bian. Hydrogen sulfide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in microglia. *Journal of Neurochemistry.* 2007;100:1121-8.

86. Di Chen Hp, Chunwen LI et all. Effects of Hydrogen Sulfide on a Rat Model of Sepsis-associated Encephalopathy. *Huazhong University of Science and Technology and Springer-Verlag Berlin Heidelberg* 2011;31(5):632-6.
87. Bo Li CL, Zechariah Martin et. all. Intestinal epithelial injury induced by maternal separation is protected by hydrogen sulfide. *Journal of Pediatric Surgery*. 2016;52:40-4.
88. Moonhee Lee EGM, Patrick L. McGeer. Sodium thiosulfate attenuates glialmediated neuroinflammation in degenerative neurological diseases. *Journal of Neuroinflammation*. 2016:1-14.
89. Runmin Guoa eKW, e Jingfu Chena et aall. Exogenous Hydrogen Sulfide Protects against Doxorubicin-Induced Inflammation and Cytotoxicity by Inhibiting p38MAPK/NFκB Pathway in H9c2 Cardiac Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2013;32:1668-80.
90. Zhen Wanga JZ, Xueer Wang et all. Sodium hydrosulfide prevents hypoxia-induced behavioral impairment in neonatal mice. *Brain Reserch*. 2013:126-34.
91. Qian Yu BW, Tianzhi Zhao et all. . NaHS Protects against the Impairments Induced by Oxygen-Glucose Deprivation in Different Ages of Primary Hippocampal Neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2017;11:1-11.
92. Yali Wang JJ, Guizhen Ao et. all. Hydrogen Sulfide Protects Blood-Brain Barrier Integrity Following Cerebral Ischemia. *journal of neurochemistry*. 2014;129:827-38.
93. Xiao-hui li y-yd, fei li. Neuroprotective effects of sodium hydrosulfide against β-amyloid-induced neurotoxicity *international journal of molecular medicine*. 2016;38:1152-60.
94. Şükran Yediel Aras, Ebru Karadağ SARI. NGF (sinir büyüme faktörü) ve fonksiyonları. *MAE Vet Fak Derg*. 2017;2(1):91-6.
95. Dongdong Wu J, Hui Li. Role of Hydrogen Sulfide in Ischemia-Reperfusion Injury. *Hindawi Publishing Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014;2015:1-16.
96. J.Yin CT, J. Zhao et al. Exogenous hydrogen sulfide protects against global cerebral ischemia/reperfusion injury via its antioxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects in rats *Brain Research*. 2013;vol. 1491:pp. 188–96.

