

T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI OLUŞTURULMUŞ  
YENİDOĞAN RATLARDA İNTRAPERİTONEAL OZON  
UYGULAMASININ MORRİS SU TANKINDAKİ SPASYAL  
BELLEK PERFORMANSINA ETKİSİ**

Bora REŞİTOĞLU

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Zeliha KURTOĞLU

MERSİN – 2012

**HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI OLUŞTURULMUŞ  
YENİDOĞAN RATLARDA İNTRAPERİTONEAL OZON  
UYGULAMASININ MORRİS SU TANKINDAKİ SPASYAL  
BELLEK PERFORMANSINA ETKİSİ**

Bora REŞİTOĞLU

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Zeliha KURTOĞLU

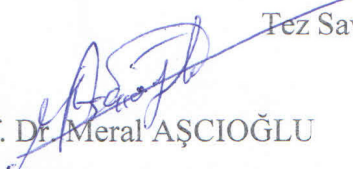
Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
BAP-SBE F (BR) 2011-4 DR nolu proje olarak desteklenmiştir

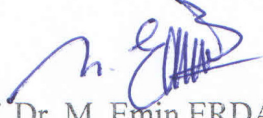
Tez No: 23.....

## Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

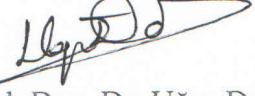
Fizyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Hipoksik İskemik Beyin Hasarı Oluşturulmuş Yeni Doğan Ratlarda İntraperitoneal Ozon Uygulamasının Morris Su Tankındaki Spasyal Bellek Performansına Etkisi” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.


Tez Savunma Tarihi: 28/05/2012

  
Prof. Dr. Meral AŞCIOĞLU  
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Fizyoloji Anabilim Dalı  
Jüri Başkanı

  
Prof. Dr. M. Emin ERDAL  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi

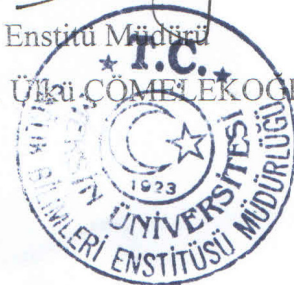
  
Doç. Dr. Zeliha KURTOĞLU  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Anatomi Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi

  
Yrd. Doç. Dr. Uğur DAL  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Fizyoloji Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi

  
Yrd. Doç. Dr. Leyla ŞAHİN  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Fizyoloji Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi

Yukarıdaki tez , Enstitü Yönetim Kurulunun 31.05.2012 tarih ve 2012/147 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

  
Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Ülku ÇOMBEK ÖKOĞLU



## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans ve Doktora eğitimim boyunca, akademik açıdan yetişmemde büyük katkısı olan, Prof. Dr. Hüseyin BEYDAĞI'na, tezimin hazırlanması boyunca gösterdiği titizlik, özveri ve bilimsel katkıdan dolayı teşekkür ederim.

Danışman hocam, Doç. Dr. Zeliha KURTOĞLU'na, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. M. Emin ERDAL'a ve anabilim dalımız hocalarından Yrd. Doç. Dr. Uğur DAL ve Doç. Dr. Rezan HATUNGİL'e Tez çalışmalarım boyunca yaptıkları bilimsel ve akademik katkıdan dolayı teşekkür ederim.

Tezimin deneysel aşamalarındaki yardımlarından dolayı, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Ayşe POLAT'a, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalından Prof. Dr. Lülüfer TAMER GÜMÜŞ' e ve Uzman Dr. Lokman AYAZ'a, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalından Uzm. Dr. Yalçın ÇELİK ve Uzm. Dr. Mustafa KÖMÜR'e teşekkür ederim. Tezimin istatistikleri ve bulguların değerlendirilmesi konusundaki yardımlarından dolayı Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Arzu KANIK'a ve Öğr. Gör. Semra ERDOĞAN'a teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, maddi ve manevi destekleriyle, eğitimimin akademik yönde devam etmesini sağlayan aileme sonsuz teşekkür ederim. Karşılaştığım tüm zorluklarda benden desteğini esirgemeyen değerli eşim Didem REŞİTOĞLU'na ve tezim, doğumunun ilk yılına gelmesine rağmen babasını üzmeyen yaşam kaynağım oğlum Berk'e teşekkür ederim.

Öğr. Gör. Bora REŞİTOĞLU

# İÇİNDEKİLER

<b>KABUL ve ONAY</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	iv
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	vii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	ix
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	x
<b>ÖZET</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	4
2.1. Hipoksik İskemik Beyin Hasarı.....	4
2.1.1. Epidemiyoloji.....	4
2.1.2. Fizyopatoloji.....	5
2.1.3. Hipoksik İskemik Ensefalopatide Nöropatolojik Bulgular.....	10
2.1.4. Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Klinik Bulgular.....	11
2.1.5. HİBH' nin Tanısı.....	13
2.1.5.1. Biyokimyasal Testler.....	14
2.1.5.2. Elektrofizyolojik testler.....	15
2.1.5.3. Radyolojik Yöntemler.....	16
2.1.6. HİBH' de Tedavi.....	16
2.1.6.1. Deneysel Tedavi Yöntemleri.....	17
2.2. Ozon.....	21
2.2.1. Ozonun kullanım alanları.....	22
2.2.2. Medikal ozonun elde edilmesi.....	22
2.2.3. Medikal ozonun uygulama biçimleri.....	23
2.2.4. Medikal ozonun etki mekanizmaları.....	26
2.3. Sıçanların Bilişsel ve Lokomotor Yetilerinin Değerlendirilmesi.....	28
2.3.1. Açık Alan Deneyi.....	30

2.3.2. Morris Su Tankı.....	30
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>32</b>
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	32
3.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	32
3.2. Deney Hayvanları.....	33
3.3. Hipoksik İskemik Beyin Hasarının Oluşturulması.....	34
3.4. Histopatolojik Değerlendirme.....	36
3.4.1. TUNEL Yöntemi.....	36
3.4.2. Kaspaz-3 Yöntemi.....	37
3.4.3. Apoptozisin Değerlendirilmesi.....	37
3.4.4. Atrofinin Değerlendirilmesi.....	38
3.5. Biyokimyasal Değerlendirme.....	38
3.5.1. Plazma Malondialdehid Düzeyi Tespiti.....	38
3.5.2. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi Tayini.....	38
3.6. Ozon Uygulaması.....	39
3.7. Davranış Deneyleri.....	39
3.7.1. Açık Alan Deneyi.....	40
3.7.2. Öğrenme ve Hafıza Deneyleri.....	41
3.8. Uygulama Takvimi.....	45
3.9. İstatistiksel Yöntemler.....	45
<b>4.BULGULAR.....</b>	<b>46</b>
4.1. Apoptoz Bulguları.....	46
4.1.1. TUNEL Yöntemiyle Beyindeki Apoptotik Hücrelerin Değerlendirilmesi.....	47
4.1.2. Kaspaz-3 Yöntemiyle Beyindeki Apoptotik Hücrelerin Değerlendirilmesi.....	52
4.2. Biyokimyasal Bulgular.....	57
4.2.1. Plazma Malondialdehid Düzeyi.....	57
4.2.2. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi Tayini.....	58
4.3. Davranış Deneyleri.....	59
4.3.1. Açık Alan Deneyi.....	59
4.3.2. Morris Su Tankı Öğrenme ve Hafıza Deneyleri.....	61

4.5. Sıçanların Beyin Ağırlıkları ve Makroskopik İnceleme.....	65
4.6. Sıçanların Vücut Ağırlıkları.....	66
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>68</b>
<b>6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....</b>	<b>76</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>79</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>93</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Apoptozis ve nekroz ile hücre ölümü.....	9
Şekil 3.1. Hipoksi odacığı.....	33
Şekil 3.2. 7 günlük sıçanlar.....	34
Şekil 3.3. Deney masasına sabitlenen yedi günlük sıçan yavrusu.....	35
Şekil 3.4. Karotid arterin bağlanması.....	36
Şekil 3.5. Ozon jeneratörü.....	39
Şekil 3.6. Açık alan düzeneğı.....	41
Şekil 3.7. Su tankının üstten ve yandan görünümü.....	42
Şekil 3.8. Sabit görsel ipuçları.....	43
Şekil 3.9. Uzak hafıza deneyinde 1. günde sıçanların suya atılış şeması.....	43
Şekil 3.10. Uzak hafıza deneyi günlere göre uygulama şeması.....	44
Şekil 3.11. Platformu bulmuş bir sıçan.....	44
Şekil 4.1. Yedinci günde hipoksi iskemi işlemi uygulanan ve ardından dekapite edilen bir sıçanın beyni.....	47
Şekil 4.2. TUNEL yöntemi ile gruplardaki sıçanların beyinlerinin sağ yarısında saptanan apoptotik nöron sayılarının karşılaştırılması. ....	49
Şekil 4.3. 1. gruptan bir sıçana ait beyin kesitinde az sayıda TUNEL-pozitif apoptotik nöron görünümü .....	49
Şekil 4.4. 2. gruptan bir sıçana ait beyin kesitinde yaygın TUNEL-pozitif apoptotik nöron görünümü .....	50
Şekil 4.5. 3. gruptan bir sıçana ait beyin kesitinde dağınık TUNEL-pozitif apoptotik nöron görünümü .....	50
Şekil 4.6. 4. gruptan bir sıçana ait beyin kesitinde dağınık TUNEL-pozitif apoptotik nöron görünümü .....	51
Şekil 4.7. TUNEL yöntemi ile gruplardaki sıçanların beyinlerinin sol yarısında saptanan apoptotik nöron sayılarının karşılaştırılması.....	51



<b>Şekil 4.8.</b> Gruplarda TUNEL yöntemi ile beynin sağ ve sol yarısında saptanan apoptotik nöron sayılarının karşılaştırılması .....	52
<b>Şekil 4.9.</b> Kaspaz-3 yöntemi ile gruptaki sıçanların beyinlerinin sağ yarısında saptanan apoptotik nöron sayılarının karşılaştırılması. ....	54
<b>Şekil 4.10.</b> 1. grupta bir sıçana ait beyin kesitinde seyrek kaspaz-3 ile pozitif boyanan apoptotik nöron görünümü.....	54
<b>Şekil 4.11.</b> 2. grupta bir sıçana ait beyin kesitinde yaygın kaspaz-3 ile pozitif boyanan apoptotik nöron görünümü.....	55
<b>Şekil 4.12.</b> 3. grupta bir sıçana ait beyin kesitinde dağınık kaspaz-3 ile pozitif boyanan apoptotik nöron görünümü.....	55
<b>Şekil 4.13.</b> 4. grupta bir sıçana ait beyin kesitinde dağınık kaspaz-3 ile pozitif boyanan apoptotik nöron görünümü .....	56
<b>Şekil 4.14.</b> Kaspaz-3 yöntemi ile gruptaki sıçanların beyinlerinin sol yarısında saptanan apoptotik nöron sayılarının karşılaştırılması .....	56
<b>Şekil 4.15.</b> Gruplarda Kaspaz-3 yöntemi ile beynin sağ ve sol yarısında saptanan apoptotik nöron sayılarının karşılaştırılması.....	57
<b>Şekil 4.16.</b> Gruplarda plazma MDA düzeylerinin karşılaştırılması .....	58
<b>Şekil 4.17.</b> Gruplardaki sıçanların plazma SOD düzeylerinin karşılaştırılması. ....	59
<b>Şekil 4.18.</b> Açık alan deneyinde gruptaki sıçanların katettikleri ortalama mesafenin gruplar arası karşılaştırılması. ....	60
<b>Şekil 4.19.</b> Açık alan deneyinde gruptaki sıçanların ortalama hareket hızlarının gruplar arası karşılaştırılması.....	61
<b>Şekil 4.20.</b> Öğrenme ve hafıza deneylerinde grupların yükseltiyi bulma sürelerinin günlere göre karşılaştırılması .....	63
<b>Şekil 4.21.</b> Grup 1'deki bir sıçanın beyni.....	65
<b>Şekil 4.22.</b> Tüm gruptan birer sıçana ait beyin örnekleri.....	66

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> Apoptoz-Nekroz Arasındaki Farklar.....	9
<b>Çizelge 2.2.</b> Hipoksik İskemik Ensefalopatide Modifiye Sarnat Sınıflaması.....	12
<b>Çizelge 2.3.</b> Hipoksik iskemik beyin hasarının sistemik etkileri.....	13
<b>Çizelge 4.1.</b> TUNEL yöntemiyle tespit edilen apoptotik nöron sayıları.....	48
<b>Çizelge 4.2.</b> Gruplarda Kaspaz-3 yöntemiyle tespit edilen apoptotik nöron sayıları.....	53
<b>Çizelge 4.3.</b> Açık alan deneyinde grupların katedilen ortalama mesafe ve hareket hızı değerleri ve bu değerler için gruplar arası karşılaştırmalar.....	60
<b>Çizelge 4.4.</b> Gruplardaki sıçanların 14. haftada ortalama vücut ağırlıkları.....	62
<b>Çizelge 4.5.</b> Öğrenme ve hafıza deneylerinde grupların günlere göre ortalama yükseltiyi bulma süreleri ve bir ile dördüncü gün arasındaki yükseltiyi bulma süresi farkları.....	63
<b>Çizelge 4.6.</b> Morris su tankı deneyinin 5. gününde grupların doğu kadranda geçirdikleri süreler. ....	64
<b>Çizelge 4.7.</b> Morris su tankı deneyinin 5. gününde grupların tüm kadrarlarda geçirdikleri süreler.....	64
<b>Çizelge 4.8.</b> 16. haftada gruplara göre sıçanların ortalama beyin ağırlıkları.....	66
<b>Çizelge 4.9.</b> 16. haftada gruplara göre sıçanların ortalama vücut ağırlıkları.....	67

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AMPA.....	$\alpha$ -Amino-3-Hidroksi-5-Metil-4- İzoksazol Propiyonat
ATP.....	Adenozin Trifosfat
BAEP.....	Beyin Sapı İşitsel Uyarılma Potansiyelleri
BOS.....	Beyin Omurilik Sıvısı
BT.....	Bilgisayarlı Tomografi
CK.....	Kreatin Kinaz
DNA.....	Deoksi Ribonükleik Asit
DNAaz I.....	Deoksiribonükleaz-I
DPG.....	Difosfogliserat
EEG.....	Elektroensefalogram
GMP.....	Guanosin Monofosfat
GSH.....	Glutasyon
HBO.....	Hiper Barik Oksijen
HDD.....	Hayvan Davranış Deneyi
HİBH.....	Hipoksik İskemik Beyin Hasarı
HİE.....	Hipoksik İskemik Ensefalopati
IFN $\gamma$ .....	İnterferon Gama
IL.....	İnterlökin
KASPAZ.....	Sistein İçeren Aspartata Özgün Proteaz
LO.....	Alkoksil Radikalleri
LOO.....	Lipoperoksitler

LOOH.....	Lipohidroperoksitler
MDA.....	Malondialdehid
MRG.....	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MRS.....	Manyetik Rezonans Spektroskopi
NAA.....	N-Asetil-Aspartat
NBT.....	Nitroblue Tetrazoluim
NMDA.....	N-Metil D-Aspartat
NO.....	Nitrik Oksit
NOS.....	Nitrik Oksit Sentetaz
OH.....	Hidroksil
PCr.....	Fosfokreatinin
PGI <sub>2</sub> .....	Prostasiklin
Pi.....	İnorganik Fosfat
SEP.....	Somato-Sensöriyel Uyarılma Potansiyelleri
SOR.....	Serbest Oksijen Radikalleri
TBA.....	Tiyobarbitürik Asit
TNF- $\alpha$ .....	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
TUNEL.....	Terminal-transferase Mediated dUTP Biotin Nick-End-Labeling
UV.....	Ultraviyole
VEP.....	Görsel Uyarılma Potansiyelleri

## ÖZET

### Hipoksik İskemik Beyin Hasarı Oluşturulmuş Yeni Doğan Ratlarda İntraperitoneal Ozon Uygulamasının Morris Su Tankındaki Spasyal Bellek Performansına Etkisi

Çalışmada hipoksik iskemik beyin hasarlı sıçanlara, hipoksi öncesi ön koşullama olarak tek doz, hipoksi sonrasında da çeşitli günlerde tek ve tekrarlayan dozlarda ozon uygulanmasının bu hayvanların morris su tankı spasyal bellek performanslarına ve apoptotik hücre miktarlarına etkisinin gösterilmesi amaçlandı. Çalışmaya 102 adet yedi günlük Wistar cinsi erkek sıçan yavruları alındı. Sıçanlar rastlantısal olarak beş gruba ayrıldı ve boyun diseksiyonu yapılarak sağ karotid arteri bulunan ancak bağlanmayan, hipoksi uygulanmayan grup, Grup 1, hipoksi yapıldıktan sonra Serum Fizyolojinin (SF) intraperitoneal olarak verildiği grup, Grup 2, hipoksi yapılmadan bir gün önce ozonun uygulandığı grup, Grup 3, hipoksinin yapıldığı 7. gün işlemde hemen sonra ozon verilen grup, Grup 4 ve hipoksi yapıldıktan sonra, Morris su tankı deneyinden hemen önce 107, 108, 109. gün ozon uygulanan grup, Grup 5 olarak isimlendirildi. Grup 3, 4 ve 5'e ozon 1,2 mg/kg olarak intraperitoneal şekilde verildi. Hipoksi sonrasında ilk dört gruptan sekiz sıçan servikal dislokasyon ile ötenazi uygulanarak dekapite edildi. Çıkarılan beyinlerde TUNEL ve Kaspaz-3 yöntemleri ile immünohistokimyasal olarak apoptoz değerlendirildi. Kalp içi girişim yoluyla alınan kan örneklerinde MDA ve SOD düzeyleri ölçüldü. Sıçanlar 10 haftalıkken açık alan deneyi, 14 haftalıkken uzak hafıza deneyi yapıldı. Açık alan deneyinde ortalama katedilen mesafe ve hareket hızlarının gruplara göre karşılaştırılmasında her iki parametre için de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı, (sırasıyla p:0,241 ve p:0,238). Uzak hafıza deneyinde ilk dört gün yükseltiyi bulma süresi, birinci gün ile dördüncü gün arasındaki yükseltiyi bulma süresi farkı ve doğru kadranda geçirilen süre parametlerinin hepsi birden değerlendirildiğinde HİBH'i uyguladıktan sonra hemen ozon verilen grup 4, HİBH'nin tedavisinde ozon kullanımı ile ilgili yeni çalışmalar yapmak için umut vericidir.

**Anahtar Kelimeler:** Hipoksik iskemik ensefalopati, hipoksik iskemik beyin hasarı, Apoptoz, Davranış deneyleri

## **ABSTRACT**

### **The Effect of Intraperitoneal Ozone Administration on Spatial Memory Performance in Morris Water Maze in Newborn Rats in which Hypoxic Ischemic Brain Injury was induced**

In our study, we aimed to show the effects of both administration of single dose of ozone as preconditioning before hypoxia, and administration of single and repeated doses of ozone on various days after hypoxia on spatial memory performance in Morris water maze and on apoptotic cell numbers of the rats. We included 102 Wistar male rats (aged seven days) in our study. The rats were randomly divided into 5 groups. The group whose right carotid artery was found by neck dissection but not tied up and to which hypoxia was not applied, was called Group 1; the group to which Physiological Saline intraperitoneally injected after hypoxia, was called Group 2; the group to which ozone was administered one day before hypoxia was called Group 3; the group to which ozone was administered immediately after hypoxia carried out on the 7<sup>th</sup> day was called Group 4, and the group to which on the 107<sup>th</sup>, 108<sup>th</sup> and 109<sup>th</sup> day ozone was administered after hypoxia and before Morris water maze test, was called Group 5. 1.2 mg/kg of ozone was intraperitoneally injected to Groups 3, 4 and 5. After hypoxia, eight rats from each group were decapitated by cervical dislocation. In the removed brains of rats, apoptosis was immunohistochemically evaluated by means of TUNEL and Caspase-3 methods. In blood samples obtained by intracardiac puncture, levels of MDA and SOD were evaluated. Open field test was performed when the rats were 10 weeks and reference memory test was performed when the rats were 14 weeks. In open field test, inter-group comparisons of average distance covered by rats and their movement speed were made and no significant difference was found for these parameters ( $p= 0.241$  and  $p= 0.238$  respectively). When we take into account the parameters such as the time the rats spent finding the platform on the first four days, the difference between the time values obtained on the first day and on the fourth day, and the time spent in the east wing; the group 4 to which we administered ozone immediately after HIBI, gives us hope to make further studies on use of ozone in the treatment of HIBI.

**Key words:** Hypoxic ischemic encephalopathy, Hypoxic ischemic brain injury, Apoptosis, Behavioral test.

# 1. GİRİŞ

Yenidoğanda hipoksik iskemik beyin hasarı (HİBH) yenidoğan dönemindeki ölümlerin, beyin felcinin, mental geriliğin ve epilepsinin en önemli nedenlerindedir (1). HİBH’de iskemi daha önemli bir rol oynamaktadır. Hipoksi ve iskemiden sonra başlayan reperfüzyon dönemi ağır hasarın olduğu kritik evredir. Bu evre öncesi yapılacak tedaviler ile HİBH’yi önleme ya da azaltma mümkün olabilir (2).

Gelişmiş toplumlarda HİBH görülme insidansı 1000 canlı doğumda 0.4-0.7 olup, buna bağlı olarak ölüm ve nörolojik hasar gelişme insidansı 1000 canlı doğumda 0.2-1.3 olarak bildirilmiştir (3).

Hipoksi-iskemi ve reperfüzyon sonrasında gelişen apoptozisin şiddeti beyin hasarlanmasının bir göstergesidir. HİBH’nin yeri ve genişliğine göre serebral palsy, nöbetler, öğrenme güçlükleri, görme ve işitme kayıpları, motor kusurlar gibi çok sayıda kalıcı klinik durum gelişebilmektedir. HİBH’de klinik bulgular hipoksi ve iskeminin şiddeti, süresi, nörolojik tutulumun şiddeti ve yerine göre farklılık gösterir. Ayrıca diğer sistemlerin etkilenme dereceleri ve yerleri, fetus yaşı ile bağlantılıdır (4).

HİBH’nin tedavisi için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Hipotermi uygulanması, serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşumunun engellenmesi (fosfolipid yıkım yolunda etkili olan maddeler (Fosfolipaz A2 İnhibitörleri, Siklooksijenaz İnhibitörleri, Lipooksijenaz İnhibitörleri), Adenozin Trifosfat (ATP) yıkım yolunda etkili olan maddeler (Ksantin Oksidaz inhibitörleri), arjinin-üre dönüşüm yolunda etkili tedaviler (Nitrik Oksit Sentetazın (NOS) baskılanması)), oluşmuş olan serbest oksijen radikallerinin temizlenmesi (antioksidan enzimler (Glutatyon Peroksidaz, Superoksit Dismutaz, Katalaz), serbest oksijen radikallerini nötralize eden ajanlar (Selenyum, E vitamini, N- Asetilsistein, Askorbik asit)), glutamatın zararlı etkilerini azaltıcı tedaviler (N-Metil D-Aspartat (NMDA) reseptör kapatıcıları,  $\alpha$ -Amino-3-Hidroksi-5-Metil-4-İzoksazol Propiyonat (AMPA) reseptör kapatıcıları), nöronal büyüme hormon tedavisi, kaspazların baskılanması, kök hücre nakli uygulanması, dekzametazon tedavisi, eritropoetin uygulanması, kalsiyum kanal kapatıcıları uygulanması, magnezyum sülfat

tedavisi, östrodiol uygulanması, morfin uygulanması ve koagülasyonun baskılanması bunlara örnek olarak verilebilir (5-12).

Ozon, stratosforde bulunan en önemli gazlardan biridir. Azami konsantrasyonu 20-30 kilometre yükseklikte yaklaşık 1000  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  düzeyine ulaşmaktadır. Güneş ışınlarını filtreleyerek zararlı olanların yeryüzüne ulaşmasını engeller. Solunum sistemini tahriş eden bir gazdır ve solunan havada bulunması hava kirliliğinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Öte yandan ozonun diğer uygulamalarının (ozonlu kan, ozonlu SF ve insuflasyon) çeşitli klinik durumlarda yararlı olabileceğini öne süren pek çok araştırma yapılmıştır (13-15). Ozonun etki mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber serbest oksijen radikallerinin oluşumuna ve lipit peroksidasyonuna yol açtığı bilinmektedir (16). Bu nedenle antioksidan sistemi uyararak etkisini kuvvetlendirdiği öne sürülmüştür (17, 18). Aynı zamanda ozon 2,3 DPG artışı yaparak hemoglobinin dokulara daha çok oksijen serbestlemesini sağlar (19).  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$ , IL-2 ve IL-8 artışı yaptığı, vasküler  $\text{PGI}_2$  sentezini uyardığı ve bir immünmodülatör olduğu öne sürülmüştür (20, 21). Yapılan bir çalışmada ozon uygulamasının karaciğerde iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (22). Yine bir başka çalışmada ise beyin iskemisinde ön koşullama olarak kullanılarak hiperbarik oksijen tedavisiyle kıyaslanmıştır (23).

Sıçanların bilişsel ve lokomotor yetilerinin değerlendirilmesinde tanımlanmış çok sayıda hayvan davranış deneyi modeli mevcuttur. Hayvan davranış deneyi modelleri ile sıçanların anksiyete, otonom işlevler, öğrenme, hafıza ve lokomotor aktivite gibi pek çok özelliğinin değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Davranış deneylerinin sıçanların nöromotor gelişimini tamamladığı 80-85. günlerden sonra yapılması önerilmektedir. Pek çok çalışmada, deneylerin ortalama 180-400 gr ağırlığındaki erişkin erkek sıçanlarla yapıldığı gözlemlenmiştir (24-26).

Hayvan davranış deneylerinin en önemlilerinden biri Morris Su Tankıdır. Su tankı Morris tarafından 1981 yılında tanımlandığından bu yana kemirgenlerin öğrenme ve hafıza çalışmalarında yaygın olarak kullanılmıştır (27). Morris Su Tankı deneyleri ile uzak hafıza, yakın hafıza ve öğrenme gibi yetiler değerlendirilebilir (24, 25, 28)

Hipoksik-iskemi ve reperfüzyon sonrasında gelişen apoptozun şiddeti serebral hasarlanmanın göstergesidir. Hipoksi süresinin uzaması apoptotik nöron sayısının



artmasına ve serebral hasarın şiddetlenmesine neden olmaktadır. HİBH modellerinde sıçanların apoptotik nöron sayısının immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi TUNEL ve Kaspaz-3 yöntemleri ile yapılabilmektedir (4). Son yıllarda HİBH ile serum Malondialdehid (MDA) düzeyleri arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Bir çalışmada zamanında doğmuş ve HİBH gelişmiş bebeklerin serum-BOS MDA düzeyleri, BOS/serum MDA oranı kontrol grubu ile karşılaştırılmış, HİBH olan grupta her iki değer de yüksek bulunmuştur. HİBH ağırlaştıkça serum düzeyinin daha belirgin şekilde yükseldiği tespit edilmiştir. HİBH gelişen bebeklerde MDA düzeyinde artış olacağı ve düzey ne kadar yüksekse HİBH' nin o kadar ağır olduğu ileri sürülmüştür (29). Süperoksit dismutaz enzimi süperoksidin, hidrojen peroksid ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Hücresel düzeydeki süperoksidin en önemli düzenleyicisidir. Ozon uygulamasının süperoksit dismutaz enzim miktarını artırdığı bildirilmiştir (17).

Literatürde hipoksik iskemik beyin hasarında ozon uygulamasıyla ilgili çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda hipoksi öncesi ön koşullama olarak tek doz, hipoksi sonrasında da çeşitli günlerde tek ve tekrarlayan dozlarda ozon uygulanmasının bu hayvanların Morris Su Tankı spasyal bellek performanslarında ve apoptotik hücre miktarında etkisinin olup olmayacağını araştırılması amaçlandı.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hipoksik İskemik Beyin Hasarı

Yenidoğanda hipoksik iskemik beyin hasarı ölümlerin, serebral palsinin, mental geriliğin ve epilepsinin başlıca nedenlerindedir (1). Hipoksi hücrelere yeterli oksijenin sağlanamaması durumudur. Hipokside kan beyin, kalp ve adrenal bezde toplanır. Akciğer, böbrek, barsak ve ciltten ise uzaklaşır. Hipoksi ağırsa, öncelikle talamus ve beyin sapı hasar görmektedir. Sonrasında ventrikül çevresindeki beyaz cevherde nekroz meydana gelmektedir (3, 30). Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, hipokside gelişmekte olan beyinde seçilmiş bölgeler hasar görmektedir (30). İskemi bir doku veya organdaki kan akımının azalması veya kesilmesini ifade etmektedir. İskemi durumunda dokuya yeterli oksijen ve besin maddeleri gitmediğinden ve toksik maddeler uzaklaştırılamayacağından hipoksiye göre daha ağır hasar oluşmaktadır. Olgunlaşmamış beynin hipoksi ve iskemiye yanıtının olgunlaşmış beyninkinden farklı olduğu çalışmalarla gösterilmiştir (31, 32). Doğum öncesinde, doğum sırasında veya doğum sonrasında yaşanan hipoksik iskemik olaylar sonucunda bebekte anormal nörolojik bulgular, perinatal hipoksik iskemik ensefalopati (HİE) olarak tanımlanır (33).

#### 2.1.1. Epidemiyoloji

HİE yenidoğan ölümlerinin ve özürlerinin önde gelen nedenlerinden olup hastaya, aileye ve topluma ciddi yükler getirmektedir. Tüm dünyada yılda dört milyon kadar bebek yenidoğan döneminde ölmektedir ve bunların dörtte birinde neden HİE'dir. HİE tanısı alan bebeklerden %10-15'i yenidoğan döneminde kaybedilmekte, %10-15'inde serebral palsy gelişmekte ve %40 kadarında bilişsel bozukluklar, nöbetler, nöromotor gelişme geriliği, körlük, işitme bozuklukları gibi önemli özürler oluşmaktadır (34).

### 2.1.2. Fizyopatoloji

HİE sıklıkla beş nedene bağlı olarak gelişmektedir.

1. Göbek kordonu ile sağlanan kan akımının kesintiye uğraması
  - a. Kordon sarkması
  - b. Kordon dolanması
  - c. Kısa kordon
2. Plasentadan gaz alış verişinin bozulması
  - a. Plasentanın yerinden ayrılması
  - b. Plasentanın doğum yoluna yerleşmesi
  - c. Placenta gelişim bozuklukları
  - d. Plasentada yangısal değişikliklerin olması
3. Plasentanın anne yüzünün yetersiz kanlanması
  - a. Annede hipotansiyon, şok
  - b. Hipertansiyon
  - c. Diyabet
  - d. Uzamış doğum eylemi
  - e. Anormal uterus kasılması
4. Annenin oksijenizasyonunun bozulması
  - a. Kalp damar sistemi hastalıkları
  - b. Akciğer hastalıkları
  - c. Ağır anemi
  - d. Annenin diğer kronik hastalıkları
5. Yenidoğan akciğerinin yeterince havalanamaması ve fetal dolaşımdan neonatal dolaşıma geçişte başarısızlık (35).

