



TC

MERSİN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ÇOCUK NÖROLOJİ BİLİM DALI

HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI OLUŞTURULMUŞ
YENİDOĞAN SIÇANLARDA LEVETİRASETAM
UYGULAMASININ NÖRONAL APOPTOZİS VE MOTOR
YETİLER ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

UZM. DR. MUSTAFA KÖMÜR
YAN DAL UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. ÇETİN OKUYAZ

MERSİN – 2012



TC

MERSİN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ÇOCUK NÖROLOJİ BİLİM DALI

HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI OLUŞTURULMUŞ
YENİDOĞAN SIÇANLARDA LEVETİRASETAM
UYGULAMASININ NÖRONAL APOPTOZİS VE MOTOR
YETİLER ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

UZM. DR. MUSTAFA KÖMÜR
YAN DAL UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. ÇETİN OKUYAZ
MERSİN – 2012

Bu tez, BAP-TF. DTB (MK) 2011-5 (TU) kodlu proje olarak
Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
desteklenmiştir

TEŞEKKÜR

Yandal uzmanlık eğitimim süresince engin tecrübe ve bilgisinden en üst düzeyde yararlandığım, tezimin seçimi ve yürütülmesinde bana ışık tutup yol gösteren, desteğini esirgemeyen hocam, sayın Doç. Dr. Çetin OKUYAZ'a,

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Tez çalışmalarımıdaki katkılarından dolayı ve kullandığımız deney modelinin Mersin Üniversitesinde kurulmasında yoğun emekleri olan Yenidoğan Ünitesinden Prof. Dr. Aytuğ Atıcı ve Uzm. Dr. Yalçın Çelik'e

Tez çalışmalarımıdaki katkılarından dolayı Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Hüseyin Beydağı ve öğretim görevlisi Bora Reşitoğlu'na,

Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Lülüfer Tamer ve araştırma görevlisi Şenay Balcı'ya,

Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ayşe Polat'a,

Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim görevlisi Semra Erdoğan'a,

Çocuk Nöroloji Bilim Dalında birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum Khatuna Makharoblidze, Funda Yavuzolcu ve Murat Şahbaz'a,

Tüm eğitimim süresince maddi-manevi desteğini esirgemeyen sevgili annem ve babama,

Yandal uzmanlık eğitimim süresince ve tezimin her aşamasında maddi-manevi yardımından, sabır ve gösterdiği özveriden dolayı değerli eşim Dr. Süheyla Kömür'e ve hayata geldiği andan itibaren yaşama sevincim olan biricik kızım Rumeysa'ya,

Sonsuz teşekkürler

Uzm. Dr. Mustafa KÖMÜR

İÇİNDEKİLER

ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET	7
GİRİŞ VE AMAÇ	9
GENEL BİLGİLER	11
Hipoksik İskemik Beyin Hasarı	11
Tanım	11
Epidemiyoloji	11
HİBH'nda Patofizyoloji	12
HİBH'nda Hücresel Mekanizma	15
HİBH'nda Nöropatolojik Bulgular	19
HİBH'nda Klinik Belirti ve Bulgular	21
HİBH'nda Tanı	23
HİBH'nda Tedavi	29
HİBH'nda Prognoz	40
HİBH'nda Hayvan Modeli	41
Sıçanların Bilişsel ve Lokomotor Yetilerinin Değerlendirilmesi	42
GEREÇ VE YÖNTEMLER	45
Histopatolojik Değerlendirme	48
Biyokimyasal Değerlendirme	49
Davranış Deneyleri	51
BULGULAR	55
Histopatolojik Bulgular	55
Biyokimyasal Bulgular	66
Davranış Deney Bulguları	69
TARTIŞMA	75
SONUÇ VE ÖNERİLER	81
KAYNAKLAR	83
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	96
RESİMLER DİZİNİ	98
ŞEKİLLER DİZİNİ	100
TABLO DİZİNİ	101

ÖZET

Perinatal dönemde oluşan hipoksik iskemik beyin hasarı (HİBH) yenidoğan bebeklerde zeka geriliği, görme ve işitme kaybı, motor kusurlar, epilepsi, beyin felci ve ölümün en önemli nedenlerindedir. Hipoksi-iskemi ve yeniden kanlanma sonrasında gelişen apoptozis şiddeti beyin hasarının bir göstergesidir. Hipoksi ve iskemiye takiben yeniden kanlanma dönemine geçmeden önce verilecek tedaviler ile hasarı önlemek ya da azaltmak mümkün olabilir.

Bu çalışmada, HİBH oluşturulan yenidoğan sıçan modelinde yeni kuşak anti-epileptik bir ilaç olan levetirasetamın nöronal apoptozis üzerine etkisi erken dönemde histopatolojik ve biyokimyasal testlerle, geç dönemde ise davranış deneyleriyle araştırıldı.

Çalışmaya 7 günlük yenidoğan sıçanlar rastgele alınarak dört gruba ayrıldı. Her bir gruptan 27 sıçan çalışmaya alındı. Grup 2, 3 ve 4'teki sıçanlara orta hat kesisi yapılarak sağ karotid arterleri bağlandı. Bu sıçanlar %8 oksijen içeren hipoksi odacığında iki saat bekletildi. Hipoksi sonrası Grup 2'dekilere serum fizyolojik, grup 3'tekilere levetirasetam (100 mg/kg) ve grup 4'tekilere levetirasetam (200 mg/kg) periton içi yolla (intraperitoneal, i.p) verildi. Grup 1'deki sıçanların ise karotid arterleri bulundu, fakat bağlanmadı. Bu sıçanlara hipoksi de uygulanmadı. Her gruptan 9 adet sıçandan hipoksi sonrası ikinci saatte kalp içi girişimle kan örneği alınarak malondialdehit, glutatyon peroksidaz, superoksit dismutaz ve katalaz enzim düzeylerine bakıldı. Kan örnekleri alındıktan sonra dekapite edilerek TUNEL ve Kaspaz-3 yöntemiyle apoptotik nöron sayısı değerlendirildi. Geriye kalan sıçanların geç dönemde lokomotor yetileri açık alan deneyi, öğrenme ve hafızaları ise morris su tankı testi ile değerlendirildi.

TUNEL ve Kaspaz-3 yöntemi ile boyanan apoptotik hücre sayısının grup 2'deki sıçanlarda diğer gruptakilere göre anlamlı bir şekilde fazla olduğu saptandı ($p<0.001$). TUNEL yöntemiyle Levetirasetam 100 mg/kg ve 200 mg/kg uygulanan gruplarda, Kaspaz-3 yöntemiyle ise sadece levetirasetam 200 mg/kg uygulanan grupta apoptotik nöron sayısı serum fizyolojik uygulanan gruba göre anlamlı derecede daha azdı ($p<0,001$).

Plazma malondialdehit düzeyi de grup 2'deki sıçanlarda daha yüksekti ve grup 1'deki sonuçlarla karşılaştırıldığında anlamlı fark saptandı ($p=0,002$). Plazma katalaz

düzeyi grup 3'teki sıçanlarda daha yüksekti, ancak gruplar arasında anlamlı farklılık yoktu. Plazma glutatyon peroksidaz ve superoksit dismutaz grup 4'te grup 1, 2 ve 3'ten istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulundu.

Doğumdan sonraki 10. haftada lokomotor aktivite açık alan deneyi ile değerlendirildi. Gruplar arasında hareket hızları ve katettikleri mesafeler yönünden farklılık yoktu.

Morris su tankı testinde ise grupların ilk dört günde yükseltiyi bulma süreleri incelendiğinde tüm gruplar günler ilerledikçe bu süreyi anlamlı olarak düşürmekteydi. Yükseltiyi bulma süresi, 1. gün ile 4. gün arasındaki yükseltiyi bulma süresi farkı ve 5. gün yükseltinin olduğu doğu kadranda geçirilen süre bakımından sham grubu ile levetirasetam 200 mg/kg uygulanan grup 4 sıçanların sonuçları benzerdi. Bu gruplarla grup 2 ve 3 arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark vardı.

On altıncı haftada dekapite edilen sıçanlarda en yüksek vücut ağırlığı grup 1'de, en düşük ise grup 3'te ölçüldü. En yüksek beyin ağırlığı ise grup 1 ve 4'teki sıçanlarda saptandı ve diğer 2 gruba göre anlamlı derecede daha yüksekti.

Sonuç olarak bu çalışma ile levetirasetamın HİBH oluşturulmuş yenidoğan sıçanlarda erken dönemde apoptotik nöron sayısını azaltarak nöron koruyucu etkide bulunduğu histopatolojik olarak gösterilmiştir. Geç dönemde doz bağımlı olarak davranış deneylerine olumlu katkısının olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlarımıza göre levetirasetamın nöron koruyucu etkinliğinin nedenlerinden birinin glutatyon peroksidaz ve superoksit dismutaz enzim düzeylerini artırarak yaptığını düşünmekteyiz. Bu çalışma bizim bilgilerimize göre levetirasetamın HİBH oluşturulmuş yenidoğan sıçanlarda nöron koruyucu etkinliğini histopatolojik, biyokimyasal ve geç dönemde davranış deneyleriyle gösteren ilk çalışmadır.

Anahtar kelimeler: Antioksidan enzimler, apoptozis, davranış deneyleri, hipoksik iskemik beyin hasarı, levetirasetam

ABSTRACT

Perinatal hypoxic ischemic brain injury (HIBI) is encountered one of the major causes of mental retardation, visual and auditory impairment, motor deficiencies, epilepsy, stroke and death in newborns. The severity of hypoxia-ischemia and increased number of the apoptotic neurons after reperfusion period are indicators of the brain injury. There is likelihood of preventing or minimizing the injury through the treatments to be administered prior to reperfusion, following hypoxia and ischemia.

In this study, the effects of a new generation antiepileptic drug levetiracetam, on neuronal apoptosis by histopathological and biochemical tests in early period and experimentally in the long term behavior in neonatal rat model of HIBI were investigated.

The 7 days-old neonatal rats included in the study were randomly divided into four groups. Twenty-seven rats from each group were studied. Midline incision was performed on the rats in Group 2, 3 and 4 and their right carotid arteries were ligated. These rats were kept in a hypoxia chamber containing 8% oxygen for two hours. After the hypoxia, normal saline was administered intraperitoneally to the rats in group 2, levetiracetam (100 mg/kg) to those in group 3 and levetiracetam (200 mg/kg) to those in group 4. The carotid arteries of those in group 1 were located, but not were ligated. The rats in this group were not exposed to hypoxia either. Blood samples were taken from 9 rats in each group two hours later than hypoxia and malondialdehyde, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase enzyme levels were determined. After blood samples taken, those were capitated and the number of apoptotic neurons were evaluated by TUNEL and Caspase-3 methods. The long-term motor capabilities of remaining rats were evaluated through open field tests and learning and memories were evaluated through morris water tank test.

The number of the apoptotic neurons dyed by TUNEL and Caspase-3 methods was observed to be significantly higher in group 2 compared to the other groups ($p < 0.001$). The number of apoptotic neurons dyded by TUNEL was observed to be significantly lower in groups administered levetiracetam 100 mg/kg and 200 mg/kg and the number of apoptotic neurons dyded by Caspase-3 method was

observed to be significantly lower in only levetiracetam 200 mg/kg group compared to saline group.

Plasma malondialdehyde levels were also higher in group 2 rats and there was statistically significant difference compared to group 1 ($p=0,002$). Plasma catalase levels were higher in group 3 rats, but no statistically significant difference was identified in the comparison among the groups. Plasma glutathione peroxidase and superoxide dismutase levels were detected to be significantly higher in group 4 compared to group 1, 2 and 3.

Locomotor activity was evaluated through open field tests at the 10th week of birth. The average speed activity and the distance they covered were not significantly different among the groups.

In morris water tank test, in the first four days all groups significantly declined the period to find elevation as the days progressed. The findings of finding elevation time, the difference of finding elevation time in first and fourth days and time spent in the eastern quadrant in fifth day were similar between sham group and group 4. There were statistically significant difference compared to group 2 and group 3.

In the rats decapitated in 16. week, the highest body weight in group 1, the lowest body weight in group 3 were measured. Brain weight was highest in group 1 and 4 and there was statistically significant difference compared to other two groups.

In conclusion, by this study in HIBI created neonatal rats, the levetiracetam's neuroprotection efficacy by reducing the number of the apoptotic neurons in the early period is revealed histologically. In late period, positive contribution was found to be dose-dependent on behavioral tests. In this study, we think that levetiracetam shows a neuroprotective efficacy through increasing levels of glutathione peroxidase and superoxide dismutase. According to our knowledge, this is the first study showing the neuroprotection efficacy of levetiracetam in HIBI created newborn rats histopathological, biochemical and behavioral experiments on late period

Key words: Antioxidant enzymes, Apoptosis, behavioral experiments, hypoxic ischemic brain injury, levetiracetam.

GİRİŞ VE AMAÇ

Yenidoğanda hipoksik iskemik beyin hasarı (HİBH) tüm dünyada yenidoğan döneminde meydana gelen ölümlerin, beyin felcinin, zeka geriliğinin ve epilepsinin önde gelen nedenlerinden biridir. Gelişmiş ülkelerde HİBH sıklığı 1000 canlı doğumda iki olarak bildirilmekle birlikte gelişmekte olan ülkelerde çok daha sık görüldüğü düşünülmektedir. Olgunlaşmamış beynin hipoksi ve iskemiye duyarlılığı daha fazladır¹⁻⁴. Hipoksi gelişmekte olan beyinde talamus, periventriküler beyaz cevher ve hipokampus gibi seçilmiş bölgeleri daha çok etkilemektedir⁵.

HİBH'nda hücre ölümü nekroz, apopitozis veya her iki şekilde olabilmektedir⁶. Hipoksi-iskemi ve yeniden kanlanma sonrasında gelişen apopitozisin şiddeti beyin hasarlanmasının önemli bir göstergesidir. Yapılan çalışmalarda yenidoğan döneminde gelişen HİBH'nda apopitozisin nekrozdaki rolü olduğu gösterilmiştir^{7,8}. Hipoksi ve iskemiye takiben başlayan yeniden kanlanma dönemi ağır hasarın oluştuğu en önemli dönemdir. Bu dönem başlamadan yapılacak tedaviler ile HİBH'nı önlemek ya da azaltmak mümkün olabilir⁹.

HİBH'na yönelik olarak klinik ve deneysel hayvan modellerinde nöronal hasarı önlemek için çeşitli ilaçlar ve yöntemler üzerinde çalışılmaktadır. Hipotermi uygulanması, serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşumunun engellenmesi, serbest oksijen radikallerini ortadan kaldıran ajanlar (Selenyum, E vitamini, N-Asetilsistein, Askorbik asit), kök hücre nakli, dekzametazon, kalsiyum kanal kapatıcılarının uygulanması, magnezyum sülfat ve antiepileptik ilaçlar bunlara örnek olarak verilebilir⁹.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda HİBH oluşturulan yenidoğan hayvanlara topiramet, lamotrijin ve valproik asit gibi bazı antiepileptik ilaçların verilmesiyle beyin hasarının azaldığı ve işlevsel testlerde iyileşme olduğu bildirilmiştir¹⁰⁻¹². HİBH oluşturulmuş yenidoğan sıçanlarda kullanılan antiepileptik ilaçların nöron koruyucu etkiyi hücre içine kalsiyum girişini engelleyerek, glutamat seviyesini azaltarak veya gama amino bütirik asit (GABA) seviyesini arttırarak yaptığı tespit edilmiştir^{13,14}. Levetirasetam (LEV) ise ülkemiz de dahil olmak üzere birçok ülkede 1 aylıktan itibaren epilepsili çocuklarda güvenle kullanılan yeni kuşak antiepileptik bir ilaçtır. Son zamanlarda yenidoğan nöbetlerinde kullanımı ile ilgili birkaç klinik çalışma mevcuttur^{15,16}. Ancak yenidoğan dönemindeki HİBH'ndaki etkinliği ve nöronal

apoptozis üzerine etkisi tam olarak bilinmemektedir. Bizim bilgilerimize göre bu zamana kadar LEV'in HİBH oluşturulmuş yenidoğan sıçanlardaki etkisini gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, HİBH oluşturulan yenidoğan sıçan modelinde yeni kuşak antiepileptik bir ilaç olan LEV'in nöronal apoptozis üzerine etkisinin erken dönemde histopatolojik ve biyokimyasal testlerle, geç dönemde ise davranış deneyleriyle değerlendirilmesi amaçlandı.

GENEL BİLGİLER

Hipoksik İskemik Beyin Hasarı

Tanım

Yenidoğandaki HİBH mortalitenin, serebral palsinin, mental motor geriliğin ve epilepsinin en önemli nedenlerinden biridir¹⁻⁴. Hipoksi kanda oksijenin normalden az olması olarak tanımlanır. Hipoksiye maruz kalan yenidoğan bebeklerde beyin başta olmak üzere bir veya birden fazla organ etkilenimi olmaktadır. Hipoksi gelişmekte olan beyinde ventrikül çevresindeki beyaz cevher, talamus ve hipokampus gibi beyin seçilmiş bölgelerini daha çok etkiler¹⁷. İskemi ise bir doku veya organdaki kan akımının azalması veya kesilmesini ifade eder. İskemide dokuya yeterli oksijen ve glukoz gibi bazı besin maddeleri gidemeyeceği ve toksik maddeler uzaklaştırılamayacağı için hipoksiye göre daha ağır bir hasara neden olur. Olgunlaşmamış beyin hipoksi ve iskemiye yanıtının olgunlaşmış beyinden farklı olduğu bilinmektedir^{3,4}.

Doğum öncesinde, doğum sırasında veya doğum sonrasında yaşanan hipoksik iskemik olaylar sonucunda yenidoğanlarda oluşan anormal nörolojik bulguların varlığı perinatal hipoksik iskemik ensefalopati (HİE) olarak tanımlanır. Yaşanan hipoksi ve iskeminin ağırlığına ve süresine bağlı olarak hafif, orta veya ağır derecede HİE olarak sınıflandırılır¹⁸.

Epidemiyoloji

HİBH yenidoğan ölümlerinin ve sakatlıklarının önde gelen nedenlerinden olup hastaya, aileye ve topluma ağır yükler getirmektedir. Tüm dünyada yılda bir milyon kadar bebek yenidoğan döneminde HİBH nedeniyle kaybedilmektedir¹⁹. Doğum öncesi ve doğum sırasındaki izlem yöntemlerindeki gelişmelere rağmen halen gelişmiş ülkelerde HİBH sıklığı 1000 canlı doğumda 2 ile 4 arasındadır. Gelişmekte olan ülkelerde ise bu oran 1000 canlı doğumda 9 ile 18 gibi çok daha yüksek oranlara ulaşmaktadır¹⁻⁴. HİBH ile doğan bebeklerden %10-15'i yenidoğan döneminde kaybedilmektedir. Yaşayanların da %10-15'inde serebral palsy, %40 kadarında bilişsel bozukluklar, nöromotor gelişme geriliği, nöbetler, işitme bozuklukları, körlük gibi önemli sakatlıklar gelişmektedir²⁰⁻²². Bu kadar sık

karşılaşılan ve çeşitli nörolojik sekellere neden olan bu durum fetüs ve yenidoğanlara yönelik uygun tedavi yaklaşımını da zorunlu hale getirmektedir.

Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Patofizyoloji

Perinatal HİBH'nın patofizyolojisinden sorumlu temel olay plasentada yetersiz gaz değişimi veya akciğerlerde ventilasyonun bozulmasıdır. Oksijen ve karbondioksit değişimindeki bozulma arteryel hipoksemi, hiperkarbi ve asidoza neden olmaktadır. Erken dönemde olay hızlı geliştiğinden organlar arası ve beyin içindeki kan dolanımının yeniden düzenlenmesi yetersiz kalmaktadır. Buna bağlı olarak hipoksik iskemik zedelenme bulguları, metabolik aktivitenin fazla, enerji depolarının az olduğu beyin, kalp gibi dokularda daha fazla görülmektedir. Beyinde talamus ve beyin sapı nükleusları belirgin derecede etkilenirken, serebral hemisferler daha iyi korunmaktadır^{18,19}.

Altta yatan patolojik olayın bilinmesi hastalığın tüm yönlerinin anlaşılmasını sağlayacaktır. Yenidoğandaki HİBH'na hipoksi ve iskemi birlikteliği neden olur. HİBH'nda olayların %50'si doğum öncesinde, %40'ı doğum sırasında, %10 kadar ise doğum sonrasında meydana gelmektedir¹⁹.

HİBH sıklıkla dört nedene bağlı olarak gelişmektedir.

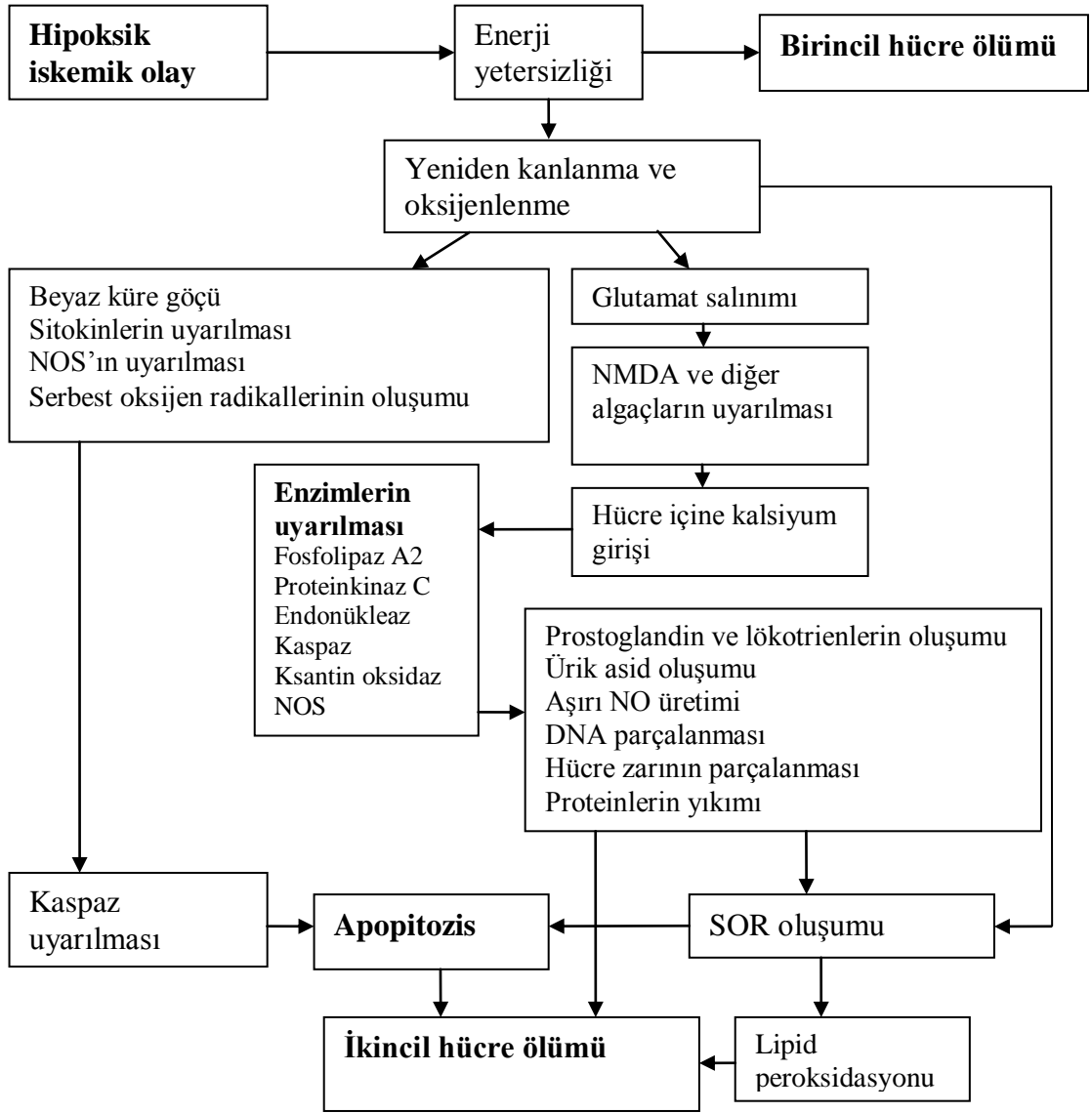
- 1) Plasenta ile ilgili sorunlar
 - a. Plasentanın yerinden ayrılması (ablasyo plasenta)
 - b. Plasentanın doğum yoluna yerleşmesi (plasenta previa)
 - c. Plasenta gelişim bozuklukları
 - d. Plasentada enflamatuvar değişikliklerin olması
 - e. Plasentanın kalsifikasyonu, ödemi veya enfarkti
- 2) Göbek kordonu ile ilgili sorunlar
 - a. Kordon sarkması veya dolanması
 - b. Kısa kordon
 - c. Kordonun anormal yerleşimi
- 3) Fetüsle ilgili sorunlar
 - a. Çoğul gebelikler
 - b. Zamanından önce veya geç doğum
 - c. Fetal anomaliler (hidrosefali gibi)
 - d. Anemi (hidrops, eritroblastozis fetalis vb.)
 - e. Fetal enfeksiyonlar

- f. İri fetüs
 - g. İntrauterin gelişme geriliği
- 4) Anneye ait nedenler
- a. Anne yaşının 16'dan küçük, 40'tan büyük olması
 - b. Düşük sosyoekonomik düzey
 - c. Kronik hastalıklar (diabetes mellitus, böbrek, akciğer, karaciğer vb)
 - d. Hipertansif hastalıklar
 - e. Uzamış doğum eylemi
 - f. Anormal uterus kasılması
 - g. Ağır anemi
 - h. Gebelik toksemisi
 - i. Perinatal enfeksiyonlar
 - j. Alkol ve narkotik ilaç alışkanlığı
 - k. Annenin magnezyum veya antiepileptik ilaç kullanması

HİBH farklı nedenlere bağlı olarak gelişse de nöropatolojik sonuçları benzerdir. Beyin hasarının ağırlığı ve dağılımı neden olan olayın şiddeti, süresi ve gebelik yaşı ile ilişkilidir. Büyük çocuk ve erişkin beynine göre gelişimini tamamlamamış beyin hipoksik iskemik olaylara karşı daha dirençlidir^{18,19}. HİBH'nın ana nöropatolojik göstergeleri seçici nöron hasarı ve enfarktittir. Seçici nöron hasarında (nekroz ya da apoptoz) nöronlar ölürken, glia hücreleri (astrositler, oligodentrositler) ve kan damarları korunur²³. Erken doğan bebeklerde HİBH daha çok serebral hemisferin beyaz cevher yapılarında lökomalazi ve kanama şeklinde, zamanında doğan bebeklerde ise beyin gri cevher yapıları olan korteks, hipokampus, bazal gangliyonlar, talamus ve beyin çekirdeklerini daha sık etkilemektedir^{17,23,24}. Bu lezyonlar genellikle seçici nöronal nekroz, parasagittal beyin hasarı (pariyeto-okspital), bölgesel ve çoklu bölgesel beyin hasarı şeklinde olmaktadır¹⁸.