HİE'nin sebepleri farklı olsa bile nöropatolojik sonuçları benzerdir. Beyin hasarının ağırlığı hipoksinin süresi, şiddeti ve fetusun yaşı ile bağlantılıdır. Büyük çocuk ve erişkin beynine göre fetusun gelişimini tamamlamamış beyni hipoksik iskemik olaylara daha dirençlidir. Hipokampus, beyincik ve korteksin bazı katmanları hipoksi ve iskemiye daha hassastır (33). Hipoksik iskemik olaylara en duyarlı hücreler nöronlardır. Hipoksi ve iskemiye bağlı olarak meydana gelen hücresel hasarın kesin mekanizmaları

tam olarak açıklanamasa da ardışık biyokimyasal olayların HİE'nin patogeneğinde rol oynadığı bilinmektedir.

HİBH modelinde hücre içi asidoz ve kalsiyum birikimi önemli rol oynamaktadır. Hücre içi kalsiyum artışında anahtar rol sinapslardan salınan uyarıcı aminoasitlerdir (36-38). İnsanda en çok bulunan uyarıcı aminoasit glutamattır. Yapılan çalışmalar glutamat reseptörlerinin uyarılmasının nöronal hücre ölümünde en önemli rolü oynadığını göstermektedir (39). Glutamat, özgün reseptörleri aracılığı ile duysal bilgilerin iletilmesi, motor aktivite, spinal reflekslerin düzenlenmesi, hafıza ve öğrenme gibi birçok işlevde rol oynamaktadır (40).

Glutamat için dört reseptör bilinmektedir.

1. NMDA reseptörleri
2. AMPA reseptörleri
3. Kâinat reseptörleri
4. Metabotropik reseptörler

NMDA reseptörlerine glutamatın bağlanması sonrasında sodyum ve kalsiyum hücre içine girerken, potasyum ise hücre dışına çıkmaktadır. Hücre içi kalsiyum düzeyinin artması sonucu, serbest radikal oluşumu ve mitokondriyal hasar meydana gelmektedir (41, 2). AMPA reseptörlerinin uyarılması sonucunda sodyum hücre içine girerken, potasyum ise hücre dışına çıkmaktadır. Kâinat reseptörlerinin, NMDA reseptörlerinin spinal kord eksitator nörotransmisyonunda yönetici özelliği olduğu düşünülmektedir. NMDA reseptörleri hücre içi kalsiyumun artmasına ve magnezyumun azalmasına sebep olmaktadır. Hücre içi kalsiyum artışı sonucunda proteaz, lipaz, fosfotaz ve endonükleaz gibi litik enzimler uyarılır. Hücre içi magnezyumun azalması da nöronal hasarın şiddetlenmesine neden olur. Metabotropik reseptörlerin uyarılması sonucu fosfolipaz C aktifleşir ve bunun sonucunda hücre içinde bağlı olan kalsiyum serbestleşir (42).

Hipoksiye verilen ilk metabolik cevap anaerobik glikolizdir. Fakat bu yolla yeterli ATP üretilemez ve laktik asidoz oluşur. ATP miktarında azalma ile bazı iyon pompaları (Na-K pompası vs.) görevlerini yerine getiremez duruma gelirler. İyon pompaları işlevlerini kaybettiklerinde nöronal membran değişmeye başlar. Bazı nöronlar hiperpolarize bazı nöronlar ise depolarize olur. Eğer anoksi devam ederse tüm

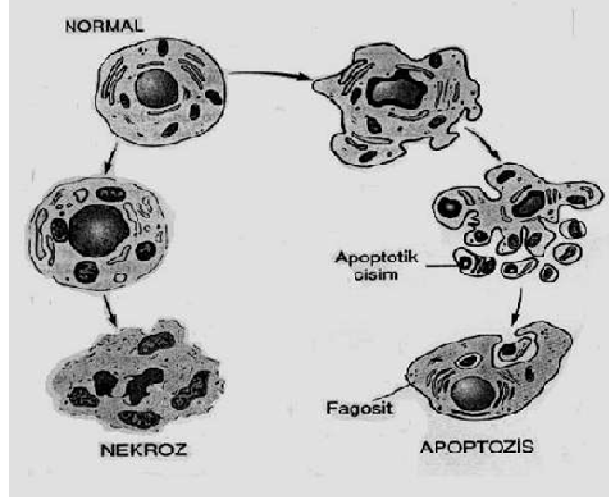
hücreler hızlı bir şekilde depolarizasyona uğrarlar. Bunun sonucunda membran potansiyeli ortadan kalkar. Nöronal membran potansiyeli kaybolduğu zaman iyon değişiklikleri meydana gelir. Bu değişiklikler hücre içine sodyum, klor ve kalsiyum girişi ve hücreden potasyum çıkışıdır. Sonuç olarak hücre içi kalsiyum yükselir, hücre dışı potasyum miktarı artar ve hücre dışı kalsiyum, sodyum ve klor azalır. Glutamatın hücre dışı yoğunluğunda önemli bir artış vardır. Bu durum nörotransmitter salınımında artma ve hücre içine geri alınmasında azalma sonucu oluşur. Sonuçta nöronal eksitator reseptörlerin aşırı uyarılması ve hücre ölümü gerçekleşir. Hızlı hücre ölümü fazla sodyumun iyon kanalları yoluyla hücre içine girmesinden dolayı oluşur. Bu da klorun nöronlara girmesine sebep olur. Artmış hücre içi klor daha fazla katyonun hücre içine girmesini uyarır. Klor ve katyon girişi suyu hücre içine çeker ve sonuçta osmotik parçalanma meydana gelir. Hücrede en önemli hasar kalsiyum girişi ile olur. Hücre içinde aşırı kalsiyum iyonu birikimi bir dizi reaksiyona sebep olur (43, 44, 42) .

1. Fosfolipaz A<sub>2</sub> aktivasyonu
2. Serbest radikallerin ortaya çıkması
3. Yağ asitlerinin serbestleşmesi
4. Toksik eikosanoidlerin sentezi
5. Mitokondrial oksidatif fosforilasyonun bozulması
6. Kalsiyuma bağımlı ATP aktivasyonu sonucu enerji rezervlerinin tükenmesi
7. Hücre iskeletinin mikrotubuler ve nörofilament komponentlerinin farklılaşması
8. Aksonal dejenerasyon
9. Proteaz, fosfataz ve endonükleaz gibi litik enzimlerin aktivasyonu (42)

Hücre içindeki kalsiyumun fazla miktarda artışı katabolik enzimlerin (fosfolipazlar, proteazlar ve endonükleazlar) uyarılmasına sebep olur. Katabolik enzimlerin uyarılması sonucunda zardaki fosfolipitlerin yapısı bozulur. Hücre içi kalsiyum artması ile fosfolipaz A<sub>2</sub> uyarılır ve araşidonik asit salınır, böylece hücre hasarı oluşur. Proteazların uyarılması ile yapısal zar proteinleri yıkılır. Lipazların uyarılması ile lipid peroksidasyonu meydana gelir. Endonükleazların uyarılması ile genetik yapı bozulur. Prostaglandinler salınır, böylece mikrovasküler geçirgenlik ve vazodilatasyon artar. Kalsiyum ayrıca nitrik oksit sentazı (NOS) uyarır ve nitrik oksit (NO) oluşumu yükselir ve bu da serbest oksijen radikalleri üretimini artırır (45). Serbest

oksijen elektron transport zinciri içinde suya dönüşürken oksijen radikalleri meydana gelir. En zararlı radikal hidroksil (OH<sup>-</sup>) radikalidir. NO siklik GMP oluşumunu bozarak hasara sebep olur. NO ayrıca oksijen ile reaksiyona girerek DNA hasarı ve membran lipid peroksidasyonuna neden olan süperoksit, peroksit ve peroksinitrit serbest radikallerini oluşturur (45). Bunlar apoptozisin potansiyel uyarıcılarıdır. NO'nun deneysel çalışmalarda fokal serebral iskemiye yol açtığı ve bu hasarın NOS inhibitörleri ile önlenebileceği bildirilmiştir (46).

Yeniden canlandırma sonrası döneme denk gelen yeniden kanlanma evresinde ise serbest oksijen radikalleri salınımı, NO üretimi, yangısal reaksiyonlar oluşmakta ve ikinci dalga hücre ölümü meydana gelmektedir. Son yıllarda yeniden kanlanma döneminde oluşan hücre ölümünün patogenezi daha önemli rol oynadığına işaret edilmekte ve tedavi seçeneklerinin bu evrede etkili olması beklenmektedir (45). Bu dönemin hipoksik iskemik olaydan iki saat sonra başladığı ve 48 saate kadar uzayabildiği düşünülmektedir. HİBH'de hücre ölümü nekroz veya apoptoz ya da her iki şekilde gerçekleşebilmektedir (48, 35). Nekrotik hücre ölümü hücrenin şişmesi, zar bütünlüğünün bozulması, hücre içeriğinin salınması ve bunun sonucunda yangı oluşması ve fagositoz ile meydana gelir. Apoptotik hücre ölümü ise kromatinin yoğunlaşması, hücrenin büzülmesi ile gerçekleşir ve yangı eşlik etmez (Şekil 2.1). Hücrenin ölüm şekli ile iskeminin derecesi arasında bir ilişki olduğu bildirilmektedir. Ağır iskemi durumunda nekroz ile hücre ölümü daha çok görülürken hafif iskemi durumunda apoptozis ön plana geçmektedir. Son yıllarda perinatal dönemde gerçekleşen HİBH'de apoptozisin nekroza göre daha önemli olduğu gösterilmiştir. Apoptoz ve nekroz yoluyla meydana gelen hücre ölümü arasında önemli farklar vardır. Bu farklar Çizelge 2.1' de özetlenmiştir (49, 35).



Şekil 2.1. Apoptozis ve nekroz ile hücre ölümü (42).

Çizelge 2.1. Apoptoz-Nekroz arasındaki farklar (42).

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

Mutasyona uğramış ya da hasarlanmış hücre genellikle yaşamamayı tercih eder. Sonuçta malign hale gelebilecek olan bu hücrelerin bir kısmı başta apoptoz olmak üzere

hücre ölüm mekanizmaları aracılığı ile ortadan kaldırılırlar. Memeli hücrelerinde, muhtemelen Deoksiribonükleaz-I (DNAaz-I) aracılığı ile düzenlenen nükleer DNA' nın degradasyonu, apoptozun en erken kanıtlarındandır. Apoptozun hücre içinde oluşturduğu harabiyet, büyük oranda proteaz kaskadı sonucu meydana gelir. Tek başına proteazın, çoklu proteaz aktivasyonuna öncülük ettiği bir amplifiye proteaz kaskadı, apoptozun morfolojik değişikliklerini açıklayabilir. Hücrelerin yaşamı ve ölümü arasındaki dengenin korunması oldukça önemlidir. Uygunsuz hücre ölümünü önleyen faktörler de en az apoptoz kadar bu dengenin sağlanmasında rol oynar. Apoptozu başlatan ve engelleyen genler bu dengenin sağlanması için önemlidir. En iyi tanımlanmış antiapoptotik gen bcl-2' dir (50, 51, 52).

Apoptozu başlatan ve engelleyen faktörler:

a. Bcl-2 grubu proteinler:

- Apoptozu engelleyen genler: Bcl-2, Bcl-xL,
- Apoptozu başlatan genler: Bad, Bak, Bax,

b. APAF: Apoptotik proteaz aktive edici faktör.

c. CASPASE: Sistein içeren aspartat özgün proteazdır (52).

### **2.1.3. Hipoksik İskemik Ensefalopatide Nöropatolojik Bulgular**

Ödem: Beyin dokusunda 24- 48 saat içinde ödem oluşabilir. Ödemden başlıca iki mekanizma sorumludur. Birincisi hücre zarında meydana gelen işlevsel bozulma ile sodyum ve suyun hücre içine girmesi ve sitotoksik ödem gelişmesidir. İkinci mekanizma ise kan beyin bariyerinin geçirgenliğinin artması ve kapiller sızma ile hücreler arası sıvı birikimi meydana gelmesidir (53).

Seçici Nöronal Nekroz: Bu durum daha çok zamanında doğan bebeklerde görülür. Ağırlıklı olarak serebral ve serebellar korteks, hipokampus, talamus, bazal ganglionlar, beyin sapı ve spinal kordun ön boynuz hücreleri etkilenmektedir. Olayın başlangıcından 24- 36 saat içinde değişiklikler başlar. Seçici nöronal nekroza bağlı olarak geç dönemde serebral atrofi ve multikistik ensefalomalazi oluşur (53, 35).

Bazal Ganglion ve Beyin Sapı Hasarı: En az görülen nöropatolojik lezyon olup genellikle zamanında doğan bebeklerde görülmektedir. Nöronal nekroz, gliosis ve



hipermiyelinizasyon bazal ganglion, talamus ve serebral kortekste mermer görünümüne neden olur. Otopside bazal ganglionlarda saptanan bu mermerimsi görünüm status marmoratus olarak adlandırılır (54).

**Parasagittal Serebral Nekroz:** Serebral korteks ve subkortikal beyaz maddedeki nekrozu ifade edmektedir. Hipoksik iskemik zedelenme ön, orta ve arka serebral arterler arasındaki vasküler yataktan parasagittal yayılım gösterir ve çoğunlukla simetrik yapıdadır. Serebrovasküler otoregülasyonun bozulması bu alanlarda belirgin iskemi ile sonuçlanır. Yenidoğan döneminde bu zedelenme hipotoni ve kuvvetsizlik bulgularıyla kendini gösterir ve bu bulgular üst ekstremitede alt ekstremiteye göre daha belirgindir. Uzun dönemde ise spastik kuadriparezi, konuşma bozukluğu ve göz hareketlerinde bozukluk ile sonuçlanır (54, 35).

**Bölgesel ve Çoklu Bölgesel İskemik Beyin Nekrozu:** Beyin parankiminde infarktlara bağlı oyuklar oluşur. Tek bir oyuk varsa bu porensfalik kist, çok sayıda oyuk varsa multikistik ensefalomalazi olarak adlandırılır. En sık etkilenen bölge orta serebral arterin kanlandığı alandır. Genellikle tek taraflıdır. Hipoksik iskemik ensefalopatili yenidoğanların %15-20'sinde görüldüğü bildirilmektedir. Erkendoğanlarda genellikle bu durum çoklu bölgesel yapıdadır. Yenidoğan döneminde, üst ekstremitede güçsüzlük, asimmetrik Moro refleksi, hemiparezi, fokal konvülsiyonlar, uzun dönemde ise spastik hemiparezi, kuadriparezi, bilişsel bozukluklar ve nöbetler görülür (55, 35).

**Periventriküler Lökomalazi:** Erkendoğan bebeklerde hipoksi ve iskemiyeye bağlı en fazla görülen lezyondur. Erkendoğanlarda ventrikül çevresindeki beyaz madde damarlar açısından oldukça zengindir ve iskemiyeye ve kanamaya karşı oldukça hassastır (54). Hafif olgularda küçük gliosis alanları, ventriküllerde genişleme ve miyelin azalması meydana gelir. Daha ağır olgularda multikistik ensefalomalaziye kadar farklılaşan bulgular ortaya çıkabilir (35).

#### **2.1.4. Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Klinik Bulgular**

HİBH' de klinik bulgular hipoksi ve iskeminin şiddetine, süresine ve bebeğin gebelik yaşına göre farklılık gösterir. HİBH konvülsiyonu, hipotonisi ve bilinç değişikliği olan bebeklerde düşünülmelidir. Olguların büyük bir kısmında beyin

dışındaki organlar da etkilenir. En sık etkilenenler sırasıyla böbrekler, kalp, akciğerler, karaciğer ve barsaklardır.

Modifiye Sarnat sınıflaması günümüzde HİE'nin evrelemede en fazla kullanılan sınıflamadır. Bu sınıflamaya göre olgular hafif, orta ve ağır olarak sınıflandırılmaktadır (33) (Çizelge 2.2).

**Çizelge 2.2.** Hipoksik iskemik ensefalopatide modifiye sarnat sınıflaması (35).

<b>Bulgular</b>	<b>Evre- I (Hafif)</b>	<b>Evre- II (Orta)</b>	<b>Evre- III (Ağır)</b>
<b>Bilinç düzeyi</b>	Uyanık	Uykuya eğilimli	Koma
<b>Kas tonusu</b>	Normal/ hipertonik	Hipotonik	Gevşek
<b>Tendon refleksleri</b>	Artmış	Artmış	Azalmış
<b>Myoklonus</b>	Var	Var	Yok
<b>Konvülsiyon</b>	Yok	Sık	Sık
<b>Karmaşık refleksler</b> Emme refleksi Moro refleksi Yakalama refleksi Okülosefalik refleksi	İyi Abartılı Normal/ abartılı Normal	Zayıf Zayıf Abartılı Aşırı aktif	Yok Yok Yok Azalmış/ yok
<b>Otonom işlevler</b> Pupiller Solunum Kalp hızı	Geniş, reaktif Düzenli Normal/ taşikardi	Dar, reaktif Düzensiz Bradikardi	Anizokorik, nonreaktif Düzensiz, apneik Bradikardi
<b>Elektroensefalogram (EEG)</b>	Normal	Düşük voltaj/ nöbet	Nöbet/ izoelektrik

HİBH' de beynin yanı sıra olguların üçte ikisinde en az iki organ etkilenmiştir. Organ hasarı en fazla böbreklerde görülür (1) . HİBH' nin sistemik etkileri Çizelge 2.3' de gösterilmiştir. Klinik bulguların düzelme derecesi değişkenlik gösterir ve önceden tahmin edilemez. Sıklıkla en hızlı düzelme gösteren bebekler en iyi prognoza sahiptirler (56) .

**Çizelge 2.3.** Hipoksik iskemik beyin hasarının sistemik etkileri (42).

<b>Sistem</b>	<b>Etki</b>
Merkezi sinir sistemi	Hipoksik-iskemik ensefalopati, beyin ödemi, infarkt, intrakraniyal kanama, hipotoni, hipertoni, konvulsiyonlar
Solunum sistemi	Pulmoner hipertansiyon, surfaktan yıkımı, mekonyum aspirasyonu, akciğer kanaması
Dolaşım sistemi	Triküspit yetmezlik, miyokard nekrozu, şok, hipotansiyon
Mide-bağırsak sistemi	Nekrotizan enterokolit, karaciğer yetmezliği
Böbrekler	Oligüri, akut böbrek yetmezliği, akut tübüler nekroz, idrar debisinde azalma, asfiktik mesane sendromu, renal ven trombozu
Endokrin	Uygunsuz ADH salınımı sendromu, adrenal kanama, adrenal yetmezlik, pankreatik hasar
Metabolik	Metabolik asidoz, hipoglisemi, hipokalsemi, hiponatremi
Hematolojik	Trombositopeni, polisitemi, beyaz küre hücrelerinde sola kayma, yaygın damar içi pıhtılaşma
Deri	Deri altı yağ nekrozu

### **2.1.5. HİBH'nin Tanısı**

Perinatal HİE'nin tanısında öykü ve fiziksel muayene oldukça önemlidir. Öyküde doğum öncesi dönem, doğum süreci ve doğumdan sonraki dönemle ilgili detaylı bilgiler alınmalıdır. Bebeğin fiziksel muayenesinin özellikle de nörolojik muayenesinin dikkatli bir şekilde yapılması HİE tanısının konmasına, ağırlığının belirlenmesine ve erken dönemde tedavinin başlanmasına yardımcı olacaktır. Amerikan Obstetrik ve Jinekoloji Derneği 2004 yılında aşağıda yer alan tanı ölçütlerinin kullanılmasını önermiştir (57, 58, 35).

Tanı için bulunması zorunlu tutulan ölçütler:

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

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

Hipoksik iskemik ensefalopatiye özgün olmayan ek ölçütler:

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

HİE tanısının konması kadar şiddetinin belirlenmesi de önemlidir. Hafif HİE genellikle tedavi gerektirmeden kısa zamanda düzelmekte ve önemli özürlere sebep olmamaktadır. Ağır HİE ciddi seyretmekte ve var olan tedavilere rağmen ağır özürlere sebep olmaktadır. Orta derecede HİE'li bebeklerin ise bir kısmı tedaviden yarar görürken ve önemli özürlere gelişmezken, diğer kısmında önemli özürlere oluşmaktadır (59). Orta derecede HİE'nin bu kadar farklı biçimde sonuçlanabilmesi evreleme amacıyla yaygın olarak kullanılan Sarnat ve Sarnat sınıflamasının yetersiz olduğunu düşündürmektedir. Öykü ve fiziksel inceleme her zaman HİE tanısının konması ve tedaviden fayda sağlayacak hasta grubunun belirlenmesi için yeterli olmamaktadır, bu nedenle elektrofizyolojik, biyokimyasal ve radyolojik yöntemlerden de yararlanılmaya çalışılmaktadır.

#### **2.1.5.1. Biyokimyasal Testler**

HİBH tanısında çok sayıda biyokimyasal testten faydalanılmaktadır. Bunlardan bir kısmı aşağıda belirtilmiştir.

- Kord kanı pH'sının 7,1'in altında olması

- Plazma laktat oranında artma
- Artmış beyin omurilik sıvısında protein düzeyi
- Artmış Kreatin Kinaz (CK), CK-MB, ürik asit, amonyak düzeyleri
- N-asetil-aspartat (Naa) düzeyinde düşme
- Naa/kreatinin veya Naa/kolin oranında düşüklük
- Son zamanlarda CK'nın beyine spesifik izoenzimi (CK-BB) üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. HİBH sonrası altı saat içinde ölçülen CK-BB düzeylerinin ölen veya ağır hasarlı olan bebeklerde çok daha fazla olduğu saptanmıştır.
- BOS' un laktat dehidrogenaz ve hidrosibütirat dehidrogenaz, plazmanın ise hipoksantin, vazopressin, eritropoetin düzeylerinde artış.
- Son yıllarda HİBH ile serum malondialdehid düzeyleri arasında bir bağlantı olduğu saptanmıştır. Bir çalışmada zamanında doğmuş ve HİBH oluşmuş bebeklerin serum-BOS MDA düzeyleri, BOS/serum MDA oranı kontrol grubu ile karşılaştırılmış, HİBH olan grupta her iki değer de yüksek bulunmuştur. HİBH ağırlaştıkça serum düzeyinin daha belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir. HİBH gelişen bebeklerde MDA düzeyinde artış ne kadar yüksekse HİBH'nin o kadar şiddetli olduğu ileri sürülmüştür (29, 42).

#### 2.1.5.2. Elektrofizyolojik testler

EEG: HİBH' de hasarın derecesini tespit etmede yardımcı olur. Ayrıca tanı koymak ve prognozu belirlemede EEG'nin önemi vardır. Ağır HİBH' den sonra özellikle zamanında doğmuş yenidoğanlarda özgün EEG bozuklukları gözlenebilir (60). İlk olarak amplitüde ılımlı baskılanma, elektriksel aktivitede yavaşlama görülür. Ara sıra patlamalarla bölünen voltaj baskılanma dönemleri ve keskin ve yavaş dalga şekli vardır. Zamanından önce doğan bebeklerde bu değişikliklerin ayırt edilmesi zordur. İlerleyen günlerde daha ciddi voltaj baskılanması ve diken, yavaş dalga patlamaları görülür. Buna patlama baskılanma görüntüsü denir. Bu görüntünün elde edilmesi kötü prognoz anlamına gelmektedir (61, 42). Klinik bulgular olmasa da sessiz nöbetlerin değerlendirilmesi amacıyla şüpheli vakalarda EEG yapılması tavsiye edilmektedir (62).

Beyin sapının işitsel ve görsel uyarılmış potansiyelleri (BAEP ve VEP) ölçümü: Beyin sapının işitsel uyarılmış potansiyelleri ve görsel uyarılmış potansiyellerin

ölçümünün sinirsel sağrlık ve görsel bozukluğu retrospektif olarak önceden bildiren yöntemler olduğu kabul edilmektedir. Uyarılmış beyin sapı potansiyelleri perinatal asfiksini tanı, izlem ve prognoz tayininde kullanılmaktadır. Bu testler, beyin sapı yapılarını değerlendirmeye imkan tanıır. Zamamında doğan bebeklerde yapılan bir çalışmada ilk 24 saatte normal somato-sensöriyel uyarılmış potansiyellerin (SEP) iyi prognozu önceden belirlemede %94 duyarlı olduğu bildirilmiştir (61).

### **2.1.5.3. Radyolojik Yöntemler**

- Kraniyal Ultrasonografi
- Renkli Doppler Sonografi
- Bilgisayarlı Tomografi (BT)
- Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG)
- Manyetik Rezonans Spektroskopi (MRS)
- Proton Manyetik Rezonans Spektroskopi

HİBH'nin tanısında kullanılan radyolojik yöntemlerdir (52, 63)

### **2.1.6. HİBH' de Tedavi**

Gebe ve yenidoğan izleminde önemli ilerlemeler sağlanmasına rağmen HİE tüm dünyada yenidoğan ölümlerinin ve özürlerinin önde gelen sebeplerinden biri olmayı sürdürmektedir ve istenen derecede etkili bir tedavi şekli bulunmamaktadır. Var olan tedavi yöntemlerinden özellikle soğutma tedavisinin etkinliği kanıtlanmış olmasına rağmen bütün hasta grupları için yeterince etkili gibi görünmemektedir. Bu nedenle yeni tedavi yöntemleri ile ilgili araştırmalar devam etmektedir (64, 65, 66).

Tüm uğraşlara rağmen HİBH önlenememişse aşağıdaki tedavi şekillerinden bebek için uygun olan seçilmeli ve uygulanmalıdır.

- Solunumun sağlanması
- Beyin dolaşımının sağlanması
- Normal kan şekeri düzeyinin sağlanması

- Nöbetlerin kontrolü
- Beyin ödeminin kontrolü
- Deneysel tedavi yöntemleri

**Solunumun Sağlanması:** Oksijen ve karbondioksit normal sınırlarda tutulmalıdır. Çünkü hipoksinin kontrol edilmediği koşullarda serebral hasar artmaktadır.

**Beyin Dolaşımının Sağlanması:** HİBH' de beyin otoregülasyonu bozulmuştur. Beynin dolaşımı, kan basıncı aracılığı ile pasif olarak sağlanmaktadır. Kan basıncı düştüğünde beyin dolaşımı azalmakta ve hasar artmaktadır. Bu sebeple sistemik basınç normal sınırlarda tutulmalıdır. Bradikardinin eşlik ettiği apnelerde beyin kan akımı azalacağından apneye neden olabilecek durumlar ortadan kaldırılmalıdır. Polisitemi hiperviskositeye neden olarak dolaşımı bozar ve beyinde enfarktlara sebep olabilir, bu nedenle olması durumunda tedavi edilmelidir (67, 68, 69).

**Kan Şeker Düzeyinin Ayarlanması:** HİBH tedavisi sırasında en uygun kan şekeri seviyesi tartışmalıdır (70). Hiperglisemi ile hipoksik dokuya yeterli substrat sağlanarak enerji yetersizliğinin engelleneceği ve hasarın azaltılabileceği iddia edilmiştir. Bazı hayvan deneyleri ise hipergliseminin hipoksik dokudaki laktat seviyesini yükselterek hasarı artırdığını bildirmişlerdir. Bu sebeplerle kabul gören güncel yaklaşım hastalarda normoglisemi sağlanmasıdır (71, 72).

**Nöbetlerin Kontrolü:** Orta ve ağır derecede HİE'li bebeklerde ilk saatlerden itibaren genellikle nöbetler görülmektedir. Yapılan hayvan ve insan çalışmaları nöbetlerin yalnızca bir bulgu olmadığını, var olan HİBH'yi artırdığını bildirilmişlerdir. Ayrıca hipoksik iskemik ensefalopati bebeklerde oluşan nöbetlerin şiddeti ve beyin hasarı arasında bağımsız bir ilişkinin varlığı da gösterilmiştir (73, 74, 75).

**Beyin Ödemi Tedavisi:** HİBH sebebiyle oluşan beyin ödemi önemli bir sorundur. Bugüne dek tedavisi için mannitol, steroid, idrar söktürücü gibi ilaçlar ve baş yükseltme gibi fiziksel yöntemler kullanılmıştır.

#### 2.1.6.1. Deneysel Tedavi Yöntemleri

**Hipotermi Uygulanması:** Hipotermi serebral metabolizma hızını düşürür. Nekrotik ve apoptotik hücre ölümünü başlatan nöronal enerji kaynaklarındaki azalmayı

önleyerek apoptozu engeller. Ayrıca oksijen metabolizmasını yavaşlatır, sitotoksik ödemi önler, eksitotoksin ve NO salınımını inhibe eder (76, 77, 78). Deneysel çalışmalar ile hafif hiperterminin olasılıkla eksitotoksinleri artırarak hipoksik-iskemik hasarı ağırlaştırdığı gösterilmiştir (79). Serebral hipoterminin yararlı etkisinin eksitator amino asitler ve nitrik oksit sentezini inhibe etmesi ve apoptozu azaltmasına bağlı olduğu ileri sürülmektedir (80, 81, 82).

**Kök Hücre Tedavisi:** Vasküler endotelial büyüme hormonu ve nöronal kök hücre tedavisinin damar içi uygulandığı sıçan çalışmasında, iki maddeyi aynı anda alan grupta, tek madde uygulanan ve madde uygulanmayan gruplara göre daha yüksek proanjiogenetik etki gözlenmiştir. HİBH'nin etkilerinin azaltılabileceği öne sürülmüştür (83). Hipoksik iskemik hasar oluşturulan sıçanlara rekombinant insan granülosit koloni uyarıcı faktör verilmesi sonrası sıçanların yaşam sürelerinin arttığı, infarkt alanının küçüldüğü bildirilmiştir (84).

Bir çalışmada sıçanlarda oluşturulan HİBH modelinde, hipoksik iskemik sıçanlara çok yönlü kök hücre astrositleri verildiğinde bu hücrelerin hasarlanmış bölgeye göç ettiği gösterilmiştir. Verilen kök hücre astrositlerinin hasarlanmış bölgelerde nöronlara ve glial hücrelere farklılaştığı saptanmıştır (85).

Zheng ve ark. doğumdan sonra sıçanlardan 1-6 günler arasında supepandimal bölgeden çok yönlü astrositik kök hücreler elde etmiş ve bu astrositik kök hücreleri doğumdan sonraki yedinci günde hipoksi-iskemi geliştirilmiş sıçanlara vermişlerdir. Sonrasında astrositik hücrelerin nöronlara dönüştüğünü ve hasarlanmış bölgede bulduklarını göstermişlerdir (85).

Takeshi Hayashi ve ark. hipoksi ve iskemiden sonra astroglial, oligodendroglial ve mikroglial hücrelerde artış olduğunu bildirmişlerdir. Bu da iyileşme evresinde bu hücrelerin önemli rollerinin olduğunu göstermektedir. Perinatal beyin hasarlanmasının tedavisinde bu progenitor hücrelerin önemli bir potansiyele sahip olduğu belirtilmektedir (86). Perinatal dönemde hipoksiye maruz kalan yenidoğanlara çok yönlü astrositlerin verilmesi ile meydana gelen nörolojik hasarın en az seviyeye indirilebileceği düşünülmektedir.

**N-asetil Sistein:** N-asetil sistein kan beyin bariyerinden ve plasentadan rahatlıkla geçebilmesi, yan etkisinin az olması ve nöron koruyucu özelliğinin olması sebebiyle dikkat çeken bir ilaçtır. Glutatyon öncülü gibi hareket ederek oksidan radikallerin,



apoptozisin ve yangının meydana gelmesini baskılar (87). Erişkin inme modelinin oluşturulduğu çalışmalarda oksijen radikallerini temizlediği, yangıyı ve NO üretimini baskıladığı böylece reperfüzyon döneminde oluşan hasarı azalttığı gösterilmiştir (88, 35).

**Magnezyum Sülfat:** Magnezyum sülfat gebeliğe ikincil gelişen hipertansiyon tedavisinde sık olarak kullanılmaktadır ve bunun için kullanıldığında yenidoğanlar üzerine de olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (89). Magnezyumun bir uyarıcı aminoasit olan glutamatın NMDA reseptörlerini inhibe ederek hücre içine kalsiyum girişini engellediği ve bunun sonucunda nöron ölümünü önlediği bildirilmiştir (90). Yenidoğan sıçanlarda yapılan çalışmada magnezyum sülfatın orta derecede HİBH tedavisinde etkili olduğu ancak ağır HİBH’de etkili olmadığı gösterilmiştir (91).

**Ksenon:** Ksenon anestezide kullanılan ve yakın geçmişte nöron koruyucu etkisinin olduğu bulunan bir gazdır (92). Etkisini uyarıcı bir aminoasit olan glutamatın NMDA reseptörlerine yarışmasız olarak bağlanarak gösterdiği düşünülmektedir. Yenidoğan sıçanlarda oluşturulan hipoksi-iskemi sonrasında ksenon uygulamasının yararlı etkileri olduğu bildirilmiştir (93). Ayrıca soğutma tedavisi ile birlikte ksenon verilmesinin daha faydalı sonuçlar sağladığı gösterilmiştir (94).

**Allopurinol:** HİBH’nin oluşumunda özellikle yeniden kanlanma evresinde serbest oksijen radikalleri önemli rol oynarlar. Ksantin oksidaz süperoksit üretiminde etkin olan bir enzimdir. Bir ksantin oksidaz baskılayıcısı olan allopurinolün HİBH’de kullanımıyla ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Yenidoğan sıçanlarda yapılan bir araştırmada hipoksi iskemi oluşturulmasından sonra 15. dakikada allopurinol verilmesinin beyin hasarını azalttığı bildirilmiştir (95). İnsanlarda da HİE’de allopurinol tedavisi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada allopurinolün hipoksik iskemik ensefalopatide önemli derecede yararlı etkisi olduğunu gösteren bir kanıt bulunamamıştır (96).

**Eritropoetin:** Eritropoetin glikoprotein yapısında bir hormondur ve en önemli görevi eritrosit yapımını kontrol altında tutmaktır. Gebeliğin erken döneminde fetus karaciğerinde, daha sonraki dönemlerde ise böbreğin tubulusları çevresinde yer alan kılcal damarların endotel hücreleri tarafından sentezlenir (97-98). HİE’li bebeklerin göbek kordonu kanında eritropoetin düzeyinin yüksek olduğu gözlemlenmiş ve bu sebeple onarım mekanizmaları ile ilişkisinin olabileceği düşünülmüştür (99).

Eritropoetin doğrudan nöron koruyucu etkisinin yanında, nöron çoğalmasını ve yeni damar yapımını uyarıcı, glutamat toksisitesini önleyici, apoptozisi, yangıyı ve serbest radikal hasarını baskılayıcı etkileri bildirilmiştir (87, 97, 35). Yenidoğan sıçan çalışmalarında eritropoetin HİBH sonrasında erken dönemde uygulanmasının yararlı etkileri olduğu gösterilmiştir (100, 101).

**Kalsiyum Kanal Kapatıcıları:** Voltaj kapılı  $Ca^{+2}$  kanallarını kapatıcı maddelerin kullanımı ile kalsiyumun hücre içine girişinin engellenebileceği ve dolayısıyla hem nekroz hem de apoptozu tetikleyen mekanizmaların baskılanabileceği ileri sürülmüştür (102). Yapılan bir çalışmada serum iyonize kalsiyum düzeyi düşük yenidoğanlarda, HİBH ve diğer organ hasarlarının daha az olduğu bildirilmiştir (103).

**Nitrik Oksit Sentaz Baskılayıcıları:** NOS' un arjininden sitrullin oluşumunu katalizlediği reaksiyon esnasında NO meydana geldiği bilinmektedir. NOS uyarılmasının apoptozu aktive ettiği gösterilmiştir (104). NO' nun deneysel çalışmalarda fokal serebral iskemiye yol açtığı ve bu hasarın NOS inhibitörleri verilerek önenebileceği bildirilmiştir (44).

**Sitokin Baskılayıcıları:** Hipoksik iskemik olaydan sonra başlayan yeniden kanlanma evresinde TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, PAF gibi yangısal sitokinler yoğun olarak salınırlar ve HİBH'yi ağırlaştırırlar (64). Bu sebeple yangıyı arttıran sitokinlerin baskılanmasının meydana gelecek hasarı azaltabileceği düşünülmektedir. Son yıllarda bu amaçla TNF- $\alpha$  baskılayıcısı olan etanersept ile ilgili araştırmalar yapılmış ve nöron koruyucu etkileri olduğu bildirilmiştir (42, 105). Yakın zamanda yapılmış bir çalışmada HİBH oluşturulmuş yedi günlük sıçanlara etanersept uygulaması ile apoptozisin azaldığı saptanmıştır (42). Yangısal süreçte önemli rol oynayan diğer bir sitokin olan trombosit uyarıcı faktörün baskılanması da hipoksi-iskemiye karşı nöronları korumaktadır. Trombosit uyarıcı faktör baskılayıcısı olan ABT-491'in HİBH'ye karşı koruyucu olduğu yenidoğan sıçanlarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (106, 52).

**Hiperbarik Oksijen Tedavisi:** İskemik kas hastalıklarının tedavisinde hiperbarik oksijenin aralıklı olarak uygulanmasının ödemi ve nekrozu azalttığı geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (107). Yenidoğan sıçanlarda yapılan bir araştırmada hipoksi-iskemi oluşturulduktan bir saat sonra hiperbarik oksijen tedavisi (HBO) uygulanmış ve HBO uygulaması ile beyin hasarının azaldığı, işlevsel testlerde iyileşme olduğu saptanmıştır (108). Ancak HBO'nun bu etkileri hangi mekanizmalarla yaptığı

açık değildir. Yakın zamanda yapılan bir araştırmada HBO tedavisinin hipoksik iskemik olaydan ne kadar zaman sonra etekli olduğu araştırılmıştır. Bu çalışmada HİBH meydana getirilmiş sıçanlara hipoksik iskemik olaydan üç, altı, 12 ve 24 saat sonra HBO tedavisi uygulanmıştır. Üç, altı, 12 saat sonra uygulanan HBO tedavisi ile beyin hasarında azalma ve davranış deneylerinde iyileşme olduğu gösterilmiştir. 24 saat sonra HBO uygulanmasının ise etkinliğinin çok az olduğu tespit edilmiştir. Sonuçta HBO tedavisinin ilk 12 saat içinde uygulanmasının beyin hasarını azalttığı ve davranış deneylerinde iyileşme sağladığı gösterilmiştir (109).

**Önkoşullama:** Hücre, doku ve organlar hasara sebep olabilecek bir olay veya etkenle karşılaştıklarında bu etkene karşı koruyucu mekanizmalar geliştirirler. Bunun sonucunda olay tekrarladığında daha az hasarla atlatılabilir. Ağır hipoksik iskemik olaydan saatler veya günler önce önkoşul olarak öldürücü derecede olmayan hipoksi-iskemi uygulanmasının hücre ölümünü azaltabileceği bildirilmiştir (110). Fakat perinatal dönemde yaşanan hipoksik iskemik durumun önceden tahmin edilememesi bu yöntemin klinikte kullanılmasını olanaksızlaştırmaktadır (87).

## 2.2. Ozon

Ozon kelimesi Yunanca “koklamak” anlamına gelen “ozein”den türemiştir. Bu gaz 1840 yılında Alman kimyacı Christian Friedrich Schönbein (1799-1868) tarafından keşfedilmiştir. Ozon, üç oksijen atomundan oluşan bir bileşendir. Normal atmosferik oksijenin enerji yüklü bir biçimidir. Oda sıcaklığında ozon renksiz ama karakteristik kokusu olan bir gazdır (111).

Ozon, stratosforde bulunan en önemli gazlardan biridir. Azami konsantrasyonu 20-30 kilometre yükseklikte yaklaşık  $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$  düzeyine ulaşmaktadır. Güneş ışınlarını filtreleyerek zararlı olanların yeryüzüne ulaşmasını engeller. Solunum sistemini tahriş eden bir gazdır ve solunan havada bulunması hava kirliliğinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. 200-300 nanometre (nm) dalga boyunda UV aralığındaki emilim kapasitesi sayesinde ozonosfer, güneşin yaydığı yüksek enerji yüklü ultraviyole ışınlarına karşı koruyucu bir filtre mekanizması sunmakta ve biyosferdeki biyolojik dengeyi korumaya yardımcı olmaktadır. Bazı zamanlarda hava türbülansları

sonucunda ozon, yeryüzüne daha yakın katmanlara küçük miktarlarda da olsa sızabilmektedir (112).

### **2.2.1. Ozonun kullanım alanları**

- Ozon; Aşırı derecede oksidan bir madde ve ileri derecede etkin bir dezenfektan olması nedeniyle bütün dünyada su tesislerinde içme suyunun temizlenmesinde,
- Oksidanların aktivasyonunda (uçaklarda ve klima sistemlerinde vb.),
- Leke temizlemede (tekstil malzemelerinde yağların ve istenmeyen maddelerin biyolojik olarak çözünmesi),
- Soğutma suyu, selüloz imalatında (istiridye, midye ve diğer deniz ürünlerinin kültürü),
- Demir ve manganezin elimine edilmesinde,
- Şişe dolumunda (örn. maden suları),
- Hidrokültürde,
- Sınai uygulamalarda, demirin yok edilmesinde,
- Kaolin imalatına,
- Organik sentezlerde oksidasyon için,
- Farmasötik üretim ve paketlenme, foto-kimya, protein sentezi, pirojensiz su eldesinde
- Doğal artıkların yok edilmesinde,
- Yüzme havuzları ve uzay araştırmalarında (mühendislik),
- Termal banyo havuzlarında, tat ve koku iyileştirmesi için,
- Virüs deaktivasyonunda,
- Su, temizleme suyu eldesinde ve mum işlemede kullanılır.

### **2.2.2. Medikal ozonun elde edilmesi**

Farklı teknik yapılarda ozon jeneratörleri piyasada bulunmaktadır. Örneğin, yüksek veya alçak frekanslı alternatif akımları temel alan, yüzey veya plazmik deşarjlı

jeneratörler vardır. Bu cihazlarda medikal ozon, seri bağlanmış iki yüksek voltaj tüpünden geçmektedir. Tüpler de yaklaşık 4000 ile 9000 V arasında değişen voltaja bağlıdır. Enerji, tekil O<sub>2</sub> moleküllerinin, oksijen atomlarına ayrışmasını sağlar. Atomlar, var olan bir O<sub>2</sub> molekülü ile birleşerek O<sub>3</sub> molekülünü oluşturur. Fazla veya kullanılmayan ozon, katalitik yolla yeniden oksijene dönüştürülür. Ozonun ayrışması yalnızca sıcaklığa değil, sistemin bütününe bağlıdır. Konteynerin hacmi küçüldükçe ve sıcaklık yükseldikçe, ozon/oksijen karışımının yarı ömrü azalır. Bunun yanında kullanılan konteynerin malzeme yapısı da yarı ömrü etkilemektedir.

Kullanıcı kural olarak ozon konsantrasyonunu iki parametre ile değiştirebilir: voltaj ve gaz akım miktarı. Uygulanan voltaj artırıldıkça ozon konsantrasyonu da artar. Gaz akışı arttıkça, yani oksijenin deşarj bölgesinden akışı hızlandıkça, ayrışmamış O<sub>2</sub> moleküllerinin sayısı, yani ozon konsantrasyonu daha az olacaktır. Oksijen akışı çoğaldıkça ve daha fazla voltaj uygulandıkça, ozon konsantrasyonu da yükselir. Ancak yaklaşık olarak 1-10 litre/dakikadan daha yüksek bir değerin uygulanması pratik olarak mümkün değildir. Ozon konsantrasyonu voltaja ek olarak sıcaklık, basınç, akış hacmi gibi çeşitli parametrelere bağlı olduğu için ozon jeneratörlerinde O<sub>3</sub> konsantrasyonu sürekli olarak ölçülmelidir. Standart ölçüm olarak UV fotometresi, konsantrasyonun belirlenmesinde tercih edilen yöntemdir (112).

### **2.2.3. Medikal ozonun uygulama biçimleri**

#### **a. Sistemik uygulamalar**

**Majör otohemoterapi:** Son yıllarda majör otohemoterapi, düşük riskli ozon uygulamalarının en önemli şekli haline gelmiştir. “Ozon+kan reaksiyonu”, hastanın vücudunun dışında gerçekleşmekte, bundan sonra hastanın kendi kanı aktif eritrositlerle reinfüzyona sokulmakta ve immüno-kompetan hücreler aktive olmaktadır.

Bu tedavide ilke olarak uygulama steril malzemeler kullanılarak kapalı, basıncı alınmış bir sistem içinde yapılmaktadır. Hastadan 50-100 ml kan alınır, organizma dışında ozon ile zenginleştirilir. Ozon/oksijen karışımı, kandan son derece ince kabarcıklar biçiminde geçirilir. Kan daha sonra hastaya rutin transfüzyon işlemlerinde olduğu gibi tekrar infüze edilir. Majör otohemoterapinin en önemli endikasyonları,

arteriyel dolaşım bozuklukları, enfeksiyonlar, bağışıklık sistemi yetersizlikleri, kanser hastalıklarının adjuvan tedavileri ve romatizma/eklem iltihaplarıdır (113).

**Rektal insüflasyon:** En eski sistemik ve lokal uygulama yollarından biri, ozon gazının rektal uygulanmasıdır. Sistemik etkileri açısından majör otohemoterapiye alternatif oluşturmuştur. Bu yöntemle, yaklaşık 10-12 insüflasyonluk bir uygulama dizisini takiben majör otohemoterapiye benzer sonuçlar elde edilebilir. Rektal insüflasyon, katetere bağlı ozona dirençli bir enjektör yardımı ile veya bir ozon konteyneri ve silikon doz çantası kullanarak gerçekleştirilebilir. Kural olarak 150-300 ml ozon/oksijen karışımı uygulanır. Bu tatbik yönteminin çocuklarda en uygunu ve pratiği olduğu gösterilmiştir. İnsüflasyon, hastaya yüzükoyun yatar pozisyonda uygulanmalıdır (113).

Genel olarak rektal insüflasyon, venöz yapılarının uygun olmadığı majör otohemoterapi endikasyonu olan hastalarda, bağırsaklarda proktit veya kolit gibi patolojik durumlarda veya immün sistemi zayıf pediatrik vakalarda rekürren enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilir (113).

#### **b. Topikal uygulamalar**

**Düşük basınçlı ozon gazı uygulaması:** Lokal olarak sınırlı yaralarda ozon/oksijen karışımı plastik kap biçiminde bir cihazdan sürekli olarak tedavi edilecek olan bölgeye akitılır. Bölge daha önce su ile ıslatılır. Basınç, yani kısmi vakum, hastanın kendisini en az rahatsız hissedeceği biçimde ayarlanır. Uygulamanın, özellikle dekübit yaralarında, radyasyon hasarında ve fistüllerde yararlı olabileceği gösterilmiştir. Diyabetik ayak yaralarında plastik bir bot kullanılır ve hastanın bacağı bot içine yerleştirildikten sonra botun üst kısmı gaz kaçırmayacak şekilde kapatılır (113).

**Ozona dirençli plastik kaplarda transkütan ozon irrigasyonu:** Venöz ülserler ve geniş alana yayılan aşırı enfekte olmuş yaraların tedavisinde ozona dirençli plastik çanta ve/veya torbaların kullanılması pratiktir. Yara, uygulama öncesinde salin ile yıkanır; ardından bir velcro bandı ile gaz kaçırmayı önlenir. İçerisindeki hava önce açma-kapama musluğu ile çıkartılır ve ardından belirlenmiş oksijen/ozon karışımı ile doldurulur. Ülser veya yara bölgesi ile gaz karışımının teması sağlanır. Medikal ozon ortalama 10-15 dakika kadar süreyle uygulanır. Artık ozon, katalizör kullanılarak

oksijene dönüştürülür ve solunum yolu ile ortaya çıkabilecek bir sorun engellenmiş olunur (113).

**Ozonize su uygulanması:** Ozonize su, yeni veya yakın zamanda yapılmış cerrahi müdahaleler de dahil olmak üzere, enfekte olmuş her tür yaraya karşı topikal uygulama için endikedir. Ozonize su, kompresler biçiminde uygulanabilir. Aynı zamanda tamamlayıcı bir tedavidir. Çünkü ıslak bir ortam söz konusu olduğundan, polar  $O_3$  molekülü, aynı yapıdaki  $H_2O$  molekülleri tarafından çevrilir; böylelikle enflamasyon, yanık ve diğer deri lezyonları gibi lokal uygulamalarda optimal bir konum sağlar. Ayrıca ozonize kompresler, ödem oluşumu gibi enflamatuvar süreçlerin başlangıç aşamaları sırasında hızlı ve önemli ölçüde ağrı kontrolü sağlar. Lokal ozon uygulanması, hücrel metabolizmayı aktive eder, ATP artışı sağlar ve lezyonun yakınındaki üreme yatkınlığını koruyan hücrelerin polarize olmalarına katkıda bulunur. (113).

Kural olarak ozonize su, çift damıtılmış sudan taze olarak hazırlanır. Bu su maksimum 20  $\mu\text{g/ml}$  ozon absorbe eder ve oda sıcaklığında yarı ömrü ortalama 10 saattir. Pratik olarak herhangi bir gaz açığa çıkarmadığı için havaya ozon karışmaz. Kullanılan ozon miktarı suda erime özelliği ile orantılı olduğundan doz aşımı gözlenmez. Ozonize su, enfekte yaraların tedavisinde, mantar enfeksiyonları, liken veya küflerde, zona, herpes tedavisinde ve diş hekimliğinde hem dezenfektan olarak, hem de diş çekimi sonrasındaki yaraların tedavisinde, bukkal kavitedeki iltihaplar, candida veya prodontitis vakalarında kullanılabilir (113).

**Topikal uygulama olarak rektal insüflasyon:** Sistemik etkisine ek olarak rektal insüflasyonunun lokal etkisi de kolit ve proktit tedavisinde önemli yer tutar. Fistül tedavisinde fistül içine ozon/oksijen infiltrasyonu için kateter ve emilim kabı birlikte kullanılır (113).

**İntraartiküler enjeksiyon:** İntraartiküler ozon enjeksiyonunun başta omuz ve diz eklemleri olmak üzere akut ve kronik ağrılı eklem rahatsızlıklarında yararlı ve etkili olduğu kanıtlanmıştır. En önemli kullanım alanları gonartroz, akut/kronik ağrılı eklem rahatsızlıkları ve hareket kısıtlılığı oluşturan eklem rahatsızlıklarıdır. İntraartiküler ozon uygulaması, eklem ağrılarının tedavisinde yardımcı bir yöntemdir (113).

#### 2.2.4. Medikal ozonun etki mekanizmaları

1-100 µg/ml konsantrasyon aralığındaki saf oksijen ve saf ozon karışımı olan medikal ozon, fizyolojik koşullarda yüksek derecede seçici reaktivite gösteren bir terapi ajanıdır.

Lokal uygulamada medikal ozonun etkileri:

1. Antimikrobiyal etki,
2. Yaraları etkin ve hızlı temizleme etkisi,
3. Yara iyileştirmede gelişme ve hızlanma sağlaması,
4. Etkin bir bağışıklık sistemi harekete geçiricisidir.

Sistemik uygulamada medikal ozonun etkileri:

a. Alyuvar hücreleri

1. Reolojik özelliklerin gelişmesi,
2. RBC metabolizmasının aktivasyonu, 2,3-DPG ve ATP artışı,
3. HbO<sub>2</sub>/Hb dengesinin sağa kayması,
4. O<sub>2</sub> salınımında artma,

b. İmmüno-kompleman hücreler

1. Mononükleer hücrelerin ılımlı aktivasyonu,
2. Sitokinlerin serbest kalması (IL-1, IL-2, IFN-γ, TNF-α, TGF-β vb) (114).

Ozon, oksijen ile kıyaslandığında 1.6 kat daha ağırdır ve suda 10 kat daha fazla çözünür. Her ne kadar ozon radikal bir molekül değilse de, florin ve persülfattan sonra üçüncü en potent oksidandır (E<sub>o</sub>= +2.076 V). Ozon, saklanamayan ve kararlı olmayan bir gazdır ve 20°C'de yarı ömrü 40 dakika olduğundan üretilir üretilmez kullanılmalıdır. Ozonun tıpta kullanılması isteniyorsa mutlaka toksisitesinden korunmak gerekir ve bu da yalnızca iyi standardize olmuş bir fotometresi olan ozon jeneratörü ve daha önceden belirlenmiş gaz hacmini kullanarak sağlanabilir. Bunun yanında toksisite oluşturmadan terapötik etkinlik sağlayacak optimal dozu bilmeliyiz. Değişen derecelerde göz ve akciğerler, ozona son derece hasastır çünkü bu organların minimal nötrale edici kapasiteleri vardır ve bu yüzden ozon, bu organlarla temas etmemelidir.

Herhangi bir gaz gibi, sıcaklığa bağlı olarak ozon saf su içinde Henry kanununa göre fiziksel olarak çözünür. Sadece bu durumda ozon reaksiyona girmez ve sıkıca



kapatılmış bir cam şişede ozonlu su birkaç gün boyunca aktif olarak kalır. Diğer yandan, biyolojik sıvılarda (fizyolojik salin, plazma, lenf sıvısı, idrar vb.) çözünür çözünmez reaksiyona girer.

Tercih sırasına göre ozon çoklu doymamış yağ asitleri, askorbik asit ve ürik asitler, sistein gibi –SH grubu olan tiol bileşikler ile indirgenmiş glutatyon (GSH) ve albümin ile reaksiyona girer. Ozonun dozuna bağlı olarak karbonhidratlar, enzimler, DNA ve RNA da etkilenebilir. Bütün bu bileşikler, elektron vericisi olarak davranırlar ve oksidasyona uğrarlar (114).

Temel reaktif oksijen türü molekülü, birçok biyolojik ve terapötik etkiden sorumlu olan, ozon mesajcısı gibi davranan hidrojen peroksittir (115, 116). Reaktif oksijen türlerinin her zaman zararlı oldukları görüşü artık kabul görmemektedir çünkü fizyolojik miktarlarda, sinyal iletiminin düzenleyicisi olarak görev yaparlar ve savunma ve immün yanıtın önemli medyatörleridir. Her ne kadar reaktif oksijen türlerinin yarı ömürleri bir saniyeden daha az olsa da, önemli hücrel bileşikleri hasara uğratabilirler ve bu yüzden hasar oluşturmaksızın biyolojik etki sağlayabilmeleri için dikkatlice kalibre edilmelidirler. Bu, kanın ölçülebilir antioksidan kapasitesine karşılık ozon dozunu ayarlayarak sağlanabilir ve eğer gerekir ise ozon tedavisi öncesi veya süresince oral antioksidan verilmesi ile güçlendirilebilir (21).

Plazmadaki mevcut çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu, lipid oksidasyon ürünlerinin üretimi takip eder: bunlar heterojendirler ve lipoperoksitler (LOO), alkoksil radikalleri (LO), lipohidroperoksitler (LOOH), izoprostanlar ve MDA'nın bulunduğu alkenaller olarak sınıflandırılabilirler. Radikaller ve aldehydler intrinsik olarak toksiktirler ve çok düşük konsantrasyonlarda ortaya çıkartılmalıdır. Reaktif oksijen türlerine göre in vitro koşullarda daha kararlıdır fakat kanın reinfüzyonu, safra ve idrardan atılmaları ve GSH-transferaz ve aldehyd transferazlarla metabolize olmaları ile vücut sıvılarında belirgin bir dilüsyona uğrarlar. Bu yüzden, yalnızca mikromolar düzeyin altında konsantrasyonları kemik iliği, karaciğer, santral sinir sistemi, endokrin bezler gibi organlara ulaşabilir ve buralarda devam eden akut oksidatif strese sinyal ileti molekülü olarak görev yaparlar. Eğer hastalık durumu çok ileri boyutta değil ise, bu moleküller süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin upregülasyonunu sağlayabilirler (117).

Mikromolar düzeylerin altındaki lipid oksidasyon ürünleri seviyelerinin uyarıcı ve yararlı, yüksek seviyelerin ise toksik olabileceği bildirilmiştir (117). Birçok deneysel veriye dayandırılan bu sonuç, terapötik sonuca ulaşabilmek için ideal ozon konsantrasyonlarına ulaşmak gerektiği sonucunu kuvvetlendirmektedir: çok düşük konsantrasyonlar etkisizken, çok yüksek dozlar negatif etki (halsizlik, yorgunluk vb.) açığa çıkartabilirler. Bu yüzden toksisite ortaya çıkartmadan oksidatif etkiyi tetikleyerek biyolojik etki gösterebilmeleri için eşik seviyenin hemen üzerinde bir değere ulaşmalıdırlar.

Ozonasyon olayı reaktif oksijen türleri ve lipid oksidasyon ürünleri oluşumu ile karakterizedir. Reaktif oksijen türleri anında etki gösterip kaybolduğundan, dolaşım yolu ile lipid oksidasyon ürünleri dokulara dağılır.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kolaylıkla plazmadan hücre içine difüze olur ve sitoplazma içinde aniden ortaya çıkması tetikleyici uyarıcıyı temsil eder; hücre tipine bağlı olarak eritrositler, lökositler ve trombositler içinde çeşitli biyokimyasal yollar aktive olur ve çok sayıda biyolojik etkinin ortaya çıkmasını sağlar. Eritrositlerde cevap olarak ATP ve 2-3 DPG üretiminde artış meydana gelir. Oksijen-hemoglobin disosiasyon eğrisindeki sağa kaymadan dolayı iskemik dokulara oksijen taşınması kolaylaşır (118).

Ozon nötrofilleri aktive ederek ve bazı sitokinlerin sentezini uyararak immün sistemin çalışmasını artırarak etki gösterir (119).

### **2.3. Sıçanların Bilişsel ve Lokomotor Yetilerinin Değerlendirilmesi**

Sıçanların bilişsel ve lokomotor yetilerinin değerlendirilmesinde bugüne dek tanımlanmış çok sayıda hayvan davranış deneyi (HDD) modeli mevcuttur. HDD' ler ile sıçanlarda anksiyete, otonom fonksiyonlar, öğrenme, hafıza ve lokomotor aktivite gibi birçok yetinin değerlendirilmesi yapılmaktadır. Bilimsel yeterlilik ölçütlerinin tümüne aynı anda sahip olan bir HDD modeli yoktur ve bu modellerin çoğu %100 kesinlikte sonuç sağlayamamaktadır. Bilim ve teknolojideki ilerlemelerle hayvan davranış deneyi modelleri giderek istenen ideal düzeye ulaşabilecektir (52).

Davranış deneylerinin sıçanların nöromotor gelişiminin tamamlandığı 80-85. günlerden sonra yapılması önerilmektedir (24). Sıçanların doğumu takiben kaç haftalık

olduğu belirtilen ya da belirtilmeyen pek çok çalışmada, deneylerin ortalama 180-400 gr ağırlığındaki erişkin erkek sıçanlarla yapıldığı bildirilmiştir (25, 26, 28).

Bu deneylerde sıçanların cinsiyetlerine göre farklı davranışlar sergilediği tespit edilmiştir (120). Özellikle uzaysal öğrenmenin değerlendirilmesinde erkek cinsiyeti daha uygun olduğu saptanmıştır (121-123). Bu durumun hormonal farklılık ve hipokampus gelişimdeki farktan kaynaklandığı ileri sürülmüştür (121). Bu nedenle yapılan pek çok çalışmada erkek sıçan kullanılmıştır (25, 26, 124) .

Tüm HDD'lerin  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklığında, 12 saatlik gece-gündüz döngüsünün sağlandığı bir odada ses, ışık, sıcaklık ve bekleme koşullarının standardize edildiği ortamlarda yapılması önerilmektedir. Bu standardizasyonun sağlanabilmesi için tüm hayvan gruplarının deney alanına deney gününden birkaç gün önce getirilmesi ve ortama alıştırılması gerekliliği bildirilmiştir (52).

Çalışmaya alınacak sıçanların daha önceden yavrulayan ve önceki yavrulara bakmış olan bir anneden alınmaları önemlidir. Aksi durumda çalışmaya alınan sıçanların anne tarafından bakılmama ve ölme riski olabilir. Tüm sıçanlar aynı sürede annelerinden ayrılmalı, benzer şekilde beslenmeli ve benzer sayıda sıçan aynı kafese konmalıdır. Böylece nöromotor gelişimlerini etkileyebilecek diğer faktörler mümkün olduğunca azaltılmalıdır (52).

Davranış deneyi modelini uygulayan araştırmacının da her grup için aynı kişi olması, aynı renk giysi giymesi, aynı parfümü kullanması, her zaman aynı yerde durması gibi faktörlere de dikkat edilmelidir (52).

Sıçanlarda bilişsel ve motor yetilerin değerlendirilmesi amacıyla pek çok farklı düzenek kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları rotarot düzeneği, sekiz kollu ışınsal labirent, T labirent, yükseltilmiş artı labirent, açık alan ve Morris su tankıdır.

Sıçanların duygusal durumunu, sedasyonunu, lokomotor aktivitesini ölçmede açık alanın kullanılması ve çalışmanın doğumu takiben 10. haftada yapılması önerilmektedir (125, 126). Morris su tankı Prof. Richard Morris tarafından tanımlandığından bu yana kemirgenlerin öğrenme ve hafıza çalışmalarında sıkça kullanılmaktadır.

### 2.3.1. Açık Alan Deneyi

Sıçanların duygusal durumunu, anksiyete davranışlarını, otonom işlevlerini, lokomotor aktivitelerini değerlendirmek için kullanılmaktadır (127). İlk defa 1934 yılında Hall ve arkadaşları tarafından daire tabanlı olarak tanımlanmıştır ancak günümüzde kare, dikdörtgen şekillerde kullanılmaktadır. Düzeneğin zemini çeşitli sayıda, eşit ölçülerde, kare şeklinde alana bölünmüştür. Çalışmaya alınan sıçan bu düzeneğe 2- 20 dakika süreyle bırakılır. Hayvanın tek olarak bilmediği ortama bırakılması geniş alan korkusunu tetikler ve anksiyete davranışı görülebilir. Dolaşılan kare sayısı çevreyi araştırıcılığın ölçüsü olarak kabul edilir. Donakalma sıçanın hiçbir hareket yapmadığı ve çevresi ile ilişkisini kestiği durumdur. Şahlanma sıçanların ön pençelerini kaldırıp arka bacakları üzerinde durdukları pozisyonudur. Çevreyi araştırıcılığın belirtisi olarak değerlendirilir (127, 128). Anksiyete için; şahlanma sayısı, kenarda kare geçme sayısı, kaçınma sayısı ve süresi, merkezde kare geçme sayısı incelenir. Otonom fonksiyonlar için kaçınma, gaita çıkarma sayılarına bakılır. Locomotor aktivite için kare geçme sayısı, donakalma süresi, katettiği yol ve hız değerlendirilir. Veri kayıtları bilgisayar programı vasıtasıyla yapılabileceği gibi gözle takip edilerek ve süre ölçer kullanılarak manuel olarak da yapılabilir (52).