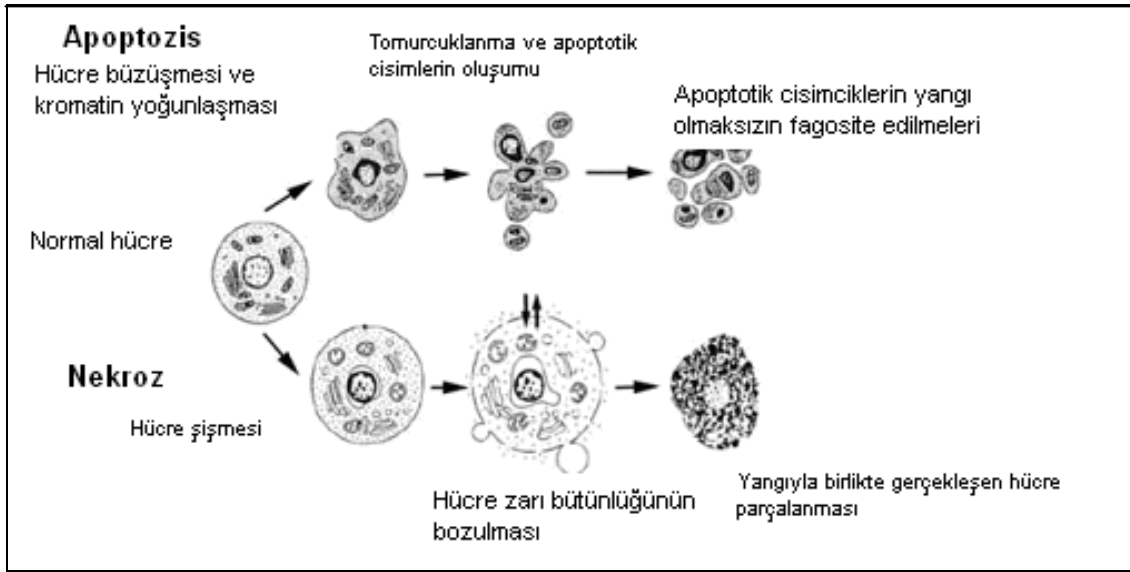
HİBH'nda oluşan hücresel hasarın mekanizması tam olarak açıklanamasa da ardışık biyokimyasal olaylar sonucu meydana geldiği bilinmektedir (Şekil 1). Hipoksi ve iskemi sonrası enerji eksikliği ve protein sentezinin baskılanması sonucunda sitotoksik ödem gelişir ve buna bağlı birincil hücre ölümü oluşmaktadır^{24,25}. Ancak HİBH sonrası asıl etkilenme daha çok yeniden kanlanma ve yeniden oksijenlenme döneminde ortaya çıkmaktadır. Bu dönemde bazı biyokimyasal mekanizmalar sonucunda ikincil hücre ölümü oluşmaktadır. Bu

biyokimyasal mekanizmalar hücre içi kalsiyumun artması, glutamat algaçlarının uyarılması, nitrik oksit (NO) üretimi, SOR salınımı ve bazı enflamatuvar reaksiyonların aktive olması sonucudur. Son yıllarda yeniden kanlanma döneminde meydana gelen hücre ölümünün birincil hücre ölümüne göre daha fazla olduğu ve tedavi seçeneklerinin de bu dönemde etkili olabileceği bildirilmiştir^{24,25}. İkincil hücre ölümü hipoksik iskemik olaydan iki saat sonra başladığı ve 48 saate kadar uzayabildiği ileri sürülmüştür.



Şekil 1: Hipoksi iskemi sonucunda beyin hücrelerini ölüme götüren fizyopatolojik olaylar. (NOS: nitrik oksit sentaz, NMDA: N- metil D- aspartat, NO: Nitrik oksit, DNA: Deoksiribonükleik asit, SOR: Serbest oksijen radikalleri)

HİBH'nda hücre ölümü nekroz, apoptoz veya her iki şekilde olabilmektedir⁶. Bu iki mekanizma arasındaki en belirgin fark apoptozda enflamatuvar olayların olmamasıdır. Nekroz, hücreye dışarıdan gelen saldırılar (osmotik, termal, toksik veya travmatik) sonucu hücrenin şişmesi, zar bütünlüğünün bozulması, hücre içeriğinin salınması ve bunun sonucunda enflamasyon oluşumu ve fagositoz ile hücrenin ölümüdür. Apoptoz özel moleküler yollarla ilerleyen kendine özgü mekanizmaların karıştığı aktif organize programlanmış hücre ölümüdür. Apoptozise bağlı hücre ölümü kromatinin yoğunlaşması, hücrenin büzülmesi ile gerçekleşir ve enflamasyon eşlik etmez²⁶⁻²⁸ (Şekil 2). 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'nda apoptozisin nekroza göre daha önemli olduğu gösterilmiştir.



Şekil 2: Apoptozis veya nekroz ile hücre ölümü.

Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Hücresel Mekanizma

a) Enerji Eksikliği ve Asidoz Gelişimi

Beynin normal fonksiyon görebilmesi için yeterli oksijen ve enerjiye ihtiyacı vardır. Vücuttaki tüm hücrelerde olduğu gibi nöronların enerji ihtiyacı da birincil olarak adenozin trifosfat (ATP) yoluyla sağlanır. ATP üretimi temel olarak mitokondriler içinde oksidatif fosforilasyonla oluşur. Nöronlar glikojen depolayamazlar ve sürekli glikoza gereksinimleri vardır. Hipoksiye ilk metabolik

yanıt anaerobik glikolizdir. Doku O₂ basıncı kritik bir değer altına indiğinde (<0.1 mmHg) mitokondrilerin sitokrom sistemleri çalışamaz ve indirgenmiş maddeler birikmeye başlar. Oksidatif fosforilasyonla oluşan ATP etimi durur. Aerobik ortamda mitokondrilerde gerçekleşen oksidatif fosforilasyon ile 36 mol ATP üretilirken anaerobik glikoliz ile sadece 2 mol ATP retilir. Enerji ihtiyacının karşılanması için anaerobik glikoliz hızının 18 kat artması gerekir. Ancak glikolizis en çok 4–5 kat artabilir²⁹. ATP eksikliği hücre zarı iyon pompalarının işlevlerini bozar, hücre zarı uyarılır, akson terminalinden uyarıcı aminoasitler salınır, hücre içi kalsiyum artar, ksantin birikimi olur ve sonuçta nekroz ve apopitozis olur²⁵.

Anaerobik glikolizin istenmeyen bir sonucu da laktik asit ve hidrojen iyon birikimidir. Artan laktik asit ve hidrojen iyonu hücre içi ve hücre dışı pH'nın düşmesine neden olur. Hücre zarı iyon pompa işlevinde aksama hücre içinde sodyum, kalsiyum ve su birikimine neden olur ve nöronal hasar daha da artar¹⁹.

Hipoksi-iskemi sırasında birincil enerji yetmezliğinin ardından gelişen ve enerjinin kısmen geri kazanıldığı bir yeniden kanlanma evresi vardır. Yaklaşık hipoksi iskemi sonrası 2. saatte başlayıp 48 saate kadar uzayan bu evre sonunda yeterli serebral kanlanma ve oksijenizasyonun olmasına rağmen ikinci bir enerji yetmezliğinin olduğu dönem gelişir. Bu dönem gecikmiş hücre hasarının oluştuğu evre olup çalışmaların yoğun olarak yapıldığı ilgi çeken bir dnemdir²⁴.

b) Uyarıcı Aminoasitlerin Nrotoksitesisi

Beyindeki temel uyarıcı aminoasit glutamattır. Glutamat algaçları nöron gelişimi, renme, hafıza ve sinaptik bağlantıların organizasyonu gibi fizyolojik işlevlerin yerine getirilmesinde önemli görevleri vardır. Glutamat salınımının hipoksi iskemi sonrası hücre ölümü mekanizmasında önemli rolünün olduğu kanıtlanmıřtır³⁰⁻³².

Oksijen eksikliği beyinde oksidatif fosforilasyonda azalmaya ve enerji eksikliğine neden olur. Hücre zarındaki iyon pompaları (Na, K ve Ca) enerji eksikliğinden dolayı iyon dengesini sağlayamaz. Hücre zarı uyarılır ve nöronun presinaptik bölgesinden başta glutamat olmak üzere uyarıcı aminoasitler salınır. Glutamatın nörotoksik etkileri yapay ortamda ve canlıda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Glutamat nöron zarında bulunan düşük ve yüksek duyarlıklı kainik asit, N-metil D-aspartat (NMDA) ve amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoazopropiyonik asit (AMPA) algaçlarını uyarır³¹⁻³³. Yapılan klinik çalışmalarda beyindeki NMDA algaçlarının talamus, striatum, serebellum, korteksin 3. 5. ve 6. tabakaları ile

hipokampüsün CA1 bölgesinde daha fazla bulunduğu saptanmıştır. AMPA algaçlarının ise korteksin derin tabakaları, striatum ve hipokampüsün piramidal hücrelerinde yoğun olarak bulunduğu gösterilmiştir. Beynin bu bölgelerinin hipoksik iskemik hasarlanmada en fazla etkilenen bölgeler olduğu görülmüştür^{30,31}.

NMDA, AMPA ve kainik asit algaçlarının uyarılması ile postsinaptik zardan sodyum, klor ve potasyum geçişi olur. NMDA algacındaki iyon kanalından sodyum, klor ve potasyuma ek olarak kalsiyum da geçer. Hücre içine geçen sodyum, klor ve su osmotik hücre parçalanmasını gerçekleştirir. Hücre içine geçen kalsiyumun, kalsiyum bağımlı enzimleri (proteaz, lipaz, endonükleaz, fosfolipaz, proteinkinaz, NOS) uyarması sonucu hücre hasarı ve apoptozis oluşur³⁴.

c) Hücre içi kalsiyum birikimi

Vücuttaki diğer hücreler gibi nöronlardaki kalsiyum, hücre içi dengeyi sağlayan enzimlerin işlevlerinde ve hücre içinde ikincil haberci olarak görev yapar. Hücre içinde kalsiyum birikimi hücre zarı bütünlüğünün bozulmasına ve nöron ölümüne neden olur. Hücre içi kalsiyum mitokondri, endoplazmik retikulum, hücre zarı ve çekirdeği gibi organellere bağlı halde bulunur^{35,36}.

Hipoksi-iskemi esnasında glutamat algaçlarının aşırı uyarılması sonucunda glutamat bağımlı kalsiyum kanalları aracılığıyla hücre içinde kalsiyum miktarı artar. Aynı zamanda endoplazmik retikulundan ve mitokondrilerden sitoplazmaya kalsiyum salınımı da olur^{25,35,36}. Enerji yetmezliği nedeniyle hücre zarından dışarıya kalsiyum çıkışı da bozular. Hücre içi kalsiyum miktarındaki artış lipaz, proteaz, siklooksijenaz, endonükleaz ve fosfolipaz gibi birçok enzimi aktive eder. Aktive olan bu enzimler lipid peroksidasyonuna, zar proteinlerinin yıkımına ve SOR'nin oluşumuna da neden olur^{25,36}.

Sonuç olarak, hipoksi-iskemi sonrası hücre içinde kalsiyum birikimi nöronlarda geri dönüşümsüz hasara neden olmaktadır^{35,36}.

d) Serbest Oksijen Radikallerinin Hasarı

SOR doku ve organlardan sürekli salınan ve bir yandan da çeşitli yollarla temizlenen ürünlerdir. SOR dokularda normalde çok düşük düzeyde üretilir; ancak patolojik durumlarda miktarları artmaktadır³². Hücreler kendilerini SOR'nin zararlı etkilerinden enzimatik (katalazlar, endoperoksidazlar, dismutazlar) ve enzimatik olmayan mekanizmalar (glutatyon, kolesterol, askorbik asit ve α - tokoferol gibi antioksidan maddeler) ile korur. Hipoksi iskemisi sonrası yeniden kanlanma

döneminde SOR üretimi artar ve hücrenin kendisini koruma kapasitesinin üzerine çıkar^{32,35,36}.

Beyin dokusu çoklu doymamış yağ asitleri açısından zengin olup SOR'ne karşı oldukça duyarlıdır. Yeniden kanlanma döneminde oluşan SOR (hidroksil radikali, süperoksit radikali, hidrojen peroksit, hipoklorit iyonu, nitrik oksit, peroksinitrit) hücre zarındaki çoklu doymamış yağ asitlerini, hücre iskeletindeki proteinleri, nükleik asitleri okside ederek hücre hasarına ve apoptozise neden olur³⁴. Yenidoğan beyinde yetersiz olan antioksidanlar nedeniyle normalden daha ağır hasar görülür²³.

f) Nitrik Oksit

Nitrik oksit, L-argininin NOS tarafından L-sitrülline dönüştürülmesi sırasında oluşan zayıf bir serbest radikaldir. Beyindeki nöronlar, endotel hücreleri, mikroglia ve astrositler tarafından üretilir. NO normalde merkezi sinir sisteminde nöronal olgunlaşmada, doğum sonrası kortikal plastisitede ve uyarı iletiminde görev almaktadır. Hipoksik iskemik olaylar sonrasında özellikle yeniden kanlanma döneminde NOS enziminin ileri derecede aktive olması aşırı miktarda NO oluşumuna neden olur³⁷.

Üç farklı NOS enzim izoformu vardır ve farklı genlerce kodlanmaktadır^{37,38}. Endotelyal NOS (eNOS) kalsiyuma bağımlı olarak endotel hücrelerinde sentezlenir ve oluşan NO vazodilatasyona neden olur. Beyinde eNOS kökenli NO serebrovasküler kan akımını düzenler. Uyarılabilir NOS (iNOS) immünolojik olaylarda ve nöron hasarında mikroglia hücreleri ve makrofajlarda sitokinlere yanıt olarak salınır. Nöronal NOS (nNOS) ise beyinde astroglia ve nöronlardan kalsiyuma bağımlı olarak salınır. Düşük düzeylerde üretilen NO nörotransmitter olarak işlev görür. Hafıza ve öğrenme ile ilişkili rolü olduğu düşünülmektedir. Beyinde korteks, hipokampus, serebellum ve korpus striatumdaki nöronların %1-2'si nNOS salınımı yapan nöronlardır^{38,39}. Beyinde nNOS uyarılması ile artan NO glutamatın serbestleşmesine, glutamat algaçlarının kolay uyarılabilirliğine, peroksinitrit oluşumuna, hücre içi serbest kalsiyumun artışına ve mitokondriyal hasar ile hücre ölümüne neden olur⁴⁰.

g) Enflamatuvar Mediyatörler

HİBH'nda patolojik mekanizmalara beyindeki mikroglia/makrofaj, astrositlerin ve dolaşımdan gelen nötrofillerin aşırı sitokin (TNF, IL-1, IL-6, PAF vb.) salınımı neden olur⁴⁰. Mikroglia/makrofaj ve astrositlerin olaya katılması ilk hipoksi

döneminde (1-4 saat) olurken, nötrofillerin olaya katılması genellikle yeniden kanlanma döneminde (24-48 saat) olmaktadır. Hipoksik iskemik olaya sitokinlerin katılması IL-6 salınımı gibi yararlı etkisinin yanında IL-1 gibi zararlı etkisinin de olduğu bildirilmiştir. Aktive olmuş nötrofiller ayrıca NADPH oksidaz enzimi uyarılması ile yeniden kanlanma esnasında SOR'ni arttırarak ileri doku hasarına neden olmaktadır^{40,41}.

Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Nöropatolojik Bulgular

HİBH'nda birçok nöropatolojik mekanizma tanımlanmıştır ve ayrı mekanizmalarla aynı anda birden fazla lezyon gözlenebilmektedir. HİBH'ndaki lezyon ve klinik bulgular olayın şiddetine (total veya kısmi), süresine (akut veya kronik), etkilediği alanın genişliğine, gebelik yaşına (erken doğum veya zamanında doğum), bölgesel damarsal faktörlere ve NMDA algaçlarının dağılımına göre farklılıklar göstermektedir^{24,25,41}.

a) Ödem: Hipoksi iskemi sonrası beyin dokusunda 24-48 saat içinde ödem gelişmektedir. Hücre zarındaki işlevsel bozulma sonucunda sodyum ve suyun hücre içine girmesiyle sitotoksik ödem gelişir. Ayrıca kan beyin engelinin geçirgenliğinin artması ve kapiller sızma ile hücreler arası sıvı birikimi olur⁴².

b) Seçici Nöronal Nekroz: HİBH'nın en sık karşılaşılan nöropatolojik durumudur. Daha çok zamanında doğan bebeklerde görülür. Genellikle serebral ve serebellar korteks, hipokampus, talamus, bazal gangliyonlar, beyin sapı ve spinal kordun ön boynuz hücreleri etkilenir. Yenidoğan döneminde stupor, koma, nöbetler, hipotoni, okülomotor, emme ve yutma bozuklukları gibi klinik bulgular gözlenir. Seçici nöronal nekroza bağlı olarak geç dönemde ise serebral ve serebellar atrofi ve multikistik ensefalomalazi gelişir⁴².

c) Bazal Gangliyon ve Beyin Sapı Hasarı: En az görülen nöropatolojik lezyon olup genellikle zamanında doğan bebeklerde gözlenir. Kronik kısmi hipoksi iskemiden çok, hızlı tam hipoksi iskemi sonrasında geliştiği gösterilmiştir. Genel olarak nöronal nekroz, gliyozis ve hipermyelinizasyon bazal gangliyon, talamus ve serebral kortekste mermer görünümüne neden olur. Otopside bazal gangliyonlarda saptanan bu mermerimsi görünüm nedeniyle "status marmoratus" olarak da isimlendirilir. Uzun dönemde distoni, koreoatetoz ve tremor gibi bazal gangliyon tutulum bulguları gösterir^{42,43}.

d) Parasagittal Serebral Nekroz: Genellikle serebral korteks ve subkortikal beyaz maddeyi etkileyen bir lezyon tipidir. Hipoksik iskemik hasar ön, orta ve arka serebral arterler arasındaki vasküler yataktan parasagittal yayılım gösterir. Sıklıkla bilateral ve simetrik yapıda olmasına rağmen asimetrik de olabilir. Beynin oyo-regülasyon işlevinin bozulması sonucunda belirgin iskemi gelişir. Yenidoğan döneminde bu zedelenme genellikle proksimalde ve üst ekstremitelerde hipotoni ve kuvvetsizlik bulgularıyla kendini gösterir. Geç dönemde ise spastik kuadriparezi, konuşma bozukluğu ve göz hareketlerinde bozukluk ile sonuçlanır^{42,43}.

e) Periventriküler Lökomalazi: Erken doğan bebeklerde hipoksi ve iskemiyeye bağlı en sık görülen lezyondur. Düşük doğum ağırlığı, kalp ve solunum sistemindeki sorunlar nedeniyle solunum cihazına ihtiyacı olanlarda daha sık görülmektedir. Erken doğan bebeklerin ventrikül çevresindeki beyaz madde damarlar açısından oldukça zengin olduğu için iskemi ve kanamaya karşı daha hassastır. Periventriküler lökomalazi özellikle lateral ventriküllerin arka-dış-yan köşelerinde nekroz ve kanamayla kendini gösterir. Hafif olgularda küçük gliyozis alanları, ventriküllerde genişleme ve miyelin azalması görülürken, ağır olgularda multikistik ensefalomalaziye kadar değişen bulgular ortaya çıkabilir. Kortikospinal yolda bacaklara giden liflerin periventriküler alandan geçmeleri nedeniyle bu bölgenin hasarlanması sıklıkla spastik dipleji ile sonuçlanır^{42,43}.

f) Periventriküler Hemorajik İnfarkt: Erken doğan bebeklerde genellikle ciddi ventrikül içi kanama ile birlikte ortaya çıkar. Sıklıkla iki taraflı ve venöz kaynaklıdır. Venöz enfarkt medüller ve uç venlerin tıkanması sonucunda oluşur. Kısa ve uzun dönem bulguları zamanından önce doğan bebeklerdeki diğer bölgesel iskemik lezyonlarda gözlenen klinik bulgulara benzerdir. Ayrıca, kanama sonrası ventrikül genişlemesi veya hidrosefali bulunabilir^{42,43}.

g) Bölgesel ve Çoklu Bölgesel İskemik Beyin Nekrozu: Genellikle zamanında doğan bebeklerde ana serebral arterlerden birinin tıkanması sonucu gelişen iskemik beyin hasarıdır. En sık etkilenen bölge orta serebral arterin suladığı alandır. Genellikle tek taraflıdır. Hipoksik iskemik ensefalopatili yenidoğanların %15-20'sinde görüldüğü bildirilmektedir. Beyin parankiminde enfarktlara bağlı kistler oluşur. Bu kistler porenselalik veya multikistik ensefalomalazi olarak isimlendirilir. Erken doğan bebeklerde sıklıkla bu durum çok sayıda, küçük, dağılmış enfarktlar şeklinde görülür. Tromboemboli fokal beyin hasarının en muhtemel nedenidir. Emboli kaynağı da genellikle plental enfarkt, harabiyete

uğramış veya kateterize edilmiş damarlardır. Yenidoğan dđneminde, ũst ekstremitede gũçsũzlũk, asimetrik moro refleksi, hemiparezi, fokal nđbetler, uzun dđnemde ise spastik hemiparezi, kuadriparezi, bilişsel bozukluklar ve nđbetler gđrũlũr^{42,43}.

Hipoksik İskemik Beyin Hasarı Klinik Belirti ve Bulgular

HİBH'nda klinik belirti ve bulgular hipoksi ve iskeminin şiddetine, sũresine, gebelik yaşına, diğer sistemlerin etkilenme dereceleri ve lezyonların yerlerine bağlı olarak değişir. HİBH'nı takiben gđrũlen en sık klinik bulgular solunum anormallikleri, apne, huzursuzluk, nđbet, postũr ve hareket bozuklukları, anormal pupil yanıtı, hipotoni ve ũn fontanelde kabarıklıktır³.

Nđbetler orta veya ağır derecede beyin hasarı durumunda gđrũlen en ũnemli klinik bulgudur. Genellikle hipoksiden sonraki ilk 24 saat içinde başlar. En sık gđrũlme zamanı ise ilk 6-12 saattir^{3,30}. Nđbetler multifokal-klonik veya fokal olarak gelişebilir. Hipoksik iskemik hasarın şiddeti ne kadar fazla ise nđbetin başlangıcı da o kadar erken olmaktadır. Bazı ağır olgularda nđbetler antiepileptik tedaviye dirençli olabilir³⁰.

Hafif derecede etkilenmiş olgularda genellikle irritabilite artışı, derin tendon reflekslerinde artma ve abartılı Moro refleksi olur. Bulgular genellikle 24 saatten uzun sũrmez. Orta derecede etkilenmiş yenidoğanlar ise letarjik, hipotonik ve derin tendon refleksleri hipoaktiftir. Ayrıca nđbet sık olarak gđrũlũr.

Gũnũmũzde HİBH olgularının değerlendirilmesinde ve prognozun tahmin edilmesinde Modifiye Sarnat sınıflaması kullanılmaktadır. İlk olarak 1976 yılında Sarnat ve Sarnat tarafından ũnerilen bu sınıflama gũnũmũzde diğer araştırmacılar tarafından gđzden geçirilmiştir. Bu sınıflamaya gđre olgular hafif, orta ve ağır olarak sınıflandırılmaktadır¹⁸ (Tablo 1).

Tablo 1: Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Modifiye Sarnat Sınıflaması.

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

Sarnat ve Sarnat'ın sınıflaması dışında Volpe doğum sonrası hipoksik iskemik süreci 12'şer saatlik dilimler şeklinde 72 saat ve sonrası dönem olarak incelemiştir⁴⁴.

İlk 12 Saatlik Dönem: Ağır olgularda ilk 12 saatte stupor, koma, düzensiz solunum, solunum yetmezliği, hipotoni, yenidoğan reflekslerinde azalma ve nöbetler gözlenir. Pupiller ise hafif olgularda geniş ve ışığa tepki verirken, ağır olgularda dar ve ışığa tepki vermezler¹⁸.

12-24 Saatlik Dönem: Bu dönemde ağır olgularda koma devam ederken hafif olgularda bilinç durumunda bir miktar iyileşme görülür. Orta ve ağır derecede etkilenmiş olgularda uyanıklığın artması ile beraber nöbetler, apne, huzursuzluk, jitterines (titreme benzeri) gibi klinik belirtiler artabilir⁴³.

24-72 Saatlik Dönem: Ağır etkilenmiş olgularda 24-72 saat içinde beyin ve beyin sapı işlevleri bozulur, bilinç giderek kötüleşir, pupillerin ışık tepkisi ve beyin sapına ait refleksler alınamaz. Koma giderek ağırlaşır, solunum durması olur ve bu dönemde bebeklerin çoğu kaybedilir¹⁹.

72. Saatten Sonraki Dönem: 72 saatten sonra hayatta kalan olgularda günler, haftalar içerisinde bir miktar düzelme devam eder. Bilinç düzeyinde kısmi iyileşme olmakla birlikte hafif bir stupor hali devam edebilir. Ancak bu dönemdeki düzelme devam etse bile bazı vakalarda emme, yutma ve dil hareketlerindeki sorunlara bağlı olarak beslenme zorlukları yaşanır⁴².

Hipoksik iskemik olaylar esnasında %60-70'inde beynin yanı sıra en az iki organ daha etkilenir. Beyin dışında en sık etkilenen organlar sırasıyla böbrekler, kalp, akciğerler, karaciğer ve barsaklardır. Hipoksi-iskemiye takiben böbrek kanlanmasının azalması sonucu oluşan akut tübüler nekroz, kortikal veya meduller hasara ikincil olarak böbrek yetmezliği gelişebilir. Bazı vakalarda oligüri hatta anüri bile görülebilir⁷. Kalpte ise miyokard iskemisine bağlı olarak, miyokard nekrozu, konjestif kalp yetmezliği, ritim bozukluğu, hipotansiyon ve şok gelişebilir. Akciğerlerde de sürfaktan yapımının baskılanması veya yıkımına bağlı olarak respiratuvar distres sendromu oluşabilir. Ayrıca ağır hipoksi iskemide akciğerlerde ödem, kanama ve pulmoner hipertansiyon gelişebilir. Barsaklarda yaşanan hipoksi ve iskemi sonucunda nekrotizan enterekolit görülebilir. Ayrıca karaciğer enzimlerinde yükselme ve pıhtılaşma testlerinde bozulma da olabilir. Ağır olgularda adrenal yetmezlik, adrenal bezlerde kanama, uygunsuz antidiüretik hormon salınımı da görülebilir. Ağır olgularda ayrıca metabolik asidoz, hipoglisemi, hipokalsemi, hiperpotasemi ve hiponatremi gibi metabolik sorunlar gelişebilir⁴⁵.

Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Tanı

Yenidoğan bebekte HİBH'nin tanısında ayrıntılı öykü ve nörolojik muayene oldukça önemlidir. Öyküde fetüs kalp hızının monitörizasyonu, fetüsün asit-baz durumu, Apgar skoru, mekonyum varlığı gibi doğum öncesi, doğum süreci ve doğum sonrası dönemle ilgili ayrıntılı bilgiler alınmalıdır. Bebeğin nörolojik muayenesinin de dikkatli bir şekilde yapılması erken dönemde HİBH tanısının konmasına, ağırlığının belirlenmesine ve uygun tedavinin başlanmasına yardımcı olacaktır.

HİBH tanı kriterleri ile ilgili olarak bu zamana kadar pek çok çalışma yapılmıştır. Son zamanlarda ise Amerikan Obstetrik ve Jinekoloji Derneği tarafından 2004 yılında yapılan tanı ölçütleri kullanılmaya başlanmıştır⁴⁶.

HİBH tanısı için bulunması zorunlu ölçütler:

1. Göbek kordonundan alınan arteriyel kan gazında metabolik asidoz olması (pH < 7.0 ve baz açığı \geq 12 mmol/L)
2. Gebelik yaşı 34 hafta veya daha büyük olan bebeklerde erken dönemde orta veya ağır derecede ensefalopati bulgularının olması
3. Enfeksiyon, travma, kanama bozuklukları, genetik bozukluklar gibi ensefalopatiye neden olabilecek diğer nedenlerin dışlanması.

HİBH'na özgü olmayan ek ölçütler

1. Beşinci dakika Apgar puanının üç veya üçten düşük 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 görüntüleme akut ve yaygın beyin hasarı varlığının kanıtlanması,
5. Başlangıçta fetal izlem bulguları normal iken hipoksik olay sonrasında anormal bulguların (bradikardi, geç veya değişken deselerasyon) saptanması.

HİBH tanısının konması kadar ağırlığının belirlenmesi de önemlidir. Hafif düzeydeki HİBH'nın çoğu tedavi gerektirmeden kısa sürede düzelmektedir. Ağır düzeydeki HİBH ise ciddi seyretmekte ve mevcut tedavi yöntemlerine rağmen ağır sakatlıklara neden olmaktadır. Orta derecedeki HİBH'lı yenidoğanların bir kısmı tedaviden fayda görür ve önemli sakatlıklar gelişmezken bir kısmında ise önemli sakatlıklar gelişebilmektedir³. Bu nedenle düzeltilmiş Sarnat ve Sarnat sınıflamasının orta derecede etkilenmiş HİBH'lı yenidoğanları tanımlamada yetersiz kaldığı düşünülmektedir. Erken dönemde tanının konması ve hangi hastaların tedaviden yarar göreceklarının belirlenmesi oldukça önemlidir. Öykü ve nörolojik muayene ile her zaman HİBH tanısının konması ve tedaviden fayda görececek hasta grubunun belirlenmesi yeterli olmamaktadır. Ayrıca erken doğan bebeklerde hipoksik iskemik hasarın tanımlayıcı klinik ve nörolojik bulguları olmadığı için gelişmiş tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. HİBH düşünülen yenidoğanlarda tanıyı desteklemek, tedaviden fayda görececek hasta grubunun belirlenmesi ve

prognoz hakkında bilgi verebilecek biyokimyasal, elektrofizyolojik ve radyolojik yöntemlerden de yararlanılmaya çalışılmaktadır.

1) Biyokimyasal İncelemeler

HİBH tanısında birçok biyokimyasal testten yararlanılmaktadır. Ancak HİBH'nin varlığını, şiddetini, prognozunu gösterebilen ve klinikte kullanılan biyokimyasal bir test şu an için bulunmamaktadır⁴⁷. Ancak hipoglisemi, hipokalsemi, hiponatremi, hiperpotasemi, hiperamonyemi ve metabolik asidoz gibi bazı biyokimyasal bozukluklar HİBH'na eşlik edebilir. Artmış kreatin kinaz (beyin spesifik), hipoksantin, aspartat amino transferaz, eritropoetin, laktat, laktat dehidrogenaz, beta endorfin, fibrin yıkım ürünleri ve nöron spesifik enolaz gibi bazı biyokimyasal belirteçler de HİBH'nı destekleyebilir. Ayrıca günümüzde bu amaçla kan, idrar veya beyin omurilik sıvısında (BOS) bakılabilecek biyokimyasal belirteçlerle ilgili araştırmalar devam etmektedir. Ramaswamy ve ark. tarafından HİBH'lı yenidoğanlarda biyokimyasal belirteçlerin incelendiği bir metaanalizde IL-6'nın hem kordon kanında, hem de serumda bakılmasının prognoz açısından pozitif tahmin değerinin olduğu bildirilmiştir. Kordon kanında bakılması erken tanı için önemli bir avantajdır. Bunun dışında serumda IL-1 β , BOS'nda IL-1 β ve nöron spesifik enolaz gibi biyokimyasal belirteçler klinik kullanım için uygun olabilir. Ayrıca idrar protein S-100 β 'nin de prognozu gösterme açısından ümit verici olduğu bildirilmiştir⁴⁷.

Son yıllarda HİBH ile lipid peroksidazları ve antioksidan enzimler arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Kumar ve ark. çalışmasında HİBH gelişmiş bebeklerde serum-BOS malondialdehit (MDA), BOS/serum MDA oranı, glutatyon peroksidaz (GPO), superoksit dismutaz (SDO) ve katalaz düzeylerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. HİBH ağırlaştıkça serum düzeyinin daha belirgin şekilde arttığı gösterilmiş. Ayrıca HİBH gelişen bebeklerde MDA düzeyinde artış ne kadar yüksekse HİBH'nin o kadar ağır olduğu ileri sürülmüştür⁴⁸.

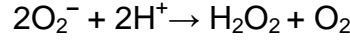
a) Malondialdehit (MDA)

MDA, genellikle oksidatif stres belirteci olarak kullanılan ve lipid peroksidasyonu ile paralellik gösteren bir enzimdir. Kan, idrar ve dokuda MDA düzeyi ölçülmesi ile lipid peroksitleri hakkında yorum yapılabilir. Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesiyle sona ermektedir. Bu bileşiklerden sonuncusu olan MDA,

tiyobarbitürikasit testi ile ölçülmekte ve bu yöntem lipid peroksidasyonunun saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır^{48,49}.

b) Superoksit Dismutaz (SOD)

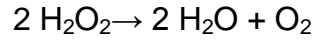
İlk olarak Mc Cord ve Fridovich tarafından 1968'de keşfedilmiş bir enzimdir. Metalloprotein özellikte olan SOD enzimi superoksit (O_2^-) molekülünü oksijene (O_2) ve hidrojen perokside (H_2O_2) dönüştürür. SOR'ne karşı en önemli antioksidan enzimdir.



Enzimin fizyolojik işlevi vücutta oksijen kullanan hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Ayrıca lipid peroksidasyonunu da inhibe ederek hücre koruyucu etkinlik gösterir. SOD enzim aktivitesi, beyin ve eritrositler gibi yüksek oksijen kullanan dokularda oldukça fazladır^{48,49}.

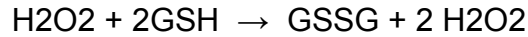
c) Katalaz

Katalaz çoğu organizmada bulunan ve hem içeren homotetramerik yapıda bir enzim olup hücrede özellikle peroksizomlarda yüksek oranda bulunur. Vücutta özellikle eritrositler ve beyin gibi oksijen tüketiminin fazla olduğu hücrelerde oluşan bir SOR olan hidrojen peroksidin H_2O ve oksijene dönüşümünü sağlar. Katalazın hidrojen perokside affinitesi glutatyon peroksidaza göre daha fazladır^{48,49}.



d) Glutatyon Peroksidaz (GPO)

GPO hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu antioksidan özellikte bir metalloenzimdir. Ayrıca lipid peroksitlerini de daha az toksik özellikteki yağ asitlerine indirger. Bu enzim de vücutta oksijen tüketiminin fazla olduğu eritrosit ve nöronlarda oluşan hidrojen peroksidin suya dönüşümünü sağlar.



GPO aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve ağır derecede hücre hasarına neden olur. Vücutta oluşan SOR, peroksitler ve kanserojenlere karşı savunmada önemli bir antioksidandır. Ayrıca GPO, lipooksijenaz ve siklooksijenaz yollarında da etkin bir enzim olup hipoksi iskemi veya yeniden kanlanma döneminde önemli rol oynar^{48,49}.

2) Elektrofizyolojik İncelemeler

a) Elektroensefalogram (EEG)

HİBH'nda zedelenme düzeyini belirlemede oldukça önemlidir. Ayrıca tanıyı desteklemede, prognozu belirlemede ve klinik olarak gözlenemeyen nöbetlerin

tanısında da çok önemlidir. Bu nedenle HİBH düşünülen veya tanı konulan tüm hastalara EEG yapılmalıdır. Hafif düzeydeki HİBH'nda EEG genellikle normal iken, orta düzeydeki HİBH'nda voltaj baskılanması veya elektriksel nöbet aktivitesi sık olarak gözlenmektedir. Ağır düzeydeki HİBH'nda ise başlangıçta keskin ve yavaş dalga boşalımları ve ara ara voltaj baskılanması olur. İlerleyen günlerde ise diken yavaş dalga boşalımlarını takiben voltaj baskılanma periyotları izlenir. Buna patlama-baskılanma görüntüsü (supresyon-burst paterni) denir. Bu görüntünün izlendiği yenidoğanlarda prognozun kötü olduğu bildirilmiştir^{18,50}.

b) Amplitüd-Entegre Elektroensefalogram (aEEG)

Son yıllarda kullanılmaya başlanan aEEG'nin geleneksel EEG'den farkı daha az sayıda elektrotla ve hasta başında sürekli olarak beynin elektriksel aktivitesinin izlenebilmesidir⁵¹. Shankaran ve ark. tarafından HİBH'lı yenidoğanlarda yapılan çalışmada aEEG'nin %91 duyarlılık ve %88 özgünlükle uzun dönemli sonuçları öngörebildiği bildirilmiştir. Bu çalışma ile erken dönemde kullanılan aEEG'nin HİBH tanısında ve tedaviye karar vermede yardımcı olduğu gösterilmiştir⁴.

c) İşitsel Uyarılmış Elektriksel Potansiyeller

Beyin sapının işitsel uyarılmış potansiyelleri HİBH'lı bebeklerin izleminde ve prognozlarının belirlenmesinde kullanılabilir. HİBH'lı yenidoğanlarda yapılan çalışmalarda normal dalga yapısının bozulduğu veya latansın belirgin olarak uzadığı durumlarda prognozun iyi olmadığı bildirilmiştir⁵⁰.

d) Görsel Uyarılmış Elektriksel Potansiyeller

Görsel uyarılmış potansiyellerin de HİBH'lı yenidoğanların izleminde ve prognozlarının belirlenmesinde katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Normal dalga yapısının bozulduğu veya dalga latansının belirgin olarak uzadığı durumlarda prognozun iyi olmadığı bildirilmiştir. Özellikle görsel uyarılmış potansiyelin alınamadığı durumlarda prognozun daha kötü olduğu gösterilmiştir⁵⁰.

e) Somatosensöryel Uyarılmış Elektriksel Potansiyeller

Somato-sensöryel uyarılmış potansiyeller HİBH'nin tanı ve tedavisini yönlendirmede katkısı olmasa da prognoz hakkında önemli ipuçları sağlayabilir. HİBH geliştikten sonraki ilk 24 saat içinde median sinir kullanılarak yapılan somato-sensöryel uyarılmış potansiyellerin normal bulunmasının iyi prognozu önceden belirlemede %94 duyarlı olduğu gösterilmiştir⁵⁰.

3) Görüntüleme Yöntemleri

a) Kraniyal Ultrasonografi

Hasta başı uygulanabilmesi, zararsız, güvenilir ve ucuz olması nedeniyle sık tercih edilen tanısal bir yöntemdir. Bazal gangliyon ve talamus hasarları, ventrikül içi ve çevresi kanamalar, ventrikül çevresi lökomalaziler, bölgesel veya çoklu bölgesel iskemik hasarlar ön fontanelden yapılan ultrasonografi ile tanınabilir. HİBH'lı yenidoğanlarda erken dönemde beyin ekodansitesinin artması, temel anatomik yapıların ayırt edilememesi, sulkusların silinmesi ve ventriküllerin basıya uğramış olması beyin ödemi düşündürür⁴².

b) Renkli Doppler Sonografi

Son yıllarda kullanılmaya başlanan bu yöntem beyin arter kan akım hızı ve beyin kan hacmi ölçülerek tanı ve prognoz hakkında bilgi vermektedir. Ön serebral arterden yapılan ölçümlerde diyastol sonu kan akım hızının sistolik kan akım hızına oranının 0,55'den küçük olmasının HİE'li bebeklerde kötü prognoz işareti olduğu bildirilmiştir⁴².

c) Bilgisayarlı Tomografi (BT)

HİBH'lı yenidoğanlarda özellikle ağır nöronal nekrozdaki yaygın kortikal hasarı, bazal gangliyon ve talamus hasarı, periventriküler lökomalazi, bölgesel ve çoklu bölgesel iskemik beyin nekrozu hakkında ultrasonografiye göre daha önemli tanısal bilgiler verir. HİBH sonrasında beyinde ortaya çıkan dansite azalması ve zamanında doğan bebeklerde daha sık olarak rastlanan parasagittal enfarktlerin gösterilmesinde BT oldukça yararlıdır. BT'nin özellikle beyin ödeminin en belirgin olduğu iki ile beşinci günler arasında dansite değişikliğini yansıtacağı kabul edilmektedir. Beyin dansitesindeki azalmanın kötü prognozu yansıttığı gösterilmiştir. Özellikle asfiktik olaydan 1-2 hafta sonra, diffüz kortikal nöronal hasar tayininde en değerli yöntemdir. Erken dönemde lezyonları BT ile ayırt etmek güçtür. Ancak günler veya haftalar sonra damar dağılımında azalma ortaya çıktığından BT'nin değeri artmaktadır⁴².

d) Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG)

Günümüzde perinatal HİBH'lı yenidoğanlarda hasarın derecesini ve özelliklerini en iyi gösteren görüntüleme yöntemlerinden biridir. MRG miyelinizasyonda gecikme, korpus kallozumda incelme, kortikal atrofi, bazal gangliyon lezyonları ve beyaz cevher patolojilerini daha detaylı göstermesi nedeniyle prognoz tahmininde önemli gelişmeler sağlamıştır. Ayrıca MRG

yönteminin iyonize edici radyasyon içermemesi de diğer bir tercih sebebidir. Beyin dokusu hakkında daha detaylı bilgi sağlaması nedeniyle HİBH'nin erken dönemlerinde oluşan beyin ödeminin bir hafta içinde düzeldiği ve yerini korteks, beyaz cevher, bazal gangliyonlar ve kapsüla internanın arka bacağında saptanan anormal sinyallere bıraktığı seri MRG tetkikleri ile gösterilmiştir. Bu değişikliklerin ağır derecede HİBH ve kötü prognoz ile birlikte olduğu saptanmıştır⁵².

e) Difüzyon Ağırlıklı Manyetik Rezonans Görüntüleme

Bu görüntüleme yöntemi beyin dokusundaki suyun moleküler hareketlerinden kaynaklanan görüntülerden elde edilir. Doğum sonrası beyaz cevher hasarını, ventrikül çevresinde oluşan lökomalazi ve diğer hasarları daha erken dönemde gösterebilmesi nedeniyle standart MRG'ye göre daha duyarlıdır. Hasarın erken dönemde gösterilmesi tedavi gerektiren hasta grubunun erken dönemde belirlenmesini sağlayabilir. Ancak teknik nedenlerden dolayı erken dönemde kullanılması zordur^{42,52}.

f) Manyetik Rezonans Spektroskopi

Hücresel düzeyde metabolik değişiklikleri gösterebilen bir görüntüleme yöntemidir. Bu yöntemle hipoksi-iskeminin erken ve geç dönem bulgularını ve prognoza etkisini değerlendirmek mümkündür. Manyetik rezonans spektroskopi ile ³¹P kullanılarak fosfokreatinin (PCr) ve inorganik fosfat (Pi) ölçümü yapılabilmektedir. PCr/Pi oranı beyindeki fosforile enerji durumunu gösterir, HİBH'lı bebeklerde bu oranın düşük olması kötü prognoza işaret eder^{42,52}.

g) Proton Manyetik Rezonans Spektroskopi

HİBH'lı bebeklerin beyinlerinde laktat oranında artış ve N-asetil-aspartat (NAA) düzeyinde düşüş olduğu bu yöntemle saptanmıştır. NAA/kreatinin veya NAA/kolin oranındaki düşüklüğün kötü prognozu yansıttığı gösterilmiştir^{42,52}.

h) Kafa İçi Basıncın İzlenmesi

Kafa içi basıncın devamlı veya sık ölçümleri HİBH'lı bebeklerde beyin ödemi, kanama sonrası hidrosefalinin tanısında değerlidir. Artmış kafa içi basınç kötü prognozla ilişkilidir.

Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Tedavi

Son yıllardaki gebe ve yenidoğan izleminde önemli gelişmeler olmasına rağmen HİBH tüm dünyada yenidoğan ölümlerinin ve sakatlıklarının önde gelen nedenlerinden biridir. Bu nedenle HİBH'nin tedavisine yönelik çalışmalar yoğun bir

şekilde devam etmektedir. Ancak bu zamana kadar HİBH oluştuktan sonra uygulanan tedavi yöntemleriyle henüz istenen başarı sağlanamamıştır^{53,54}. Doğum öncesi ve doğum esnasında oluşabilecek asfiksini önlenmesine yönelik olarak yüksek riskli fetüsün gebelik ve doğum esnasında yakından takibi, anneye ait risk faktörlerinin belirlenmesi, doğum öncesi bakım kalitesinin artırılması ve doğumların uzmanlar tarafından yaptırılması HİBH gelişiminin önlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca doğum sonrası oluşabilecek asfiksini önlenmesine yönelik olarak da yenidoğan canlandırılması konusunda deneyimli en az bir kişinin doğum odasında bulunması önerilmektedir. Tüm çabalara rağmen HİBH önlenememiş ise bebek için uygun olan destek tedavileri uygulanmalıdır¹⁹.

1. Destek Tedavileri

a) Solunumun Sağlanması

Doğumu takiben etkin bir şekilde uygulanan solunum desteği özellikle doğum esnasında ve doğum sonrasında bebekte oluşabilecek HİBH'ni önleyebilir veya başlamış olan HİBH'nin süresini ve şiddetini azaltabilir. Hipoksi beyin hasarına neden olurken, solunum desteği esnasında uygulanan hiperoksi de istenmeyen sonuçlara neden olabilir. Yaşamın ilk saatlerinde hiperoksiye maruz kalınması SOR'nin oluşumuyla beyinde oksidatif hasara ve uzun dönemde kötü nörolojik sonuçlara neden olabilmektedir. Bu yüzden günümüzde zamanında doğan bebeklerin yeniden canlandırılmasında başlangıçta oda havası ile solunum desteği %100 oksijene göre tercih edilmektedir⁵⁵.

Doğum odasındaki yeniden canlandırma sonrasında gerekirse solunum desteğine yenidoğan ünitesinde etkin şekilde devam edilmelidir. Bu esnada karbondioksit normal sınırlar içerisinde tutulmalıdır. Karbondioksit düşüklüğü beyin damarlarında daralma yaparak HİBH'nin daha da artmasına neden olabilir. Karbondioksitin yüksekliği ise beyin damarlarında genişlemeye neden olarak beyin kanaması yapabilir.

b) Beyin kan dolaşımının sağlanması

Beynin kan dolaşımı, sistemik kan dolaşımı ile pasif olarak sağlanır. HİBH kan-beyin bariyerini ve beyinin damarsal otonöregülasyonunu bozmaktadır. Kan basıncı düştüğü esnada beyin dolaşımı azalır ve HİBH daha da artar. Bu nedenle sistemik kan basıncı normal sınırlarda tutulmaya çalışılmalıdır. Tansiyon düşüklüğü yönünden bebek yakın takip edilmeli gerekirse sıvı ve inotrop ilaç desteği sağlanmalıdır. Ayrıca

beyin dolaşımını bozacak duktus açıklığı, polisitemi, apne ve bradikardi gibi nedenler uygun şekilde tedavi edilmelidir^{36,54}.

c) Sıvı-elektrolit ve kan şekerinin ayarlanması

Tansiyon düşüklüğü yönünden yakın takip edilerek sıvı desteği sağlanan bebeğin elektrolitlerinin ve kan şekerinin de yakın takip edilmesi gerekmektedir. Sıvı desteği esnasında uygunsuz antidiüretik hormon salınımı ve beyin ödemi yönünden dikkat edilmelidir. Elektrolit takibi esnasında hipokalsemi, hiponatremi, hipomagnezemi, metabolik asidoz, hiperpotasemi, böbrek yetmezliği yönünden de yakın takip edilmeli ve gerekli durumlarda uygun şekilde tedavi edilmelidir⁵⁶.

HİBH tedavisinde en uygun kan şekeri düzeyi hala tartışmalıdır. Yüksek kan şekeri ile hipoksik iskemik dokuya yeterli enerji sağlanarak hasarın önlenilebileceği öne sürülmüştür. Ancak yapılan hayvan çalışmalarında yüksek kan şekeri düzeyinin hipoksik dokuda laktat seviyesini arttırarak hasarı arttırdığı gösterilmiştir. Klinik sonuçlar hala tartışılmaya devam etmektedir. Bunun yanında hipogliseminin hem HİBH'ni arttırdığı hem de uzun dönem bilişsel bozukluklara neden olduğu kanıtlanmıştır⁵⁷. Bu nedenle HİBH'lı yenidoğanlarda kan şekeri düzeyinin normal sınırlarda olması önerilmektedir.

d) Nöbetlerin kontrol altına alınması

Orta ve ağır derecede HİBH'lı yenidoğanlarda doğum sonrası ilk saatlerden itibaren nöbetler sıklıkla ortaya çıkar. Nöbetler HİBH'nın bir bulgusu olduğu gibi HİBH'ni arttırdığı da kanıtlanmıştır. Bu nedenle HİBH'lı yenidoğanlarda nöbetlerin etkili bir şekilde tedavi edilmesi beyin hasarının daha da artmasını engelleyecektir^{58,59}. Nöbet tedavisinde öncelikli olarak varsa hipoglisemi, hipokalsemi gibi elektrolit dengesizlikleri düzeltilmelidir. Yenidoğan nöbet tedavisinde ilk seçenek olarak fenobarbital, ikinci olarak da fenitoin önerilmektedir⁶⁰. Nöbet kontrolü sağlandıktan sonra, nörolojik muayene ve EEG'nin normal olması durumunda ilaç erken dönemde kesilmelidir. Nöbet kontrol edilmesine rağmen EEG'de anormal bulgular devam ediyorsa tedavi EEG normal olana kadar sürdürülmelidir. EEG'de anormal bulgular ve nöromotor gelişme geriliği olan hastalarda tedavi daha uzun süreli olmalıdır⁴⁴. HİBH olan yenidoğanlarda klinik nöbet olmasa bile subklinik nöbet için EEG yapılması önerilmektedir⁵¹.

1. Fenobarbital

Fenobarbital 1912 yılında bulunan ve günümüzde hala kullanımda olan en eski antiepileptik ilaçtır. Antiepileptik etkinliğini GABA aracılı klor kanallarının açık

kalma sürelerini arttırarak ve glutamat etkilerini azaltarak yapar. Büyük kısmı karaciğerde metabolize edilir. Bilişsel fonksiyonlarda bozulma, uykusuzluk, sersemlik, konuşma bozukluğu, ataksi, hipotansiyon ve koma gibi yan etkiler görülebilir⁶¹.

Yapılan hayvan çalışmalarında fenobarbitalin nöron koruyucu etkinliği hala netlik kazanmamıştır. HİBH oluşturulmuş yenidoğan sıçanlarda fenobarbitalin belirli dozun üstünde apopitotik nöron hasarına neden olduğu bildirilmiştir⁶². Ancak buna rağmen fenobarbital yenidoğan nöbetlerinde ilk tercih edilen antiepileptik ilaçtır. Orta ve ağır derecede HİBH'li yenidoğanlarda fenobarbitalin ön koruyucu olarak kullanılıp kullanılmaması ise halen tartışma konusu olup daha fazla çalışmaya ve uzun dönemli sonuçlara ihtiyaç vardır^{44,62,63}.

2. Fenitoin

Fenitoin, nöronlara sodyum girişini engelleyerek nöron zarının uyarılabilme eşiğini yükseltir. Emilim hızı ve karaciğerdeki metabolizasyonu kişiler arasında önemli farklılıklar gösterir. Plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanır. Fenitoin kullanımına bağlı olarak uykusuzluk, sinirlilik, tremor, yüksek dozlarda da deliryum ve koma gibi nörolojik yan etkiler görülebilir⁶¹. Yenidoğan nöbetlerinde fenobarbitalden sonra ikinci sıklıkta kullanılan antiepileptik ilaçtır.

Hayakawa ve ark. çalışmasında HİBH oluşturulmuş yenidoğan sıçanlarda fenitoinin nöron koruyucu etkinliğinin olmadığı bildirilmiştir⁶⁴. HİBH oluşturulmuş yenidoğan sıçanlarda fenitoinin doz bağımlı nörotoksik aktivitesinin olduğu gösterilmiştir^{62,64}.

3. Topiramet

Topiramet erişkinlerde ve çocuklarda epilepsi tedavisinde sık kullanılan yeni kuşak bir antiepileptik ilaçtır. Antiepileptik etkisini voltaj bağımlı sodyum ve kalsiyum kanallarını inhibe ederek zar stabilizasyonu ve glutamat algaç alt tiplerinden kainik asit ve AMPA algaçlarını engelleyerek gösterir. Proteinlere bağlanma oranı düşüktür. Topiramet kullanımına bağlı olarak parestezi, kilo kaybı, sedasyon, halsizlik, psikomotor yavaşlama ve böbrek taşı oluşumu gibi yan etkiler bildirilmiştir^{65,66}. Yenidoğan nöbetlerinde fenobarbital, fenitoin ve benzodiazepin tedavisine yanıt alınamayan durumlarda kullanılmaktadır. Ancak etkinliğiyle ilişkili yeterli veri yoktur.