### 2.3.2. Morris Su Tankı

Su tankı 1981 yılında Morris tarafından (27) tanımlandığından bu yana kemirgenlerin öğrenme ve hafıza çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (129). Genellikle silindir şeklinde bir tank kullanılır ve içi 21- 26°C sıcaklıkta su ile doldurulur, oda sıcaklığı  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de sabit tutulur (52). Su tankının içine su yüzeyinin 1- 2,5 cm kadar altına hayvan tarafından görülemeyecek şekilde kare veya daire şeklinde bir yükselti yerleştirilir. Hafızanın değerlendirilmesinde su tankı sanal olarak dört kadrana ayrılır. Bir kadrana gizli yükselti sabit olarak yerleştirilir. Her gün sıçanlar sırasıyla farklı bir kadrandan yüzleri su tankının duvarına dönük şekilde bırakılırlar ve gizlenmiş sabit yükseltiyi bulmaları beklenir. Sıçanlar suya her bırakıldıklarında yükseltiyi bulmaları için beklenen süre eşit olmalıdır ve bu süre 30- 180 saniye arasında belirlenebilir. Eğer gizli yükselti bulunamaz ise deneyi uygulayan kişi tarafından sıçan

yönlendirilerek gizli yükseltiyi bulması sağlanır. Yükselti üzerinde bekleme süresi her sıçan için eşit olmak üzere üç saniye ile 30 saniye arasında belirlenebilir. Gün geçtikçe sıçanların gizli yükseltinin yerini öğrenerek daha kısa sürede bulmaları beklenir. Hafıza deneyleri beş ile 13 gün arasında sürdürülebilmektedir. Deneyin son gününde yükselti yerinden çıkarılır ve eskiden yükseltinin bulunduğu yerde sıçanların ne kadar süre geçirdikleri değerlendirilir (52, 128).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

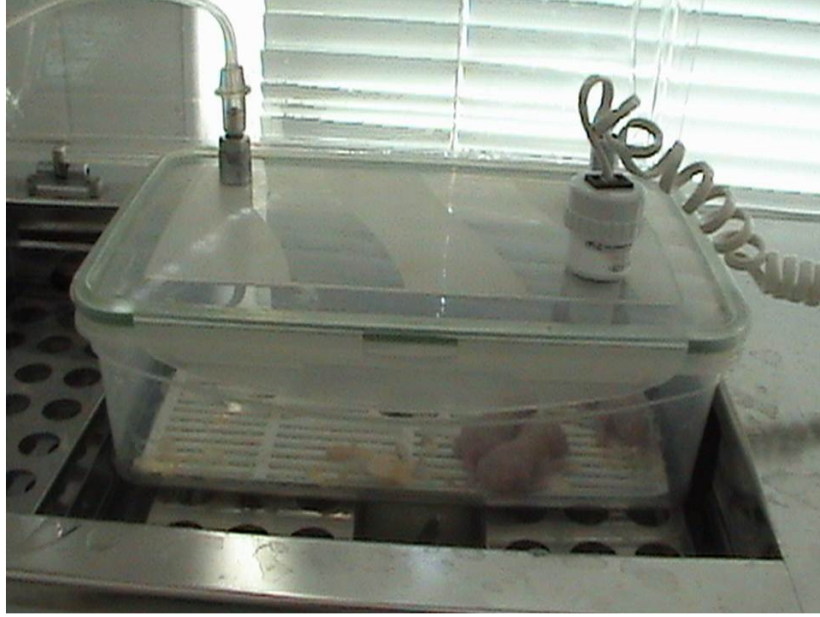
Bu çalışma Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Patoloji ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalları tarafından yürütülmüştür. Çalışma Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı ve Fizyoloji Anabilim Dalı Davranış Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışma için Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulundan onay alınmıştır.

#### 3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

##### 3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- Diseksiyon için mikroskop (Leica S6D)
- Deri ve deri altı dokuların açılması ve dekapitasyon için pens, bistüri
- Sağ karotid arterin bağlanması ve derinin kapatılması için 6-0 ipek ve portegü
- Hipoksi Odacığı (25x25x10), (Şekil 3.1)
- %8 oksijen %92 azot karışımının bulunduğu gaz tankı
- Oksimetre (Hudson RCI)
- Hava iletimi için bağlantı hortumları
- Sıçan yavrularının ısıtılması için ısıtıcı su banyosu (Elektro-mag M96-KP)
- Hipoksi odacığı sıcaklığının sürekli izlemi için elektronik termometre
- Ağırlık ölçümleri için hassas terazi (Dikomsan KD-KC-300)
- Lokomotor aktivite ölçümü için kare şeklinde ve zemini 100x100 cm, kenar yüksekliği 40 cm, iç yüzeyi siyah olan pleksi-glas bir açık alan deney kutusu
- Öğrenme ve hafızanın değerlendirilmesi için daire şeklinde çapı 150 cm, derinliği 60 cm olan ve içinde 15 cm çaplı bir yükselti bulunan paslanmaz çelikten Morris Su Tankı

- Ozon uygulaması için ozona dirençli 10 ml'lik enjektör
- Ozon jeneratörü (Evozone Basic Plus Ozone Unite)



Şekil 3.1. Hipoksi odacığı.

### 3.2. Deney Hayvanları

Çalışmaya 102 adet yedi günlük Wistar cinsi erkek sıçan yavruları alındı (Şekil 3.2). Sıçanlar rastlantısal olarak beş gruba ayrıldı. Sham grubu dışındaki tüm sıçanlarda HİBH oluşturuldu.

**Grup I** (Sham) (n=26): Anestezi sonrasında boyun diseksiyonu yapılarak sağ karotid arteri bulunan ancak bağlanmayan, hipoksi uygulanmayan grup.

**Grup II** (HİBH) (n=22): Hipoksi yapıldıktan sonra SF'in intraperitoneal olarak verildiği grup.

**Grup III** (HİBH+Ozon Ön Koşullama) (n=21): Hipoksi yapılmadan bir gün önce ozonun uygulandığı grup (6. gün).

**Grup IV** (HİBH+Ozon Aynı Gün) (n=21): Hipoksinin yapıldığı 7. gün işlemden hemen sonra ozon verilen grup.

**Grup V** (HİBH+Ozon 96., 97., 98. Günlerde) (n=12): Hipoksi yapıldıktan sonra, Morris su tankı deneyinden hemen önce 96., 97., 98. gün ozon uygulanan grup.

Bu gruplara ozon 1,2 mg/kg dozda intraperitoneal olarak verildi.

Hayvanlar davranış deneyleri yapılana kadar Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarında barındırıldılar. 24. günden itibaren anne yanından ayrılarak her kafeste 4 adet sıçan olacak şekilde ayrı kafeslere alındı. Davranış deneylerinden iki gün önce hayvanlar ortama uyum sağlamaları için Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Davranış Deneyleri Laboratuvarına alındılar.



**Şekil 3.2.** 7 günlük sıçanlar.

### **3.3. Hipoksik İskemik Beyin Hasarının Oluşturulması**

Çalışmaya alınan yedi günlük sıçan yavrularına isofluran inhalasyon anestezisi yapıldı. Sıçanlar sırtları masaya sabitlenecek şekilde kol ve bacaklarından flaster



aracılığı ile masaya yapıştırıldı (Şekil 3.3). Boyunda orta hattan kesi yapılarak mikroskopta sağ karotid arter bulundu. Sham Grubu dışında diğer tüm sıçanların sağ karotid arterleri bağlandı (Şekil 3.4). Bu işlemden sonra Sham Grubu haricindeki tüm sıçanlar hipoksi odacığına alındı. Hipoksi odacığının sıcaklığı ve oksijen oranı sürekli olarak takip edildi. Odacık sıcaklığının  $33,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  ve oksijen düzeyinin ise % 8 olması sağlandı. İki saatlik hipoksi sonrasında sıçanlar odacıktan çıkarıldı ve anne yanına verildi. Oluşturulan HİBH'nin gösterilmesi ve nöronal apoptozisin değerlendirilmesi için iki saatlik derlenme sürecinden sonra ilk dört gruptan sekiz sıçan servikal dislokasyonla dekapite edildi. Beyin, bütünlükleri bozulmadan %10'luk formaldehit içeren kaplara konuldu. Çıkarılan beyinlerde TUNEL ve Kaspaz-3 yöntemleri ile immünohistokimyasal olarak apoptoz değerlendirildi (35).



**Şekil 3.3.** Deney masasına sabitlenen yedi günlük sıçan yavrusu.



**Şekil 3.4.** Karotid arterin bağlanması.

### **3.4. Histopatolojik Değerlendirme**

Çıkarılan beyinler sıçanların hangi gruptan olduğunu ve sıçanın hangi karotid arterinin bağlandığını bilmeyen bir patolog tarafından değerlendirildi. Subtalamik çekirdekler, hipokampus ve parietal korteksi temsil eden bir veya iki örnek takip işlemine sokuldu. Hipoksik iskemik hasara daha duyarlı olduğu için bu bölgedeki nöronlar seçildi. Rutin takip işleminde beyin dokuları alkol, ksilol ve parafin solüsyonlarında bekletildiler. Hazırlanan parafin bloklardan elde edilen beş mikron kalınlığındaki kesitler rutin hematoksilin eozin histokimyasal boyası ile boyandı. Preparatlar ışık mikroskopik düzeyde (Nikon Eclipse 80i) incelendi. Koronal kesitlerde rutin boya ile nöronal morfolojik değişiklikler not edildi (130, 131).

#### **3.4.1. TUNEL Yöntemi**

Nöronlardaki DNA fragmantasyonunu göstermek amacıyla Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated-dUTP nick end labeling (TUNEL) metodu (“in

situ apoptosis detection kit” ,Biogen, katolog no S7101) uygulandı. Elde edilen 5 mikron kalınlığındaki koronal beyin kesitleri, deparafinizasyon ve alkol takip işlemlerinin sonrasında proteinaz K ile 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Fosfat tampon solüsyonunda yıkandıktan sonra kesitler, buharlı kabin içerisine konuldu ve üzerlerine terminal deoksi transferaz reaksiyon karışımı damlatılarak 37<sup>0</sup>C de etüv içinde bir saat inkübe edildi. Kromojen olarak 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride, zemin boyaması için metil yeşili uygulandı. Kesitler kapama maddesi ile kapatıldı. Pozitif kontrol olarak germinal merkezleri belirgin tonsil kesitleri kullanıldı (130, 131).

### **3.4.2. Kaspaz-3 Yöntemi**

5 mikron kalınlığındaki koronal beyin kesitlerine, deparafinizasyon ve alkol takip işlemlerinin sonrasında, Avidin Biotin kompleks immun peroksidaz yöntemi ile poliklonal tavşan antikoru, Kaspaz antikoru (1:100 dilusyon, Neomarkers, RB-1197-B0) uygulandı. İmmunhistokimyasal boyama yönteminde Lab-Vision, Ultravision Large Volume Detection System Anti-Polyvalent, HRP biokimyasal kit, zemin boyaması için Mayer hematoksilen uygulandı. Preparatlar Nikon E 600 ışık mikroskopunda değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak germinal merkezleri belirgin tonsil kesitleri kullanıldı (130, 131).

### **3.4.3. Apoptozisin Değerlendirilmesi**

Koronal beyin kesitleri TUNEL ve Kaspaz yöntemi işlemlerinden sonra ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Her iki beyin yarısı ayrı ayrı ele alındı. Her iki taraftaki subtalamik çekirdekler, hipokampus ve parietal kortekste TUNEL ve Kaspaz ile immünreaktivite gösterip boyanan hücreler sayıldı. Sayım için kesitler ışık mikroskopik düzeyde öncelikle küçük büyütmede ve x 40 büyütme alanında taranarak sağ ve sol yarı için sayım yapılacak alanlar belirlendi. Sayıma uygun beş alan X 400 büyütmede (her büyük büyütme =152  $\mu\text{m}^2$ , toplam alan 760  $\mu\text{m}^2$ ) tarandı. TUNEL ve Kaspaz ile boyanan toplam apoptotik nöronlar sayıldı.

### **3.4.4. Atrofinin Değerlendirilmesi**

Davranış deneylerinin bitirilmesinin ardından 16. haftada sıçanlar dekapite edildi. Makroskopik olarak HİBH bulguları ve beyinlerinin ağırlıkları değerlendirildi.

## **3.5. Biyokimyasal Değerlendirme**

### **3.5.1. Plazma Malondialdehid Düzeyi Tespiti**

Doğumdan sonra yedinci günde dekapite edilen sıçanlardan kalp içi girişim ile alınan kan örneklerinde, lipid peroksidasyonunda ikincil ürün olarak meydana gelen MDA düzeyleri ölçüldü.

Aerobik koşullarda örneklerin pH: 3.4' de ve 95°C ısıda tiyobarbitürik asit (TBA) ile inkübasyonu yoluyla MDA varlığı saptandı. Oluşan MDA ve TBA pembe renkli bir kompleks meydana getirmekte ve renk şiddetinin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü ile lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyleri ölçülmektedir. Tüplere alınan kan örnekleri 3000 rpm' de 10 dk santrifüj edilerek elde edilen plazma çalışılacağı güne kadar -20°C' de muhafaza edildi. İşlem uygulanacağı gün hazırlanan solüsyonlar 95°C' de 30 dk inkübe edildi. Sonrasında musluk suyunda soğutuldu. 1 ml distile su ve 5 ml n-bütanol: piridin solüsyonu ilave edildi. Vortekste karıştırıldı. 4000 rpm' de 15 dk santrifüje edildi. Üstteki kısmı alınarak spektrofotometrede 532 nm.'de absorpsiyonu okundu. Sonuçların değerlendirilmesinde 1.1.33 tetraetoxipropane ile hazırlanan standart eğri kullanıldı (132).

### **3.5.2. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi Tayini**

Ksantin- ksantin oksidaz sistemi ile süperoksit radikali üretilir. Ortamda yüksek süperoksit radikali NBT'yi (Nitroblue Tetrazoluim) redükler ve mavi renk oluşur. Ortamdaki SOD miktarına göre süperoksit radikalinin ortamdan kalkması ve NBT redüksiyonunun inhibe olması mavi rengin şiddetinde azalmaya neden olur. Yöntem bu prensibe dayanmaktadır (133).

### 3.6. Ozon Uygulaması

Ozon jeneratörü olarak Evozone Basic Plus Ozone Unite cihazı kullanıldı (Şekil 3.5). Cihazın akış hızı 10 ml/sn ve konsantrasyon aralığı ise 0-80  $\mu\text{g/ml}$ 'dir. Çalışmada 25  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonda ozon kullanıldı. Sıçanlara ozon 1,2 mg/kg olarak intraperitoneal şekilde verildi (Örn: 10 gramlık bir sıçana 25  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonda 0,48 ml hacim verildi). Ozon uygulaması ozona dayanıklı özel kaplamalı enjektörler ile yapıldı. Ozon cihazdan çekildikten ve hacmi ayarlandıktan sonra enjektör cihazdan alındı. Ozonun havadan ağır olması nedeniyle enjektör ucu yukarı gelecek şekilde taşındı ve ozon hızlıca intraperitoneal olarak sıçanlara uygulandı.



Şekil 3.5. Ozon jeneratörü.

### 3.7. Davranış Deneyleri

Davranış deneyleri eni 2,9, boyu 3,9 ve yüksekliği 3,1 metre olan bir odada yapıldı. Bu odanın camlarına hem ışık hem de ses yalıtımı amacıyla köpükle izolasyon uygulandı. Oda sıcaklığını sabitlemek için dijital olarak ısıyı ayarlanabilen klima yerleştirildi. Oda sıcaklığı 23°C'de sabit tutuldu. Ayrıca deney sırasında ışık şiddeti ayarlanabilen dört adet halojen lamba ile 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ritmi

otomatik bir ayarlayıcı ile sağlandı. Tüm deneyler Noldus Ethovision XT yazılımı vasıtasıyla kaydedildi.

Her deneyden iki gün önce deneyin yapılacağı gruptaki sıçanlar davranış laboratuvarına getirilerek, tüm sıçanların aynı streslere maruz kalmaları ve ortama alışmaları için eşit süre geçirmeleri sağlandı. Tüm deneyler süresince sıçanlar aynı araştırmacı tarafından düzeneklere kuyruklarından tutularak bırakıldı. Bir deneyin bütün gruplara uygulanışı süresince araştırmacı aynı renk kıyafet giydi ve odada aynı yerde durdu. Davranış deneylerine sabah saat 09:00' da başlandı ve en geç saat 14:00'de bitirildi. Dört adet şeffaf, plastikten yapılmış, talaşsız ve kuru kap bekleme kafesi olarak kullanıldı. Her sıçan düzeneklere bırakılmadan önce 10 dakika süreyle bu kaplarda bekletildi. Deney süresince her kafes değişiminde bu kaplar yıkandı. Açık alan deneylerinde her sıçanın bırakılmasından önce alan temizlendi. Su tankının dibinde biriken kirler, hergün deney bitiminde vakumlu bir sistemle temizlendi. Hayvan kafesleri üç gün aralarla düzenli olarak temizlendi.

### **3.7.1. Açık Alan Deneyi**

Açık Alan deneyinde lokomotor aktivitenin değerlendirilmesi amaçlandı (Şekil 3.6). Tüm sıçanlara 10. haftayı tamamlamalarından sonra bir gün, bir defa ve 5 dk süreyle, saat 09:00 ile 13:00 arasında uygulandı. Ekrandaki görüntüye göre sağ alt köşe başlangıç alanı olarak belirlendi ve kuyruklarından tutulan sıçanlar yüzleri alanın duvarına bakacak şekilde bırakıldı. 100x100 cm ölçülerindeki zeminde beş dakika boyunca katettikleri mesafe cm ve hareket hızları cm/sn türünden kaydedildi. Deney bitiminde sıçanların ağırlıkları ölçüldü.



**Şekil 3.6.** Açık alan düzeneği.

### **3.7.2. Öğrenme ve Hafıza Deneyleri**

Spasyal bellek performansının ölçümü sıçanların doğumundan sonra 14. haftada yapıldı. 150 cm çaplı, 60 cm derinliğinde, sıcaklık kontrollü, paslanmaz çelik bir su tankı kullanıldı (Şekil 3.7). Tankın çevresine görülebilir ve yerleri sabit görsel ipuçları yerleştirildi (Şekil 3.8). Deneyler hergün saat 09:00-13:00 arasında uygulandı. Bilgisayar ekranındaki görüntü üzerinden su tankı batı, kuzey, doğu ve güney olmak üzere dört eşit kadrana bölündü. Tank 42 cm derinlik olacak şekilde ve  $22 \pm 1$  C° sıcaklığında suyla dolduruldu. Deneyin ilk dört gününde 15 cm çaplı platform su altında gizlenecek biçimde 40 cm yüksekliğe ayarlanıp, yeri sabit olarak doğu kadrannın orta noktasına yerleştirildi. Deneyin ilk günü tüm sıçanlar batı kadrannın başlanıp saat yönünde ilerleyerek her kadrandan bir kez olmak koşuluyla toplam dört kez, başları su tankı duvarına dönük olacak şekilde suya bırakıldı (Şekil 3.9). Deneyin 2,3 ve 4. günlerinde saat yönünde ilerleyerek ilk atışların hergün farklı bir kadrandan yapılması sağlandı (3.10). Sıçanlar her atışta 60 sn süre ile yüzdürüldü, bu süre içinde platform üzerine çıkıp 5 sn orada kalan sıçanlar deneyin bu aşamasını tamamlamış olarak kabul edildi ve 15 sn süreyle platform üzerinde kalmalarına izin verildi (Şekil 3.11). 60 sn içinde platformu bulamayan sıçanlar elle yönlendirilerek yükseltiyi bulmaları ve 15 sn

süreyle platform üzerinde kalmaları sağlandı. Dört gün boyunca her atışta platformu bulma süreleri kaydedildi. Deneyin 5. günü platform çıkarılarak batı kadranından tek atış yapıp 60 sn süresince kayıt alındı. Bu süre sonunda eskiden yükseltinin olduğu doğu kadranında ortalama geçirdikleri süre sn, yüzme hızları cm/sn ve katetikleri mesafeler cm türünden kaydedildi.

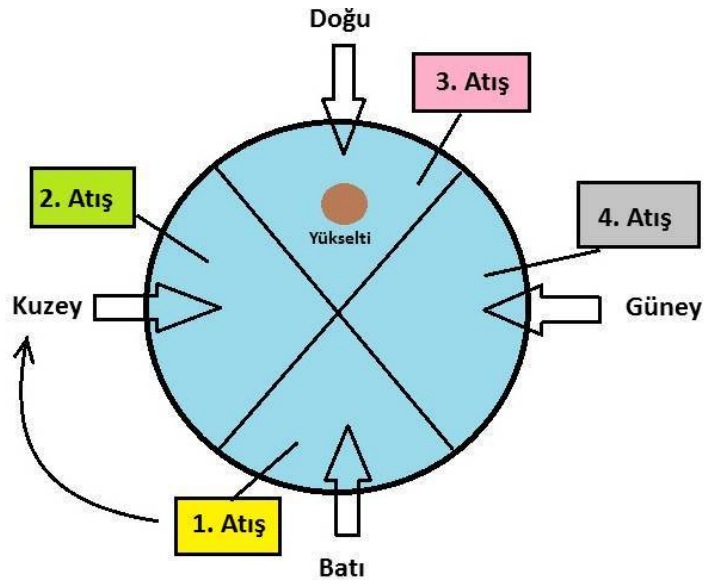


**Şekil 3.7.** Su tankının üstten ve yandan görünümü.

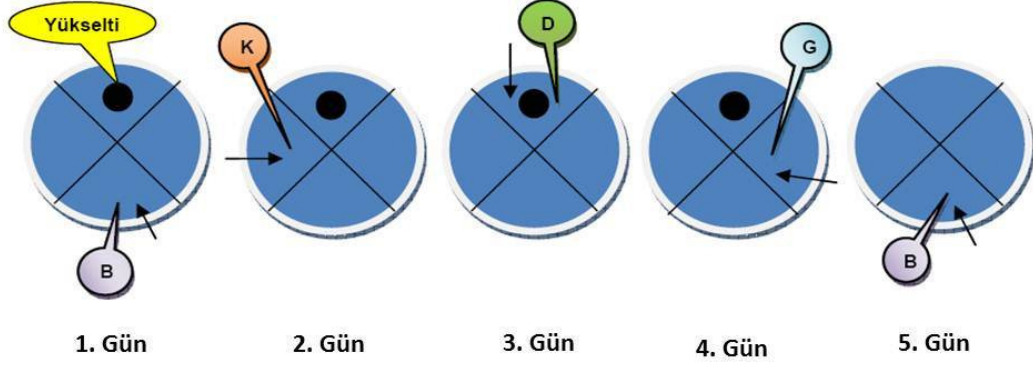




Şekil 3.8. Sabit görsel ipuçları.



Şekil 3.9. Uzak hafıza deneyinde 1. günde sıçanların suya atılış şeması (İlk atış batı kadranından yapılır ve saat yönünde ilerleyerek her sıçan için günlük toplam 4 atışla deney tamamlanır).

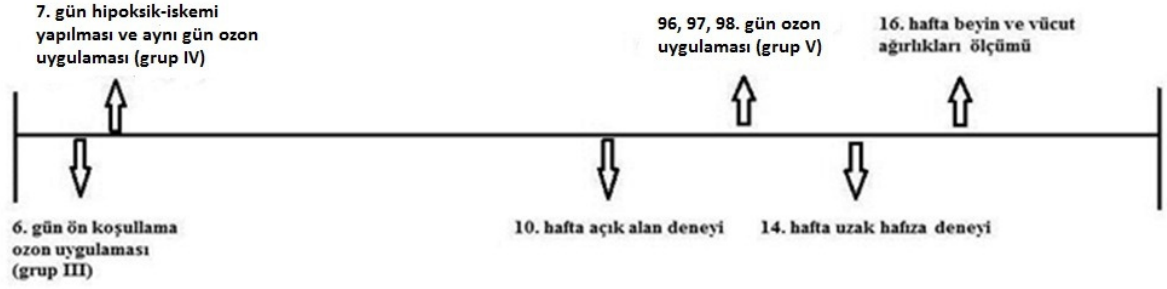


**Şekil 3.10.** Uzak hafıza deneyi günlere göre uygulama şeması (B batı, K kuzey, D doğu, G güney kadranını, oklar ise hergünün ilk atış yapılan kadranını göstermektedir).



**Şekil 3.11.** Platformu bulmuş bir sıçan.

### 3.8. Uygulama Takvimi



### 3.9. İstatistiksel Yöntemler

Veriler SPSS 11.5 paket programına (134) girildikten sonra sürekli ölçümlere ait normallik kontrolleri Shapiro Wilk testi ile test edilmiş ve normal dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Biyokimyasal ve histopatolojik veriler olan SOD, MDA, vücut ağırlıkları, beyin ağırlıkları, mesafe ve hız parametreleri için gruplar arası farklılıklar varyans analizi (One Way ANOVA) ile test edilmiştir. Varyansların homojenliği kontrolü Levene testi ile yapılmıştır ve ikili karşılaştırmalar Tukey testi ile gerçekleştirilmiştir. Tunel ve Kaspaz ölçümlerinin sağ ve sol beyin apoptotik nöron sayıları için eş yapma t testi (Paired sample t test) kullanılmıştır. Uzak hafıza deneyinin 1, 2, 3 ve 4. günlerine ait karşılaştırmalar için iki faktörlü ve faktörlerden biri tekrarlanan ölçüm içeren bir varyans analizi (Repeated measures ANOVA) ile hem gruplar arası farklılıklar hem de her bir gruba ait günler arasındaki farklılıklar incelenmiştir. Uzak hafıza deneyinin 5. gününde kuzey, güney, doğu ve batı bölgeleri arasındaki farklılıklar için de tekrarlanan ölçümlü varyans analizi (Repeated measures ANOVA) kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistik olarak ortalama ve standart sapma değerleri verilmiştir. İstatistik anlamlılık olarak  $p < 0,05$  alınmıştır.

## 4.BULGULAR

Başlangıçta çalışmaya alınan 102 adet yedi günlük sıçan yavrusundan 32'si planlandığı gibi dekapite edildi. Kalan 70 sıçanla açık alan deneyleri yapıldı. Sıçanlardan ikisi belirlenemeyen nedenlerle öldü, bunun sonucunda öğrenme ve hafıza deneyleri 68 sıçanla yapıldı.

Grup 1'de deneyin başlangıcında (7. gün) ortalama ağırlığı  $11,884 \pm 0,961$  olan 26 sıçandan 8'i apoptotik nöron sayımı için dekapite edildi. Kalan 18 sıçan ile açık alan deneyleri yapıldıktan sonra, belirlenemeyen bir nedenden 1 sıçan öldü ve uzak hafıza deneyleri 17 sıçan ile yapıldı.

Grup 2'de deneyin başlangıcında ortalama ağırlığı  $11,772 \pm 1,017$  olan 22 sıçandan 8'i apoptotik nöron sayımı için dekapite edildi. Kalan 14 sıçan ile açık alan ve uzak hafıza deneyleri yapıldı.

Grup 3'de deneyin başlangıcında ortalama ağırlığı  $11,880 \pm 0,956$  olan 21 sıçandan 8'i apoptotik nöron sayımı için dekapite edildi. Kalan 13 sıçan ile açık alan deneyleri yapıldıktan sonra, belirlenemeyen bir nedenden 1 sıçan öldü ve uzak hafıza deneyleri 12 sıçan ile yapıldı.

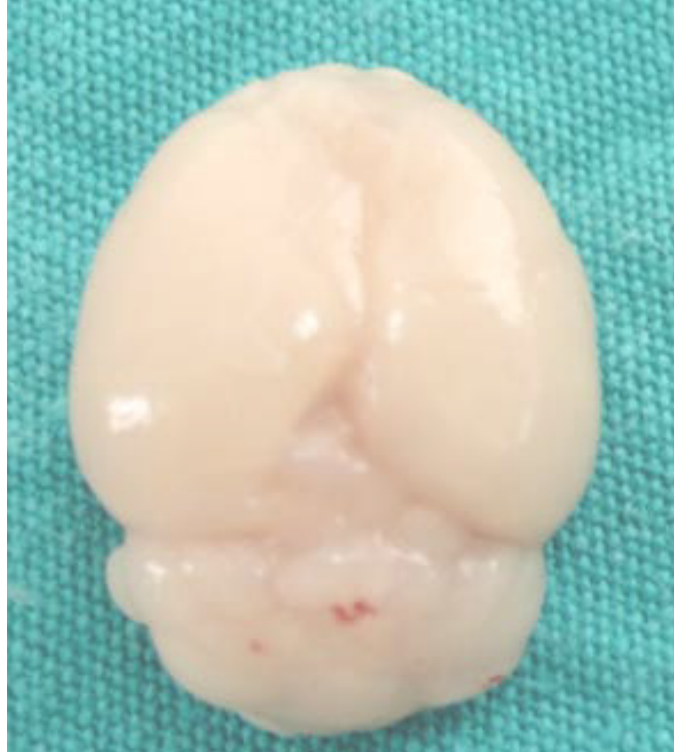
Grup 4'de deneyin başlangıcında ortalama ağırlığı  $11,890 \pm 1,284$  olan 21 sıçandan 8'i apoptotik nöron sayımı için dekapite edildi. Kalan 13 sıçan ile açık alan ve uzak hafıza deneyleri yapıldı.

Grup 5'de deneyin başlangıcında ortalama ağırlığı  $12,375 \pm 1,267$  olan 12 sıçan ile açık alan ve uzak hafıza deneyleri yapıldı.

### 4.1. Apoptoz Bulguları

Hipoksi-iskemi uygulamasını takiben dekapite edilen yedi günlük sıçanların beyinleri makroskopik olarak normal görünümdeydi (Resim 4.1). Yapılan koronal

kesitlerde de normal makroskopik bulgular vardı ve kanama, ödem, infarkt alanı saptanmadı. Rutin hematoksilen eozin boyası ile apoptotik nöronlar normal morfoloji gösteren nöronlara göre yuvarlak sınırlı, nükleer kondansasyon ve sitoplazmik büzüşme göstermekteydi. Normal görünümlü nöronlarda TUNEL ile pozitif boyanma gözlenmezken, apoptotik hücrelerin çoğu TUNEL ile nükleer pozitif olarak boyandı. Kaspaz-3 ile apoptotik nöronlarda sitoplazmik ve nükleer pozitif boyanma izlenirken, normal nöronlarda boyanma izlenmedi.



**Şekil 4.1.** Yedinci günde hipoksi iskemi işlemi uygulanan ve ardından dekapite edilen bir sıçanın beyni.

#### **4.1.1. TUNEL Yöntemiyle Beyindeki Apoptotik Hücrelerin Değerlendirilmesi**

Gruplara göre TUNEL yöntemiyle tespit edilen apoptotik nöron sayılarını değerlendirecek olursak (Çizelge 4.1), beynin sağ yarısında uygulanan hipoksi-iskemi modeliyle apoptotik hücre sayısında artış gözlenmektedir.

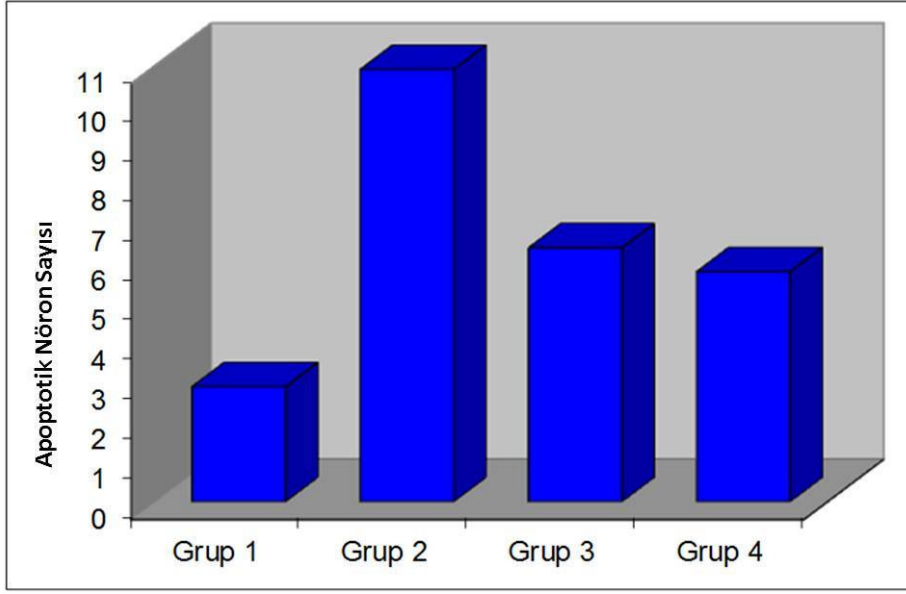
**Çizelge 4.1.** TUNEL yöntemiyle tespit edilen apoptotik nöron sayıları (SS: standart sapma).

<b>Grup</b>	<b>Sağ Beyin (Ort ± SS)</b>	<b>Sol Beyin (Ort ± SS)</b>
<b>1. Grup (n=8)</b>	2,900 ± 0,737	2,800 ± 0,632
<b>2. Grup (n=8)</b>	10,900 ± 1,728	5,000 ± 1,632
<b>3. Grup (n=8)</b>	6,400 ± 1,173	2,800 ± 1,032
<b>4. Grup (n=8)</b>	5,888 ± 1,054	3,333 ± 0,707

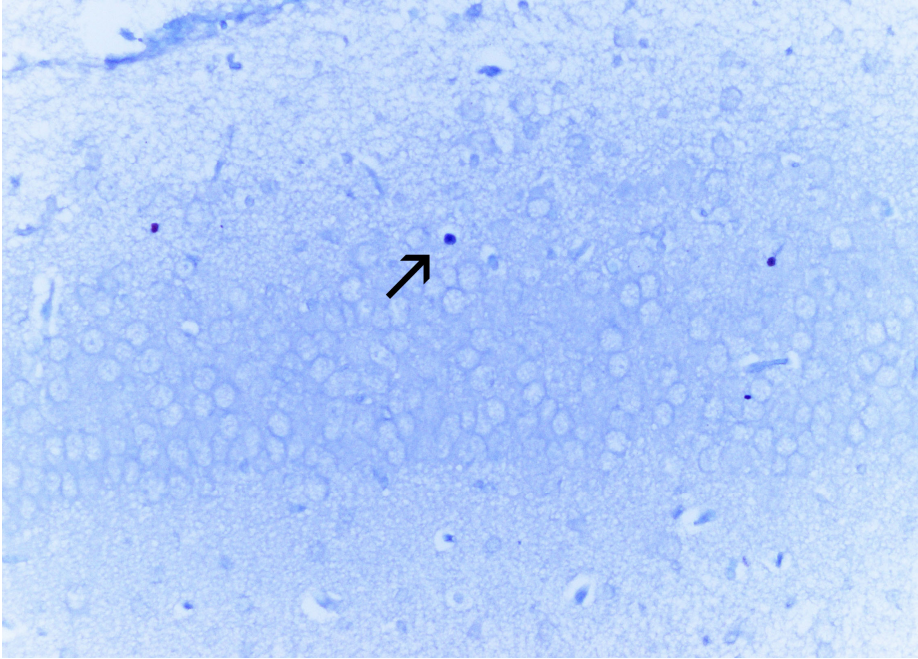
Sağ beyin yarısında TUNEL yöntemiyle tespit edilen apoptotik nöron sayılarının istatistiksel değerlendirmesinde, sadece 3. ve 4. grup arasında fark gözlemlenmedi ( $p=0,803$ ), diğer gruplar arasında ise apoptotik nöron sayısı bakımından anlamlı fark vardı ( $p<0,001$ ). Sonuç olarak ön koşul olarak ozon verilmiş grup 3 ve hipoksiyle aynı gün ozon verilen grup 4 sıçanların sağ beyinlerindeki apoptotik nöron sayıları sham grubundan anlamlı olarak fazla iken tedavi verilmeyen grup 2'den ise anlamlı olarak azdır (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6), aralarında ise bir fark gözlemlenmemiştir.

Sol beyin yarısında TUNEL yöntemiyle tespit edilen apoptotik nöron sayılarının istatistiksel değerlendirmesinde (Şekil 4.7), grup 1 ile grup 3, grup 1 ile grup 4 ve grup 3 ile grup 4 arasında fark bulunamadı (sırasıyla  $p=0,991$ ,  $p=0,698$ ,  $p=0,710$ ), diğer gruplar arasında ise apoptotik nöron sayısı bakımından anlamlı fark vardı (grup 1-grup 2 arasında  $p<0,001$ , grup 2-grup 3 arasında  $p<0,001$ , grup 2-grup 4 arasında  $p=0,01$ ). Bu veriler değerlendirildiğinde her iki ozon grubundaki apoptotik nöron sayılarının HİBH'li gruptan anlamlı olarak az olduğu gözlemlendi. Ozon gruplarının apoptotik nöron sayılarının sham grubundan anlamlı olarak yüksek olmamasıda diğer kayda değer istatistikti.

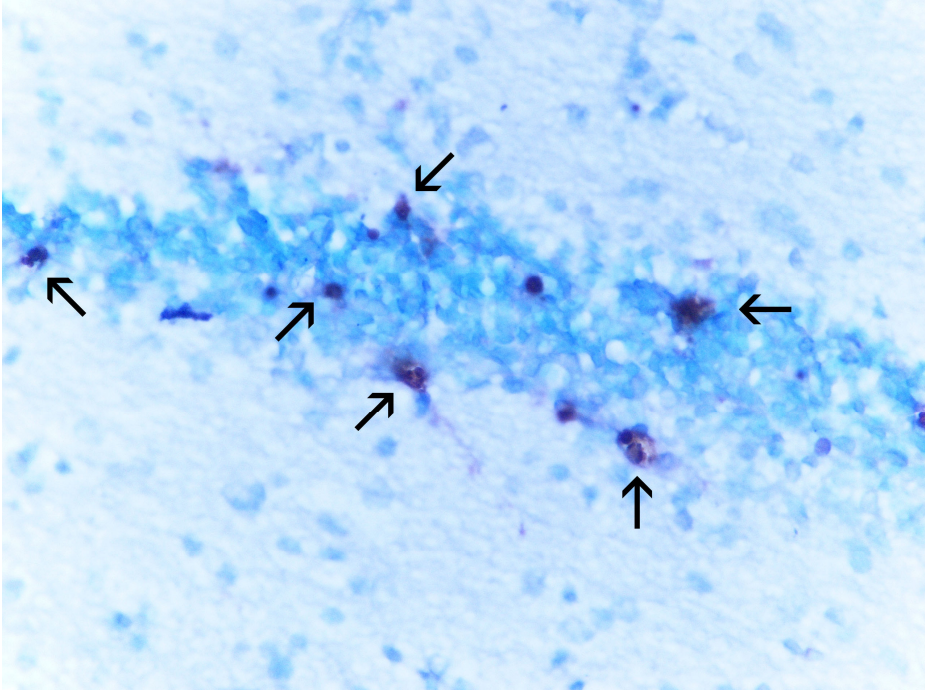
Grupların kendi içlerinde sağ ve sol beyinleri arasındaki apoptotik nöron sayılarının farkına bakıldığında (Şekil 4.8), sham grubu hariç diğer tüm gruplardaki sıçanların sağ beyinlerindeki apoptotik nöron sayıları sol beyinlerindeki anlamlı düzeyde fazla bulunmuştur (grup 1  $p=0,678$ , grup 2, grup 3, grup 4  $p<0,001$ ).



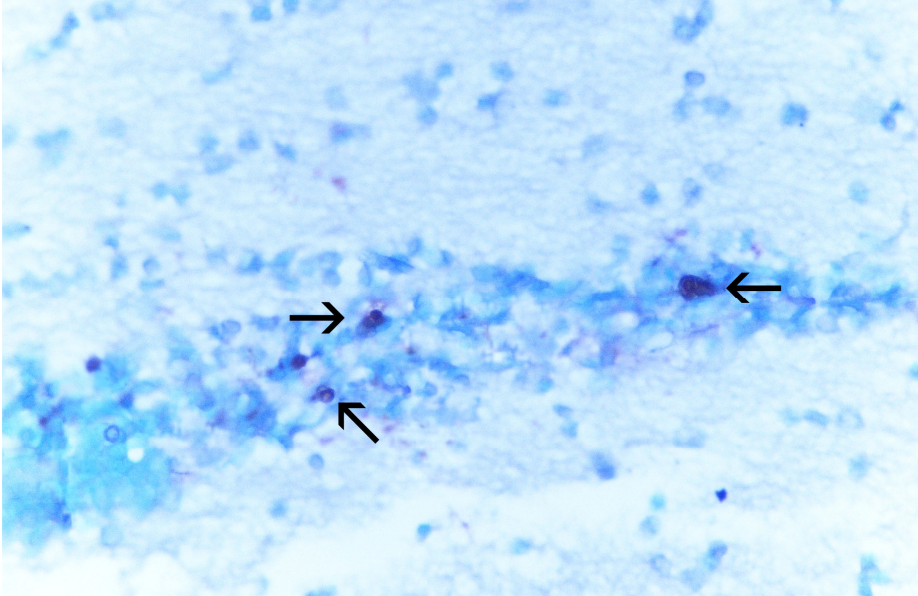
**Şekil 4.2.** TUNEL yöntemi ile gruptaki sıçanların beyinlerinin sağ yarısında saptanan apoptotik nöron sayılarının karşılaştırılması. (sadece 3. ve 4. grup arasında fark gözlemlenmedi.  $p=0,803$ )



**Şekil 4.3.** 1. gruptan bir sıçana ait beyin kesitinde az sayıda TUNEL-pozitif apoptotik nöron görünümü (ok ile işaretli) (orjinal büyütme, X400).

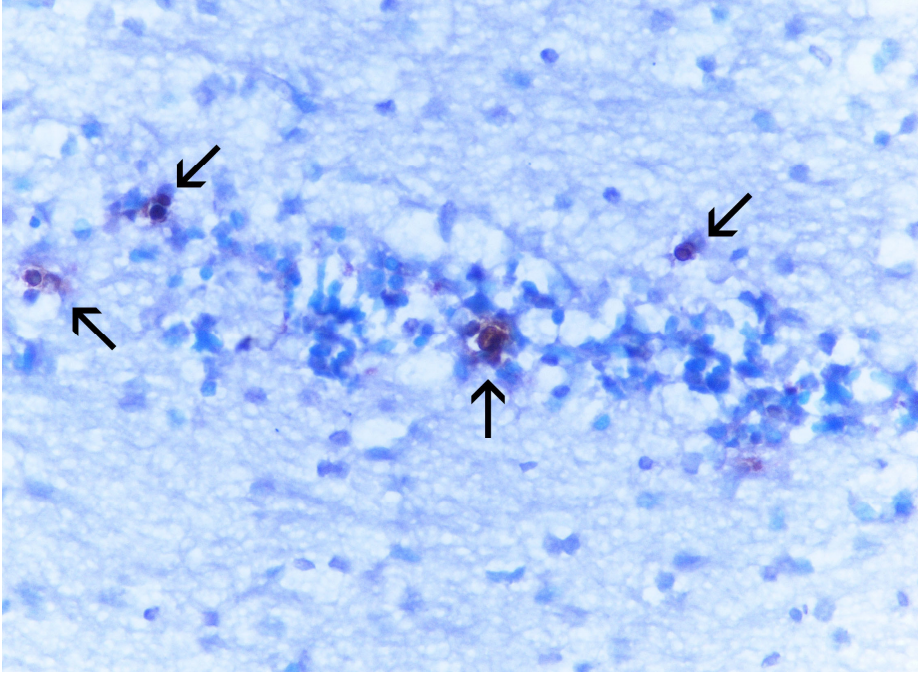


**Şekil 4.4.** 2. gruptan bir sıçana ait beyin kesitinde yaygın TUNEL-pozitif apoptotik nöron görünümü (ok ile işaretli) (orjinal büyütme, X400).

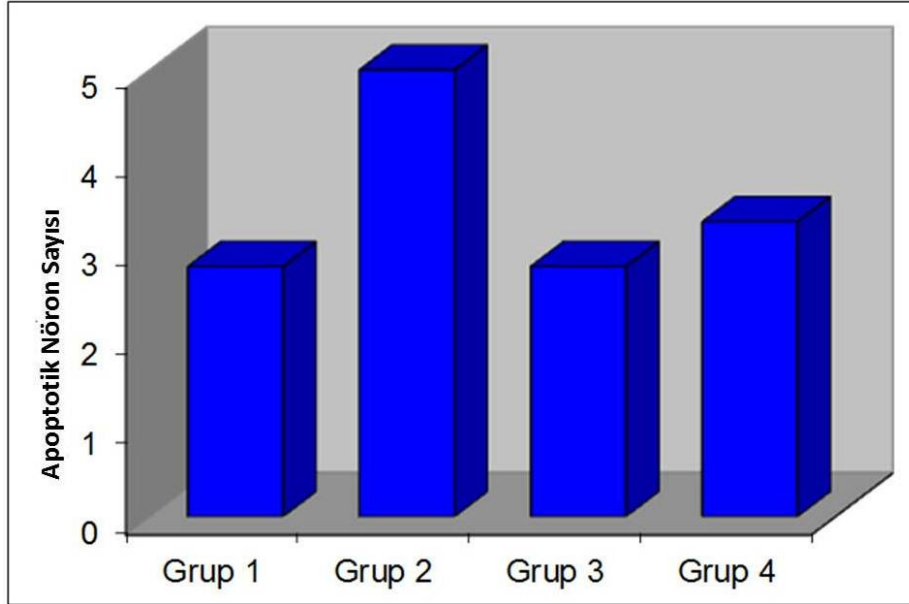


**Şekil 4.5.** 3. gruptan bir sıçana ait beyin kesitinde dağınık TUNEL-pozitif apoptotik nöron görünümü (ok ile işaretli) (orjinal büyütme, X400).

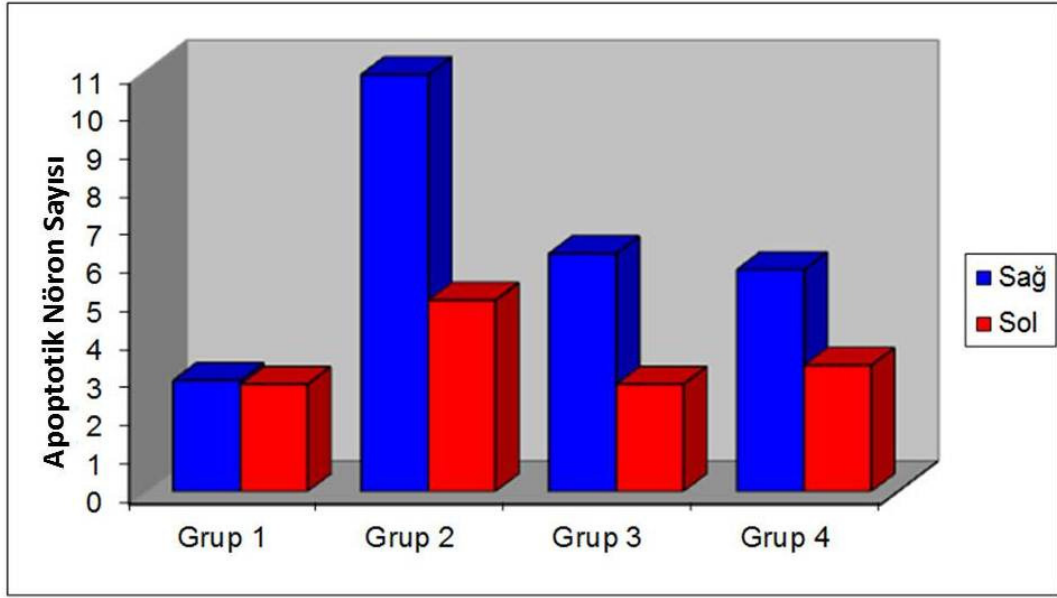




**Şekil 4.6.** 4. gruptan bir sıçana ait beyin kesitinde dağınık TUNEL-pozitif apoptotik nöron görünümü (ok ile işaretli) (orjinal büyütme, X400).



**Şekil 4.7.** TUNEL yöntemi ile gruptaki sıçanların beyinlerinin sol yarısında saptanan apoptotik nöron sayılarının karşılaştırılması. (grup 1 ile grup 3 arasında, grup 1 ile grup 4 arasında ve grup 3 ile grup 4 arasında fark bulunamadı (sırasıyla  $p=0,991$ ,  $0,698$ ,  $0,710$ ), diğer gruplar arasında ise apoptotik nöron sayısı bakımından anlamlı fark vardı.)



**Şekil 4.8.** Gruplarda TUNEL yöntemi ile beynin sağ ve sol yarısında saptanan apoptotik nöron sayılarının karşılaştırılması. (sham grubu hariç diğer tüm gruplarda sağ beyin dokusundaki apoptotik nöron sayısı sol beyindekine göre anlamlı derecede ( $p<0,001$ ) yüksek bulundu)

#### 4.1.2. Kaspaz-3 Yöntemiyle Beyindeki Apoptotik Hücrelerin Değerlendirilmesi

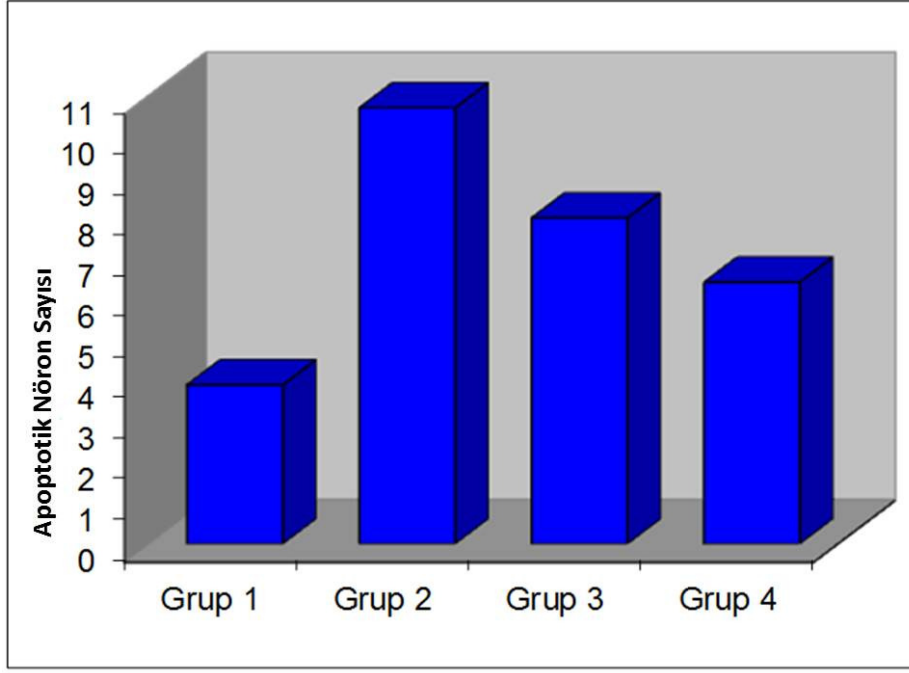
Beynin sağ yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle yapılan apoptotik hücre sayılarının değerlendirilmesinde; uygulanan hipoksi ve iskemi modeliyle beyindeki apoptotik hücre sayısında artış olduğu belirlendi (Çizelge 4.2). Apoptotik nöron sayıları kıyaslandığında grup 1-grup 2, grup 1-grup 3 ve grup 2-grup 4 arasında anlamlı fark olduğu gözlemlendi (sırasıyla  $p<0,001$ ,  $p=0,011$  ve  $p=0,014$ ), diğer gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu. HİBH işlemi ile aynı gün ozon verdiğimiz grup olan grup 4 sıçanların sağ beyin yarılarındaki apoptotik nöron sayıları sham grubundan anlamlı olarak farklı değilken, HİBH grubundan anlamlı olarak azdı (Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, 4.13).

**Çizelge 4.2.** Gruplarda Kaspaz-3 yöntemiyle tespit edilen apoptotik nöron sayıları (SS: standart sapma).

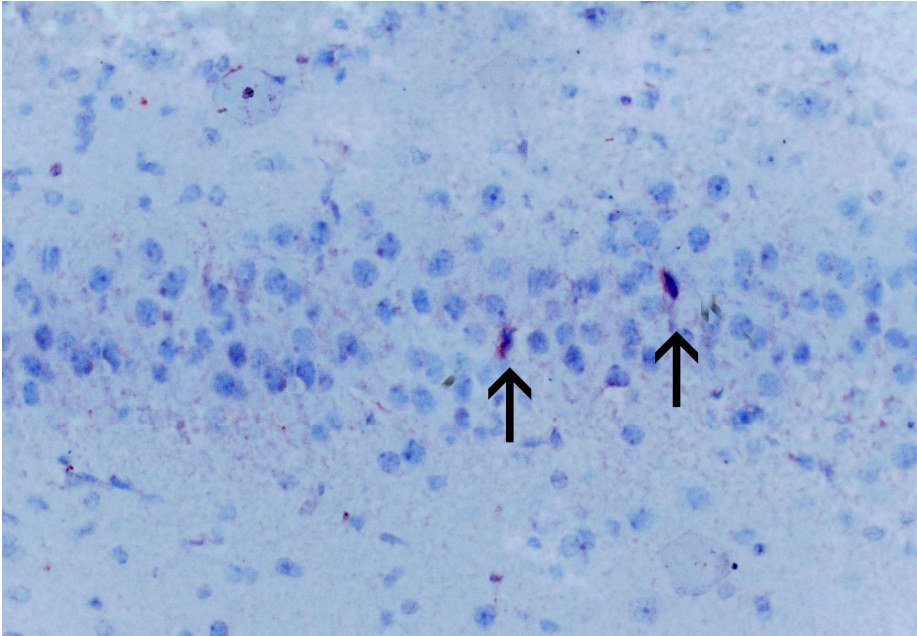
<b>Grup</b>	<b>Sağ Beyin (Ort ± SS)</b>	<b>Sol Beyin (Ort ± SS)</b>
<b>Grup 1 (n=8)</b>	3,900 ± 1,197	3,600 ± 1,577
<b>Grup 2 (n=8)</b>	10,700 ± 4,083	6,600 ± 2,458
<b>Grup 3 (n=8)</b>	8,000 ± 2,236	3,444 ± 1,589
<b>Grup 4 (n=8)</b>	6,420 ± 1,988	3,714 ± 1,603

Gruplardaki sıçanlarda beynin sol yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle belirlenen apoptotik nöron sayıları değerlendirilecek olursa; sadece grup 2 HİBH'ı grubundaki apoptotik nöron sayılarının diğerlerinden anlamlı olarak daha fazla olduğu belirlendi (grup 2-grup 1 p= 0,006, grup 2-grup 3 p= 0,005 ve grup 2-grup 4 p= 0,019), diğer gruplarda ise anlamlı bir fark yoktu. Grup 3 ve grup 4 ozon gruplarındaki apoptotik nöron sayıları sham grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmadı (Şekil 4.14).

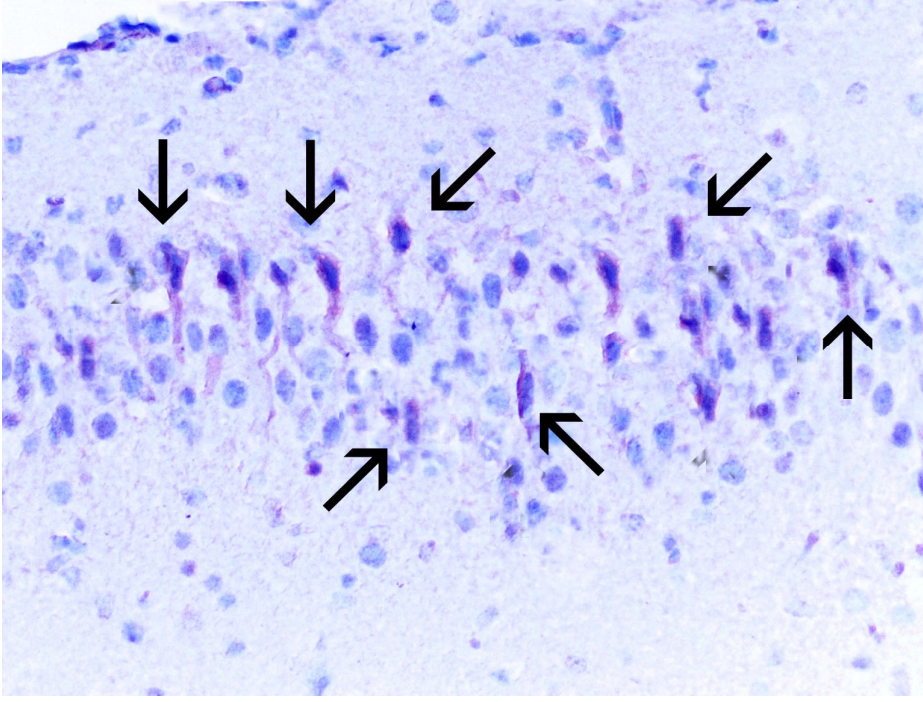
Grupların kendi içlerinde sağ ve sol beyinleri arasında apoptotik nöron sayıları açısından farka bakılacak olursa (Şekil 4.15), sham grubu hariç diğer tüm gruplardaki sıçanların sağ beyinlerindeki apoptotik nöron sayıları sol beyinlerindeki anlamlı olarak fazla bulunmuştur (grup 1 p=0,279, grup 2 p=0,003, grup 3 p=0,001, grup 4 p=0,02).



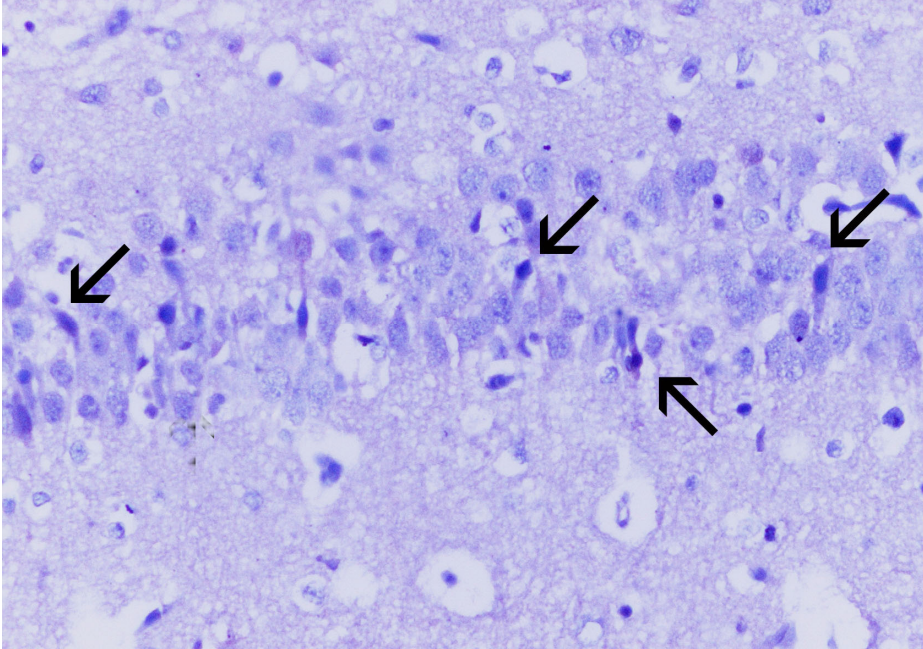
**Şekil 4.9.** Kaspaz-3 yöntemi ile gruptaki sıçanların beyinlerinin sağ yarısında saptanan apoptotik nöron sayılarının karşılaştırılması. (grup 1-grup 2, grup 1-grup 3 ve grup 2-grup 4 arasında anlamlı fark olduğu gözlemlendi. Sırasıyla  $p<0,001$ ,  $p=0,011$  ve  $p=0,014$ )



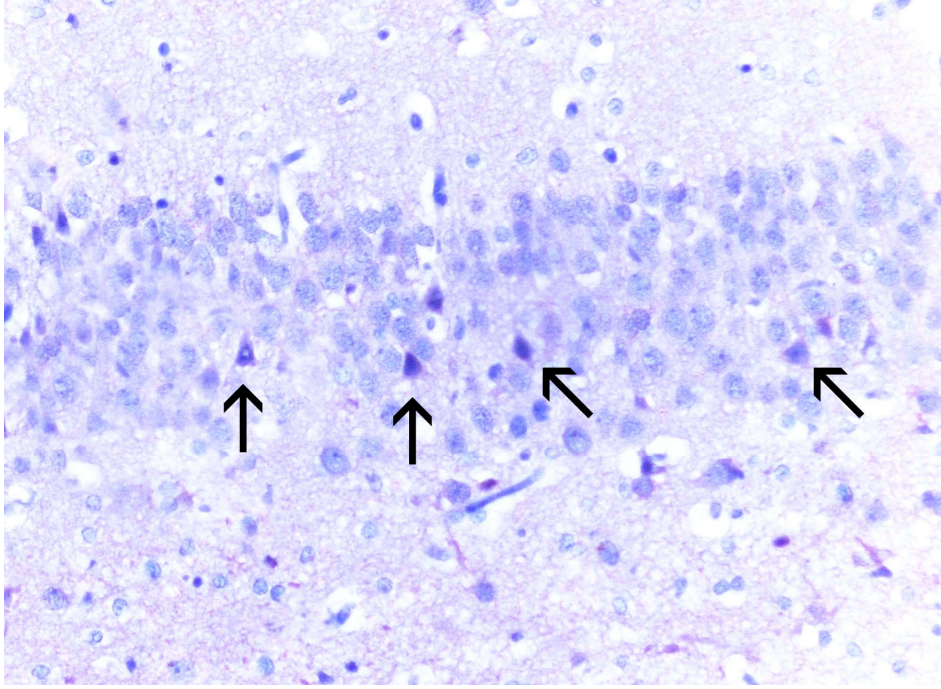
**Şekil 4.10.** 1. grupta bir sıçana ait beyin kesitinde seyrek kaspaz-3 ile pozitif boyanan apoptotik nöron görünümü. (ok ile işaretli) (orjinal büyütme, X400).