HİBH oluşturulmuş yenidoğan sıçanlarda topirametin nöron koruyucu etkisinin olduğu bildirilmiştir. Noh ve ark. çalışmasında HİBH oluşturulmuş yenidoğan sıçanlarda topirametin nöron hasarını azalttığı ve davranış deneylerinde sham grubuyla benzer sonuçlar gösterdiği tespit edilmiştir⁶⁷. Literatürde yapılan farklı

çalışmalarda topiramatin tek başına veya soğutma tedavisi ile birlikte verilmesinin HİBH'ni azalttığı gösterilmiştir. Topiramatin nöron koruyucu etkisini AMPA ve kainik asit algaçlarını baskılayarak, voltaj bağımlı sodyum ve kalsiyum kanallarını kapatarak ve aşırı glutamat salınımını engelleyerek gösterdiği düşünülmektedir^{68,69}. Filippi ve ark. çalışmasında HİBH'li yenidoğanlarda topiramat ile birlikte soğutma tedavisinin erken dönemde olumlu sonuçlarının olduğu bildirilmiştir. Ancak tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi için uzun dönemli sonuçların beklenmesi önerilmiştir⁷⁰.

4. Lamotrijin

Lamotrijin, feniltiazin sınıfından olan yeni kuşak bir antiepileptiktir. Antiepileptik etkisini voltaj duyarlı sodyum kanallarını kapatarak ve özellikle başta glutamat olmak üzere uyarıcı nörotransmitter salınımını azaltarak gösterir. Ağızdan biyoyararlanımı %100'e yakındır. Karaciğerde metabolize edilip, idrarla atılır. En sık görülen yan etkileri deri lezyonları, sersemlik, çift görme, ataksi ve görme bulanıklığıdır. Yenidoğan nöbetlerinde etkinliğine yönelik yeterli veri yoktur⁷¹.

HİBH oluşturulmuş yenidoğan ve erişkin sıçan modellerinde lamotrijinin nöron koruyucu etkinliği gösterilmiştir⁷². Papazisis ve ark. çalışmasında HİBH oluşturulmuş yenidoğan sıçanlarda lamotrijinin iskemi oluşturulan tarafta glutamat, aspartat düzeyini azaltırken ve GABA düzeyini artırarak nöron koruyucu etkide bulunduğu tespit edilmiştir⁷³.

5. Valproik asit

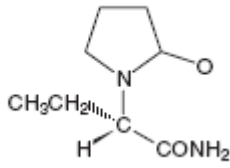
Valproik asit, GABA'in beyindeki düzeyini artırarak ve nöron zarındaki voltaj bağımlı sodyum kanallarını kapatarak antiepileptik etki gösterir⁶¹. Valproik asit ağızdan alım sonrası hızla ve tama yakın barsaklardan emilir. Karaciğerde metabolize edilir⁴⁴. En sık gözlenen yan etkileri tremor, sedasyon, yorgunluk, trombositopeni, karaciğer enzimlerinde yükselme, polikistik over sendromu, hiperandrojenizm ve kilo alımıdır. Yenidoğanlarda ve sütçocukluğu döneminde hepatotoksisiteye neden olabileceği için metabolik hastalıklar dışlanmadan kullanılmamalıdır^{63,74}.

Hayvan çalışmalarında GABAerjik etki ile serebral iskemiye karşı direnci ve antiapoptotik gen oluşumunu arttırdığı, hücre zarı viskozitesini düzenleyerek nöron koruyucu etkinlik yaptığı bildirilmiştir⁷⁵. Kim ve ark. çalışmasında ise valproik asidin yüksek dozlarda (400 mg/kg) yenidoğan sıçanlarda apoptotik hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir⁷⁶. Kabakus ve ark. çalışmasında HİBH oluşturulmuş yenidoğan sıçanlarda valproik asidin doz bağımlı nöron koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir¹⁰.

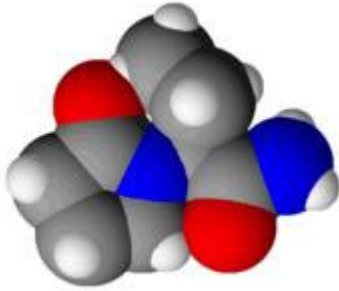
6. Levetirasetam

Son on yılda epilepsi tedavisinde kullanılmaya başlanan yeni kuşak bir antiepileptik ilaçtır^{77,78}. LEV (α -etil-2-okso-1-pirolidin asetamidin S-enantiomeri), pirasetamın etil analogunun S-kimyasal bileşenidir. Diğer antiepileptik ilaçlarla kimyasal benzerliği yoktur^{79,80}. Kimyasal yapısı Şekil 3'te, molekül yapısı ise Şekil 4'te gösterilmektedir.

Şekil 3. LEV'in kimyasal yapısı⁸¹.



Şekil 4. LEV molekülü⁸¹.



Antiepileptik ilaç olarak 1999'da FDA onayı alan levetirasetam 2000 yılından itibaren klinikte kullanılmaya başlanmıştır. İlk zamanlarda diğer antiepileptik ilaçlara direnç gösteren, parsiyel nöbetli (ikincil jeneralizasyon olan veya olmayan) erişkin hastalarda kullanılırken, son 2 yıl içerisinde 1 aylıktan itibaren kullanılmaya başlanmıştır. Ancak yenidoğan döneminde kullanım onayı yoktur^{79,82}.

Etki mekanizması

LEV'in antiepileptik etki mekanizması hala tam olarak açıklanamamaktadır. Yapılan invitro çalışmalarda N-tipi yüksek voltajlı aktive kalsiyum kanallarını kısmi olarak kapatarak hücre içi depolardan kalsiyumu azaltarak etki ettiği gösterilmiştir. Aynı zamanda GABA ve glisin ile düzenlenen akımlardaki azalmayı kısmen tersine çevirir^{79,82,83}. Diğer taraftan antiepileptik olmayan bir özelliği ise presinaptik düzeyde sinaptik vezikül proteini 2A'ya (SV2A) spesifik olarak bağlanması ve bu proteinin

ekzositoz işlevini düzenlemesidir. Zar glikoproteini olan SV2A en fazla sinaptik ve endokrin hücrelerin vezikül zarlarında bulunmaktadır. LEV'in SV2A üzerinden de antiepileptik etkisinin olduğu ileri sürülmüştür. LEV dışındaki diğer antiepileptik ilaçların SV2A'ya etkinliği yoktur^{84,85}.

Farmakolojik özellikleri

Ağızdan alındıktan sonra tama yakın olarak emilir. Gıda ile birlikte alımı biyoyararlanımı etkilemez ancak emilim oranı yavaşlar. Çocuklarda günlük idame doz erişkinin %130-140'ına biyoeşdeğerdir. Günlük çocuk dozu: 10-20 mg/kg/gün başlanılıp, haftalık 10 mg/kg artırılarak 32-60 mg/kg/gün dozuna kadar verilebilir⁷⁹.

LEV karaciğer tarafından metabolize olmaz, plazma proteinlerine bağlanma oranı düşük olduğundan, diğer antiepileptik ilaçlarla alındığında etkileşime girmez. Kararlı plazma düzeyine 2 gün içinde ulaşmaktadır. Alınan miktarının % 66-76'sı değişmeden idrar ile atılmakta ve % 27'si aktif olmayan metabolitlere dönüşmektedir. Yarılanma ömrü 7 saat olup böbrek yetersizliğinde bu süre uzamaktadır^{79,82}.

Endikasyonları

Bir ayın üstündeki bebek, çocuk ve erişkin epilepsili hastalarda, ikincil jeneralize olan veya olmayan parsiyel başlangıçlı nöbetlerin ek tedavisinde, semptomatik ve idiyopatik jeneralize nöbetlere etkilidir^{82,85}.

Yan etkileri

Yan etkiler genellikle tedavi başlangıcının ilk 5 ayında görülmektedir. Sıklığı %17,2 - 51,3 oranında bildirilmiştir. Halsizlik, yorgunluk, uyuklama, sinirlilik, ajitasyon, depresyon, davranışsal bozukluklar, saldırganlık ve kişilik değişikliği gibi nöropsikiyatrik yan etkiler görülebilir. Davranış bozukluklarında pridoksin (vitamin B6) ile birlikte kullanıldığında yan etkinin düzeldiği bildirilmiştir. Hastaneye yatış veya ölüm gibi ciddi olumsuz yan etkiler bildirilmemiştir^{86,87}.

LEV'la yapılan hayvan çalışmalarında nöbetleri kontrol altına almasının yanında nöron koruyucu etkisinin de olduğu bildirilmiştir⁷⁸. Erişkin sıçanlarda orta beyin arterinin bağlanmasıyla oluşturulan beyin hasarının LEV tedavisi ile azaldığı gösterilmiştir. Hanon ve ark. erişkin sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada LEV'in antiepileptik etkinin yanında antiepileptogenezis etkisinin de olduğu bildirilmiştir⁸⁸. Oliveira ve ark. çalışmasında ise LEV'in erişkin sıçanlarda pilokarpinin indüklediği nöbetlerde hipokampüste lipid peroksidasyonunu ve oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir⁸⁹. Yine yapılan hayvan çalışmalarında LEV'in tedavi dozunun birkaç kat üstünde dahi nöron ölümüne neden olmadığı ve bu durumun fenobarbital, fenitoin,

valproat gibi geleneksel antiepileptik ilaçlara göre önemli bir üstünlük olduğu ileri sürülmüştür. Kim ve ark. status epileptikus oluşturulmuş yenidoğan sıçanlardaki çalışmasında LEV'in yüksek dozlarda beyin dokusunda apoptozisi önlediği histopatolojik olarak tespit edilmiştir⁷⁶. Ancak LEV'in HİBH'nda geç dönem etkinliğini gösteren hayvan çalışması yoktur. Bu nedenle perinatal HİBH'nda geç dönem etkinliğini gösterecek deneysel hayvan çalışmalarına ihtiyaç vardır.

Ayrıca son zamanlarda bazı merkezlerde yenidoğan nöbetlerinin tedavisinde kullanılmış ve önemli bir yan etkisi olmadan nöbetleri kontrol altına aldığı gösterilmiştir^{1516,90,91}.

e) Soğutma Tedavisi

Son yıllarda HİBH'lı yenidoğanlarda uygulanmaya başlanan soğutma tedavisinin ölüm oranlarını azalttığı ve nörogelişimi olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir. Soğutmanın beyin metabolizma hızını, glutamat salınımını, NO üretimini, lipid peroksidasyonunu ve SOR üretimini azaltarak apoptozisi önlediği düşünülmektedir^{5,90}. Soğutma tedavisi tüm vücut soğutma veya seçici baş soğutma tedavisi şeklinde yapılabilmektedir. Baş soğutma tedavisinde sadece başa soğutma uygulanarak soğutmanın sistemik yan etkilerinden kaçınılmaya çalışılmaktadır⁵. Her iki yöntemde de HİBH sonrası erken dönemde soğutmaya başlanmakta ve 72 saat boyunca devam edilmektedir. Yapılan klinik çalışmalar sonucunda hangi yöntemin daha üstün olduğuna dair yeterli kanıt bulunmamaktadır.

2. Deneysel tedavi yöntemleri

a) Kök Hücre Tedavisi

Son yıllarda HİBH'lı yenidoğan sıçanlarda kök hücre tedavisi ile ilgili deneysel çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. HİBH oluşturulan yenidoğan sıçanlara çok yönlü astrosit kök hücreleri verilmiş ve bu hücrelerin hasarlı beyin alanına göç ederek nöronlara ve astrositlere dönüştükleri gösterilmiştir⁹³. Yine aynı model ile mezenkimal kök hücreleri ile yapılan çalışmada da sıçanlarda beyin hasarının azaldığı ve işlevsel testlerde iyileşme olduğu bildirilmiştir⁹⁴. Mezenkimal kök hücre verilerek yapılan başka bir çalışmada ise nöronlar, oligodendrositler ve astrositler daha fazla çoğalırken, mikrogliaların çoğalmasının baskılandığı tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda HİBH'lı hayvan modelinde mezenkimal kök hücrelerinin hasarlı beyin alanını azalttığı ve davranış testlerinde iyileşme yaptığı gösterilmiştir⁹⁵. Perinatal HİBH'lı yenidoğanlara çok yönlü astrositlerin ve mezenkimal kök hücrelerinin verilmesi ile oluşan nörolojik hasarın en aza

indirilebileceği düşünülmektedir. Ancak daha fazla deneysel hayvan çalışmalarına ihtiyaç vardır⁹⁶.

b) Sitokin Baskılayıcıları

İmmün sistem hormonları olarak da bilinen sitokinler uyaran etkisi ile immün ve immün olmayan hücrelerden sentezlenerek hedef hücre davranışını etkiler. Yapılan çalışmalarda hipoksi iskemi sonrasında başlayan yeniden kanlanma döneminde TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, PAF gibi enflamatuvar sitokinlerin yoğun olarak salındığı tespit edilmiştir. Salınan bu sitokinlerin HİBH'nı arttırdığı gösterilmiştir^{97,98}. Bu nedenle enflamasyonu arttıran sitokinlerin baskılanmasının oluşacak beyin hasarını azaltabileceği düşünülmektedir. Yakın zamanda yapılmış bir araştırmada HİBH oluşturulmuş yenidoğan sıçanlara TNF- α algaç blokörü olan etanersept verilmesi ile apoptozisin azaldığı gösterilmiştir⁹⁹. Bir diğer sitokin olan trombosit uyarıcı faktörün baskılanması da hipoksi-iskemiye karşı nöronları korumaktadır. Trombosit uyarıcı faktör baskılayıcısı olan ABT-491'in yenidoğan HİBH sıçan modelinde koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir^{100,101}.

c) Magnezyum Sülfat

Magnezyum sülfat gebelikte oluşan tansiyon yüksekliğinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ilaçtır. Magnezyum sülfat kullanılan annelerin bebeklerinin doğum sonrasında yenidoğan ünitelerine daha az yattıkları ve daha az entübasyon gereksinimlerinin olduğu bildirilmiştir¹⁰². Hipoksik iskemik hayvan çalışmalarında magnezyum sülfatın enflamatuvar sitokinleri ve hipoksi iskemi sonrası yeniden kanlanma döneminde oluşan SOR'ini azaltarak beyin hasarını azalttığı gösterilmiştir¹⁰³.

Orta ve ağır derecede HİE'li yenidoğanlarda magnezyum sülfatın NMDA algaçlarını engelleyerek hücre içi kalsiyum artışını engelleyerek beyin hasarını azalttığı bildirilmiştir¹⁰⁴. Yenidoğan sıçanlarda yapılan bir çalışmada magnezyum sülfatın orta derecede HİBH tedavisinde etkili olduğu ancak ağır HİBH'nda etkili olmadığı bildirilmiştir¹⁰⁵. Klinik kullanım için magnezyum sülfat ile ilgili daha fazla sayıda çalışmalara ihtiyaç vardır.

d) Allopurinol

HİBH'nda özellikle yeniden kanlanma döneminde SOR önemli rol oynar. SOR oluşumunda önemli rol oynayan ksantin oksidaz enziminin baskılayıcısı allopurinolün kullanımıyla ilgili çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu

çalışmalardan elde edilen metaanalizde allopurinolün HİBH'nda önemli derecede yararlı etkisinin olmadığı bildirilmiştir¹⁰⁶.

e) N-asetil Sistein

N-asetil sisteinin HİBH sonrası yeniden kanlanma döneminde oluşan SOR'ni temizlediği, trombosit agregasyonunu azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca son yıllarda N-asetil sistein kan beyin bariyerinden ve plasentadan kolaylıkla geçebilmesi, yan etkisinin az olması ve nöron koruyucu etkisinin de gösterilmesi nedeniyle önem kazanmıştır¹⁰⁷. Glutasyon öncülü gibi hareket ederek oksidan radikallerinin, apoptozisin ve enflamasyonun oluşumunu baskılar⁹. Wang ve ark. HİBH oluşturulmuş hayvan çalışmasında 200 mg/kg dozunda N-asetil sistein verilmesinin hipoksi ve iskemiye karşı beyni koruduğu bildirilmiştir¹⁰⁸. Jatana ve ark. HİBH oluşturulmuş yenidoğan sıçanlarda hipotermi ile birlikte N-asetil sistein verilmesi ile hasar alanı azalmış, miyelin yapımı artmış ve işlev testlerinde iyi sonuçlar alındığı gösterilmiştir¹⁰⁹.

f) E vitamini

Yağda eriyen vitaminlerden biri olup çok güçlü bir antioksidandır. E vitamininin hücre zarında oksidanlara bağlı oluşan lipid peroksidasyonunu önlediği bilinmektedir. Özellikle eser bir element olan selenyum ile birlikte GPO'ı aktive ederek lipid peroksidasyonunu azaltma yönünde tamamlayıcı etki gösterdikleri bildirilmiştir¹¹⁰.

g) Eritropoetin

Eritropoetinin hangi mekanizmayla apoptozu azalttığı tam olarak bilinmese de HİE'li yenidoğan bebeklerin göbek kordon kanında yüksek düzeyde saptanması onarım mekanizmaları ile ilişkisinin olabileceğini düşündürmüştür. Yakın zamanda eritropoetin ile ilgili yapılmış çalışmaların metaanalizinde doğrudan nöron koruyucu etkisiyle birlikte, nöron çoğalmasını ve yeni damar yapımını uyarıcı, glutamat toksisitesini önleyici, apoptozisi, enflamasyonu ve SOR hasarını baskılayıcı etkilerinin olduğu bildirilmiştir¹¹¹.

h) Melatonin

Hipofizde bulunan pineolasit hücreleri tarafından triptofandan üretilen gece-gündüz ritminden sorumlu ve güçlü bir SOR temizleyicisi hormondur⁹. SOR temizleyici etkisini GPO, glutasyon redüktaz, katalaz ve SDO gibi antioksidan enzimleri uyararak yapar. Ayrıca mitokondriyal elektron transport sisteminin etkinliğini de arttırarak oksidatif strese karşı koruyucu özelliği vardır. Sıçanlarda yapılan hipoksi iskemi modelinde melatoninin SOR'ni temizlediği, enflamasyon ve

apoptozisi engelleyerek nöron koruyucu etkilerinin olduğu bildirilmiştir¹¹². HİE'li yenidoğanlara melatonin verilerek yapılan bir klinik çalışmada serum MDA ve nitrit/nitrat düzeyinin düştüğü ve melatonine bağlı herhangi bir yan etkinin olmadığı bildirilmiştir¹¹³. Ancak tüm bu çalışmalara rağmen melatoninin HİE'deki etkinliğine yönelik daha fazla sayıda çalışmalara ihtiyaç vardır.

ı) Kalsiyum Kanal Kapatıcıları

HİBH tedavisinde nöronlara kalsiyum girişini engelleyecek ilaçların kullanımı ile kalsiyumun hücre içine girişinin önlenebileceği, dolayısıyla hem nekroz hem de apoptozu tetikleyen mekanizmaların baskılabileceği ileri sürülmüştür¹¹⁴. Yapılan klinik bir çalışmada iyonize kalsiyum düzeyi düşük olan yenidoğanlarda, HİBH ve diğer organ hasarlarının daha az olduğu bildirilmiştir¹¹⁵. Bu nedenle nöronlara kalsiyum girişini engelleyerek hasarın azaltılmasına yönelik çok sayıda araştırma yapılmıştır⁵³. Kalsiyum kanal kapatıcılarından özellikle nikardipin ve flunarizin ile hayvan çalışmalarında her iki ilacın nöron koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir^{116,117}. Nikardipin ile HİE'li yenidoğan bebeklerde yapılan klinik bir çalışma ciddi hipotansiyon gelişmesi üzerine sonlandırılmıştır¹¹⁸.

i) İndometazin

HİBH oluşturularak yapılan hayvan çalışmalarında siklooksijenaz enzim baskılayıcısı olan indometazinin beyin hasarını azalttığı bildirilmiştir. Taskın ve ark. çalışmasında HİBH oluşturulmuş yedi günlük sıçanlarda indometazinin nöronal apoptozisi önemli derecede azalttığı gösterilmiştir¹¹⁹.

j) Alfa-2 Agonistler

HİBH'li hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda alfa-2 agonistlerden klonidinin ve deksmedetomidinin nöron koruyucu etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Klonidinin ve deksmedetomidin HİBH oluşturulmuş koyunlarda hasarlı beyin alanını azalttığı ve nöromotor işlevlerde kısmi iyileşme yaptığı gösterilmiştir^{120,121}. Ancak klinik kullanım öncesi daha fazla sayıda HİBH oluşturulmuş hayvan çalışmalarına ihtiyaç vardır.

k) Nitrik Oksit Sentaz Baskılayıcıları

Yeniden kanlanma döneminde NOS enzimi tarafından aşırı miktarda üretilen NO'nin apoptozisi aktive ederek beyin hasarını arttırdığı gösterilmiştir. Bu hasarın NOS baskılayıcıları verilerek önlenebileceği birçok çalışmada bildirilmiştir^{122,123}. Seçici olmayan bir NOS baskılayıcısı olan nitro-L-argininin (7 nitroindazole) HİBH oluşturulmuş sıçanlarda beyin hasarını azalttığı gösterilmiştir¹²³. Yedi günlük

sıçanlarda HİBH'nin hemen ardından 50 mg/kg L-NAME (N-Nitro-L-Arginin Metil Ester) verilen grupta apoptotik hücre sayısının azaldığı saptanmış ancak nöromotor testlerde iyileşme bulunamamıştır⁹⁹.

I) Büyüme Faktörleri

HİBH oluşturulmuş hayvan modellerinde çeşitli büyüme faktörleri ile tedavi yöntemleri denenmiştir^{124,125}. En sık kullanılan büyüme faktörleri insülin benzeri büyüme faktörü-1, epidermal büyüme faktörü, nöronal büyüme faktörü, beyin kaynaklı nörotrofik faktör, vasküler endotelial büyüme faktörü ve fibroblast büyüme faktörleridir (FBF).

1-Nöronal Büyüme Faktörü

HİBH oluşturularak yapılan bir hayvan çalışmasında nöronal büyüme faktörü ventrikül içine verildiğinde beyin hasarını önleyici etkisinin olduğu gösterilmiştir¹²⁶. Nöronal büyüme faktörünün apoptotik hücrelerde bulunan "terminal transferaz nick end labeling" (TUNEL) algacı üzerinden etki ettiği, nöronal hücrede NOS uyarılmasının ve apoptozun daha az olduğu saptanmıştır¹²⁷. Ancak literatürde nöronal büyüme faktörü ile ilgili az sayıda çalışma olması nedeniyle klinik kullanım için daha fazla sayıda hayvan çalışmalarına ihtiyaç vardır.

2-Fibroblast Büyüme Faktörleri

Yapılan hayvan çalışmalarında FBF-2'nin travmaya bağlı oluşan beyin hasarının onarılmasında önemli işlevleri olduğu bildirilmiştir. İskemik beyin hasarı oluşturularak yapılan bir hayvan çalışmasında FBF-2 verilen hayvanların beyinde hücre çoğalmasının ve farklılaşmasının arttığı gösterilmiştir^{128,129}. Yapılan hayvan çalışmaları sonucunda özellikle iskemi sonrasında FBF-2'nin nöron koruyucu etkilerinin olduğunu düşünülmektedir. Ancak klinik kullanımı ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Prognoz

HİBH'nda prognoz özellikle HİBH'nin derecesine, metabolik sorunlara, kalp ve solunum sistemi komplikasyonlarına bağlı olarak değişir. Ayrıca bebeğin kaçınıcı gebelik haftasında doğduğu da prognozu etkiler. Ölüm veya nörolojik sekel oranı ağır derecede HİBH'nda %78, orta HİBH'nda %24 iken hafif HİBH'nda %2'ye kadar düşmektedir. Ağır derecede HİBH koma, apne, oküloşefalik refleks yokluğu ve dirençli nöbetlerle karakterize ve kötü prognozlu bir durumdur. Doğum sonrası 20. dakikada APGAR skorunun çok düşük olması, kendiliğinden solunumun olmaması,

ikinci haftada anormal nörolojik bulguların devam ediyor olması ölüm veya bilişsel ve motor yetilerde ciddi bozukluk gelişeceğinin göstergesidir. Klinik bulgulara ek olarak EEG anormallikleri ve MRG'de patolojik görünüm saptanması da kötü prognozu destekler. Hastaların nöromotor sorunlarının erken ortaya konması, nöromotor gelişmeyi destekleyici tedavi ve fiziksel aktiviteye erken başlanması prognozda daha iyi sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır^{3,8}. HİBH derecesinin önemli prognostik faktör olması, HİBH'nı önlemeye yönelik tedavileri ön plana çıkarmaktadır.

Hipoksik İskemik Beyin Hasarı Hayvan Modeli

Günümüzde hayvan çalışmalarında laboratuvar sıçanları yaygın olarak kullanılmaktadır. Sıçanların ortalama ömrü 2,5-3,5 yıl arasında değişmektedir. Yenidoğan bir sıçanın ortalama ağırlığı 5-6 gramdır (gr). Doğum sonrası 20-24. günlere kadar anne sütü ile beslenirler. Ortalama beyin ağırlığı ise 1,8 gr/250 gr'dır¹³⁰. Yenidoğan sıçanların beyni çok az gelişmiş olduğundan insan fetüs beyninin yaklaşık 15. haftasına karşılık gelmektedir. Sıçanlarda beyin gelişimi doğum sonrası ilk 3 haftada çok hızlı olmaktadır. İnsanda bu dönemin karşılığı gebeliğin ikinci trimestirinden doğum sonrası yaşamın 2. yılına kadardır. Beynin hızlı büyüme döneminin postnatal hayatta gerçekleşmesi, sıçanları postnatal dönemde sinir sisteminin gelişimini araştırmada ideal bir deney hayvan modeli yapmaktadır^{131,132}. Yine yapılan çalışmalar sonucunda yedi günlük sıçanların histolojik olarak beyin gelişimleri 34-37. gebelik haftasındaki insan fetüs ya da yenidoğan beynine benzerdir. Serebral kortekste nöron tabakaları oluşmuş, germinal matriks değişime uğramaya başlamış ve beyaz cevherde kısmen miyelinizasyon tamamlanmıştır¹³³.

Yenidoğan sıçanlarda hipoksi iskemi modeli Rice ve ark. tarafından Levin yönteminin modifiye edilmesi ile oluşturulmuştur¹³⁴. İskemi tek taraflı ana karotis arter bağlanmasıyla, hipoksi ise %92 azot ile %8 oksijen karışımının solutulması ile oluşturulmaktadır. Ana karotis arter bağlanmasıyla aynı taraf beyin hemisferinde, serebral korteks, subkortikal ve periventriküler beyaz cevher, striatum, talamus (bazal gangliyonlar) ve hipokampüsde seçici nöron hasarından enfarkta kadar ilerleyen iskemik lezyonlar gözlenmektedir^{133,134}.