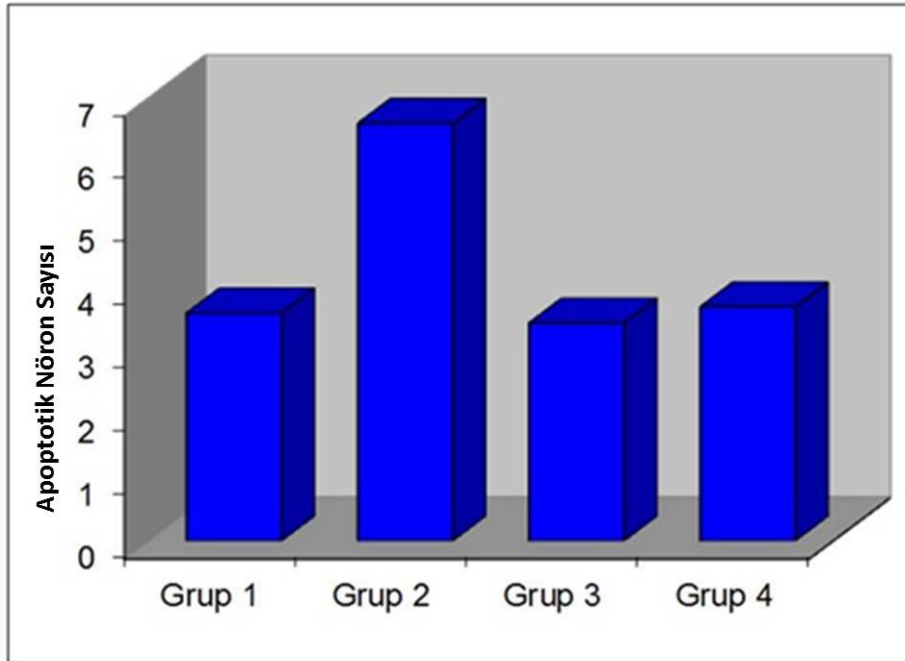
**Şekil 4.11.** 2. grupta bir sıçana ait beyin kesitinde yaygın kaspaz-3 ile pozitif boyanan apoptotik nöron görünümü. (ok ile işaretli) (orjinal büyütme, X400).



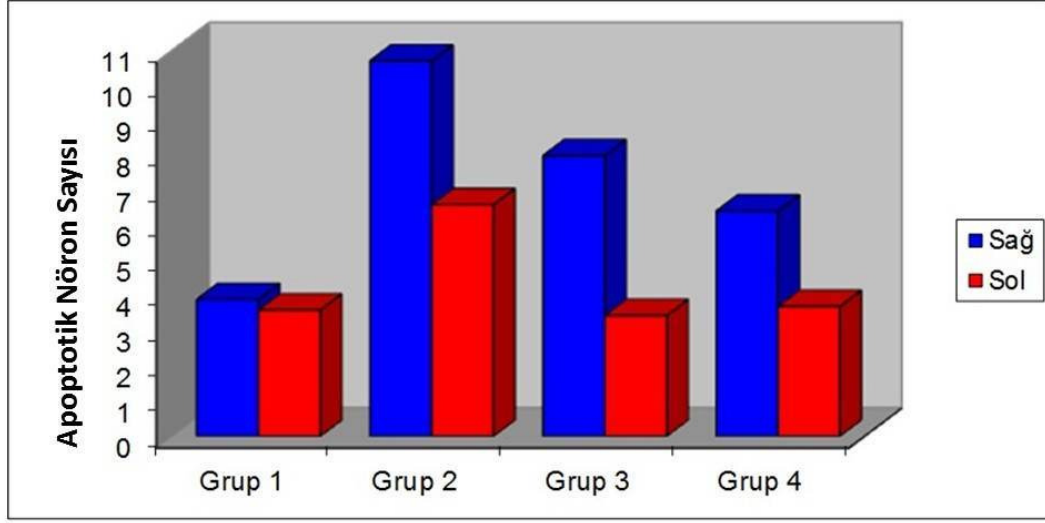
**Şekil 4.12.** 3. grupta bir sıçana ait beyin kesitinde dağınık kaspaz-3 ile pozitif boyanan apoptotik nöron görünümü. (ok ile işaretli) (orjinal büyütme, X400).



**Şekil 4.13.** 4. grupta bir sıçana ait beyin kesitinde dağılık kaspaz-3 ile pozitif boyanan apoptotik nöron görünümü. (ok ile işaretli) (orjinal büyütme, X400).



**Şekil 4.14.** Kaspaz-3 yöntemi ile gruptaki sıçanların beyinlerinin sol yarısında saptanan apoptotik nöron sayılarının karşılaştırılması. (sadece grup 2'deki apoptotik nöron sayılarının diğerlerinden anlamlı olarak fazla olduğu gözlemlendi. grup 2-1  $p=0,006$ , grup 2-3  $p=0,005$  ve grup 2-4  $p=0,019$ )

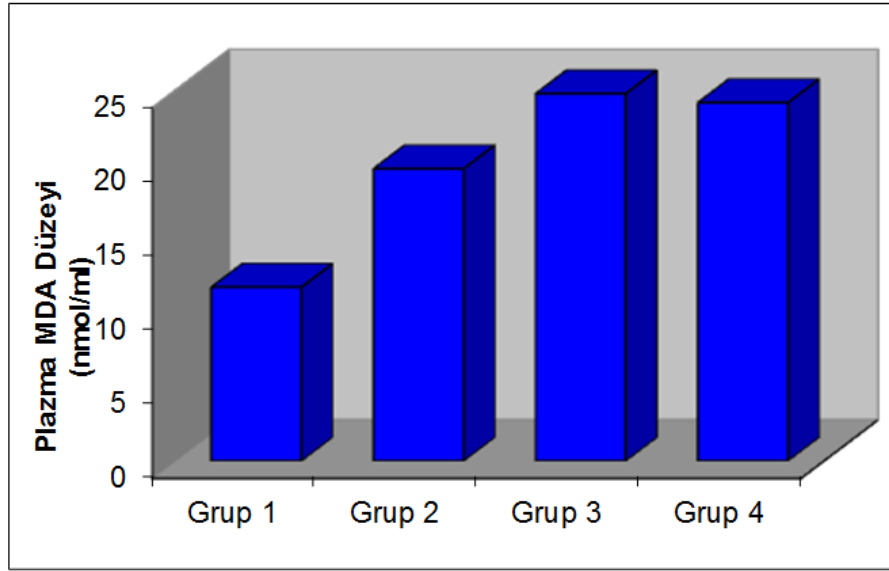


**Şekil 4.15.** Gruplarda Kaspaz-3 yöntemi ile beynin sağ ve sol yarısında saptanan apoptotik nöron sayılarının karşılaştırılması. (sham grubu hariç diğer tüm gruplarda fark bulundu. grup 2 p=0,003, grup 3 p=0,001, grup 4 p=0,02)

## 4.2. Biyokimyasal Bulgular

### 4.2.1. Plazma Malondialdehid Düzeyi

Doğumu takiben yedinci gün yapılan HİBH' den sonra kalp içi girişimle alınan kan örneklerinde en yüksek ortalama MDA düzeyi grup 3'deki sıçanların plazmalarında saptandı (Şekil 4.16). Plazma MDA düzeyleri grup 1'de  $11,720 \pm 7,486$ , grup 2'de  $19,705 \pm 6,163$  grup 3'de  $24,775 \pm 9,488$  ve grup 4'de  $24,166 \pm 10,966$  nmol/ml olarak ölçüldü. Plazma MDA düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılmasında grup 1-grup 3 ve grup 1-grup 4 arasında anlamlı bir fark gözlemlendi (sırasıyla p=0,008, p=0,018), diğer gruplar arasında ise anlamlı fark yoktu.

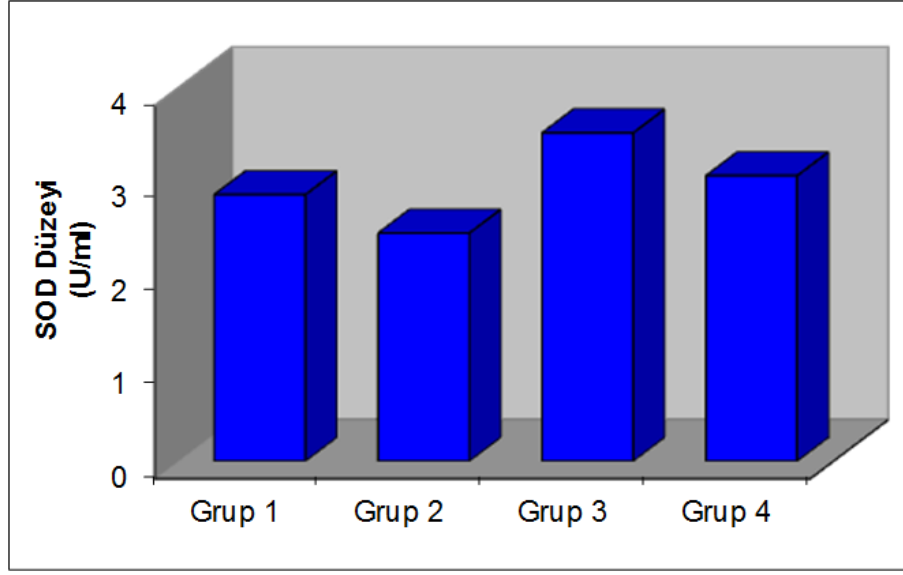


**Şekil 4.16.** Gruplarda plazma MDA düzeylerinin karşılaştırılması. (grup 1-3 ve grup 1-4 arasında anlamlı bir fark gözlemlendi (sırasıyla  $p=0,008$ ,  $p=0,018$ ))

#### 4.2.2. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi Tayini

Doğumu takiben yedinci gün yapılan HİBH'den sonra kalp içi girişimle alınan kan örneklerinde en yüksek ortalama SOD enzim aktivitesi grup 3'deki sıçanlarda saptandı. SOD düzeyleri grup 1'de  $2,857 \pm 0,987$ , grup 2'de  $2,444 \pm 1,206$ , grup 3'de  $3,519 \pm 1,426$  ve grup 4'de  $3,060 \pm 1,162$  U/ml olarak ölçüldü (Şekil 4.17). SOD enzim aktivitesinin gruplar arası karşılaştırılmasında herhangi anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p=0,253$ ).





**Şekil 4.17.** Gruplardaki sıçanların plazma SOD düzeylerinin karşılaştırılması. (anlamli fark gözlemlenmedi.  $p=0,253$ )

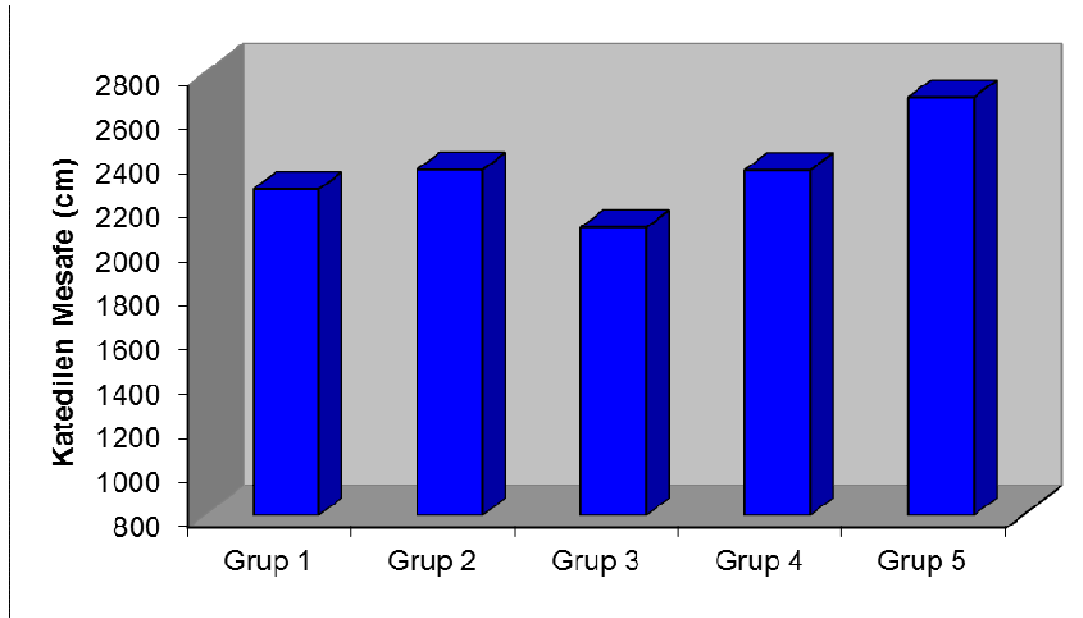
### 4.3. Davranış Deneyleri

#### 4.3.1. Açık Alan Deneyi

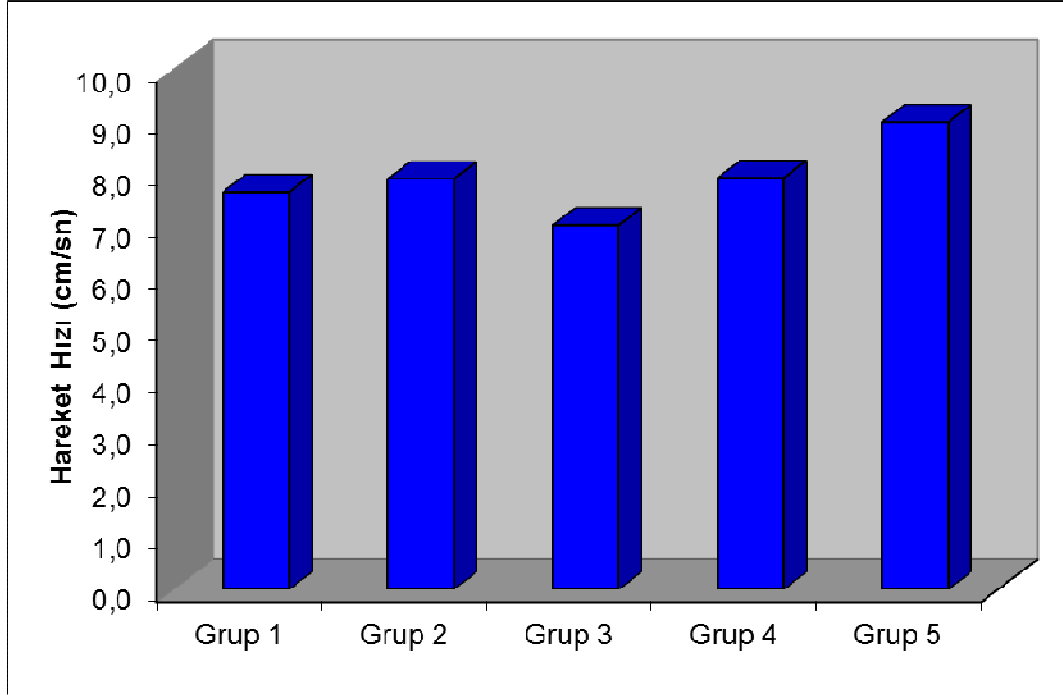
Açık Alan Deneyi 10. haftasını tamamlamış sıçanlara uygulandı. Açık alan deneyinde her grubun 5 dakikada ortalama katettiği mesafe ve hareket hızları çizelge 4,3'de gösterilmiştir. Ortalama katedilen mesafe ve hareket hızları için gruplar arası karşılaştırmada her iki parametre için de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4.18, Şekil 4.19), (sırasıyla  $p:0,241$  ve  $p:0,238$ ).

**Çizelge 4.3.** Açık alan deneyinde grupların katedilen ortalama mesafe ve hareket hızı değerleri ve bu değerler için gruplar arası karşılaştırmalar (SS: standart sapma).

	<b>Katedilen mesafe (cm)</b> <b>(Ort ± SS)</b>	<b>Hareket Hızı (cm/sn)</b> <b>(Ort ± SS)</b>
<b>Grup 1</b> (n=18)	2274,025 ± 379,965	7,656 ± 1,331
<b>Grup 2</b> (n=14)	2362,893 ± 743,754	7,933 ± 2,502
<b>Grup 3</b> (n=13)	2101,638 ± 775,041	7,017 ± 2,584
<b>Grup 4</b> (n=13)	2360,125 ± 504,226	7,928 ± 1,684
<b>Grup 5</b> (n=12)	2690,916 ± 780,165	9,011 ± 2,559
<b>p</b>	0,241	0,238



**Şekil 4.18.** Açık alan deneyinde gruplardaki sıçanların katettikleri ortalama mesafenin gruplar arası karşılaştırılması. (anlamli fark gözlemlenmedi. p=0,241)



**Şekil 4.19.** Açık alan deneyinde gruptaki sıçanların ortalama hareket hızlarının gruplar arası karşılaştırılması. (anlamli fark gözlemlenmedi.  $p=0,238$ )

#### 4.3.2. Morris Su Tankı Öğrenme ve Hafıza Deneyleri

Tüm grupta doğumu takiben 14. haftasını tamamlamış olan sıçanlara uygulandı. Sıçanların grupta göre ortalama vücut ağırlıkları çizelge 4,4’de verilmiştir. Her grup için ayrı ayrı Morris su tankı deneyinin birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü günlerinde yükseltiyi bulmaları için geçen ortalama süreler hesaplandı (Çizelge 4.5, Şekil 4.20). Grup 1’de günler ilerledikçe yükseltiyi bulma süreleri anlamlı olarak azalırken ( $p<0,001$ ), diğer grupta sadece 1. ve 2. gün arasında yükseltiyi bulma süreleri bakımından anlamlı bir fark görülmedi. Üçüncü ve 4. Günlerdeki platformu bulma süreleri birinci gün değeri ile karşılaştırıldığında istatistiksel bakımdan anlamlı olarak azaldığı belirlendi.

Grupların Birinci gün yükseltiyi bulma süreleri incelendiğinde yükseltiyi en çabuk grup 1’in bulduğu ve grup 3 ile arasında anlamlı fark olduğu belirlenmiştir ( $p=0,035$ ). Diğer gruplar arasında 1. günde yükseltiyi bulma süreleri açısından fark gözlemlenmedi.

İkinci günde de yükseltiyi en çabuk grup 1 sıçanlar buldu. İkinci en iyi sonuç grup 4 sıçanlarda ölçüldü ve aralarında anlamlı fark belirlenmedi ( $p=0,483$ ). 1. Grubun yükseltiyi bulma süresi diğer 3 gruptan anlamlı olarak daha kısa idi ( $p<0,001$ ). Grup 4'ün yükseltiyi bulma süresi ise sadece grup 3'ten anlamlı olarak daha kısa idi ( $p<0,001$ ).

Üçüncü günde yükseltiyi yine en çabuk Grup 1 sıçanlar buldu ve bulma süreleri diğer tüm gruplardan anlamlı olarak kısaydı ( $p<0,001$ ). Diğer gruplar arasında ise anlamlı bir fark gözlemlenmedi.

Dördüncü gün sonuçlarındada en kısa bulma süreleri grup 1 sıçanlara aitti ve diğer gruplardan anlamlı olarak farklıydı (grup 1 ile grup 2,3 ve 5 arasında  $p<0,001$ , grup 1 ile grup 4 arasında  $p=0,04$ ). Grup 1'den sonra en kısa süre ortalaması grup 4'e aitti ve grup 4'te grup 2,3 ve 5'ten anlamlı olarak daha kısa sürede yükseltiyi bulmuştu ( $p<0,001$ ).

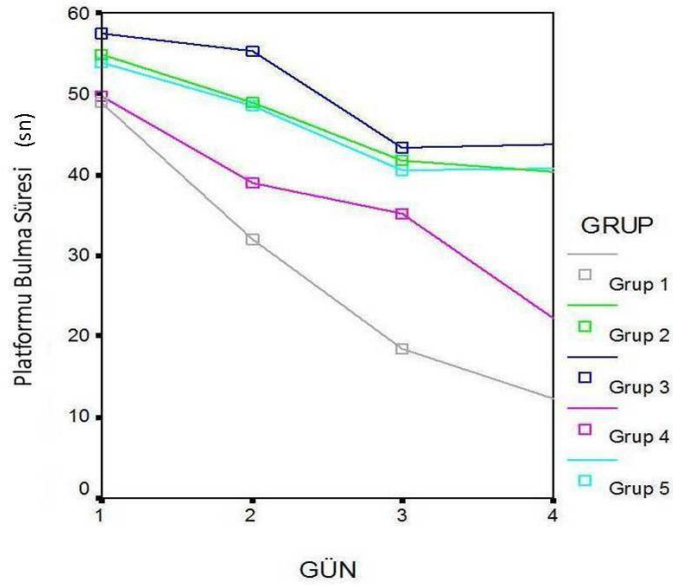
Birinci gün ile dördüncü gün arasındaki yükseltiyi bulma süresi farkı incelendiğinde, en fazla süreyi düşüren ve en iyi öğrenmiş olarak ölçülen gruplar olan grup 1 ve grup 4 arasında anlamlı fark gözlenmiyordu. Bu gruplarla grup 2,3 ve 5 arasında ise anlamlı fark vardı (grup 1 ve diğer gruplar arasında  $p<0,001$ , grup 4 ile grup 2 arası  $p=0,015$ , grup 4 ile grup 3 arası  $p=0,001$ , grup 4 ile grup 5 arası  $p=0,037$  )

**Çizelge 4.4.** Gruplardaki sıçanların 14. haftada ortalama vücut ağırlıkları (SS: standart sapma).

<b>Grup</b>	<b>Vücut Ağırlığı (gr) (Ort ± SS)</b>
<b>Grup 1 (n=17)</b>	230,665 ± 19,254
<b>Grup 2 (n=14)</b>	211,414 ± 23,805
<b>Grup 3 (n=12)</b>	215,825 ± 42,486
<b>Grup 4 (n=13)</b>	221,062 ± 24,224
<b>Grup 5 (n=12)</b>	208,800 ± 23,242

**Çizelge 4.5.** Öğrenme ve hafıza deneylerinde grupların günlere göre ortalama yükseltiyi bulma süreleri ve bir ile dördüncü gün arasındaki yükseltiyi bulma süresi farkları (SS: standart sapma).

	Yükseltiyi bulma süreleri (sn) (Ort ± SS)				1- 4.gün arasındaki yükseltiyi bulma süresi farkları (sn) (Ort ± SS)
	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	
<b>Grup 1</b>	48,820 ± 20,640	32,082 ± 21,729	18,520 ± 16,881	12,288 ± 12,218	38,973 ± 19,536
<b>Grup 2</b>	54,757 ± 15,113	48,803 ± 20,038	41,742 ± 22,881	40,250 ± 22,598	19,235 ± 22,229
<b>Grup 3</b>	57,370 ± 10,680	55,295 ± 11,947	43,354 ± 23,287	43,670 ± 21,234	15,241 ± 20,544
<b>Grup 4</b>	49,600 ± 19,533	38,915 ± 23,571	35,069 ± 23,622	22,276 ± 22,549	32,500 ± 22,427
<b>Grup 5</b>	53,758 ± 17,293	48,412 ± 21,863	40,441 ± 21,630	40,725 ± 23,318	19,900 ± 22,965



**Şekil 4.20.** Öğrenme ve hafıza deneylerinde grupların yükseltiyi bulma sürelerinin günlere göre karşılaştırılması.

Öğrenme ve hafıza deneylerinin 5. gününde sıçanların eskiden yükseltinin olduğu doğu kadranında geçirdikleri süre incelendi (Çizelge 4.6, 4.7). Doğu kadranında en fazla süreyi grup 1 ve grup 4 sıçanların geçirdiği ölçüldü. Bu 2 grupta da sıçanların doğu kadranında geçirdikleri süre diğer kadranlarda geçirdikleri süreden anlamlı olarak fazlaydı ( $p < 0,001$ ). Diğer gruplarda anlamlı bir fark gözlemlenmedi (grup 2  $p = 0,577$ , grup 3  $p = 0,382$ , grup 5  $p = 0,111$ ).

**Çizelge 4.6.** Morris su tankı deneyinin 5. gününde grupların doğu kadranında geçirdikleri süreler (SS: standart sapma).

Grup	Doğu kadranında geçirilen süre (sn) (Ort $\pm$ SS)
Grup 1	23,011 $\pm$ 4,756
Grup 2	13,357 $\pm$ 7,610
Grup 3	13,116 $\pm$ 8,837
Grup 4	21,261 $\pm$ 6,140
Grup 5	18,066 $\pm$ 6,934

**Çizelge 4.7.** Morris su tankı deneyinin 5. gününde grupların tüm kadranlarda geçirdikleri süreler (grup 2 ve 4'ün doğu kadranında geçirdikleri süreler diğer kadranlardan anlamlı olarak fazlaydı.  $p < 0,001$ ) (SS: standart sapma).

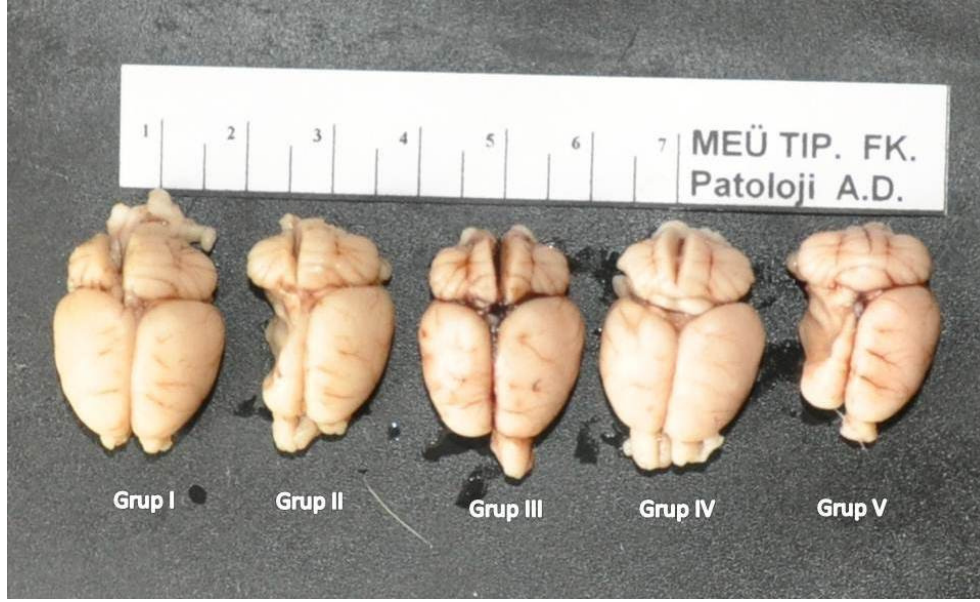
Grup	Kadranlarda Geçirilen Süreler (sn) (Ort $\pm$ SS)			
	Batı	Kuzey	Doğu	Güney
Grup 1	13,129 $\pm$ 3,042	12,705 $\pm$ 3,588	23,011 $\pm$ 4,756	11,152 $\pm$ 3,899
Grup 2	17,657 $\pm$ 5,788	14,457 $\pm$ 7,760	13,357 $\pm$ 7,610	14,528 $\pm$ 8,002
Grup 3	20,033 $\pm$ 1,755	15,183 $\pm$ 4,518	13,116 $\pm$ 8,837	11,666 $\pm$ 5,414
Grup 4	13,292 $\pm$ 6,510	14,384 $\pm$ 4,747	21,261 $\pm$ 6,140	11,061 $\pm$ 3,809
Grup 5	11,833 $\pm$ 7,892	17,883 $\pm$ 5,837	18,066 $\pm$ 6,934	12,216 $\pm$ 7,243

#### 4.5. Sıçanların Beyin Ağırlıkları ve Makroskopik İnceleme

Tüm gruplarda 16. haftasını tamamlamış sıçanlar dekapite edildi. Beyinleri bütünlüğü bozulmadan çıkarıldı. Çıkarılan beyinler makroskopik olarak incelendi. Grup 1'e ait sıçan beyinleri normal olarak izlenirken (Şekil 4.21), doğum sonrası yedinci günde HİBH oluşturulmuş olan Grup 2, 3, 4 ve 5'e ait sıçan beyinlerinin sağ beyin yarılarının küçülmüş olduğu görüldü (Şekil 4.22). Grup 2'ye ait sıçan beyinlerinin sağ yarıküreleri diğer gruplara göre daha küçülmüş ve sınırları daha düzensiz görünümdeydi. Beyin ağırlıklarına bakıldığında Grup 1'deki sıçanların beyin ağırlığının diğer gruplardan anlamlı olarak fazla olduğu görüldü ( $p < 0,001$ ), (Çizelge 4.8). En düşük beyin ağırlıklarında grup 2 ve grup 5'de ölçüldü.



Şekil 4.21. Grup 1'deki bir sıçanın beyni.



Şekil 4.22. Tüm gruplardan birer sıçana ait beyin örnekleri.

Çizelge 4.8. 16. haftada gruplara göre sıçanların ortalama beyin ağırlıkları (SS: standart sapma).

Grup	Beyin Ağırlığı (gr) (Ort ± SS)
Grup 1	1,860 ± 0,127
Grup 2	1,447 ± 0,229
Grup 3	1,525 ± 0,189
Grup 4	1,620 ± 0,190
Grup 5	1,413 ± 0,214

#### 4.6. Sıçanların Vücut Ağırlıkları

Sıçanlar yedi günlük iken çalışmaya alındıklarında ortalama vücut ağırlıkları  $11,961 \pm 1,097$  gr idi ve vücut ağırlıkları açısından gruplar arasında anlamlı fark yoktu. Sıçanlar 16. haftada tekrar tartıldıklarında vücut ağırlıkları  $241,843 \pm 25,771$  gr olarak ölçüldü. Grupların 16. haftada ortalama vücut ağırlıkları Çizelge 4,9'da gösterilmiştir. Gruplar arasında anlamlı fark gözlemlenmedi ( $p=0,059$ ). En düşük vücut ağırlıkları



grup 5 ve 2 de görülürken en yüksek vücut ağırlığı ise sham grubu olan grup 1'de ölçüldü.

**Çizelge 4.9.** 16. haftada gruplara göre sıçanların ortalama vücut ağırlıkları (SS: standart sapma).

<b>Grup</b>	<b>Vücut Ağırlığı (gr) (Ort ± SS)</b>
<b>Grup 1</b>	254,523 ± 20,579
<b>Grup 2</b>	236,157 ± 23,300
<b>Grup 3</b>	246,609 ± 32,225
<b>Grup 4</b>	240,492 ± 27,056
<b>Grup 5</b>	227,608 ± 21,193

## 5.TARTIŞMA

HİBH ve buna bağılı komplikasyonlar gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde yenidoğanlardaki en önemli mortalite ve morbitide nedenlerindedir (135). Son yıllarda gebe ve yenidoğan izleminde kaydedilen ilerlemelere karşın görülme sıklığında büyük bir değişiklik olmamıştır ve istenen düzeyde etkili bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır (136). HİBH geliştikten sonra geç dönemde uygulanacak tedavilerin yeterince etkili olmadığı bilinmektedir. Bunun neticesinde araştırmacılar erken dönemde hasarı azaltıcı tedavilere yönelmişlerdir. Yakın zamana kadar destek tedavisi dışında bir tedavi seçeneği bulunmamışken, HİE'nin fizyopatolojisinin daha iyi anlaşılması ile beraber birçok tedavi yöntemi geliştirilmiştir. Bunlar arasında allopurinol, magnezyum sülfat, eritropoetin, melatonin, ksenon, serbest radikal temizleyicileri, nitrik oksit sentaz baskılayıcıları, kalsiyum kanal kapatıcıları, soğutma tedavisi, kök hücre nakli ve büyüme faktörleri tedavileri sayılabilir (87). Sunulan tez çalışmasında ise bu amaçla ozon kullanıldı. Ozonun etki mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber serbest oksijen radikallerinin oluşumuna ve lipid peroksidasyonuna yol açtığı bilinmektedir (16). Bu nedenle antioksidan sistemi uyararak bu sistemin etkisini kuvvetlendirdiğı öne sürülmüştür (17, 18). Aynı zamanda ozon 2,3 DPG artışı yaparak hemoglobinden dokulara daha çok oksijen serbestlenmesini sağlar (19). TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-2 ve IL-8 artışı yaptığı, vasküler PGI $_2$  sentezini uyardığı ve bir immünmodülatör olduğı öne sürülmüştür (20, 21). Yapılan bir çalışmada ozon uygulamasının karaciğerde iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olduğı bildirilmiştir (22). Yine bir başka çalışmada ise beyin iskemisinde ön koşullama olarak kullanılarak etkisi hiperbarik oksijen tedavisiyle kıyaslanmıştır (23).

Ozonun kronik oksidatif strese yönelik adaptasyonu indüklediğı ilk olarak 1996 yılında ileri sürülmüştür (137). Başka çalışmalarda kontrollü ozon verilmesinin, oksidatif ön koşullama yaptığı ve oksidatif strese adaptasyonu sağlayarak reaktif oksijen türleri ile indüklenen hasarı azaltabileceğı gösterilmiştir (113, 138).

Literatürde iskemi reperfüzyon hasarına karşı ön koşul olarak ozon kullanımı ile ilgili çalışmalar vardır. Ajamieh ve ark. sıçanlarda oluşturdukları hepatik iskemi-

reperfüzyon modelinde iskemik ön koşullama ve ozon ön koşullamasının etkilerini karşılaştırmışlar ve biyokimyasal parametreler açısından iki yöntemin eş sonuçlar verdiğini fakat histopatolojik incelemede ozonun iyileştirme etkisinin üstün geldiğini bildirmişlerdir (139). Birçok çalışma karaciğerin yeniden oksijenasyonunu takiben oksijen serbest radikallerinin oluşmasının karaciğer hücre hasarı, nekroz/apoptoz ve sonrasında enflamatuar hücre infiltrasyonu kaskadını başlatabileceğini göstermiştir. Her ne kadar reaktif oksijen türleri birçok kaynaktan türeyebilirse de, ksantin oksidaz bu toksik oksijen türlerinin belirgin bir kaynağı olarak gösterilmiştir. İskemik ön koşullama, tekrarlanan kısa süreli iskemi/reperfüzyon ile ardından gelen iskemi reperfüzyona karşı koruma sağladığına inanılan potent, endojen bir mekanizmadır. Öte yandan, düşük dozlarda ozonun endojen antioksidan sistemlerin korunması ve aktive edilmesini sağlayarak oksidatif ön koşullama yapabildiği gösterilmiştir (140). Stadlbauer ve ark. kardiyak greft vericisi ve alıcısına transplantasyon öncesi intraperitoneal olarak ozon uygulamışlar ve transplantasyon sırasında gelişen iskemi-reperfüzyon hasarını azaltıcı etkisini histolojik ve biyokimyasal bulgularla göstermişlerdir (141). Son zamanlarda yapılan farmakolojik çalışmaların ışığında ozon, bir ön-ilaç olarak kabul edilebilir. Belirli toksik olmayan dozlarda biyokimyasal yolların yeniden düzenlenmesini indükleyebilir ve birçok sistemde ikincil mesajcıların aktivasyonunu sağlayabilir. Günümüzde düşük doz ozon ile antioksidan enzimlerin, nitrik oksit yolunun ve diğer hücreyel aktivitelerin düzenlenebileceği gösterilmiştir (140). Bu çalışmaların verilerinin doğrultusunda çalışmamızda ön koşul grubu oluşturuldu. Ön koşul grubunun histopatolojik bulgularında HİBH grubundakine göre daha olumlu sonuçlar elde edilmesine rağmen, davranış deneylerinde olumsuz sonuçlar alındı. Davranış deneylerinde daha iyi sonuç alabilmek için sonraki çalışmalarda ozon dozunun artırılması ve ardışık günlerde tekrarlayan uygulamalar ön koşul grubu için önerilebilir.

Karaciğerde yapılan çalışmalara ek olarak Calunga ve ark. tarafından yapılan çalışmada sıcak iskemiyeye maruz bırakılan sıçanlarda, böbreklerin ozona karşı biyolojik cevapları test edilmiş ve ozon tedavisi ile antioksidan enzim aktivitelerinin artırıldığı ve reaktif oksijen türlerinin toksik etkilerine karşı böbreklerde etkili bir savunma mekanizmasının oluşturulduğu bulunmuştur. Burada yapılan histolojik çalışmalarda

ozona ilişkin en iyi sonuçlar, iskemi-reperfüzyon hasarı oluşumundan önce en az 10 veya daha üzeri kürde ozon tedavisi alan sıçanlarda gözlenmiştir (142).

Bir diğer çalışmada intermitan kladikasyonu olan hemodiyaliz hastalarında, ozon ile otohemoterapi yapılmış ve ağrısız yürüme mesafesi ile maksimum yürüme mesafesi saptanmıştır. Oksijen ile kıyaslandığında, ozon ile otohemoterapi yapılan periferik arter hastalarında yürüme mesafesinin arttığı, iskeminin subjektif klinik bulgularının azaldığı gösterilmiştir (143) Yine periferik arter hastalığı ve diabetes mellitusu olan hastalarda yapılan bir çalışmada ozon terapisi yapılanlarda maksimum ağrısız yürüme mesafesinin arttığı tespit edilmiş, aynı zamanda kan ve plazma viskozitesinde de anlamlı azalmalar gözlemlenmiştir. Burada intermitan kladikasyoda azalmanın derecesi, ozon terapisi sonrasında kan viskozitesindeki azalma ile korele bulunmuştur (144).

Sanchez ve ark. yaptıkları bir çalışmada tip 2 diabetes mellitusu bulunan ve nöroenfeksiyöz diyabetik ayağı olan hastalarda ozon tedavisinin hiperglisemiye azaltarak glisemik kontrolü iyileştirdiğini, insülin duyarlılığını artırdığını ve diabetes mellitus ve komplikasyonları ile ilişkili oksidatif stresi iyileştirerek yara iyileşmesinde rol oynadığını öne sürmüştür. Bu çalışmada ozonun farmakodinamik etkilerinin süperoksitler üzerine olan etkilerine dayandığı belirtilmiştir. Ozon ile medikal tedavi alan grupta kontrol grubuna kıyasla lezyonlarda iyileşmenin daha fazla olduğu ve amputasyonların daha az görüldüğü belirtilmiş, bu özelliklerine dayanarak diabetes mellitus ve komplikasyonlarına yönelik alternatif bir tedavi metodu olabileceği belirtilmiştir. (145)

Merin O. ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada izole sıçan kalbinde ozon verilmesinin reperfüzyon hasarını azalttığı bildirilmiştir. (146)

Günümüzde iskemi-reperfüzyon hasarının etiyopatogenezinde oksijen serbest radikallerinin rol oynadığını söylemek mümkündür. Bu radikaller etkilerini sarkolemma fosfolipidlerinin oksidasyonu ve bunun sonucunda membran bütünlüğünün bozulması ile göstermektedirler. SOD, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi serbest radikal hasarını azaltan enzimlerin iskemi sonrasında miktarlarının azalmış olduğu tespit edilmiştir (147). Ozon ile karıştırılmış kanın reinfüzyonu ile iskemik alanlarda vazodilatasyon, SOD aktivasyonu ve glutatyon seviyesinde azalma meydana gelir. Bunun sonucunda oksidatif stresin azaltıldığı gösterilmiştir (148, 113). Bizim çalışmamızda da bu çalışmalara paralel olarak HİBH grubunda SOD aktivitesinin azaldığı ozon gruplarında

ise arttığı gözlenmiştir. Ozon gruplarında oluşan SOD aktivitesindeki bu artışında oksidatif stresi azaltıcı bir etkisinin olabileceği düşünülmüştür.

Medikal ozon daima saf ozon ve saf oksijenin karışımı şeklinde konsantrasyonu 1 ve 100 µg/ml (%0.05– 5 O<sup>3</sup>) arasında kullanılır ve antioksidandır. Bu etkinin IFN-β indüksiyonu, süperoksit dismutaz aktivasyonu, TGF-β indüksiyonu ile ortaya çıktığı düşünülmektedir. Süperoksit dismutaz aktivasyonu ile oksijen radikalleri azalırken, TGF-β indüksiyonu ile kollajen, proteoglikan ve hyaluronik asit üretimi uyarılır, proteaz ve proteaz inhibitörleri arasındaki oran modüle edilir (149).

Serebral palsy, işitme ve görme kayıpları, nöbetler, öğrenme güçlüğü gibi bir çok komplikasyona neden olan HİBH'yi (4) hücresele düzeyde nekroz ve apoptozu azaltarak tedavi etmek mümkündür (106). Erken dönemde hipoksi ve iskeminin neden olduğu hücre ölümü nekrozla oluşur. Geç dönemde ise nöronal ölüm; saatler ve günler içerisinde apoptozla sonuçlanan bir dizi karmaşık biyokimyasal ve moleküler olaylar sonucunda oluşur. Hipoksik-iskemi ve reperfüzyon evresini takiben oluşan hücresele olaylar zinciri eksitator bir aminoasit olan glutamatın aşırı salınımına, NMDA ve diğer reseptörlerin uyarılmasına, kalsiyumun hücre içinde artmasına, lipid peroksidasyonu ve arachidonic asit metabolitlerinin meydana gelmesine, SOR üretimine, kaspazlar aktivasyonuna, sonuç olarak geriye dönüşümsüz olarak hücre ölümüne neden olmaktadır (36).

Yapılan çalışmalar yenidoğan döneminde meydana gelen hipoksik iskemik beyin hasarında apoptozun en az nekroz kadar önemli olduğunu göstermektedir (36, 150). Apoptotik nöron sayısı ne kadar fazla ise hasar da o derece fazla olmaktadır. Bu nedenle apoptozu azaltmaya yönelik pek çok tedavi denenmektedir.

Perinatal HİE'de en önemli problem nöronların ve glial hücrelerin ölmeleri, buna karşı beyin ölen hücrelerin yerine yenilerini koyamamasıdır. Bu sebeple tedavi yöntemleri üç ana nokta üzerinde yoğunlaşmıştır. Bunlardan birincisi beyin hücrelerinin ölmesinin engellenmesi, ikincisi ölen hücrelerin yerine yenilerinin dışarıdan verilmesi, üçüncüsü ise beyin gerekli yeni hücreleri kendisinin yapması amacıyla desteklenmesidir.

HİBH'yi ve olumsuz etkilerini engellemeye yönelik tedavilerin sonuçlarını sıçanlarda biyokimyasal ve histopatolojik yöntemler ile bilişsel ve lokomotor yetilerin değerlendirilmesiyle göstermek mümkündür.

HİBH'yi kavrayabilmek amacıyla farklı deneysel hayvan modelleri kullanılmıştır. Bu modellerde beynin kan akımı ve oksijen yoğunluğu düşürülerek beynin belirli bölgelerinin nasıl etkilendiği araştırılmıştır (151, 152, 153). Bu çalışmalarda karotid arter veya orta serebral arterin kapatılmasıyla beyinde iskemi meydana getirilmiştir (154). Günümüzde yenidoğan HİBH'nin değerlendirildiği deneysel çalışmalarda en çok kullanılan model Rice ve Vannucci tarafından uygulanan yöntemdir (155). Bu modelde tek taraflı karotid arter bağlanmasıyla yanısıra deney hayvanları hipoksi odacıklarına konulmaktadır. Hipoksi modellerinde %5-10 oksijen ve %90-95 azot kullanılmaktadır. Çalışmamızda yedi günlük sıçanların sağ karotid arterleri bağlandıktan sonra derlenme sürecini takiben iki saat boyunca %8 oksijen ve %92 azot karışımıyla hipoksi oluşturulmuştur.

HİBH'nin insanlarda oluşturduğu klinik ve histopatolojik bulguları taklit edebilecek en uygun hayvanın hangisi olduğu tartışmalıdır. Bizim çalışmamızda da yedi günlük sıçanlar kullanılmıştır. Özellikle insanların beyin gelişimi göz önünde bulundurulduğunda, yedi günlük yavru sıçan beyinlerinin insanlardaki perinatal dönem için uygun olduğu düşünülmektedir (36).

Subtalamik nükleuslar, hipokampus ve paryetal korteks bölgelerindeki nöronların hipoksik-iskemik hasara daha duyarlı olduğu gösterilmiş ve apoptozisin histopatolojik değerlendirilmesi için bu bölgelerin araştırılması önerilmiştir (32, 2, 44). Bizim çalışmamızda da özellikle beynin bu bölgeleri incelenmiştir.

Yenidoğan sıçanlarda, iskemi ve 1-3 saatlik hipoksiden sonra beyinde apoptotik nöron sayısının, karotid arter bağlanması yapılan tarafta daha fazla olmak üzere, her iki beyin yarısında da arttığı, çalışmalarda gösterilmiştir (106).

Çalışmamızda, HİBH'nin ve HİBH'de ozon uygulamasının histopatolojik ve biyokimyasal etkileri, beyin dokularında apoptotik nöronlar sayılarak ve kan örneklerinde SOD ile MDA düzeylerine bakılarak değerlendirildi.

Apoptotik nöron sayısının artmasının HİBH'nin şiddetini artıracığı bilgisi doğrultusunda gruplar değerlendirildiğinde, TUNEL yöntemi ile grup 3 ve grup 4 sıçanların apoptotik nöron sayılarının HİBH'li gruptan anlamlı olarak az bulunması, ayrıca kaspaz-3 yöntemiyle de grup 4 sıçanların apoptotik nöron sayılarının shamdan anlamlı olarak fazla olmaması ozon uygulamasının apoptoza uğrayan nöron sayısını

etkileyebileceğini düşündürmektedir. Çıkarılan beyinlerin makroskopik görüntüleri ve ağırlıkları da bu görüşümü desteklemektedir.

Plazma MDA düzeyi artışı ile HİBH'nin şiddeti arasında paralel bir ilişki olduğu saptanmış, MDA düzeyi ne kadar yüksekse HİBH'nin de o kadar şiddetli olduğu gösterilmiştir (29). Çalışmamızda da en yüksek ortalama MDA düzeyi ozon uygulanan grup 3 ve grup 4 sıçanlarda ölçüldü fakat bu değerler grup 2'nin plazma MDA düzeyinden anlamlı olarak yüksek değildi.

Süperoksit dismutaz enzimi süperoksidin, hidrojen peroksid ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Hücresel düzeydeki süperoksidin en önemli düzenleyicisidir. Ozon uygulamasının SOD miktarını artırdığı bildirilmiştir (17). Sunulan çalışmada da en yüksek SOD düzeylerinin ozon uygulanan grup 3 ve grup 4 sıçanlarda olduğu belirlendi. Bu iki grup ile diğer gruplar arasında SOD düzeyi bakımından anlamlı bir fark gözlemlenmedi.

Sıçanların bilişsel ve lokomotor yetilerini değerlendirme amacıyla kullanılan davranış deneylerinin, sıçanların nöromotor gelişimini tamamladığı 80-85. günlerden sonra (24) ve/veya ortalama 180-400 gr ağırlığındaki erişkin erkek sıçanlarda uygulanması önerilmektedir (25). Literatürde sıçanların cinsiyetlerine göre de farklı davranışlar sergilediği, bu olayın hormonal farklılık ve hipokampus gelişimdeki farktan kaynaklandığı ve özellikle uzaysal öğrenmenin değerlendirilmesinde erkek cinsiyetin daha uygun olduğu bildirilmektedir (120-122). Bu nedenle bizim çalışmamızda da son yıllarda yapılan pek çok hayvan davranış deneyi çalışmasında olduğu gibi erkek sıçanlar kullanılmıştır.

Hayvan davranış deneylerinde, sıçanların stres ve anksiyeteye girerek beklenenden farklı davranışlar sergiledikleri bilinmektedir. Daha önce yapılmış çalışmaların bulguları doğrultusunda Ehman ve Moser, bu durumu en aza indirmek amacıyla düzeneklerin siyaha boyanmasını, deneyin yapıldığı odanın loş bir şekilde aydınlatılmasını, aynı gün içinde tekrarların yapıldığı çalışmalarda sıçanların yorulmaması için atışlar arasında yeterince süre bırakılmasını, su tankı deneyinde yükseltinin sıçanın büyüklüğüne uygun olacak şekilde su altına gizlenmesini ve sıçanların vücut sıcaklıklarının korunması amacıyla önlem alınmasını önermiştir (156).

Açık alan düzeneği kare veya daire şekilli olabilmekle birlikte, deneylerde en fazla 1 m<sup>2</sup>'lik kare zemin üzerine yerleştirilen 30 cm yükseklikteki duvarları olan, üstü

açık bir düzenek kullanılmaktadır (126). Açık alan deneyi genellikle her sıçana bir defa, 2-20 dakika süreyle uygulanmaktadır (125, 126). Açık alan, sıçanların lokomotor aktivitesini değerlendirmede en sık kullanılan düzenektir. Locomotor aktivite; katedilen mesafe ve hareket hızının ölçümüyle değerlendirilebilmektedir (126). Yapılan çalışmalarda, lokomotor etkilenmesi olan sıçanların açık alan deneyinde kontrol grubuna göre daha yavaş hareket ettikleri ve daha az mesafe katettikleri gösterilmiştir. Açık alana bırakılan hayvanın kendi ortamından alınıp tek başına bilmediği farklı bir ortama bırakılması sıçanlarda anksiyete meydana getirir. Stresin sıçanların köşelerde donup kalmasına neden olacağı gibi aşırı hareketli olmasına da sebep olabileceği iddia edilmektedir (157, 158). Ancak çalışmamızın bu aşaması, bütün sıçanlar için eşit şartların oluşturulduğu bir odada yapıldı. Uygulamalar aynı kişi tarafından yapıldığından, anksiyete-stres gibi problemlerin tüm sıçanları eşit düzeyde etkilemesi sağlanmıştır. Çalışmamızda açık alan deneyinde grupların katetikleri mesafe ve hareket hızları değerlendirildiğinde bu parametreler için gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu sonuç dikkate alındığında da HİBH'nin lokomotor etkilerini göstermek için sonraki çalışmalarda daha ağır hipoksi yapılması ve açık alanda kalma sürelerinin uzatılması önerilebilir.

Sıçanlar 14 haftalık olduğunda uyguladığımız Morris Su Tankı Deneyleri hakkında yapılmış pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu deneylerde kullanılan havuzların, yükseltelerin çapları ve yükseklikleri değişkenlik göstermektedir. Son yıllarda 150 cm çap ve 45-60 cm yükseklikteki havuzlar daha fazla kullanılmaktadır. Bu havuzlar galvanizli saçtan, fiberglastan ve poliüretandan üretilmektedir. Öğrenme ve bellek değerlendirmesi için bu bilgiler ışığında çalışmamızda galvanizli saçtan üretilen, 150 cm çap ve 60 cm yükseklikte, içi siyaha boyanmış bir su tankı ve 15 cm çapında daire şekilli bir yükselti kullanıldı.

Literatürde Morris su tankı ile özellikle uzaysal öğrenmenin değerlendirildiği ve bu yetinin de hipokampal fonksiyonlarla ilgili olduğu bildirilmiştir (129, 27). HİBH meydana gelmiş sıçanlarda kontrol grubuna göre gizli yükseltiyi bulma süresinin daha uzun olduğu tespit edilmiştir (24, 159, 160, 161). Çalışmamızda grupların ilk dört günde yükseltiyi bulma süreleri incelendiğinde tüm gruplar için günler ilerledikçe bulma süreleri anlamlı olarak düşmekteydi. En kısa ortalama bulma süreleri grup 1 sıçanlara aitti ve birinci gün hariç diğer günlerde grup 2, 3 ve 5'ten anlamlı olarak farklıydı.



İkinci en kısa değerler HİBH'nin yapıldığı gün ozon verdiğimiz grup 4'e aitti ve dördüncü gün bu grup, grup 2, 3 ve 5'ten anlamlı olarak daha hızlı yükseltiyi buldu. Grup 1 ve grup 4 kendi aralarında karşılaştırıldığında 2. gün hariç diğer günlerde grup 1'in değerleri anlamlı olarak daha kısaydı.

Öğrenme kriteri olarak incelediğimiz diğer bir parametre olan birinci gün ile dördüncü gün arasındaki yükseltiyi bulma süresi farkına bakılacak olursa, öğrenmenin en iyi olduğu belirlenen grup 1 ve grup 4 arasında anlamlı fark gözlenmiyordu. Bu gruplarla grup 2,3 ve 5 arasında ise anlamlı fark vardı. Ozon uyguladığımız grup 4'ün hem ilk dört günlük performansı hem de birinci gün ile dördüncü gün arasındaki yükseltiyi bulma süresi farkı parametresindeki değerleri HİBH'de ozon uygulaması için kayda değer verilerdir.

Öğrenme ve hafıza deneylerinin 5. gününde, sıçanların yükseltinin yerini öğrendiklerini teyit etmek ve yükseltiyi bulmalarının tesadüf olmadığını göstermek için yükselti çıkarıldı ve sıçanların eskiden yükseltinin olduğu doğu kadranında geçirdikleri süre incelendi. Doğu kadranında en fazla süreyi grup 1 ve grup 4 sıçanların geçirdiği ölçüldü. Bu 2 grupta da sıçanların doğu kadranında geçirdikleri süre diğer kadranlarda geçirdikleri süreden anlamlı olarak fazlaydı. Diğer gruplarda anlamlı bir fark gözlenmedi.

İlk dört gün yükseltiyi bulma süresi, birinci gün ile dördüncü gün arasındaki yükseltiyi bulma süresi farkı ve doğu kadranında geçirilen süre parametrelerinin hepsi birlikte değerlendirildiğinde HİBH uygulandıktan sonra hemen ozon verilen grup 4, HİBH'nin tedavisinde ozon kullanımı ile ilgili yeni çalışmalar yapmak için bizi umutlandırmaktadır.

## 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. Hipoksi-iskemi uygulamasını takiben dekapite edilen yedi günlük sıçanların beyinleri makroskopik olarak normal görünümdeydi. TUNEL ve Kaspaz-3 yöntemiyle yapılan sayımlarda iskemi modeliyle apoptotik hücre sayısında artış gözlemlendi. Sağ beyin yarısında TUNEL yöntemiyle tespit edilen apoptotik nöron sayılarının istatistiksel değerlendirmesinde, sadece 3. ve 4. grup arasında fark gözlemlenmedi ( $p=0,803$ ), diğer gruplar arasında ise apoptotik nöron sayısı bakımından anlamlı fark vardı ve en düşük nöron sayısı sham grubu olan grup 1'deydi. Beynin sağ yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle yapılan apoptotik hücre sayılarının değerlendirilmesinde; grup 1-grup 2, grup 1-grup 3 ve grup 2-grup 4 arasında anlamlı fark olduğu gözlemlendi (sırasıyla  $p<0,001$ ,  $p=0,011$  ve  $p=0,014$ ), diğer gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu. Her iki yöntemle de grupların kendi içlerinde sağ ve sol beyinleri arasındaki apoptotik nöron sayılarının farkı değerlendirildiğinde, sham grubu hariç tüm gruplardaki sıçanların sağ beyinlerindeki apoptotik nöron sayıları sol beyinlerindeki anlamlı olarak fazla bulunmuştur.
2. Doğumu takiben yedinci gün yapılan HİBH' den sonra kalp içi girişimle alınan kan örneklerinde en yüksek ortalama MDA düzeyi grup 3'deki sıçanların plazmalarında saptandı. Plazma MDA düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılmasında grup 1-grup 3 ve grup 1-grup 4 arasında anlamlı bir fark gözlemlendi (sırasıyla  $p=0,008$ ,  $p=0,018$ ), diğer gruplar arasında ise anlamlı fark yoktu.
3. Doğumu takiben yedinci gün yapılan HİBH' den sonra kalp içi girişimle alınan kan örneklerinde en yüksek ortalama SOD aktivitesi grup 3'deki sıçanlarda saptandı. SOD aktivitesinin gruplar arası karşılaştırılmasında herhangi anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p=0,253$ ).

4. Açık alan deneyinde ortalama katedilen mesafe ve hareket hızlarının gruplara göre karşılaştırılmasında her iki parametre için de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla  $p=0,241$  ve  $p=0,238$ ).
5. Morris su tankı Öğrenme ve hafıza deneylerinin ilk dört gününde yükseltiyi bulma süreleri incelendiğinde, Grup 1’de günler ilerledikçe yükseltiyi bulma süreleri anlamlı olarak azalıyordu ( $p<0,001$ ). Diğer grupların tamamında ise sadece 1. ve 2. günler arasında yükseltiyi bulma süreleri bakımından anlamlı fark bulunmazken, diğer günlerde bulma süreleri birinci günle kıyaslandığında istatistiksel bakımdan anlamlı olarak azalıyordu. Günlere göre grupların birbiriyle karşılaştırılmasında ise en kısa ortalama yükseltiyi bulma süreleri grup 1 sıçanlara aitti ve birinci gün hariç diğer günlerde grup 2, 3 ve 5’ten anlamlı olarak farklıydı. Grup 1’den sonra en kısa değerler HİBH’nin yapıldığı gün ozon verdiğimiz grup 4’e aitti ve dördüncü gün bu gruptaki sıçanlarda grup 2, 3 ve 5’ten anlamlı olarak daha hızlı yükseltiyi buldu. Grup 1 ve grup 4 kendi aralarında karşılaştırıldığında 2. gün hariç diğer günlerde grup 1’in değerleri anlamlı olarak daha kısaydı.
6. Birinci gün ile dördüncü gün arasındaki yükseltiyi bulma süresi farkı incelendiğinde, en fazla süreyi düşüren ve en iyi öğrenmiş olarak ölçülen gruplar olan grup 1 ve grup 4 arasında anlamlı fark gözlenmiyordu. Bu gruplarla grup 2, 3 ve 5 arasında ise anlamlı fark vardı (grup 1 ve diğer gruplar arasında  $p<0,001$ , grup 4 ile grup 2 arası  $p=0,015$ , grup 4 ile grup 3 arası  $p=0,001$ , grup 4 ile grup 5 arası  $p=0,037$  ).
7. Öğrenme ve hafıza deneylerinin 5. gününde sıçanların eskiden yükseltinin olduğu doğru kadranında geçirdikleri sürele bakıldığında, doğru kadranında en fazla süreyi grup 1 ve grup 4 sıçanların geçirdiği ölçüldü. Bu 2 grupta sıçanların doğru kadranında geçirdikleri süre diğer kadranlarda geçirdikleri süreden anlamlı olarak fazlaydı ( $p<0,001$ ). Diğer gruplarda anlamlı bir fark gözlemlenmedi (grup 2  $p=0,577$ , grup 3  $p=0,382$ , grup 5  $p=0,111$ ).

8. 16 haftalıkken dekapite edilen sıçanların beyin ağırlıklarına bakıldığında Grup 1'deki sıçanların beyin ağırlığının diğer gruplardan anlamlı olarak fazla olduğu görüldü ( $p < 0,001$ ). En düşük beyin ağırlıklarında grup 2 ve grup 5'de ölçüldü.
9. 16. haftada sıçanların vücut ağırlıkları tartıldığında gruplar ağırdan hafife doğru 1, 3, 4, 2 ve 5 olarak sıralanıyordu. Gruplar arasında anlamlı fark gözlemlenmedi ( $p=0,059$ ).
10. Öğrenme ve hafıza deneyi sonuçlarının daha iyi irdelenebilmesi amacıyla sıçanlara yükseltiyi bulması için verilen sürenin 120-180 saniyeye çıkarılması önerilebilir.
11. Ozonun etkilerinin daha iyi gösterilebilmesi için sonraki çalışmalarımızda ardışık günlerde tekrarlayan ozon uygulamaları yapılabilir.
12. Antioksidan, antiinflamatuvar ve antienfektif özellikleri ile ozon vazooklüzif hastalıkların tedavisinde yeni bir alternatif olarak gözükmeyle birlikte klinikte uygulanabilmesi için uygulama zamanı, dozu, tekrar sayısı ve endikasyonlarının belirlenmesi ileride yapılacak çalışmalarla mümkün olacaktır.
13. Diğer çalışmalarda ortaya konan ozon ile ilgili başarılı klinik uygulamalar göz önüne alınacak olursa, başarılı hayvan modellerinde test edildikten sonra uygun deneysel modellerde yapılacak insan çalışmalarına da ihtiyaç vardır. Her ne kadar ozon tedavisi başarılı örneklere sahip olsa da, kanıta dayalı tıp kapsamında etkinliği mutlaka bilimsel verilerle doğrulanmalıdır.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Hill A, Volpe JJ.** Hypoxic-ischemic Cerebral Injury in the Newborn. In: Swaimann KF Eds. *Pediatric Neurology*, 2<sup>nd</sup> Ed. St.Louis: Mosby Year Book, **1994**: 489-508.
2. **Hossan MA.** Molecular mediators of hypoxic-ischemic injury and implications for epilepsy in the developing brain. *Epilepsy Behav*, **2005**; 7: 204-13.
3. **Vannucci RC.** Hypoxic-ischemic encephalopathy. *Am J Perinatol*, **2000**; 17: 113-20.
4. **Jerome YY.** Animals Models of Hypoxic-Ischemic Brain Damage in the Newborn. *Seminars in Pediatric Neurology*, **2004**; 11: 31-46.
5. **Shankaran S, Lupton AR, Ehrenkranz RA.** Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *N Engl J Med*, **2005**; 353: 1574-84.
6. **Delivoria PM, Mishra OP.** Mechanism of perinatal cerebral injury in fetus and newborn. *Ann N Y Acad Sci*, **2000**; 900:1 59-68.
7. **Akhlaq AF, Wei YO, Lloyd AH.** Inhibitors of Brain Phospholipase A2 Activity: Their Neuropharmacological Effects and Therapeutic Importance for the Treatment Neurologic Disorders. *Pharmacol Rev*, **2006**; 58: 591-620.
8. **William MA.** Role of altered cyclooxygenase metabolism in impaired cerebrovasodilatation to nociceptin/orphanin FQ following brain Injury. *Brain Research Bulletin*, **2000**; 53: 807-12.
9. **Ge QF, Wei EQ, Zhang WP, Hu X, Huang XJ, Zhang L, Song Y, Ma ZQ, Chen Z, Luo JH.** Activation of 5-lipoxygenase after oxygen-glucose deprivation is partly mediated via NMDA receptor in rat cortical neurons. *Journal of Neurochemistry*, **2006**; 97: 997-1004.
10. **Legido A, Valencia I, Katsetos CD, Delivoria PM.** Neuroprotection in perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. Effective treatment and future perspectives. *Medicina*, **2007**; 67: 543-55.
11. **Sies H.** Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*, **1991**; 91: 31-8.
12. **Yoshida E, Mokuno K, Aoki S, Takahashi A, Riku S, Murayama T, Yanagi T, Kato K.**

Cerebrospinal fluid levels of superoxide dismutases in neurological diseases detected by sensitive enzyme immunoassays. *J Neurol Sci*, **1994**; 124: 25-31.