Sıçanların Bilişsel ve Lokomotor Yetilerinin Değerlendirilmesi

Sıçanların bilişsel ve lokomotor yetilerinin değerlendirilmesinde günümüzde pek çok hayvan davranış deney modeli bulunmaktadır. Hayvan davranış deney modelleri ile sıçanlarda öğrenme, hafıza, lokomotor aktivite, anksiyete ve otonom işlevler gibi pek çok özellik değerlendirilebilmektedir. Bu bilimsel yeterlilik ölçütlerinin tümüne aynı anda sahip olan hayvan davranış deney modeli yoktur. Bununla birlikte var olan hayvan davranış deney modellerinin hiçbirinin % 100 güvenilirlikleri de bulunmamaktadır. Bilim ve teknolojiye ilerlemeler ve yapılacak çalışmalar ile hayvan davranış deney modelleri giderek istenen ideal düzeye ulaşabilecektir^{101,135}.

Davranış deneylerinin sıçanların nöromotor gelişimlerini tamamladıkları 80-85. günlerden sonra yapılması önerilmektedir. Davranış deneylerinde cinsiyete bağlı önemli farklılıklar olabildiği için çalışmalarda genellikle erkek sıçanlar tercih edilmektedir. Deneylerin ayrıca sıçanlar 180-250 gram ağırlığına ulaştıktan sonra yapılması önerilmektedir^{101,135}.

Çalışmaya alınacak sıçanların tümünün daha önce yavrulayan, bir gebelikte birbirine yakın sayıda yavru doğuran ve önceki yavrulara bakmış olan annelerin yavrularından seçilmesi önemlidir. Aksi durumda çalışmaya alınan sıçanların anne tarafından reddedilme ve yenme riski olabilecektir. Tüm yavru sıçanlar aynı günde sütten kesilmeli ve annelerinden ayrılmalıdır. Anneden ayrılan sıçanlar her kafeste aynı sayıda olacak şekilde barındırılmalıdır. Böylece nöromotor gelişimlerini etkileyebilecek faktörlerin eşit olması sağlanacaktır.

Sıçanlar davranış deneylerinin yapılacağı laboratuvara iki gün önce getirilerek ortama alışmaları sağlanmalıdır. Oda sıcaklığı $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ olmalı, 12 saatlik gece gündüz ritmi sağlanmalı, ses, bekleme koşulları standardize edilmiş olmalıdır. Davranış deneyi modelini uygulayan araştırmacının da her grup için aynı kişi olması, aynı renk giysi giymesi, aynı yöntemle düzeneklere konması ve her zaman aynı yerde durması gibi faktörlere de dikkat edilmelidir^{101,135}.

Sıçanların bilişsel ve lokomotor yetilerinin değerlendirilmesinde Holeboard, Morris su tankı, açık alan, rotator düzeneği, T labirent, yükseltmiş artı labirent testi gibi testler kullanılmaktadır.

Açık Alan Testi

Sıçanların duygusal durumunu, sedasyonunu, anksiyete davranışlarını, otonom işlevlerini, lokomotor aktivitesini ölçmek için sık kullanılan bir düzenektir¹³⁶.

İlk kez 1934 yılında Hall ve ark. tarafından deney hayvanlarının emosyonel durumunu test etmek için kullanılmıştır. Başlangıçta daire tabanlı olarak kullanılırken, günümüzde kare, dikdörtgen şeklinde ve ortamı ışıklandırılmış olan değişik formları vardır^{137,138}. Açık alan deneyinde 80x80x50 cm veya 100x100x30 cm boyutlarında zemini 16 eşit kareye bölünmüş bir kutu kullanılmaktadır.

Çalışmaya alınan sıçanın açık alana bırakılma süresi 2-20 dakika arasında değişmekle birlikte genellikle 5 dakikadır. Açık alana bırakılan sıçanda anksiyete davranışı hayvanın kendi ortamından alınıp tek başına bilmediği bir ortama bırakılması geniş alan korkusu yapacaktır. Test sırasında sıçanın hareketleri (dolaşılan kare sayısı, donakalma, arka ayakları üzerine yükselme) kaşınma ve defekasyon sayısı değerlendirilir. Donakalma ve arka ayakları üzerinde yükselme sıçanın tanımadığı çevreyi araştırıcılığı olarak kabul edilir¹³⁶. Kaşınma ve defekasyon sayısı sıçanın otonom fonksiyonlarının göstergesi olarak değerlendirilir¹³⁹. Kaşınma sayısındaki artış sıçanın anksiyetesi hakkında dolaylı olarak fikir vermektedir. Ancak doğrudan anksiyete değerlendirilmesinde kullanılamaz¹⁴⁰. Anksiyete için; şahlanma sayısı, kaşınma sayısı ve süresi, kenarda kare geçme sayısı, merkezde kare geçme sayısı incelenir. Otonom fonksiyonlar için kaşınma ve gaita çıkarma sayısına bakılır. Lokomotor aktivite ise kare geçme sayısı, donakalma süresi, katettiği yol ve hareket hızının ölçümü ile değerlendirilebilir. Açık alan testinde elde edilen veri kayıtları bilgisayar programları aracılığıyla yapılabileceği gibi kronometre ile gözle takip edilerek de yapılabilir^{101,135}.

Morris Su Tankı Testi

Su tankı testi ilk olarak 1981 yılında Morris tarafından tanımlanmıştır. Sıçanların öğrenme ve hafıza çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Morris su tankı testi ile hayvanların uzak hafıza, yakın hafıza ve öğrenme yetileri değerlendirilmektedir. Test için kullanılan su tankı genellikle silindirik şeklindedir¹⁴¹. Su tankı sıcaklığı 21-26°C olan su ile doldurulur ve oda sıcaklığı da 23 ±1°C'ye ayarlanır^{101,135}. Silindirik şeklindeki su tankının içine su yüzeyinin 1-2,5 cm kadar altına hayvan tarafından görülmeyecek bir şekilde kare veya daire şeklinde bir yükselti yerleştirilir. Hafızanın değerlendirilmesinde hayali olarak dört kadrana ayrılmış su tankının bir kadrana gizli yükselti sabit olacak şekilde yerleştirilir. Her gün sıçanlar farklı bir kadrandan başlamak şartıyla ardışık olarak birkaç kez yüzleri su tankının duvarına bakacak şekilde bırakılırlar ve gizlenmiş sabit yükseltiyi bulmaları beklenir. Günler ilerledikçe sabit yükseltinin yerini öğrenerek daha kısa

sürede bulmaları beklenir. Sıçan gizli yükseltiyi bulamaz ise deneyi uygulayan kişi tarafından yönlendirilerek gizli yükseltiyi bulması sağlanır. Yükselti üzerinde bekleme süresi her sıçan için eşit olmak üzere üç saniye ile 30 saniye arasında belirlenebilir^{101,135}. Deneyin son günü ise sabit yükselti su tankından çıkarılarak sıçanların sabit yükseltinin olduğu kadranda geçirdikleri süre de değerlendirilir. Sıçanlar suya her bırakıldıklarında yükseltiyi bulmaları için beklenen süre eşit olmalıdır ve bu süre 30-180 saniye arasında belirlenebilir. Hafıza deneyleri beş ile 13 gün arasında sürdürülebilir^{142,143}.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma Ekibi: Bu çalışma Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Çocuk Nöroloji Bilim Dalı, Fizyoloji, Patoloji ve Biyokimya Anabilim Dalları tarafından yürütülmüştür. Çalışma Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı ve Fizyoloji Anabilim Dalı Davranış Deneyleri Laboratuvarında yapılmıştır.

Etik Kurul Onayı: Çalışma için Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan onay alındı.

Gereçler: Deney sırasında mikroskop, deri ve deri altı dokuların açılması ve dekapitasyonu için pens, bistüri, sağ karotid arterin bağlanması ve derinin kapatılması için 6-0 ipek ve portegü, ilaç ve sıvı uygulamaları için 10 µl ve 100 µl'lik Hamilton enjektörü, hipoksi odacığı, % 8 oksijen % 92 azot karışımının bulunduğu gaz tankı, oksijen ölçer, hava iletimi için bağlantı hortumları, sıçan yavrularının ısıtılması için ısıtıcı su banyosu, hipoksi odacığı sıcaklığının sürekli izlemi için elektronik termometre, çıkarılan beyinlerin saklanması için saklama kapları, ağırlık ölçümleri için hassas terazi, steril örtü ve eldiven kullanıldı.

Lokomotor aktivite ölçümü için kare şeklinde ve zemini 100x100 cm, kenar yüksekliği 40 cm, iç yüzeyi siyah olan bir açık alan deney kutusu kullanıldı. Öğrenme ve hafızanın değerlendirilmesi için ise daire şeklinde 150 cm çaplı, 60 cm derinliği olan ve içinde 15 cm çaplı bir yükselti bulunan Morris su tankı kullanıldı.

Deney Hayvanları: Çalışmaya yedi günlük Wistar cinsi erkek sıçan yavruları alındı. Hayvanlar davranış deneyleri tamamlanana kadar Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında izlendi. 24. günden itibaren annelerinden ayrılarak her kafeste 4-5 adet sıçan olacak şekilde ayrı kafeslerde barındırıldı. Davranış deneylerinden iki gün önce hayvanlar ortama uyum sağlamaları için Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Hayvan Davranış Deneyleri Laboratuvarına alındılar.

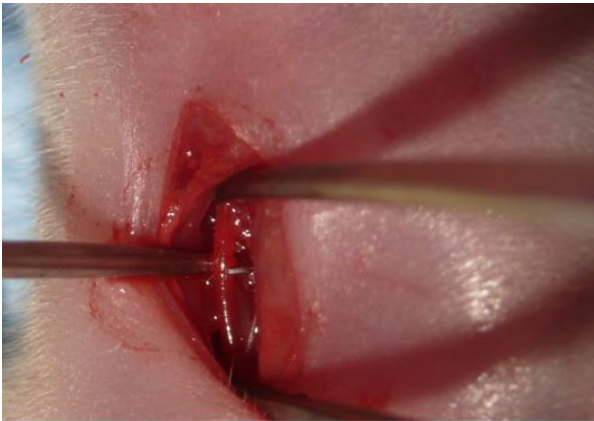
Hipoksik İskemik Beyin Hasarının Oluşturulması

Çalışmaya alınan tüm yavru sıçanlara isofluran emdirilmiş pamuk ile 30-45 saniye inhalasyon anestezisi uygulandı. Sıçanlar uyandıkça doz tekrarlandı. Sıçanlar işlem yapılacak masaya dört ekstremitesi flasterle sırt üstü yapıştırıldı (Resim 1). Boyunda orta hattan kesi yapılarak mikroskop altında sağ karotid arter

bulundu (Resim 2). Sham grubu hariç diğer tüm sıçanların sağ karotid arterleri bağlandı (Resim 3). Sağ karotid arteri bağlanarak iskemi oluşturulan tüm sıçanlar hipoksi odacığına alındı. Hipoksi odacığının sıcaklığı termometre ile oksijen oranı ise "oksimetri" ile sürekli olarak izlendi. Odacık sıcaklığının $33,5 \pm 0,5$ °C ve oksijen düzeyinin ise % 8 olması sağlandı. Cerrahi işlem esnasında ve hipoksi oldağıında iken her 3 dakikada bir solunum hareketleri ve cilt rengi yakından takip edildi. İki saatlik hipoksi süreci sonrasında sıçanlar odacıktan çıkarılarak anne yanına verildi. Anne yanında iki saatlik derlenme süreci sonrasında her gruptaki 9'ar sıçandan MDA, MPO, SOD ve katalaz ölçümü için kalp içi girişimle kan örneğı alındıktan sonra erken dönem nöronal apoptozisin değerlendirilmesi için servikal dislokasyon ile ötenazi uygulanarak dekapite edildi. Beyin, bütünlükleri bozulmadan %10'luk formaldehit içeren kaplara koyuldu. Çıkarılan beyinlerde TUNEL ve Kaspaz-3 yöntemleri ile immünohistokimyasal olarak apoptozis değerlendirildi.



Resim 1: Sağ karotid arterin bağlanması için deney masasına sabitlenen yedi günlük yenidoğan sıçan görülmekte.



Resim 2: Sağ karotid arterin bulunması.



Resim 3: Karotid arterin bağlanması.

Deney Planı ve Uygulama Takvimi

108 adet wistar cinsi yedi günlük yavru sıçanlar rastlantısal olarak dört gruba ayrıldı. Sham Grubu dışındaki tüm sıçanlara HİBH işlemi uygulandı.

Grup 1 (n=27): Anestezi sonrası sadece boyun diseksiyonu yapılarak sağ karotid arteri bulunan ancak bağlanmayan, hipoksi uygulanmayan (Sham Grubu).

Grup 2 (n=27): HİBH oluşturulduktan sonra İP olarak SF uygulanan grup

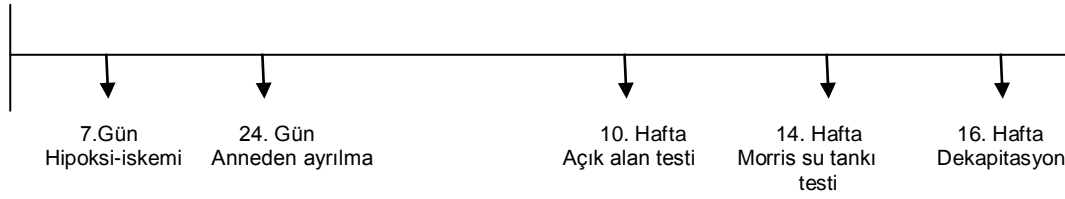
Grup 3 (n=27): HİBH oluşturulduktan sonra İP olarak 100 mg/kg LEV uygulanan grup

Grup 4 (n=27): HİBH oluşturulduktan sonra İP olarak 200 mg/kg LEV uygulanan grup

Geri kalan diğer sıçanlara işlem sonrası 10. haftada açık alan, 14. haftada öğrenme ve hafıza deneyleri yapıldı. 16. haftada gruplardaki tüm sıçanlar dekapite edilerek vücut ve beyin ağırlıkları ölçüldü. Tüm sıçanları beyinleri makroskopik olarak incelendi. Deney uygulama takvimi Şekil 5'te gösterilmiştir.

İlaç Uygulama Yöntemi

Levetirasetam grup 3'deki sıçanlara 100 mg/kg ve grup 4'deki sıçanlara ise 200 mg/kg dozunda İP hamilton enjektörü ile 20 µl SF içerisinde verildi. Grup 2'deki sıçanlara ise yine İP olarak 20 µl sadece SF uygulandı.



Şekil 5: Deney uygulama takvimi.

Histopatolojik değerlendirme

Doğumu takiben yedinci günde HİBH işlem sonunda çıkarılan beyinlerde TUNEL ve Kaspaz-3 yöntemleri ile immünohistokimyasal olarak apoptozis değerlendirildi. Beyin dokularının değerlendirilmesi sıçanların hangi gruptan olduğunu bilmeyen bir patolog tarafından yapıldı. Formaldehit tespit işleminin ardından beyin dokularının sağ yarısı doku boyası ile işaretlenerek koronal seri kesitler alındı. Hipoksik-iskemik hasara daha duyarlı olan subtalamik nükleuslar, hipokampüs ve pariyetal korteksi temsil eden bir veya iki örnek rutin takip işlemine sokuldu. Rutin takip işleminde beyin dokuları alkol, ksilol ve parafin solüsyonlarında bekletildi. Hazırlanan parafin bloklardan elde edilen beş mikron kalınlığındaki kesitler rutin hematoksil-eozin histokimyasal boyası ile boyandı. Preparatlar ışık mikroskopik düzeyde (Nikon Eclipse 80i) incelendi. Koronal kesitlerde rutin boya ile nöronal morfolojik değişiklikler not edildi.

TUNEL Yöntemi

Nöronlardaki DNA parçalanmasını göstermek için “Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP end labeling” (TUNEL) yöntemi (in situ apoptozis detection kit, Biogen, katalog no S7101) seçildi. Bu işlem, elde edilen 5 mikron kalınlığındaki koronal beyin kesitlerinin, deparafinizasyon ve alkol takip işlemlerinin ardından proteinaz K ile 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi (10µl/2.5 ml, fosfat tampon solüsyonu). Fosfat tampon solüsyonunda yıkandıktan sonra kesitler, buharlı kabin içerisine yerleştirildi ve üzerlerine terminal deoksi transferaz reaksiyon karışımı damlatılarak 37°C de etüv içerisinde bir saat inkübe edildi. Kromojen olarak 3,3-diaminobenzidin tetrahidroklorid, zemin boyası için metil yeşili kullanıldı. Kesitler kapama maddesi ile kapatıldı. Pozitif kontrol olarak germinal merkezleri belirgin tonsil kesitleri kullanıldı.

Kaspaz-3 Yöntemi

Yine elde edilen 5 mikron kalınlığındaki koronal beyin kesitlerine deparafinizasyon ve alkol takip işlemlerinin ardından Avidin Biotin kompleks immün peroksidaz yöntemi ile poliklonal tavşan antikoru, Kaspaz antikoru (1:100 dilüsyon, Neomarkers, RB-1197-B0) uygulandı. İmmün histokimyasal boyama yönteminde Lab-Vision, Ultravision Large Volume Detection System Anti-Polyvalent, HRP biyokimyasal kit, zemin boyaması için Mayer hematoksilen kullanıldı. Preparatlar Nikon E 600 ışık mikroskop ile değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak germinal merkezleri belirgin tonsil kesitleri kullanıldı.

Apoptozisin Değerlendirilmesi

Sağ yarısı doku boyası ile işaretlenen koronal beyin kesitleri TUNEL ve Kaspaz-3 immünohistokimyasal boyama işlemlerinden sonra ışık mikroskopunda değerlendirildi. Her iki beyin yarısı ayrı ayrı olacak şekilde subtalamik çekirdekler, hipokampüs ve pariyetal korteksteki TUNEL ve Kaspaz-3 ile immünreaktivite gösteren hücreler sayıldı. Sayım için kesitler ışık mikroskopik düzeyde önce küçük büyütmede ve x 40 büyütme alanında taranarak sağ ve sol yarı için sayım yapılacak alanlar seçildi. Sayım için uygun beş alan X 400 büyütme (her büyük büyütme =152 μm^2 , toplam alan 760 μm^2) tarandı. TUNEL ve Kaspaz-3 ile boyanan toplam nöronlar sayıldı.

Biyokimyasal Değerlendirme

Doğumu takiben yedinci günde HİBH işlem yapılan sıçanlardan kalp içi girişim yoluyla alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip plazma olarak hazırlandıktan sonra ölçüm gününe kadar -70 °C'de muhafaza edildi. İşlem günü plazma oda ısısına gelene kadar bekletildikten sonra analiz edildi. MDA, GPO, SOD ve katalaz düzeyleri "Enzim Linked Immune Assay" (ELISA) yöntemiyle saptandı.

Malondialdehit

MDA düzeyi ELISA yöntemi ile "Rat Malondialdehyde (MDA) ELISA Kit" (Katalog No: CSB-E08558r), (Cusabio Biotech Company, in PRC) kiti kullanılarak ölçüldü.

1. 100 μl standart, örnek dilüeti (kör için) ve örnekler sırayla antikor kaplı kuyucuklara eklendi.
2. İki saat 37 °C'de inkübe edildi.

3. Kuyucuklardaki sıvı kısım aspire edildi.
4. Her kuyucuğa 100 µl biotin antikor eklendi. Bir saat 37 °C'de inkübe edildi.
5. Her bir kuyucuk aspire edildikten sonra 3 kez 200 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı.
6. Her kuyucuğa 100 µl HRP-avidin çalışma solüsyonu eklendi. Bir saat 37 °C'de inkübe edildi.
7. Yıkama işlemi 5 kez tekrarlandı.
8. Her kuyucuğa 90 µl TMB substrat eklendi.
9. 20 dakika 37 °C'de inkübe edildi.
10. 50 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Mavi renkli karışım sarı renge dönüştü. 450 nm dalga boyunda 30 dakika okutuldu.

Superoksit Dismutaz

SOD düzeyi ELISA yöntemi ile "Superoxide Dismutase Assay Kit" (Katalog No: 706002), (Cayman Chemica Company, in USA) kiti kullanılarak ölçüldü.

1. SOD standart kuyucuklarına 200 µL dilüe radikal detektör ve 10 µL standart (A-G tüplerine) eklendi.
2. Örnek kuyucuklarına 200 µL dilüe radikal detektör ve 10 µL örnek eklendi.
3. Reaksiyonu başlatmak için her kuyucuğa 20 µL dilüe ksantin oksidaz eklendi.
4. 96 kuyucuklu plak dikkatli birkaç saniye karışımı sağlamak için sallandı
5. Plak 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Sonuçlar 450 nm dalga boyunda ölçüldü.

Katalaz

Katalaz düzeyi ELISA yöntemi ile "Catalase Assay Kit" (Katalog No: 707002), (Cayman Chemica Company, in USA) kiti kullanılarak ölçüldü.

1. Her bir kuyucuğa 100 µL test tamponu, 30 µL metanol eklendi. Standart kuyucuklarına farklı konsantrasyonlardaki standartlar, kontroller ve hasta örnekleri 20'şer µL olacak şekilde eklendi.
2. Bu karışıma 20 µL hidrojen peroksit eklendi. Çalkalanarak oda ısısında 20 dakika inkübe edildi.
3. Reaksiyonu sonlandırmak için her kuyucuğa 30 µL potasyum hidroklorür ve kromojen olarak da 30 µL purpald eklendi.
4. 10 dakika oda ısısında çalkalanarak inkübe edildi.

5. 10 µL potasyum periodat eklenerek 5 dakika inkübe edildi.
6. 540 nm'de absorbans okuyucuyla okutuldu.

Glutasyon Peroksidaz (GPO)

GPO düzeyi ELISA yöntemi ile "Glutathione Peroxidase Assay Kit" (Katalog No: 703102), (Cayman Chemica Company, in USA) kiti kullanılarak ölçüldü.

1. Kör olarak alınan kuyucuğa 120 µL, diğer kuyucuklara 100 µL olacak şekilde test tamponu eklendi.
2. Kontrol kuyucuğa ise 20 µL GPO kontrol örneği, örnek kuyucuklarına 20 µL plazma eklendi. Her kuyucuğa 50 µL ko-substrat karışımı eklendi.
3. Tüm kuyucuklara 20 µL Cumene hidroperoksit eklendi.
4. Birkaç saniye çalkalandıktan sonra 340 nm'de 5 kez 1'er dakika arayla okutuldu.

Davranış Deneyleri

Davranış deneylerine başlamadan iki gün önce deneyin uygulanacağı gruptaki sıçanlar davranış laboratuvarına getirilerek ortama alışmaları ve ortamda eşit süre geçirmeleri sağlandı. Tüm deneyler süresince aynı araştırmacı aynı renk kıyafet giydi ve odada aynı yerde durdu. Davranış deneyleri tüm gruplara saat 09.00 ile 14.00 arasında yapıldı.

Açık Alan Deneyi

Açık alan deneyi ile sıçanların lokomotor aktivitelerinin değerlendirilmesi amaçlandı. Onuncu haftasını dolduran sıçanların 100x100cm'lik zeminde bir gün, bir kez olmak üzere beş dakika süreyle kat ettikleri mesafe (cm) ve hareket hızları (cm/sn) kaydedildi (Resim 4).



Resim 4: Açık Alan Düzeneği.

Öğrenme ve Hafıza Deneyleri

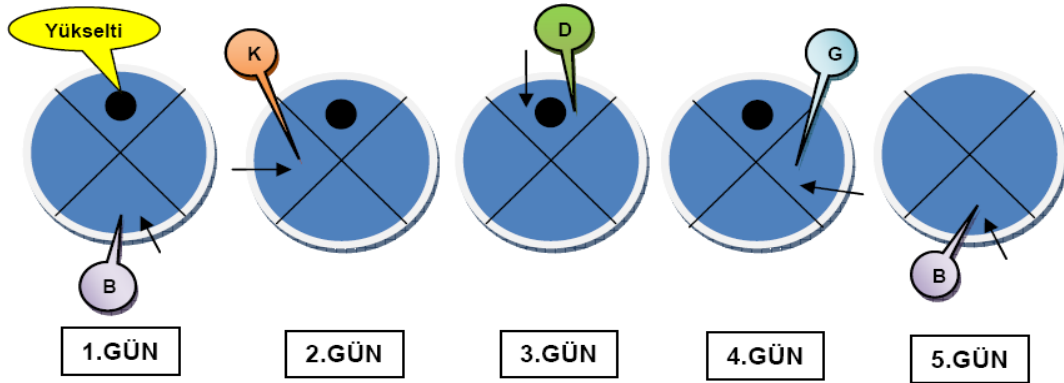
Sıçanlar doğumdan sonraki 14. haftayı tamamladığında öğrenme ve hafıza deneylerine başlandı. Test ardışık olarak beş gün süreyle uygulandı. 42 cm derinliği olan tank 22°C sıcaklığındaki su ile dolduruldu (Resim 5). Bilgisayar ekranına aktarılan görüntüde tank batı, kuzey, doğu ve güney olmak üzere dört eşit kadrana ayrıldı (Resim 6). Deneyin ilk dört gününde 15 cm çaplı gizli yükselti 40 cm yüksekliğe ayarlanıp doğu kadranının orta noktasına yerleştirildi. Deneyin ilk günü tüm sıçanlar batı kadrانından başlayıp saat yönünde ilerleyerek her kadrانdan günde bir kez olmak üzere toplam dört kez, başları su tankına dönük olarak suya bırakıldı. Sıçanlar her suya bırakılışta en geç 60 saniye içinde gizli yükseltiyi bulmaları beklendi. Bu süre içinde yükselti üzerine çıkan ve orada 5 saniye kalan sıçanlar deneyin bu aşamasını tamamlamış olarak kabul edildi. 60 saniyelik sürede yükseltiyi bulamayan sıçanlar elle yönlendirilerek yükseltiyi bulmaları sağlandı. Deneyin 2, 3 ve 4. günlerinde atışlar saat yönünde değiştirildi ve her gün farklı bir kadrانdan suya bırakıldı. Dört gün boyunca her atışta yükseltiyi bulma süreleri kaydedildi. Her grubun 1., 2., 3. ve 4. günlerdeki ortalama yükseltiyi bulma süreleri hesaplandı. Bu süreler her grup için kendi içinde birbirleriyle ve her gün için gruplar arasında karşılaştırıldı. Ayrıca 1. gün ile 4. gün arasındaki yükseltiyi bulma süresi farkı da gruplar arasında karşılaştırıldı.

Deneyin beşinci günü (son gün) doğu kadrانındaki gizli yükselti su tankından çıkarıldı. Tüm sıçanlar batı kadrانından suya bırakılarak 60 saniye süreyle suda

kalmaları sağlandı. Eskiden yükseltinin bulunduğu doğu kadranında geçirilen süre (sn) kaydedildi.



Resim 5: Su tankının üstten ve yandan görünümü.



Resim 6: Uzak hafıza deneyi günlere göre uygulama şeması¹⁰¹. (B batı, K kuzey, D doğu, G güney kadranını, oklar ise hergünün ilk atışı yapılan kadranını göstermektedir.)

Atrofinin Değerlendirilmesi

Davranış deneylerinin tamamlanmasının ardından 16. haftada her gruptaki tüm sıçanlar dekapite edilerek vücut ve beyin ağırlıkları ölçüldü. Tüm sıçanların beyinleri makroskopik olarak incelendi.