13. **Alvarez RG, Zamora ZB, Borrego A, Delgado R, Schulz S, Alonso Y.** Ozone oxidative preconditioning reduces nitrite levels in blood serum in LPS: induced endotoxic shock in mice. *Inflamm Res*, **2009**; 58: 441–443.
14. **Zamora ZB, Borrego A, Lopez OY, Delgado R, Gonzalez R, Menendez S, Hernandez F and Schulz S.** Effects of Ozone Oxidative Preconditioning on TNF- $\alpha$  Release and Antioxidant-Prooxidant Intracellular Balance in Mice During Endotoxic Shock. *Mediators of Inflammation*, **2005**; 1: 116–22
15. **Bette M, Nusing RM, Mutters R, Zamora ZB, Menendez S, Schulz S.** Efficiency of tazobactam/piperacillin in lethal peritonitis is enhanced after preconditioning of rats with O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub>-pneumoperitoneum. *Shock*, **2006**; 25: 23-29.
16. **Guzman RG, Arriaga V, Kendrick KM, Bernal C, Vega X, Mercado-Gomez OF, Rivas-Arancibia S.** Estradiol prevents ozone-induced increases in brain lipid peroxidation and impaired social recognition memory in female rats. *Neuroscience*, **2009**; 159: 940–950.
17. **Borrego A, CA, Zamora ZB, Gonzalez R, Romay C, Menendez S, Hernandez F, Montero T, Rojas E.** Protection by ozone preconditioning is mediated by the antioxidant system in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Mediators of Inflammation*, **2004**; 13(1): 13-19.
18. **Güven A, Gundogdu G, Vurucu S, Uysal B, Öztas E, Öztürk H, Korkmaz A.** Medical ozone therapy reduces oxidative stress and intestinal damage in an experimental model of necrotizing enterocolitis in neonatal rats. *J Pediatr Surg*, **2009**; 44(9): 1730-5.
19. **Coppola L, Giunta R, Verrazzo G, Luongo C, Sammartino A, Vicario C, Giugliano D.** Influence of ozone on haemoglobin oxygen affinity in type-2 diabetic patients with peripheral vascular disease: in vitro studies. *Diabete Metab*, **1995**; 21(4): 252-5.
20. **Valacchi G, Bocci V.** Studies on the biological effects of ozone: 10. Release of factors from ozonated human platelets. *Mediators Inflamm*, **1999**; 8(4-5): 205-9.
21. **Valacchi G, Bocci V.** Studies on the biological effects of ozone: 11. Release of factors from human endothelial cells. *Mediators Inflamm*, **2000**; 9(6): 271-6.
22. **Peralta C, León OS, Xaus C, Prats N, Jalil EC, Sala Planell E, Puig-Parellada P, Gelpí E, Roselló-Catafau J.** Protective effect of ozone treatment on the injury associated with hepatic ischemia-reperfusion: Antioxidant-prooxidant balance. *Free Radical Research*, **1999**; 31(3): 191-96.

23. **Oter S, Seyrek M, Sadir S, Duz B, Topal T, Kaplan M, Korkmaz A, Kahraman S, Obut S.** Effectiveness of hyperbaric oxygen and medical ozone pretreatment against oxidative stress after global cerebral ischemia in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **2009**; 29: 413-414.
24. **Pereria LO, Arteni NS, Peterson RC, Padilha da Rocha A, Achaval M, Netto CA.** Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, **2007**; 87: 101-8.
25. **Szyndler J, Piechal A, Blecharz-Klin K, Skórzewska A, Maciejak P, Walkowiak J, Turzyńska D, Bidziński A, Płaźnik A, Widy-Tyszkiewicz E.** Effect of kindled seizures on rat behavior in water Morris maze test amino acid concentrations in brain structures. *Pharmacological Reports*, **2006**; 58: 75-82.
26. **Nowakawska E, Kus K, Czubak A, Glowacka D, Matschay A.** Some Behavioural effects of carbamazepin-comparison with haloperidol. *Journal of Physiology and Pharmacology*, **2007**; 58: 253-64.
27. **Morris RGM.** Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv*, **1981**; 12: 239-60.
28. **Nicholas A, Munhoz CD, Ferguson D, Campbell L, Sapolsky R.** Enhancing Cognition after stress with Gen Therapy. *The Journal of Neuroscience*, **2006**; 26: 11637-43.
29. **Kumar A, Ramakrishna SV, Basu S, Rao GR.** Oxidative stress in perinatal asphyxia. *Pediatr Neurol*, **2008**; 38: 181-5.
30. **Johnston MV, Hoon Jr AH.** Possible mechanisms in infants for selective basal ganglia damage from asphyxia, kernicterus, or mitochondrial encephalopathies. *J Child Neurol*, **2000**; 15: 588-91.
31. **William LS, Garg BP, Cohen M, Fleck JD, Biller J.** Subtypes of ischemic stroke in children and young adult. *Neurology*, **1997**; 49: 1541-45.
32. **Vannucci SJ, Hagberg H.** Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J Exp Biol*, **2004**; 207: 3149-54.
33. **Levene MI, de Vries L.** Hypoxic-ischemic encephalopathy. In: Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh MC. Eds. *Neonatal-Perinatal Medicine*. 8<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Elsevier, **2006**: 938-56.
34. **Verklan MT.** The chilling details: hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Perinat Neonatal Nurs*, **2009**; 23: 59-68.
35. **Çelik Y.** Hipoksik İskemik Beyin Hasarı Oluşturulmuş Yenidoğan Sıçanlara Çok Yönlü

Astroisit Kök Hücre ile Birlikte Fibroblast Büyüme Faktörü-2 Verilmesinin Bilişsel ve Motor Yetiler Üzerine Etkileri. Uzmanlık Tezi, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Anabilim Dalı, Mersin, **2011**.

- 36. Northington JF, Graham EM, Martin LJ.** Apoptosis in perinatal hypoxic–ischemic brain injury: how important is it and should it be inhibited?. *Brain Res Rev*, **2005**; 50: 244-57.
- 37. Vries LS, Larocche JC, Levene MI.** Cerebral ischaemic lesions. In: Levene MI, Bennett MJ, Punt J. Eds. *Fetal and Neonatal Neurology and Neurosurgery*. Edinburg: Churchill Livingstone, **1988**; 326-338.
- 38. Kjellmer I.** Prenatal and intrapartum asphyxia. In: Levene MI, Bennett MJ, Punt J, Eds. *Fetal and Neonatal Neurology and Neurosurgery*. Edinburg: Churchill Livingstone, **1988**: 357-392.
- 39. Johnston MV.** Excitotoxicity in neonatal hypoxia. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, **2001**; 7: 229-34.
- 40. Choi DW, Rothman SW.** The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci*, **1990**; 13: 171-82.
- 41. Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, Nakaji W.** Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatr Res*, **2001**; 49: 735–41.
- 42. Özkan A.** Hipoksik İskemik Beyin Hasarı Oluşturulmuş Yenidoğan Sıçanlarda Tümör Nekrozis Faktör Alfa Baskılayıcısı (Etanersept) ve Nitrik Oksit Sentaz Baskılayıcısı (L-NAME) Uygulamasının Nöronal Apoptozis ve Motor Yetiler Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Anabilim Dalı, Mersin, **2009**.
- 43. Amar AP, Levy ML.** Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery*, **1999**; 44: 1027-1039.
- 44. Berksoy İ.** Ac-DMQD-CHO Nöroprotektif etkilerinin deneysel spinal kord travması modelinde incelenmesi. Uzmanlık Tezi, Taksim Eğit. Araş. Hast. Nöroşirürji, İstanbul, **2004**.
- 45. Rodrigo J, Fernandez AP, Serrano J, Peinado M A, Martinez A.** The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. *Free Radic Biol Med*, **2005**; 39: 26-50.
- 46. Dawson DA.** Nitric oxide and focal cerebral ischemia: multiplicity of actions and diverse outcome. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, **1994**; 6: 299-324.
- 47. Shalak L, Perlman JM.** Hypoxic-ischemic brain injury in the term infant-current concepts. *Early Hum Dev*, **2004**; 80:125- 41.



48. **Bonfold E, Krainc D, Ankarcona M, Nicotera P, Lipton SA.** Apoptosis and necrosis: two distinct events, induced respectively by mild and intense insults with N methyl-dopartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci*, **1995**; 92: 7162-6.
49. **Edwards AD, Mehmet H.** Apoptosis in perinatal hypoxic–ischemic cerebral damage. *Neuropathol Appl Neurobiol*, **1996**; 22: 494-8.
50. **Chao DT, Korsmeyer SJ.** BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual Review of Immunology*, **1998**; 16: 395-419.
51. **Renehan AG, Booth C, Potten CS.** What is apoptosis, and why is it important? *British Medical Journal*, **2001**; 322: 1536-8.
52. **Büyükdereli Z.** Hipoksik İskemik Beyin Hasarı Oluşturulmuş Yenidoğan Sıçanlarda Trombosit Uyarıcı Faktör Antagonisti Uygulamasının Bilişsel ve Motor Yetiler Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Anabilim Dalı, Mersin, **2008**.
53. **Can G.** Perinatal asfiksi. In: Yurdakök M, Erdem G. Eds. *Neonatoloji*. 1<sup>st</sup>. Ankara: Alp Ofset, **2004**: 719-29.
54. **Apak S.** Hipoksik iskemik ensefalopati. In: Dağoğlu T, Ovalı F. Eds. *Neonatoloji*, 2<sup>nd</sup> Ed. İstanbul: Nobel Matbaacılık, **2007**: 651-66.
55. **Pierrat VHN, Liska A, Thomas D, Subtil D, Truffert P.** Prevalence, causes, and outcome at 2 years of age of newborn encephalopathy: population based study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, **2005**; 90: 257–261.
56. **Riviello P, de Rogalski Landrot I, Holmes GL.** Lack of cell loss following recurrent neonatal seizures. *Brain Res*, **2002**; 135: 101.
57. **Gomella TL.** Neonatology. 6<sup>th</sup> Ed. Newyork: Mc Graw Hill Medical, **2009**: 624-36.
58. **American Collge of Obstetricians and Gynecologists (ACOG).** Neonatal encephalopathy and cerebral palsy: executive summary. *Obstet Gynecol*, **2004**; 103: 780-1.
59. **Ramaswamy V, Horton J, Vandermeer B, Buscemi N, Miller S, Yager J.** Systematic review of biomarkers of brain injury in term neonatal encephalopathy. *Pediatr Neurol*, **2009**; 40: 215-26.
60. **Voorthies TM, Lipper EG, Lee BC.** Oclusive vascular disease in asphyxiated newborn infants. *J Pediatr*, **1984**; 105: 92-96.

61. **Sarnat HB, Sarnat MS.** Neonatal encephalopathy following fetal distress. A clinical and electroencephalographic study. *Arch Neurol*, **1976**; 33: 696-705.
62. **Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D.** Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev*, **2001**; 53: 135-59.
63. **Rutherford M, Malamateniou C, McGuinness A, Allsop J, Biarge MM, Counsell S.** Magnetic resonance imaging in hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Hum Dev*, **2010**; 86: 351-60.
64. **Fan X, Kavelaars A, Heijnen CJ, Groenendaal F, van Bel F.** Pharmacological neuroprotection after perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Curr neuropharmacol*, **2010**; 8: 324-34.
65. **Glass HC, Ferriero DM.** Treatment of hypoxic-ischemic encephalopathy in newborns. *Curr. Treat Options Neurol*, **2007**; 9: 414-423.
66. **Gonzalez FF, Ferriero DM.** Therapeutics for neonatal brain injury. *Pharmacol Ther*, **2008**; 120: 43-53.
67. **Pryds O, Greisen G, Lou H, Friis-Hansen B.** Vasoparalysis associated with brain damage in asphyxiated term infants. *J Pediatr*, **1990**; 117: 119-25.
68. **Vannucci RC.** Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia: relation to perinatal brain damage. *Pediatr Res*, **1990**; 27: 317-26.
69. **Berger R, Garnier Y, Jensen A.** Perinatal brain damage: underlying mechanisms and neuroprotective strategies. *J Soc Gynecol Investig*, **2002**; 9: 319-28.
70. **Vannucci RC, Vannucci SJ.** A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Ann N Y Acad Sci*, **1997**; 835: 234-49.
71. **Vannucci RC, Yager JY.** Glucose, lactic acid, and perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Pediatr Neurol*, **1992**; 8: 3-12.
72. **Vannucci RC, Muijsce DJ.** Effect of glucose on perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Biol Neonate*, **1992**; 62: 215-24.
73. **Glass HC, Glidden D, Jeremy RJ, Barkovich AJ, Ferriero DM, Miller SP.** Clinical neonatal seizures are independently associated with outcome in infants at risk for hypoxic-ischemic brain injury. *J Pediatr*, **2009**; 155: 318-23.

74. **Wirrell EC, Armstrong EA, Osman LD, Yager JY.** Prolonged seizures exacerbate perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Pediatr Res*, **2001**; 50: 445–54.
75. **Miller SP, Weiss J, Barnwell A, Ferriero DM, Latal-Hajnal B, Ferrer-Rogers A, Newton N, Partridge JC, Glidden DV, Vigneron DB, Barkovich AJ.** Seizure-associated brain injury in term newborns with perinatal asphyxia. *Neurology*, **2002**; 58: 542–8.
76. **Busto R, Mordecai Y-T, Globus, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD.** Effect of Mild Hypothermia on ischemia-Induced Release of Neurotransmitters and Free Fatty Acids in Rat Brain. *Stroke*, **1989**; 20: 904-10.
77. **Laptook AR, Corbett RJ, Burns D, Sterett R.** Neonatal ischemic neuroprotection by modest hypothermia is associated with attenuated brain acidosis. *Stroke*, **1995**; 26: 1240-6.
78. **Gunn AJ, Gluckman PD, Gunn TR.** Selective head cooling in newborn infants after perinatal asphyxia: a safety study. *Pediatrics*, **1998**; 102: 885-92.
79. **Azzopardi D.** Pilot study of treatment with whole body hypothermia for neonatal encephalopathy. *Pediatrics*, **2000**; 106: 684-94
80. **Batin MR, Dezoete JA, Gunn TR, Gluckman PD, Gunn AJ.** Neurodevelopmental outcome of infants treated with head cooling and mild hypothermia after perinatal asphyxia. *Pediatrics*, **2001**; 107(3): 480-4.
81. **Bernard SA, Gray TW, Buist MD, Jones BM, Silvester W, Gutteridge G, Smith K.** Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N ENG J Med*, **2002**; 346 (8): 557-63
82. **Edwards AD, Yue X, Squier MV.** Specific inhibition of apoptosis after cerebral hypoxia-ischemia by moderate post-insult hypothermia. *Biochem Biophys Res Comm*, **1995**; 217 (3): 1193-99.
83. **Chu K, Park KI, Lee ST, Jung KH, Ko SY, Kang L, Sinn DI, Lee YS, Kim SU, Kim M, Roh JK.** Combined treatment of vascular endothelial growth factor and human neural stem cells in experimental focal cerebral ischemia. *Neurosci Res*, **2005**; 53 (4): 384-90.
84. **Yanqing Z, Yu-Min L, Jian Q, Bao-Guo X, Chuan-Zhen L.** Fibronectin and neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor in focal cerebral ischemia. *Brain Res*, **2006**; 1098: 161-9.
85. **Zheng T, Laywell ED, Steindler DA.** Transplantation of an indigenous neural stem cell population leading to hyperplasia and atypical integration. *Cloning Stem Cells*, **2002**; 4: 3-8.

86. **Hayashi T, Iwai M, Ikeda T, Jin G, Nagano I, Abe K.** Neural precursor cells division and migration in neonatal rat brain after ischemic/hypoxic injury. *Brain Res*, **2005**; 1038: 41-49.
87. **Kelen D, Robertson NJ.** Experimental treatments for hypoxic ischaemic encephalopathy. *Early Hum Dev*, **2010**; 86: 369-77.
88. **Khan M, Sekhon B, Jatana M, Giri S, Gilg AG, Sekhon C, Singh I, Singh AK.** Administration of N- acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a rat model of experimental stroke. *J Neurosci Res*, **2004**; 76: 519–27.
89. **Schendel DE, Berg CJ, Yeargin-Allsopp M, Boyle CA, Decoufle P.** Prenatal magnesium sulfate exposure and the risk for cerebral palsy or mental retardation among very low-birth-weight children aged 3 to 5 years. *JAMA*, **1996**; 276: 1805-10.
90. **Bhat MA, Charoo BA, Bhat JI, Ahmad SM, Ali SW, Mufti MU.** Magnesium sulfate in severe perinatal asphyxia: a randomized, placebo-controlled trial. *Pediatrics*, **2009**; 123: 764-9.
91. **Spandou E, Soubasi V, Papoutsopoulou S, Augoustides-Savvopoulou P, Loizidis T, Pazaiti A, Karkavelas G, Guiba-Tziampiri O.** Neuroprotective effect of long-term MgSO<sub>4</sub> administration after cerebral hypoxia-ischemia in newborn rats is related to the severity of brain damage. *Reprod Sci*, **2007**; 14: 667–677.
92. **Franks N, Dickinson R, de Sousa S, Hall A, Lieb W.** How does xenon produce anaesthesia?. *Nature*, **1998**; 26: 324.
93. **Dingley JTJ, Porter H, Thoresen M.** Xenon provides short-term neuroprotection in neonatal rats when administered after hypoxia-ischemia. *Stroke*, **2006**; 37: 501–6.
94. **Ma D, Hossain M, Chow A, Arshad M, Battson RM, Sanders RD, Mehmet H, Edwards AD, Franks NP, Maze M.** Xenon and hypothermia combine to provide neuroprotection from neonatal asphyxia. *Ann Neurol*, **2005**; 58: 182–93.
95. **Palmer C, Towfighi J, Roberts RL, Heitjan DF.** Allopurinol administered after inducing hypoxia-ischemia reduces brain injury in 7-day-old rats. *Pediatr Res*, **1993**; 33: 405–11.
96. **Chaudhari T, McGuire W.** Allopurinol for preventing mortality and morbidity in newborn infants with suspected hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Sys Rev*, **2008**; 16 (2):
97. **Kumral A, Tüzün F, Oner MG, Genç S, Duman N, Ozkan H.** Erythropoietin in neonatal brain protection: The past, the present and the future. *Brain Dev*, **2011**; 33: 32-43.
98. **Tarcan A.** Prematüre anemisi. *J Paediatr Child Health*, **2010**; 53: 298-304.

99. **Ruth V, Widness JA, Clemons G, Raivio KO.** Postnatal changes in serum immunoreactive erythropoietin in relation to hypoxia before and after birth. *J Pediatr*, **1990**; 116: 950–4.
100. **Kellert BA, McPherson RJ, SE J.** A comparison of high-dose recombinant erythropoietin treatment regimens in brain-injured neonatal rats. *Pediatr Res*, **2007**; 61: 451–5.
101. **Gonzalez FF, McQuillen P, Mu D, Chang Y, Wendland M, Vexler Z, Ferriero DM.** Erythropoietin enhances long-term neuroprotection and neurogenesis in neonatal stroke. *Dev Neurosci*, **2007**; 29: 321–30.
102. **Schurr A.** Neuroprotection against ischemic/hypoxic brain damage: blockers of ionotropic glutamate receptor and voltage sensitive calcium channels. *Curr Drug Targets*, **2004**; 5: 603–18.
103. **Yoneda S, Ibara S, Kobayashi K, Kato E, Maruyama Y, Maruyama H, Sumida Y, Sunami R, Sakai M, Ikenoue T, Saito S.** Low adjusted serum ionized calcium concentration shortly after birth predicts poor outcome in neonatal hypoxicischemic encephalopathy. *J Obstet Gynaecol Res*, **2005**; 31: 57–64.
104. **Almedia A, Bolanos JP.** A transient inhibition of mitochondrial ATP synthesis by nitric oxide synthase activation triggered apoptosis in primary cortical neurons. *J Neurochem*, **2001**; 77: 676–90.
105. **Nijboer CH, Heijnen CJ, Groenendaal F, van Bel F, Kavelaars A.** Alternate pathways preserve tumor necrosis factor- $\alpha$  production after nuclear factor- $\kappa$ B inhibition in neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Stroke*, **2009**; 40: 3362–8.
106. **Bozlu G, Atici A, Turhan AH, et al.** Platelet-activating factor antagonist ABT-491 decreases neuronal apoptosis in neonatal rat model of hypoxic ischemic brain injury. *Brain Res*, **2007**; 1143: 193–8.
107. **Strauss MB, Hargens AR, Gershuni DH, Greenberg DA, Crenshaw AG, Hart GB, Akeson WH.** Reduction of skeletal muscle necrosis using intermittent hyperbaric oxygen in a model compartment syndrome. *J Bone Joint Surg Am*, **1983**; 65: 656–62.
108. **Calvert JW, Yin W, Patel M, Badr A, Mychaskiw G, Parent AD, Zhang JH.** Hyperbaric oxygenation prevented brain injury induced by hypoxia-ischemia in a neonatal rat model. *Brain Res*, **2002**; 951: 1–8.
109. **Wang XL, Zhao YS, Yang YJ, Xie M, Yu XH.** Therapeutic window of hyperbaric oxygen therapy for hypoxicischemic brain damage in newborn rats. *Brain Res*, **2008**; 1222: 87–94.
110. **Gidday JM.** Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat Rev Neurosci*, **2006**; 7: 437–48.

111. **Bocci V.** Physical-chemical properties of ozone. Natural production of ozone. The toxicology of ozone. Springer, **2005**: 5-8.
112. **Viebahn-Haensler R.** *Ozon Oksijen Karışımlarının Tıpta Kullanımının Temel Özellik ve Gereklilikleri; Ozonun Tıpta Kullanımı.* Medikal Ozon Oksijen Derneği, **2005**: 13-52.
113. **Viebahn-Haensler R.** *Ozon Oksijen Karışımlarının Tıpta Kullanımının Temel Özellik ve Gereklilikleri; Ozonun Tıpta Kullanımı.* Medikal Ozon Oksijen Derneği, **2005**: 53-65.
114. **Viebahn-Haensler R.** *Ozon Oksijen Karışımlarının Tıpta Kullanımının Temel Özellik ve Gereklilikleri; Ozonun Tıpta Kullanımı.* Medikal Ozon Oksijen Derneği, **2005**: 102-134.
115. **Halliwell B, Clement MV, Long LH.** Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett*, **2000**; 486: 10-13.
116. **Bocci V, Aldinucci C, Bianchi L.** The use of hydrogen peroxide as a medical drug. *Riv Ital Ossigeno Ozonoterapia*, **2005**; 4: 30-39.
117. **Dianzani MU.** 4-Hydroxynonenal and cell signalling. *Free Radic Res*, **1998**; 28: 553-560.
118. **Stone JR, Collins T.** The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses. *Endothelium*, **2002**; 9: 231-238.
119. **Bocci V.** Autohaemotherapy after treatment of blood with ozone. A reappraisal. *J Intern Med Res*, **1994**; 22: 131-144.
120. **Voyer D, Voyer S, Bryden MP.** Magnitude of sex differences in spatial abilities: a meta-analysis and consideration of critical variables. *Psychol Bull*, **1995**; 117: 250-70.
121. **Bucci DJ, Chia AA, Gallegher M.** Spatial learning in male and female long-evans rats. *Behav Neurosci*, **1995**; 109: 180-3.
122. **Gaulin SJC, Hoffman HA.** Evolution and development of sex differences in spatial ability. In: Betzig L, Mulder M, Turke P. Eds. *Human reproductive behavior a darwinian perspective*, Cambridge University Press, **1998**: 129-152.
123. **Jonasson Z.** Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: a review of behavioral and biological data. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, **2005**; 28: 811-25.

- 124. Paganelli RA, Benetolli A, Lima KC, Cestari-Junior LA, Favero Filho LA, Milani H.** A Novel Version of The 8-Arm Radial Maze: Effects of Cerebral Ischemia on Learning and Memory. *Journal of Neuroscience Methods*, **2004**; 132 (1): 9-18.
- 125. Prut L, Belzung C.** The open field as a paradigm measure. *Eur J Pharmacology*, **2003**; 463: 3-33.
- 126. Lieben CKJ, Oorsouw KV, Deutz NEP, Blokland A.** Acute tryptophan depletion induced by a gelatin-based mixture impairs object memory but not affective behavior and spatial learning in the rat. *Behav Brain Res*, **2004**; 151: 53-64.
- 127. Carli M, Prontera C, Samanin R.** Effect of 5-HT1A agonists on stress-induced deficit in open field locomotor activity of rats: evidence that this model identifies anxiolytic-like activity. *Neuropharmacology*, **1989**; 28: 471-6.
- 128. Eşsizoğlu A, Yıldırım EA, Mengi M Oral T, Yurdakoş E.** Kronik immobilizasyon stresine maruz bırakılan sıçanlarda 7-nirtoindazolün anksiyete ve mekânsal bellek üzerine etkileri. *Nöropsikiyatri Arşivi*, **2009**; 46: 157-62.
- 129. D' Hooger D, De Deyn PP.** Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev*, **2001**; 36: 60-90.
- 130. Zhu C, Wang X, Cheng X, Qiu L, Xu F, Simruner G, Blomgren K.** Post-ischemia hypothermia induced tissue protection and diminished apoptosis after neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Brain reseach*, **2004**; 996: 67-75.
- 131. Atıcı A, Bozlu G, Turhan AH, Polat A, Nayci A, Okuyaz C, Taşkınlar H.** The Role of Traidil on Neuronal Apoptosis in Neonatal Rat Model of Hypoxic Ischemic Brain Injury. *Early Hum Dev*, **2008**; 84: 243-247.
- 132. Yagi K.** Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine. In: Armstrong D. Eds. *Free Radicals in Diagnostic Medicine*. Plenum Press, New York, **1994**; 1-15.
- 133. Durak I, Canbolat O, Kavutcu M, Öztürk H S, Yurtarlan Z.** Activities of total, cytoplasmic and mitochondrial superoxide dismutase enzymes in sera and pleural fluids from patients with lung cancer. *J Clin Lab Anal*, **1996**; 10: 17-20
- 134.** SPSS Inc. SPSS for Windows. Version 11.5.1, Chicago: 2002.
- 135. Blair E, Watson L.** Epidemiology of cerebral palsy. *Semin Fetal Neonatal Med*, **2006**; 11: 117-25.
- 136. Wilkinson DJ.** Cool heads: ethical issues associated with therapeutic hypothermia for newborns. *Acta Paediatr*, **2009**; 98: 217-20.

- 137. Bocci V.** Does ozone therapy normalize the cellular redox balance? Implications for therapy of human immunodeficiency virus infection and several other diseases. *Med Hypotheses*, **1996**; 46: 150-154.
- 138. Leon OS, Menendez S, Merino N, Castillo R, Sam S, Perez L, Bocci V.** Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals. *Mediat Inflamm*, **1998**; 7: 289-294.
- 139. Ajamieh HH, Menéndez S, Merino N, Martínez-sánchez G, Re L, León O.** Ischemic and ozone oxidative preconditioning in the protection against hepatic ischemic-reperfusion injury. *Ozone: Science & Engineering*, **2003**; 25: 241-50.
- 140. Re L, Mawsouf MN, Menendez S, Leon OS, Sanchez GM, Hernandez F.** Ozone therapy: Clinical and basic evidence of its therapeutic potential. *Arch Med Res*, **2008**; 39: 17-26.
- 141. Stadlbauer TH, Eisele A, Heidt MC, Tillmanns HH, Schulz S.** Preconditioning with ozone abrogates acute rejection and prolongs cardiac allograft survival in rats. *Transplant Proc*, **2008**; 40 (4): 974-7.
- 142. Calunga JL, Menendez S, Barber E, Merino N, Cruz E.** Ozone biological response in kidneys of rats submitted to warm ischemia. *Ozone Sci Eng*, **2003**; 25: 233-240.
- 143. Biedunkiewicz B, Tylicki L, Nieweglowski T, Butakowski S, Rutkowski B.** Clinical efficacy of ozonated autohemotherapy in hemodialyzed patients with intermittent claudication: an oxygen-controlled study. *Int J Artif Organs*, **2004**; 27: 29-34.
- 144. Turczynski B, Sroczynski J, Antoszewski Z, Matyszczyk B, Krupa G, Mlynarski J.** Ozone therapy and viscosity of blood and plasma, distance of intermittent claudication and certain biochemical components in patients with diabetes type II and ischemia of the lower extremities. *Pol Tyg Lek*, **1991**; 46(37-39): 708-710 (abstract).
- 145. Martínez-Sánchez G, Al-Dalain SM, Menéndez S, Re L, Giuliani A, Candelario-Jalil E, Alvarez H, Fernández-Montequín JI, León OS.** Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol*, **2005**; 523: 151-161.
- 146. Merin O, Attias E, Elstein D, Schwalb H, Bitran D, Zimran A, Silberman S.** Ozone administration reduces reperfusion injury in an isolated rat heart model. *J Card Surg*, **2007**; 22: 339-342.
- 147. Weman SM, Karhunen PJ, Pentilla A, Jarvinen AA, Salminen US.** Reperfusion injury associated with one-fourth of deaths after coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg*, **2000**; 70: 807-812.
- 148. Ajamieh HH, Menéndez S, Martínez-Sánchez G, Candelario-Jalil E, Re L, Giuliani A.** Effects of ozone oxidative preconditioning on nitric oxide generation and cellular redox



- balance in a rat model of hepatic ischaemiareperfusion. *Liver Int*, **2004**; 24 (1):55-62.
- 149. Babacan A.** Ozon, Ozonterapi ve Klinik Kullanımı, *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, **2008**; 2: 245-47
- 150. Sastry PS, Rao KS.** Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem*, **2000**; 74: 1-20.
- 151. Llinas R, Muhlethaler M.** Electrophysiology of guinea pig cerebellar nuclear cells in the in vitro, *Brain stem-cerebellar preparation*, **1988**; 186: 33-45.
- 152. Alonso D, Serrano J, Rodríguez I, Ruiz-Cabello J, Fernández AP, Encinas JM, Castro-Blanco S, Bentura ML, Santacana M, Richart A, Fernández-Vizarra P, Uttenthal LO, Rodrigo J.** Effects of oxygen and glucose deprivation on the expression and distribution of neuronal and inducible nitric oxide synthase and on protein nitration in rat cerebral cortex. *J Comp Neurol*, **2002**; 111: 183-200.
- 153. Muhlethaler M, Serafin M.** Talamic spindles in an isolated and perfused brain preparation in vitro. *Brain Res*, **1990**; 524: 17-21.
- 154. Gümüşlü S, Serteser M, Özben T, Balkan S, Balkan E.** Inhibitory role of N-omega-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a potent nitric oxide synthase inhibitor, on brain malondialdehyde and conjugated diene levels during focal cerebral ischemia in rats. *Clin Chim Acta*, **1997**; 267: 213-23.
- 155. Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB.** The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol*, **1981**; 9: 131-41.
- 156. Ehman KD, Moser VC.** Evaluation of cognitive function in weanling rats: A review of methods suitable for chemical screening. *Neurotoxicology and Teratology*, **2006**; 28: 144-161.
- 157. Candland DK.** The open field: some comparative data. *Annals New York Academy of Sciences*, **1969**; 159: 831-851.
- 158. Phillips KM.** Effects of time and administration of ethanol on open field behavior in hamsters. *Physiology & Behavior*, **1982**; 29: 785-787.
- 159. Ikeda T, Mishima K, Yoshikawa T, Iwasaki K, Fujiwara M, Xia YX, Ikenoue T.** Selective and long-term learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats. *Behav Brain Res*, **2001**; 118: 17-25.
- 160. Chou IC, Trakht T, Signori C, Smith J, Felt BT, Vazquez DM, Barks JD.** Behavioral/Environmental Intervention Improves Learning After Cerebral Hypoxia-Ischemia In Rats. *Stroke*, **2001**; 32: 2192-7.

- 161. Ikeda T, Mishima K, Aoo N, Harada K, Liu AX, Egashira N, Iwasaki K, Fujiwara M, Ikenoue T.** Rehabilitative training tasks improve spatial learning impairment in the water maze following hypoxic-ischemic insult in neonatal rats. *Ped Research*, **2006**; 59: 61-5.

## ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Malatya’da doğdu. İlkokulu Mersin Aliye Pozcu İlköğretim Okulu’nda, ortaokulu ve lise eğitimini Mersin Dumlupınar Lisesi’nde tamamladı.

2002 yılında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümünden mezun oldu. 2002 yılı Eylül ayında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 2004 yılı Haziran ayında aynı Anabilim Dalına Araştırma Görevlisi olarak atandı. 2006 yılında yüksek lisans eğitimini tamamlayıp aynı yıl Fizyoloji Anabilim Dalında Doktora eğitimine başladı. 19.10.2010 tarihinde Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokuluna Öğretim Görevlisi olarak atandı. Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalında Doktora eğitimine devam etmekte.