İstatistiksel Yöntemler

Veriler SPSS 11.5 paket programına girildikten sonra sürekli ölçümlere ait normallik kontrolleri Shapiro Wilk testi ile test edilmiş ve normal dağılım gösterdiği

belirlenmiştir. Biyokimyasal veriler olan MDA, katalaz, SOD ve GPO, vücut ağırlığı, 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. Biyokimyasal veri olan TUNEL ve Kaspaz-3 verilerin sağ ve sol ölçümleri için eş yapma t testi (Paired sample t test) kullanılmıştır. Su tankı verilerinin 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. Su tankının 5. gününde kuzey, güney, doğu ve batı bölgeleri arasındaki farklılıklar için de tekrarlanan ölçümlü varyans analizi (Repeated measures ANOVA) kullanılmıştır. Ayrıca, kuzey, güney ve batı bölgelerinin ortalaması ile doğu bölgesine ait ortalama değer arasındaki farklılıklar için eş yapma t testi (paired samples t test) kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistik olarak ortalama ve standart sapma değerleri verilmiştir. İstatistik anlamlılık olarak $p < 0,05$ alınmıştır.

BULGULAR

HİBH oluşturulmak üzere çalışmaya alınan 108 adet yedi günlük yenidoğan sıçandan 10'u çeşitli nedenlerle öldü. 36'sı planlandığı gibi dekapite edildi. Kalan 62 sıçana davranış deneyleri yapıldı.

Grup 1'deki (Sham grubu) 27 sıçanın deney başlangıcında (7. gün) ortalama ağırlıkları $11,88 \pm 0,96$ gr idi. Bu sıçanların 9'undan kalp içi girişim ile biyokimyasal testler için kan alındıktan sonra apoptotik nöron sayımı için beyin dokuları çıkarılarak dekapite edildi. Kalan 18 sıçan ile açık alan deneyleri yapıldıktan sonra, belirlenemeyen bir nedenden 1 sıçan öldü ve 17 sıçana morris su tankı ile öğrenme ve hafıza deneyleri yapıldı.

Grup 2'deki (hipoksi iskemi sonrası SF uygulanan) 27 sıçanın deney başlangıcında (7. gün) ortalama ağırlıkları $11,77 \pm 1,02$ gr idi. Bu sıçanların 9'undan kalp içi girişim ile kan alındıktan sonra apoptotik nöron sayımı için beyin dokuları çıkarılarak dekapite edildi. Bilinmeyen bir nedenden dolayı 4 sıçan öldü. Kalan 14 sıçana açık alan ve morris su tankı ile öğrenme ve hafıza deneyleri yapıldı.

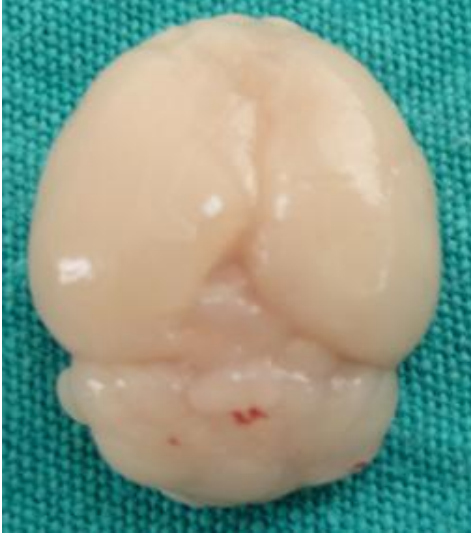
Grup 3'te (LEV 100 mg/kg) 27 sıçanın deney başlangıcında (7. gün) ortalama ağırlıkları $11,84 \pm 1,16$ gr idi. Bu sıçanların 9'undan kalp içi girişim ile biyokimyasal testler için kan alındıktan sonra apoptotik nöron sayımı için beyin dokuları çıkarılarak dekapite edildi. Hipoksi iskemi işlemi esnasında 3 sıçan ve hipoksi iskemi sonrasında bilinmeyen bir nedenden dolayı da 2 sıçan öldü. Kalan 13 sıçana açık alan ve morris su tankı ile öğrenme ve hafıza deneyleri yapıldı.

Grup 4'te (LEV 200 mg/kg) 27 sıçanın deney başlangıcında (7. gün) ortalama ağırlıkları $11,79 \pm 1,04$ gr idi. Bu sıçanlardan 9'undan kalp içi girişim ile biyokimyasal testler için kan alındıktan sonra apoptotik nöron sayımı için beyin dokuları çıkarılarak dekapite edildi. Kalan 18 sıçana açık alan ve morris su tankı ile öğrenme ve hafıza deneyleri yapıldı.

Histopatolojik Bulgular

Hipoksi-iskemi uygulamasını takiben dekapite edilen yedi günlük sıçanların beyinlerinin her iki yarısı da makroskopik olarak normal görünümdeydi (Resim 6). Ayrıca yapılan koronal kesitler makroskopik olarak normal idi ve kanama, ödem ve enfarkt alanı saptanmadı. Rutin hematoksilen eozin boyası ile apoptotik nöronlar

normal morfolojideki nöronlara göre yuvarlak sınırlı, nükleer kondansasyon ve sitoplazmik büzüşme göstermekteydi. Normal görünümlü nöronlarda TUNEL ve Kaspaz-3 ile pozitif boyanma izlenmezken, apoptotik hücrelerin çoğu TUNEL ile nükleer pozitif, Kaspaz-3 ile sitoplazmik ve nükleer pozitif olarak boyanmaktaydı.



Resim 7: Doğumu takiben yedinci günde hipoksi iskemi işlemi uygulanan ve ardından dekapite edilen bir sıçanın beyni normal yapıda görünmekte.

TUNEL Yöntemiyle Beyindeki Apoptotik Hücrelerin Değerlendirilmesi

Hipoksi iskemi uygulanan sıçanların beyin sağ yarısında TUNEL yöntemiyle boyanan apoptotik hücre sayılarında artış gözlemlendi (Resim 8-11). Hipoksi iskemi sonrası grup 2, 3 ve 4'teki yavru sıçanların sağ beyin yarısındaki ortalama apoptotik hücre sayıları sırasıyla $10,33 \pm 1,12$, $6,67 \pm 1$ ve $4,89 \pm 0,78$ iken; Grup 1'deki sıçanlarda (Sham) ortalama apoptotik hücre sayısı $3,56 \pm 0,73$ olarak bulundu (Tablo 2, Şekil 6).

Grup 2'deki sıçanların beyinlerinin sağ yarısında TUNEL yöntemiyle boyanan apoptotik hücre sayıları, grup 1, 3 ve 4 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu (sırasıyla $p < 0,001$, $p < 0,001$ ve $p < 0,001$). Ayrıca grup 1'deki sıçanların beyinlerinin sağ yarısında TUNEL yöntemiyle boyanan apoptotik hücre sayıları grup 3 ve 4 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük saptandı (sırasıyla $p < 0,001$ ve $p = 0,021$).

Hipoksi iskemi sonrası 200 mg/kg LEV uygulanan grup 4'teki sıçanların beyinlerinin sağ yarısında TUNEL yöntemiyle boyanan apoptotik hücre sayıları

Grup 3 (100 mg/kg LEV) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi ($p=0,001$) (Tablo 2).

Beynin sol yarısında ise TUNEL yöntemiyle boyanan apoptotik hücre sayıları grup 2, 3 ve 4'te $6,33 \pm 1,94$, $4,56 \pm 1,01$ ve $3,33 \pm 1,12$ iken, grup 1'de (sham) saptanan ortalama apoptotik hücre sayısı $3,11 \pm 0,78$ olarak bulundu (Tablo 2, Şekil 7). Grup 2'deki sıçanların beyinlerinin sol yarısında TUNEL yöntemiyle boyanan apoptotik hücre sayıları grup 1, 3 ve 4 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek düzeyde olduğu tespit edildi (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,046$ ve $p=0,007$). Grup 1'deki sıçanların beyinlerinin sol yarısında TUNEL yöntemiyle boyanan apoptotik hücre sayıları grup 3 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu saptandı ($p=0,019$).

Hipoksi iskemi sonrası 100 mg/kg LEV uygulanan grup 3'teki sıçanların beyinlerinin sol yarısında TUNEL yöntemiyle boyanan apoptotik hücre sayıları Grup 4 (200 mg/kg LEV) ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,112$).

Beynin sağ ve sol yarısında TUNEL yöntemiyle saptanan apoptotik hücre sayılarının her bir grup için karşılaştırılmasında; Grup 1'de istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmaz iken ($p=0,055$), Grup 2, 3 ve 4'te beynin sağ yarısında saptanan apoptotik hücre sayıları sol taraftakine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksekti (sırasıyla $p<0,001$, $p=0,001$ ve $p<0,001$) (Tablo 2, Şekil 8).

Tablo 2: TUNEL yöntemiyle tespit edilen apoptotik nöron sayıları.

	Sağ	Sol	P ₀
Grup 1 (n=9)	$3,56 \pm 0,73$	$3,11 \pm 0,78$	0,055
Grup 2 (n=9)	$10,33 \pm 1,12$	$6,33 \pm 1,94$	<0,001
Grup 3 (n=9)	$6,67 \pm 1,00$	$4,56 \pm 1,01$	0,001
Grup 4 (n=9)	$4,89 \pm 0,78$	$3,33 \pm 1,12$	<0,001
P ₁	<0,001	0,004	
P ₂	<0,001	0,019	
P ₃	0,021	0,96	
P ₄	<0,001	0,046	
P ₅	<0,001	0,007	
P ₆	0,001	0,112	

P₀: Sağ-sol beyin arasındaki apoptotik nöron sayısının karşılaştırması. (Bakınız Şekil 6,7,8).

P₁: Grup 1-Grup 2

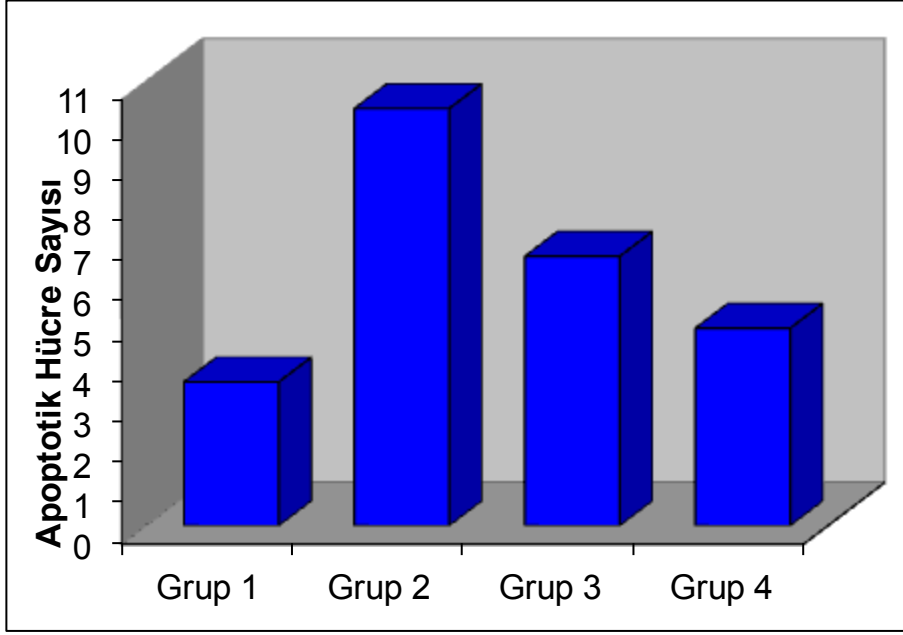
P₂: Grup 1-Grup 3

P₃: Grup 1-Grup 4

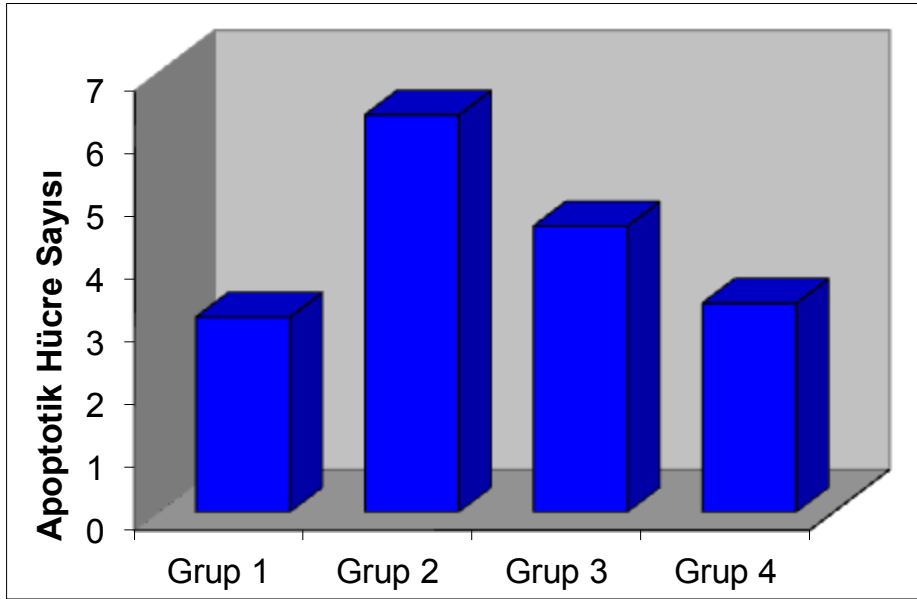
P₄: Grup 2-Grup 3

P₅: Grup 2-Grup 4

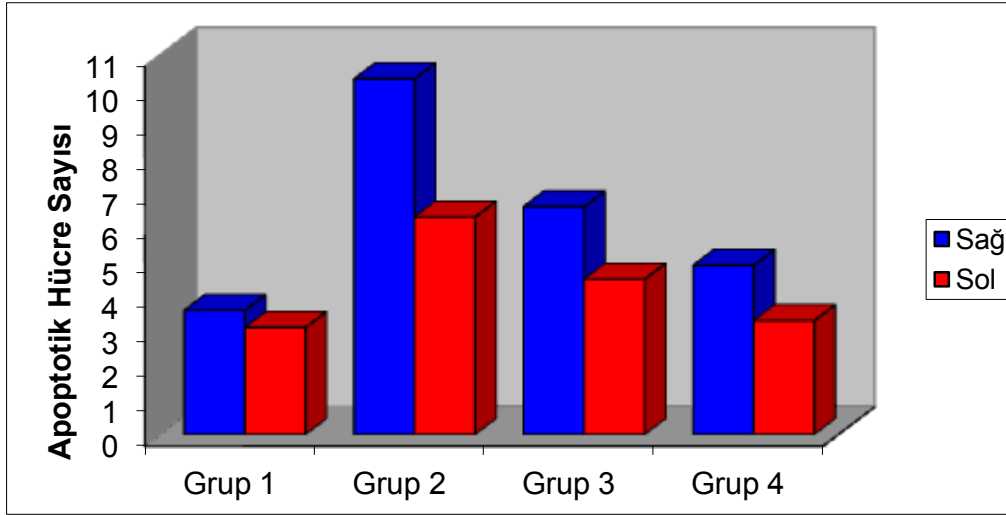
P₆: Grup 3-Grup 4



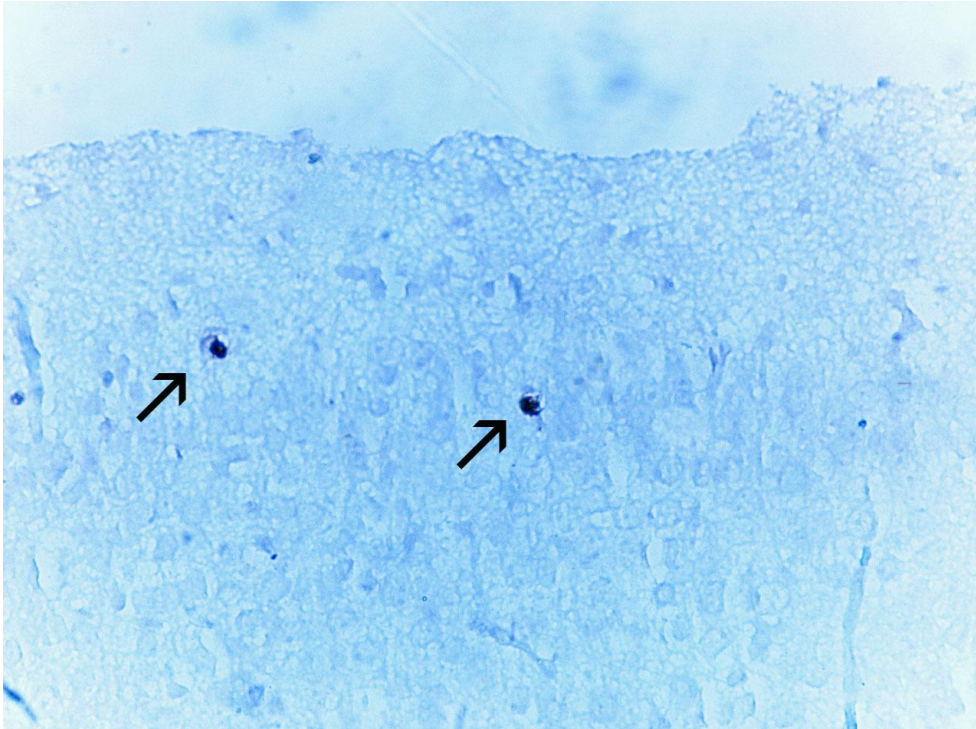
Şekil 6: TUNEL yöntemi ile beynin sağ yarısında saptanan apoptotik nöronların gruplara göre dağılımı. [Grup 2 ile grup 1, 3 ve 4 karşılaştırmasında ($p<0,001$), grup 1 ile grup 3 ve 4 karşılaştırmasında (sırasıyla $p<0,001$ ve $p=0,021$), grup 3 ile grup 4 karşılaştırmasında ($p=0,001$)] (Bakınız Tablo 2).



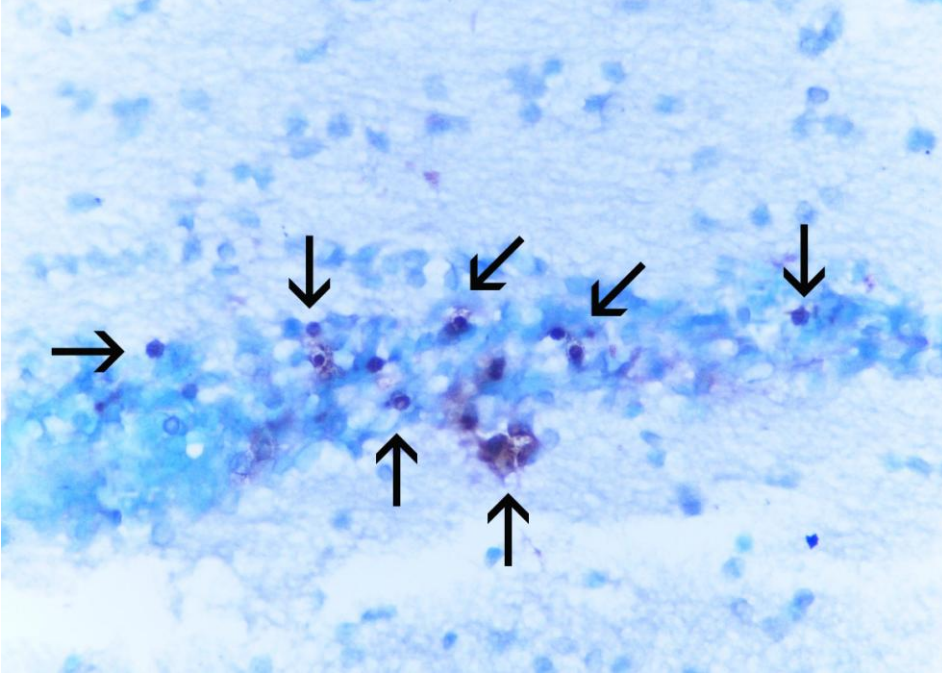
Şekil 7: TUNEL yöntemi ile beynin sol yarısında saptanan apoptotik nöronların gruplara göre dağılımı. [Grup 2 ile grup 1, 3 ve 4 karşılaştırmasında (sırasıyla $p=0,004$, $p=0,046$ ve $p=0,007$), grup 1 ile grup 3 karşılaştırmasında ($p=0,019$), grup 3 ile grup 4 karşılaştırmasında ($p=0,112$)] (Bakınız Tablo 2).



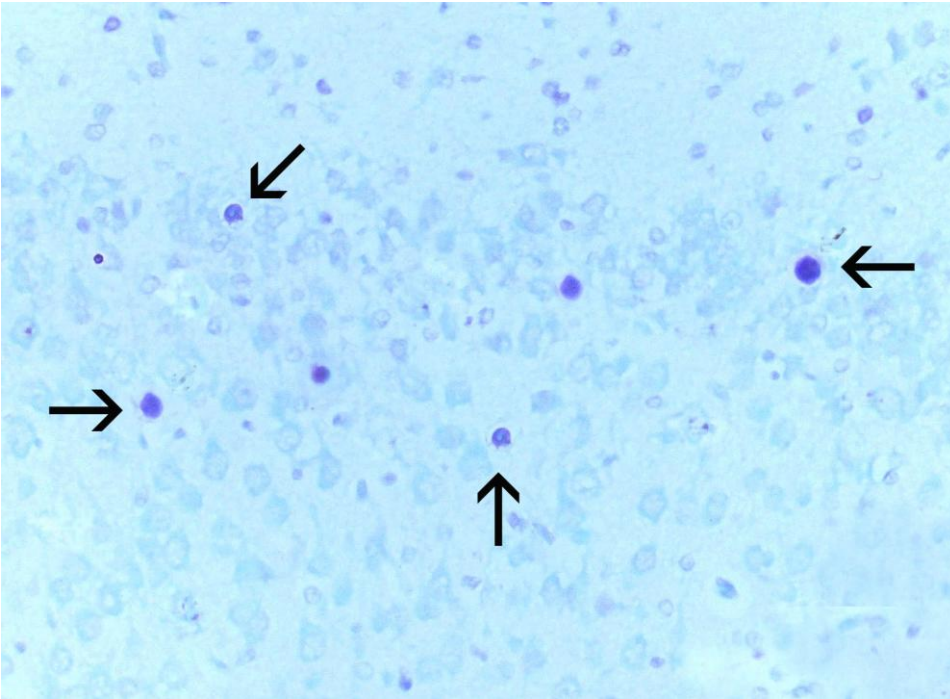
Şekil 8. TUNEL yöntemi ile beynin sağ ve sol yarısında saptanan apoptotik nöronların gruplara göre dağılımı. (Grup 1 dışında diğer 3 grubun kendi aralarındaki karşılaştırmada anlamlı farklılık saptandı. Grup 1 $p=0,055$, grup 2 $p<0,001$, grup 3 $p=0,001$ ve grup 4 $p<0,001$). (Bakınız Tablo 2).



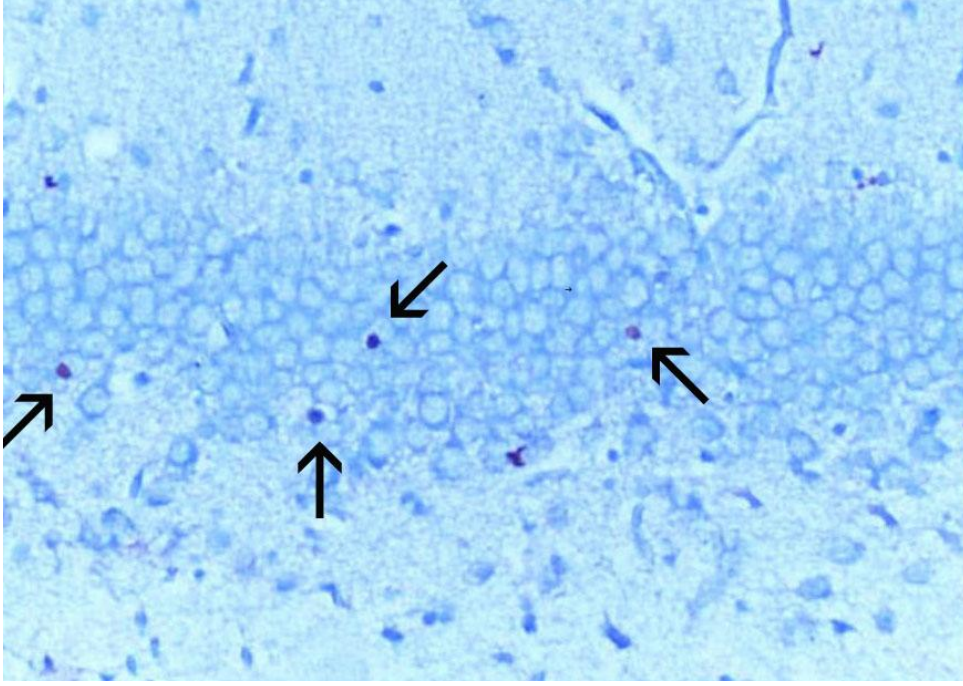
Resim 8: Sham grubuna ait beyin kesitlerinde az sayıda TUNEL-pozitif apoptotik nöron görüldü. (ok ile işaretli) (orjinal büyütme, X400).



Resim 9: 2. gruba ait beyin kesitlerinde yaygın TUNEL-pozitif apoptotik nöron görüldü. (ok ile işaretli) (orjinal büyütme, X400).



Resim 10: LEV 100 mg/kg dozda uygulanan 3.gruba ait beyin kesitlerinde TUNEL ile nükleer pozitif boyanma gösteren nöronlar izlenmekte. (ok ile işaretli) (Orjinal büyütme, X400).



Resim 11: LEV 200 mg/kg dozda uygulanan 4.gruba ait beyin kesitlerinde TUNEL ile nükleer pozitif boyanma gösteren nöronlar izlenmekte. (ok ile işaretli) (Orjinal büyütme, X400).

Kaspaz-3 İmmünohistokimya Yöntemiyle Beyindeki Apoptotik Hücrelerin Değerlendirilmesi

Beynin sağ yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle yapılan apoptotik hücre sayıları değerlendirildiğinde; uygulanan hipoksi ve iskemi modelinin beyindeki apoptotik hücre sayısını arttırdığı gözlemlendi (Resim 12-15). Grup 2, 3 ve grup 4'teki ortalama apoptotik hücre sayıları sırasıyla $9,89 \pm 3,10$, $8,44 \pm 2,01$ ve $6,33 \pm 1,0$ iken; grup 1'in (sham) ortalama apoptotik hücre sayısı $3,89 \pm 0,78$ olarak tespit edildi (Tablo 3, Şekil 9). Grup 2 ve 3'ün beyin sağ yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle belirlenen ortalama apoptotik hücre sayıları grup 1 ile karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu (sırasıyla $p < 0,001$ ve $p < 0,001$). Grup 2'deki beyin sağ yarısındaki Kaspaz-3 yöntemiyle saptanan apoptotik hücre sayıları grup 4 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek tespit edildi ($p = 0,003$) (Tablo 3, Şekil 9).

Hipoksi iskemi sonrası 100 mg/kg LEV uygulanan grup 3'teki sıçanların beyinlerinin sağ yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle saptanan apoptotik hücre sayıları grup 4 (200 mg/kg LEV) ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p = 0,121$).

Beynin sol yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle saptanan apoptotik hücre sayıları değerlendirildiğinde; grup 2, 3 ve 4'teki ortalama apoptotik hücre sayısı sırasıyla $6,56 \pm 1,81$, $4,78 \pm 0,97$ ve $4,22 \pm 1,3$ iken, grup 1'in (sham) ortalama apoptotik hücre sayısı $3,67 \pm 0,71$ olarak tespit edildi. Grup 2'deki ortalama apoptotik hücre sayısı grup 1, 3 ve 4 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,005$, $p=0,043$ ve $p=0,032$). Grup 1'deki ortalama apoptotik hücre sayısı grup 3 ve 4 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptandı (sırasıyla $p=0,062$ ve $p=0,682$) (Tablo 3, Şekil 10).

Hipoksi iskemi sonrası 100 mg/kg LEV uygulanan grup 3'teki sıçanların beyinlerinin sol yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle saptanan apoptotik hücre sayıları grup 4 (200 mg/kg LEV) ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p=0,737$).

Beynin sağ ve sol yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle saptanan apoptotik hücre sayıları her bir grup için karşılaştırıldığında, grup 1'de istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmaz iken ($p=0,447$), grup 2, 3 ve 4'te beyin sağ yarısında saptanan apoptotik hücre sayısı sol taraftakine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti (sırasıyla $p=0,022$, $p=0,001$ ve $p=0,006$) (Tablo 3, Şekil 11).

Tablo 3: Kaspaz-3 yöntemiyle tespit edilen apoptotik nöron sayıları.

	Sağ	Sol	P ₀
Grup 1 (n=9)	$3,89 \pm 0,78$	$3,67 \pm 0,71$	0,447
Grup 2 (n=9)	$9,89 \pm 3,10$	$6,56 \pm 1,81$	0,022
Grup 3 (n=9)	$8,44 \pm 2,01$	$4,78 \pm 0,97$	0,001
Grup 4 (n=9)	$6,33 \pm 1,00$	$4,22 \pm 1,30$	0,006
P1	<0,001	0,005	
P2	<0,001	0,062	
P3	0,056	0,682	
P4	0,41	0,043	
P5	0,003	0,032	
P6	0,121	0,737	

P₀: Sağ-sol beyin arasındaki apoptotik nöron sayısının karşılaştırması. (Bakınız Şekil 9,10,11).

P₁: Grup 1-Grup 2

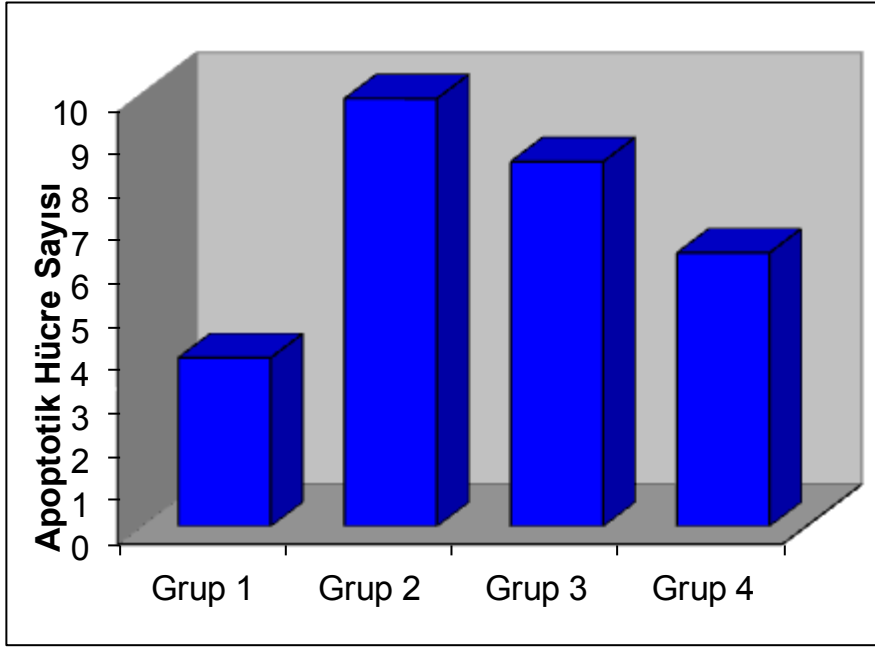
P₂: Grup 1-Grup 3

P₃: Grup 1-Grup 4

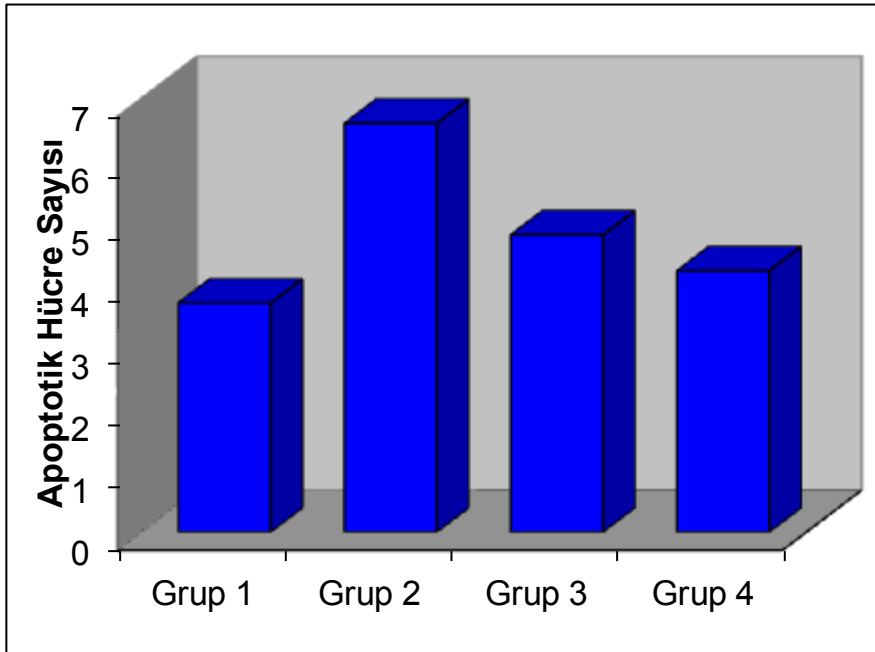
P₄: Grup 2-Grup 3

P₅: Grup 2-Grup 4

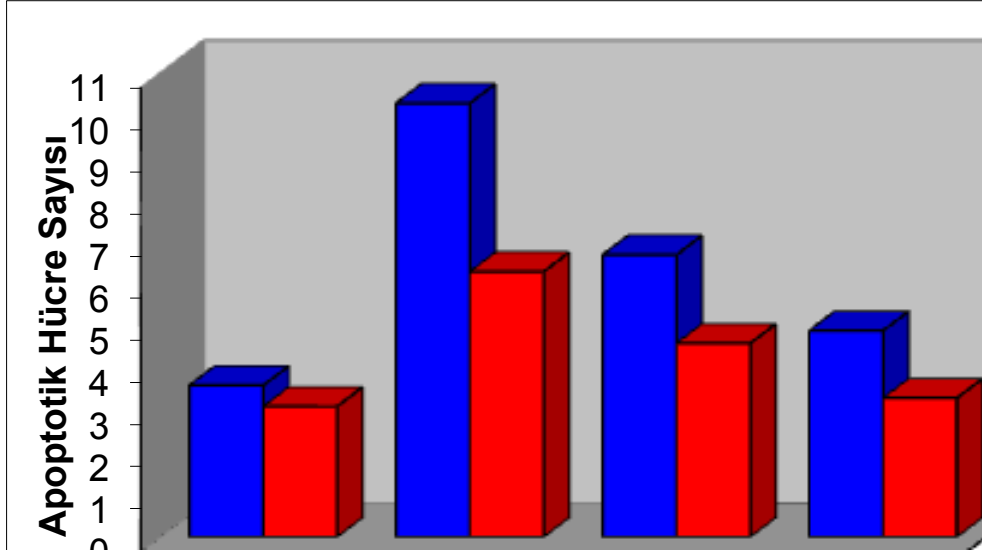
P₆: Grup 3-Grup 4



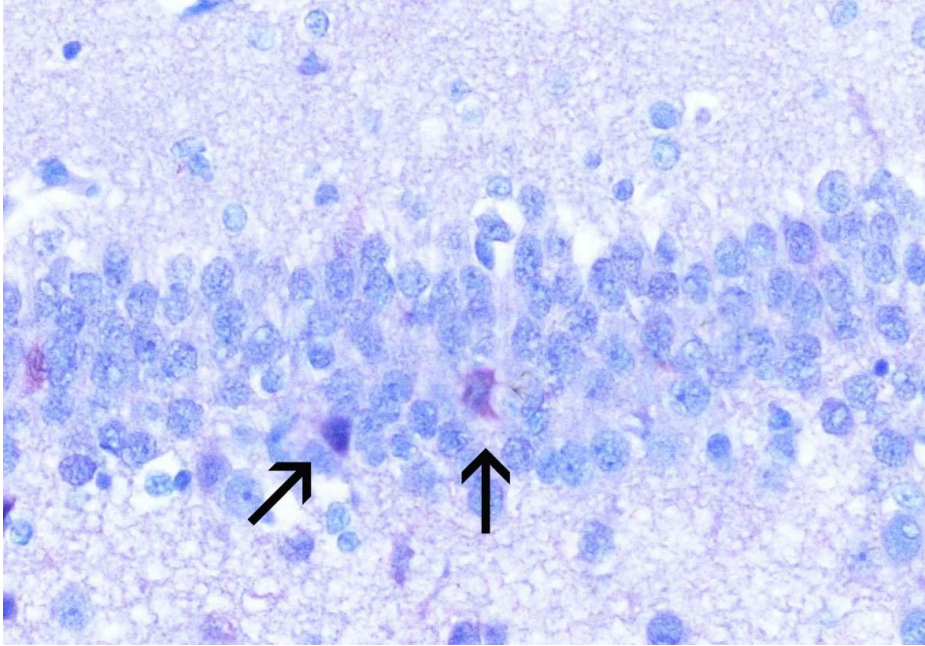
Şekil 9: Kaspaz-3 yöntemi ile beynin sağ yarısında saptanan apoptotik nöronların gruplara göre dağılımı. [Grup 1 ile grup 2 ve 3 karşılaştırmasında ($p<0,001$), grup 2 ile grup 4 karşılaştırmasında ($p=0,003$), grup 3 ile grup 4 karşılaştırmasında ($p=0,121$)]. (Bakınız Tablo 3).



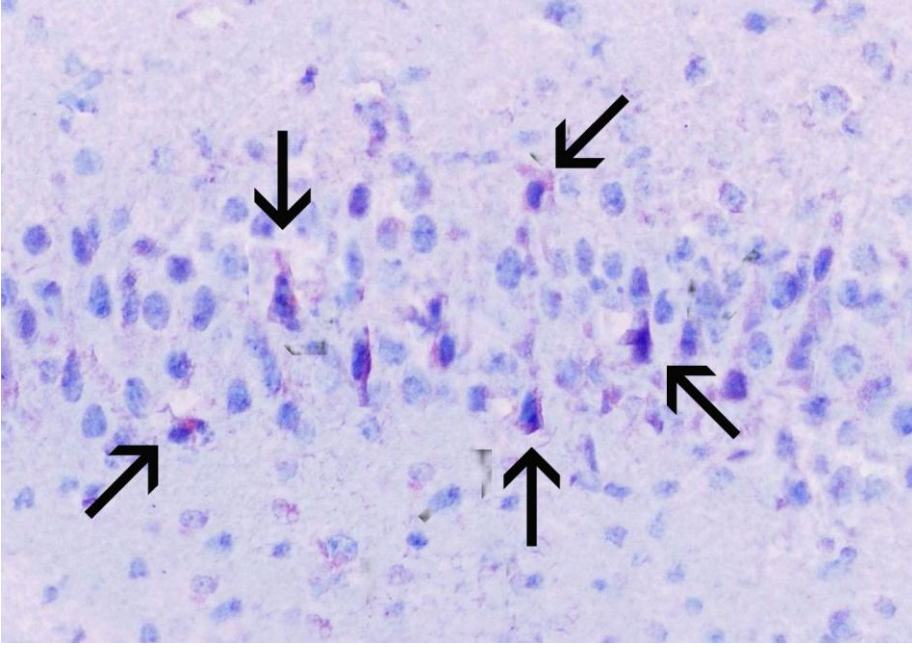
Şekil 10: Kaspaz-3 yöntemi ile beynin sol yarısında saptanan apoptotik nöronların gruplara göre dağılımı. [Grup 2 ile grup 1, 3 ve 4 karşılaştırmasında (sırasıyla $p=0,005$, $p=0,043$ ve $p=0,032$), grup 1 ile grup 3 ve 4 karşılaştırmasında (sırasıyla $p=0,062$ ve $p=0,682$), grup 3 ile grup 4 karşılaştırmasında ($p=0,737$)]. (Bakınız Tablo 3).



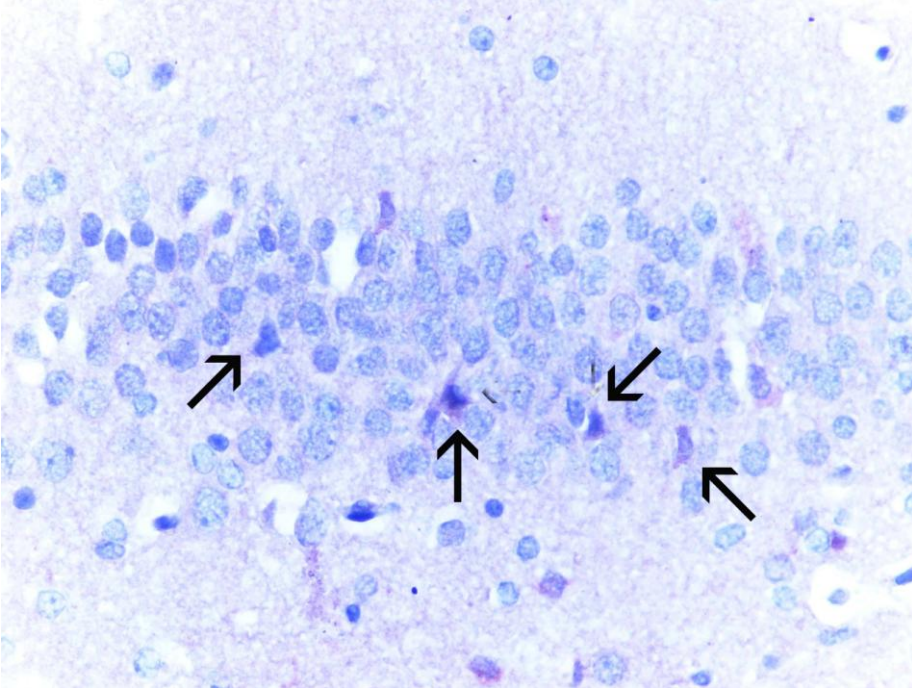
Şekil 11: Kaspaz-3 yöntemi ile beynin sağ ve sol yarısında saptanan apoptotik nöronların gruplara göre dağılımı. (Grup 1 dışında diğer 3 grubun kendi aralarındaki karşılaştırmada anlamlı farklılık saptandı. Grup 1 $p=0,447$, grup 2 $p<0,022$, grup 3 $p=0,001$ ve grup 4 $p=0,006$). (Bakınız Tablo 3).



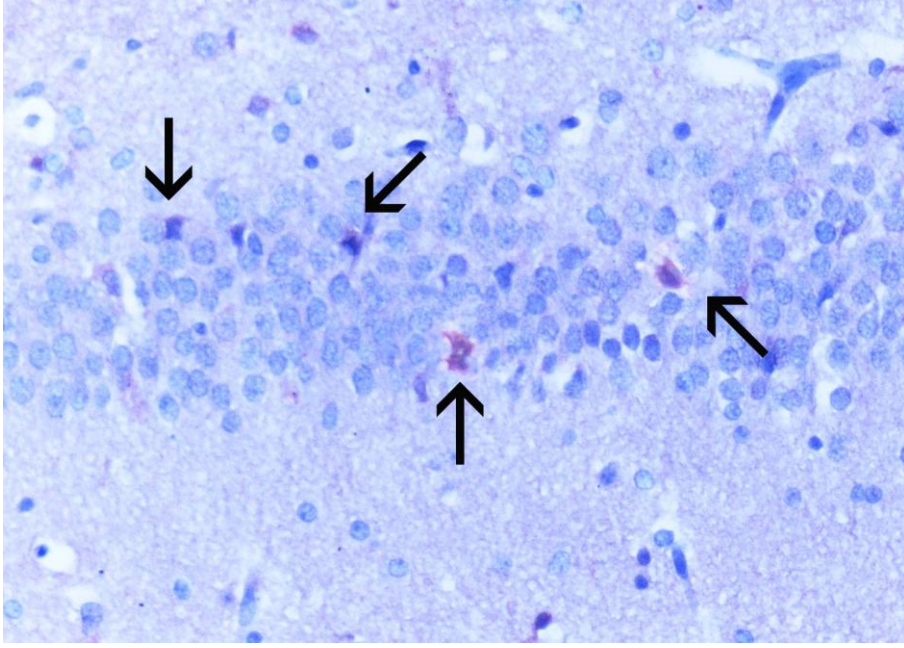
Resim 12: Sham grubuna ait beyin kesitlerinde az sayıda Kaspaz-3 pozitif apoptotik nöron görüldü. (ok ile işaretli) (orjinal büyütme, X400).



Resim 13: 2. gruba ait beyin kesitlerinde yaygın kaspaz-3 ile pozitif boyanan apoptotik nöron görüldü. (ok ile işaretli) (Orjinal büyüme, X400).



Resim 14: LEV 100 mg/kg dozda uygulanan 3.gruba ait beyin kesitlerinde Kaspaz-3 ile sitoplazmik pozitif boyanan nöronlar izlenmekte. (ok ile işaretli) (Orjinal büyüme, X400).



Resim 15: LEV 200 mg/kg dozda uygulanan 3.gruba ait beyin kesitlerinde Kaspaz-3 ile sitoplazmik pozitif boyanan nöronlar izlenmekte. (ok ile işaretli)
(Orjinal büyütme, X400).

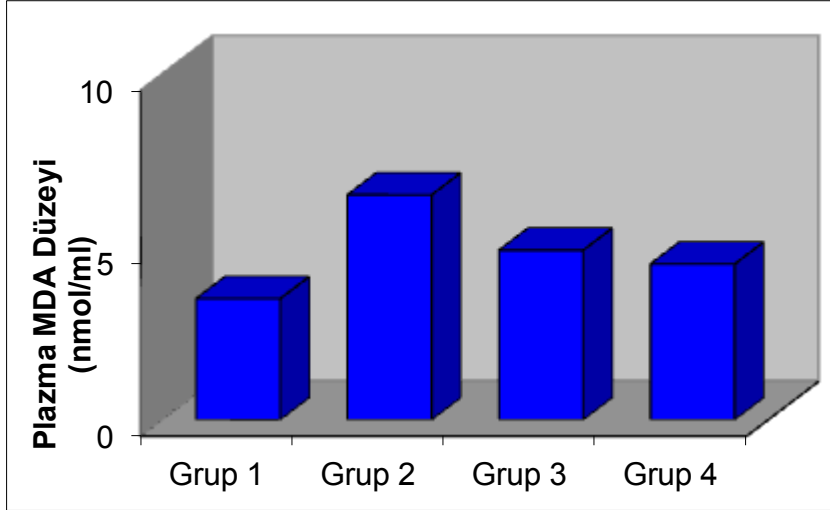
Biyokimyasal Bulgular

Malondialdehit Düzeyi

Doğumu takiben yedinci gün yapılan HİBH'den sonra kalp içi girişimle alınan kan örneklerinde en yüksek ortalama MDA düzeyi grup 2'deki sıçanların plazmalarında saptanırken, en düşük MDA düzeyi ise grup 1'deki sıçanların plazmalarında saptandı. Plazma MDA düzeyleri grup 1'de $3,4 \pm 1,02$ nmol/ml, grup 2'de $6,4 \pm 1,6$ nmol/ml, grup 3'de $4,88 \pm 1,02$ nmol/ml ve grup 4'de $4,44 \pm 1,77$ nmol/ml olarak ölçüldü. Plazma MDA düzeyi grup 2'de grup 1'den istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulundu ($p=0,02$). Diğer gruplar birbirleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 4) (Şekil 12).

Tablo 4: Plazma örneklerindeki MDA, GPO, SOD ve katalaz değerleri.

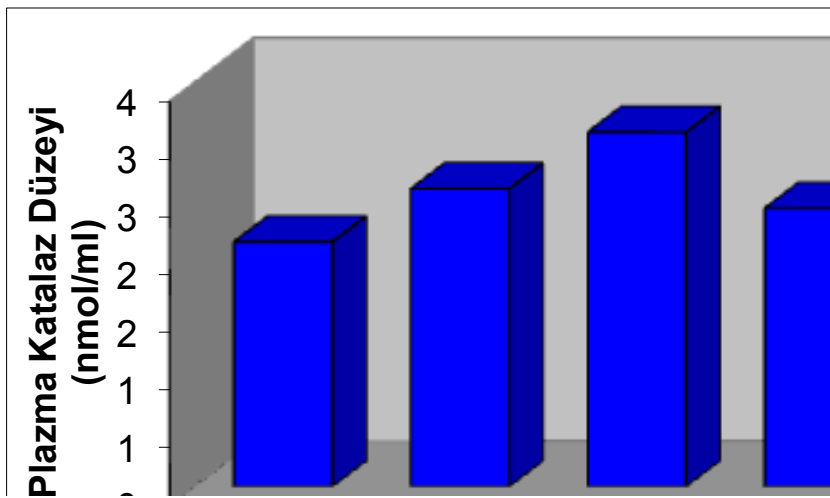
	Grup1 (n=9)	Grup 2 (n=9)	Grup 3 (n=8)	Grup 4 (n=9)
MDA (nmol/ml)	$3,4 \pm 1,02$	$6,4 \pm 1,6$	$4,88 \pm 1,02$	$4,44 \pm 1,77$
Katalaz (nmol/ml)	$2,13 \pm 1,03$	$2,59 \pm 0,98$	$3,07 \pm 0,58$	$2,42 \pm 0,93$
SOD (U/ml)	$3,92 \pm 1,08$	$2,93 \pm 1,02$	$3,84 \pm 1,69$	$5,73 \pm 1,32$
GPO (nmol/ml)	$11,27 \pm 6,9$	$14,09 \pm 10,7$	$17,43 \pm 11,39$	$36,5 \pm 17,11$



Şekil 12: Plazma MDA düzeyinin gruplara göre dağılımı. [Grup 1 ile 2 arasında anlamlı fark saptandı ($p=0,02$)]. (Bakınız Tablo 4).

Katalaz Düzeyi

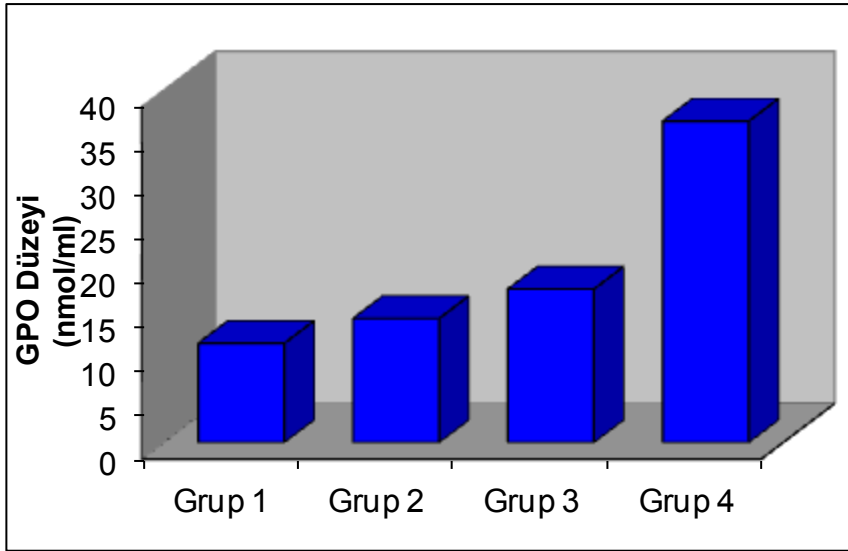
Doğumu takiben yedinci gün yapılan HİBH'den sonra kalp içi girişimle alınan kan örneklerinde en yüksek ortalama katalaz düzeyi grup 3'teki sıçanlarda tespit edilirken, en düşük katalaz düzeyi ise grup 1'deki sıçanlarda saptandı. Serum katalaz düzeyleri grup 1'de $2,13 \pm 1,03$ nmol/ml, grup 2'de $2,59 \pm 0,98$ nmol/ml, grup 3'te $3,07 \pm 0,58$ nmol/ml ve grup 4'te $2,42 \pm 0,93$ nmol/ml olarak ölçüldü. Plazma katalaz düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 4, Şekil 13).



Şekil 13: Plazma Katalaz düzeyinin gruplara göre dağılımı. (Gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı). (Bakınız Tablo 4).

Glutasyon Peroksidaz Düzeyi

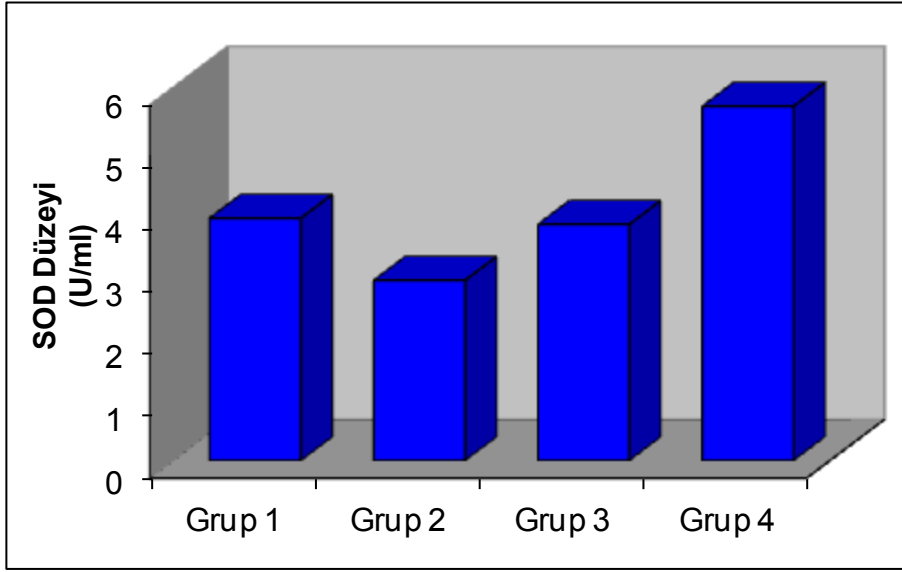
Doğumu takiben yedinci gün yapılan HİBH'den sonra kalp içi girişimle alınan kan örneklerinde en yüksek ortalama GPO düzeyi grup 4'teki sıçanların plazmalarında saptanırken, en düşük GPO düzeyi ise grup 1'deki sıçanların plazmalarında saptandı. Serum GPO düzeyleri grup 1'de $11,27 \pm 6,9$ nmol/ml, grup 2'de $14,09 \pm 10,7$ nmol/ml, grup 3'de $17,43 \pm 11,39$ nmol/ml ve grup 4'te $36,5 \pm 17,11$ nmol/ml olarak ölçüldü. Plazma GPO düzeyi grup 4'te grup 1, 2 ve 3'ten istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulundu (sırasıyla $p < 0,001$, $p = 0,003$ ve $p = 0,013$). Diğer gruplar birbirleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 4, Şekil 14).



Şekil 14: GPO düzeyinin gruplara göre dağılımı. [Grup 4'te grup 1, 2 ve 3'ten istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulundu (sırasıyla $p < 0,001$, $p = 0,003$ ve $p = 0,013$).]. (Bakınız Tablo 4).

Superoksit Dismutaz Düzeyi

Doğumu takiben yedinci gün yapılan HİBH'den sonra kalp içi girişimle alınan kan örneklerinde en yüksek ortalama SOD düzeyi grup 4'teki sıçanların plazmalarında saptanırken, en düşük SOD düzeyi ise grup 2'deki sıçanların plazmalarında saptandı. Serum SOD düzeyleri grup 1'de $3,92 \pm 1,08$ U/ml, grup 2'de $2,93 \pm 1,02$ U/ml, grup 3'te $3,84 \pm 1,69$ U/ml ve grup 4'te $5,733 \pm 1,3181$ U/ml olarak ölçüldü. Plazma SOD düzeyi grup 4'te grup 1, 2 ve 3'ten istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulundu (sırasıyla $p = 0,033$, $p = 0,030$ ve $p < 0,001$) (Tablo 4, Şekil 15).



Şekil 15: SOD düzeyinin gruplara göre dağılımı. [Grup 4'te grup 1, 2 ve 3'ten istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulundu (sırasıyla $p < 0,001$, $p = 0,003$ ve $p = 0,013$)]. (Bakınız Tablo 4).

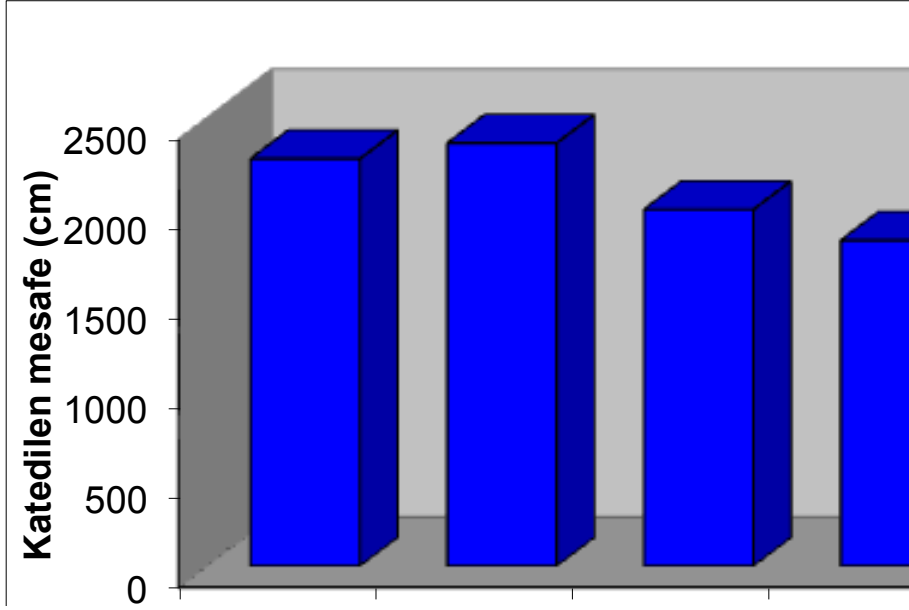
Davranış Deney Bulguları

Açık Alan Deneyi Bulguları

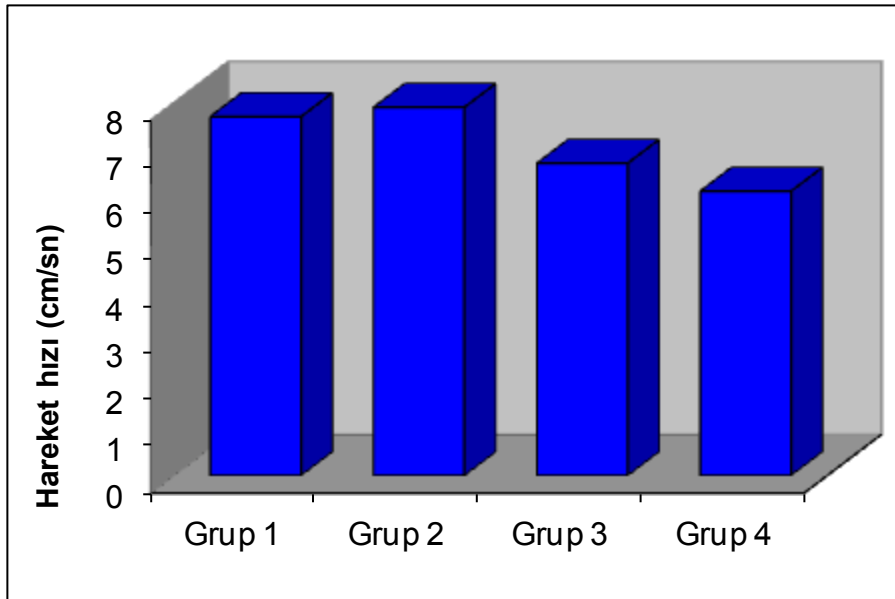
Doğumu takiben 10. haftasını tamamlamış sıçanlara uygulandı. Açık alan deneyinde her grubun 5 dakikada ortalama katettiği mesafe ve hareket hızları değerlendirildi (Tablo 5). Ortalama katedilen mesafe ve hareket hızları gruplar arasında karşılaştırıldığında her iki parametre için de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla $p:0,087$ ve $p:0,08$) (Şekil 16).

Tablo 5: Açık alan deneyinde sıçanların katettikleri mesafelerin gruplara göre dağılımı.

Gruplar	Katedilen mesafe (cm)	Hareket hızı (cm/sn)
Grup 1 (n=18)	2274,025 ± 379,965	7,656 ± 1,331
Grup 2 (n=14)	2362,893 ± 743,755	7,934 ± 2,502
Grup 3 (n=13)	1991,239 ± 723,797	6,667 ± 2,422
Grup 4 (n=18)	1819,356 ± 783,275	6,090 ± 2,625



Şekil 16: Açık alan deneyinde sıçanların katettikleri mesafenin gruplara göre dağılımı. (Gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı). (Bakınız Tablo 5).



Şekil 17: Açık alan deneyinde sıçanların hareket hızlarının gruplara göre dağılımı. (Gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı). (Bakınız Tablo 5).

Morris Su Tankı Öğrenme ve Hafıza Deneyleri

Morris su tankı öğrenme ve hafıza testi doğumu takiben 14. haftasını tamamlamış, ortalama ağırlıkları $217,42 \pm 23,27$ gram olan sıçanlara uygulandı. Her grup için ayrı ayrı birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü günlerde ortalama yükseltiyi bulma süreleri hesaplandı. Grup 1, 3 ve 4'te günler ilerledikçe yükseltiyi bulma sürelerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı tespit edildi ($p < 0,001$). Grup 2'de ise sadece 1. ve 2. günler arasında yükseltiyi bulma süresi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmazken ($P=0,3$), 1. gün ile 3. ve 4. günler arasında yükseltiyi bulma süresi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptandı (her ikisi için $p < 0,001$) (Tablo 6).

Birinci gün grupların yükseltiyi bulma süreleri incelendiğinde yükseltiyi en çabuk grup 1'in bulduğu ancak diğer gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi ($p > 0,05$) (Tablo 6).

İkinci günde yükseltiyi yine en çabuk grup 1'deki sıçanlar buldu. İkinci en iyi sonuç grup 4'teki sıçanlarda ölçüldü ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi ($p=0,2$). Birinci grubun 2. ve 3. gruptan istatistiksel olarak anlamlı derecede daha kısa zamanda yükseltiyi bulduğu saptandı (her ikisi için $p < 0,001$) (Tablo 6).

Üçüncü günde yükseltiyi yine en çabuk sırasıyla grup 1 ve grup 4 sıçanlar buldu. Bu 2 grup arasında yükseltiyi bulma süreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,18$). Grup 1 ve 4'ün her ikisi grup 2 ve 3'ten istatistiksel olarak anlamlı seviyede daha kısa sürede yükseltiyi buldukları tespit edildi (her ikisi için $p < 0,001$) (Tablo 6). Dördüncü gün sonuçlarında da yükseltiyi en kısa sürede bulma grup 1 sıçanlara aitti ve grup 2, 3, 4'ten istatistiksel olarak anlamlı derecede daha kısa sürede yükseltiyi buldukları saptandı (sırasıyla $p < 0,001$, $p < 0,001$ ve $p=0,001$). Yine ikinci en çabuk sürede yükseltiyi bulan grup 4 idi ve grup 2 ve 3'ten istatistiksel olarak anlamlı derecede daha kısa sürede yükseltiyi bulduğu tespit edildi (sırasıyla $p=0,001$ ve $p=0,001$) (Tablo 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 saptanmadı. Bu gruplarla grup 2 ve 3 arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edildi (grup 1 ile grup 2 ve 3

arasında $p < 0,001$, grup 4 ile grup 2 arası $p = 0,001$, grup 4 ile grup 3 arası $p = 0,015$) (Tablo 6).

Tablo 6: Morris su tankı öğrenme ve hafıza deneylerinde grupların günlere göre ortalama yükseltiyi bulma süreleri ve bir ile dördüncü gün arasındaki yükseltiyi bulma süresi farkları görünmekte.

Gruplar	1. gün (sn)	2. gün (sn)	3. gün (sn)	4. gün (sn)	1-4. gün arasındaki YBS farkı (sn)
Grup 1 (n=17)	48,82 ± 20,64	32,08 ± 21,73	18,52 ± 16,88	12,29 ± 12,22	36,53 ± 2,89
Grup 2 (n=14)	54,76 ± 15,11	48,80 ± 20,04	41,74 ± 22,88	40,25 ± 22,60	14,50 ± 3,42
Grup 3 (n=13)	55,56 ± 13,48	48,80 ± 20,04	45,37 ± 19,82	34,19 ± 24,95	21,37 ± 3,45
Grup 4 (n=18)	54,20 ± 16,12	39,81 ± 24,78	25,17 ± 21,61	24,42 ± 22,32	29,78 ± 2,97
P₁	0,257	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
P₂	0,141	0,001	<0,001	<0,001	<0,001
P₃	0,322	0,207	0,181	0,001	0,451
P₄	0,991	0,781	0,814	0,552	0,063
P₅	0,997	<0,001	<0,001	0,001	0,001
P₆	0,956	0,616	<0,001	0,118	0,015

Gruplar arası günlere göre ortalama yükseltiyi bulma süreleri ve 1-4. gün arasındaki yükseltiyi bulma süresi farklarının karşılaştırılması.

P₁: Grup 1-Grup 2

P₂: Grup 1-Grup 3

P₃: Grup 1-Grup 4

P₄: Grup 2-Grup 3

P₅: Grup 2-Grup 4

P₆: Grup 3-Grup 4

Öğrenme ve hafıza deneylerinin 5. gününde sıçanların eskiden yükseltinin olduğu doğu kadranında geçirdikleri süre incelendi. Doğru kadranında en fazla süreyi grup 1 ve grup 4 sıçanlarının geçirdiği tespit edildi. Bu 2 grupta da sıçanların doğu kadranında geçirdikleri süre diğer kadranlarda geçirdikleri süreden istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazlaydı ($p < 0,001$). Diğer gruplarda ise anlamlı bir fark gözlemlenmedi (grup 2 $p = 0,577$, grup 3 $p = 0,105$) (Tablo 7).

Tablo 7: Morris su tankı öğrenme ve hafıza deneyinin beşinci gününde sıçanların gruplara göre doğu kadranında geçirdikleri süreler (Grup 1 ve 4'ün doğu kadranında geçirdikleri süreler diğer kadranlardan anlamlı olarak fazlaydı. $p<0,001$).

Gruplar	Kadranlarda Geçirilen Süreler (sn)			
	Batı	Kuzey	Güney	Doğu
Grup 1 (n=17)	13,13 ± 3,50	12,71 ± 3,59	11,15 ± 3,90	23,01 ± 4,76
Grup 2 (n=14)	17,66 ± 5,79	14,46 ± 7,76	14,53 ± 8,00	13,36 ± 7,61
Grup 3 (n=13)	20,74 ± 14,29	10,85 ± 6,20	18,12 ± 14,26	10,29 ± 6,22
Grup 4 (n=18)	12,13 ± 6,74	15,19 ± 6,38	10,56 ± 5,97	22,12 ± 9,94

Sıçanların Ortalama Beyin Ağırlıkları ve Makroskopik İnceleme

Tüm gruplarda 16. haftasını tamamlamış sıçanlar dekapite edildi ve beyinleri bütünlüğü bozulmadan çıkarıldı. Çıkarılan beyinler makroskopik olarak incelendi. Grup 1'e ait sıçan beyinleri normal olarak izlenirken, doğum sonrası yedinci günde HİBH oluşturulmuş olan Grup 2, 3 ve 4'e ait sıçan beyinlerinin sağ beyin yarılarının küçülmüş olduğu görüldü (Resim 16). Grup 2 ve 3'e ait sıçan beyinlerinin sağ yarıküreleri diğer gruplara göre daha belirgin şekilde küçülmüş ve sınırları daha düzensiz görünümdeydi.

Beyin ağırlıkları yönünden incelendiğinde en fazla beyin ağırlığına sahip gruplar olan grup 1 ve grup 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Bu grupların ortalama beyin ağırlıkları ile grup 2 ve 3 arasında ise istatistiksel olarak anlamlı derecede fark olduğu tespit edildi (grup 1 ile grup 2 ve 3 arasında her ikisi için $p<0,001$, grup 4 ile grup 2 ve 3 arasında her ikisi için $p=0,002$) (Tablo 8).

Sıçanların Ortalama Vücut Ağırlıkları

Sıçanlar yedi günlük iken çalışmaya alındıklarında ortalama vücut ağırlıkları $11,82 \pm 1,097$ gram idi ve gruplar arasında anlamlı fark yoktu. Sıçanlar 16. haftada tekrar tartıldıklarında vücut ağırlıkları ortalama $243,28 \pm 23,1$ gram olarak ölçüldü. En yüksek ortalama vücut ağırlığı grup 1'deki sıçanlarda ölçülürken en düşük ortalama vücut ağırlığı grup 3'teki sıçanlarda ölçüldü. Ortalama vücut ağırlığı grup 1'de grup 3'ten istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,045$) (Tablo 8).

Sıçanların Beyin Ağırlıklarının Vücut Ağırlıklarına Oranı

Grupların ortalama beyin ağırlıklarının vücut ağırlıkları oranına bakıldığında en yüksek oran grup 1 ve grup 4 sıçanlarda tespit edildi (sırasıyla $0,74 \pm 0,07$ ve $0,7 \pm 0,1$). Her iki grubun beyin ağırlıklarının vücut ağırlıklarına oranı grup 2 ve 3'ten istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı saptandı (grup 1 ile grup 2 ve 3 arasında her ikisi için $p=0,001$, grup 4 ile grup 2 ve 3 arasında her ikisi için $p=0,023$)

Tablo 8: Gruplara göre sıçanların ortalama vücut ve beyin ağırlıkları ve beyin ağırlığının vücut ağırlığına oranı.

	Grup1 (n=17)	Grup 2 (n=14)	Grup 3 (n=13)	Grup 4 (n=13)
Vücut Ağırlığı (gr)	$254,52 \pm 20,58$	$236,16 \pm 23,30$	$232,69 \pm 21,49$	$246,85 \pm 22,72$
Beyin Ağırlığı (gr)	$1,86 \pm 0,128$	$1,448 \pm 0,229$	$1,449 \pm 0,164$	$1,716 \pm 0,197$
Beyin ağırlığı / Vücut Ağırlığı	$0,74 \pm 0,07$	$0,62 \pm 0,12$	$0,63 \pm 0,07$	$0,7 \pm 0,1$



Resim 16: On altıncı haftada her gruptan çıkarılan sıçan beyinlerinden birer örnek makroskopik olarak izlenmektedir. (Grup 1'e ait sıçan beyini normal olarak izlenirken diğer gruplardaki sıçan beyinlerinin sağ yarıkürelerinin küçüldüğü görülmektedir. Grup 2'den çıkarılan sıçan beyininin sağ yarıküresinin diğer gruplara göre daha küçük ve sınırlarının daha düzensiz olduğu görülmektedir.)

TARTIŞMA

Yenidoğan dönemindeki HİBH ve buna bağlı komplikasyonlar, tanı ve tedavideki gelişmelere rağmen tüm dünyada yenidoğan ölümlerinin ve sakatlıklarının önde gelen nedenlerindendir¹⁻⁵. HİBH'nda yakın zamana kadar destek tedavisi dışında bir tedavi seçeneği bulunmazken, fizyopatolojisinin daha iyi anlaşılması ile birlikte çok sayıda tedavi yöntemi geliştirilmiştir^{1,2,9,13,25,53,56}. Diğer taraftan deneysel tedavi yöntemleri arasında allopurinol, magnezyum sülfat, eritropoetin, melatonin, ksenon, nitrik oksit sentaz baskılayıcıları, kalsiyum kanal kapatıcıları, serbest radikal temizleyicileri, soğutma tedavisi, kök hücre nakli ve antiepileptik ilaçlar yer almaktadır^{1,2,9,25,36,54,56,60,62,104,106,108}.

Bu çalışmada, HİBH oluşturulan yenidoğan sıçan modelinde yeni kuşak bir antiepileptik ilaç olan LEV'in nöron koruyucu etkileri erken dönemde histopatolojik ve biyokimyasal testlerle, geç dönemde ise davranış deneyleriyle değerlendirildi. HİBH modifiye Levine yöntemi ile oluşturuldu¹³⁴.

LEV nöron koruyucu etkisi ve güçlü antiepileptik etkinliği ile dikkat çeken yeni kuşak bir antiepileptik ilaçtır. Nöron koruyucu etkinliği az sayıda hayvan çalışması ile gösterilmiş olsa da etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır^{82,144,145}. Niespodziany ve ark. ve Angehagen ve ark. çalışmalarında LEV'in "N" tipi kalsiyum kanallarını seçici olarak kapatarak antiepileptik etkinin yanında nöron koruyucu etki de gösterdiği ileri sürülmüştür^{146,147}. Diğer taraftan LEV'in doğrudan GABAerjik sistemi etkilemeden GABA giriş çıkışını ve GABA-A antagonistlerinin aktivitesini düzenleyerek ve SV2A denilen sinaptik vezikül proteinine bağlanarak antiepileptik ve nöron koruyucu etki gösterebileceği ileri sürülmüştür¹⁴⁸⁻¹⁵¹. Ayrıca Madeja ve ark. çalışmasında LEV'in hücre içine potasyum akışını azaltıp zar uyarılmasını engelleyerek geri dönüşümsüz hücre hasarını önlediği bildirilmiştir^{77,152}. Marini ve ark. çalışmasında ise kainik asit ile oluşturulan nörotoksisiteye karşı LEV'in lipid peroksidasyonunu engelleyerek direkt koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir¹⁵³. Gibbs ve ark. çalışmasında ise status epileptikus oluşturulmuş erişkin sıçanlarda LEV'in glutatyon düzeyini doz bağımlı artırarak mitokondriyal işlevler üzerinde olumlu etkisi olduğu ve bunun nöron koruyucu etkiye yol açtığı ileri sürülmüştür¹⁵⁴. Bizim çalışmamızda nöron koruyucu etkinliği biyokimyasal, histopatolojik ve geç dönemde davranış deneyleriyle gösterilen LEV'in bu etkisini SOD ve GPO enzim

düzeylerini arttırarak yapmış olabileceğini düşündüren sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca LEV'in hücre içi kalsiyum miktarını azaltarak da nöron koruyucu etkiye katkıda bulunmuş olabileceğini düşünmekteyiz.

Apopitozisin Değerlendirilmesi

Yenidoğan sıçanlarda HİBH oluşturulduktan sonra beyinde apopitotik nöron sayısının, karotid arterin bağlandığı tarafta daha fazla olmak üzere, her iki beyin yarısında da arttığı pek çok çalışma ile gösterilmiştir^{10,11,14,73}. HİBH oluşturulmuş yenidoğan sıçanlarda antiepileptik ilaçların nöron koruyucu etkisi çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir^{10,11,14,67,73}. Kabakuş ve ark. çalışmasında HİBH oluşturulmuş yenidoğan sıçanlarda valproik asitin, Liu ve ark. çalışmasında ise topiramet ile memantin birlikte uygulanmasının apopitotik nöron sayısını istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir^{10,11}. Bizim çalışmamızda ise apopitotik nöron sayısının TUNEL yöntemiyle grup 3 ve grup 4'te, Kaspaz-3 yöntemiyle ise yalnızca grup 4'te grup 2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha az olduğu tespit edildi. Bu sonuçlarla çalışmamızda HİBH oluşturulmuş yenidoğan sıçanlarda LEV'in doz bağımlı olarak apopitotik nöron sayısını azalttığı histopatolojik olarak gösterilmiştir. Bizim bilgimize göre çalışmamız LEV'in HİBH oluşturulmuş hayvan modellerinde nöron koruyucu etkinliğinin histopatolojik olarak gösterildiği ilk çalışmadır. LEV'in gösterilen etkisinin daha önce belirttiğimiz gibi hücre içi kalsiyum düzeyini azaltarak ve antioksidan enzim düzeylerini arttırarak yapmış olabileceğini düşünmekteyiz.

Lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzimler;

Son yıllarda oksidatif stresin bir göstergesi olan plazma MDA düzeyi artışı ile HİBH'nin ağırlığı arasında paralel bir ilişki olduğu saptanmıştır^{155,156,157}. Kumar ve ark. tarafından HİBH gelişmiş bebeklerde serum ve BOS MDA düzeyleri ve BOS/serum MDA oranı kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. HİBH ağırlaştıkça serum düzeyinin daha belirgin şekilde arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca HİBH'nden dolayı kaybedilen bebeklerde serum ve BOS MDA düzeyinin yaşayanlara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir⁴⁸. Oliveira ve ark. tarafından erişkin sıçanlarda pilokarpinle uyarılmış nöbette LEV uygulanan grupta serum MDA düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu gösterilmiştir⁸⁹. Marini ve ark. çalışmasında ise kainik asit ile oluşturulan nörotoksitete karşı LEV'in MDA

düzenini azaltarak nöron koruyucu etkisinin olduğu bildirilmiştir¹⁵³. Bizim çalışmamızda HİBH oluşturulup SF uygulanan grupta plazma MDA düzeyini en yüksek düzeyde ölçüldü ve sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptandı (p=0,02). LEV uygulanan gruplarda (grup 3 ve grup 4) ise plazma MDA düzeyleri SF uygulanan gruba göre daha düşüktü, ancak gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Bu sonuçlar LEV'in HİBH oluşturulmuş sıçanlarda oksidatif stresin bir göstergesi olan MDA düzeyini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasa da azalttığını göstermiştir. Bu konuda daha fazla yorum yapılabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Oksijenli ortamda, hücrede metabolizma sonucunda oluşan SOR'leri hücredeki antioksidan enzimler tarafından ortadan kaldırılmaktadır. Hipoksi iskemi ve yeniden kanlanma döneminde hücre içine kalsiyum girişinin artmasının SOR'lerini arttırdığı gösterilmiştir^{23,24,25,32,34,47,48}. Son yıllarda HİBH ile antioksidan enzimler arasındaki ilişkiyi gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur^{14,39,47,48,67,89}. Kumar ve ark. tarafından HİBH gelişmiş bebeklerin serum GPO, SOD ve katalaz düzeylerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Antioksidan özellikteki bu enzimlerin artışının HİBH gelişmiş bebeklerde SOR'nin zararlı etkilerine karşı hücrelerin savunma mekanizması olabileceği ileri sürülmüştür⁴⁸. Güncel bazı çalışmalarda LEV'in nöron koruyucu etkinliğini antioksidan enzimleri arttırarak yaptığı bildirilmiştir^{89,158}. Oliveira ve ark. tarafından erişkin sıçanlarda pilokarpinle uyarılmış nöbette LEV'in nitrit-nitrat seviyelerini azalttığı, glutatyon kaybını önlediği ve hipokampüsteki katalaz aktivitesini koruduğu saptanmıştır. Çalışma sonucunda LEV'in, lipid peroksidasyonunu ve hipokampal oksidatif stresi azaltarak nöron koruyucu etkide bulunduğu ileri sürülmüştür⁸⁹. Ueda ve ark. çalışmasında ise LEV'in antioksidan etkiyi arttırıp glutamat düzeyini azaltarak nöron koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir¹⁵⁸. Bizim sonuçlarımız da Oliveira ve Ueda'nın çalışmalarıyla büyük benzerlik göstermekteydi. Çalışmamızda HİBH oluşturulmuş yenidoğan sıçanlarda hipoksi iskemi sonrası LEV 200 mg/kg uygulanan sıçanların GPO ve SOD enzim düzeylerinin diğer 3 gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı. Bizim çalışmamızda nöron koruyucu etkinliği gösterilen LEV'in, bu etkisini antioksidan enzimler olan SOD ve GPO düzeyini arttırarak yapmış olabileceğini düşünüyoruz. Ayrıca LEV'in MDA düzeyini azaltması da bu sonucu desteklemektedir. LEV'in çalışmamızda tespit edilen etkileri hücre içi kalsiyum düzeyini azaltmasıyla da ilişkili olabilir.

Davranış deneyleri

HİBH oluşturulmuş yenidoğan sıçanlarda davranış deneyleriyle antiepileptik ilaçların geç dönemde nöron koruyucu etkisi çeşitli çalışmalarda değerlendirilmiştir^{10,11,12,62,67,73}. Noh ve ark. çalışmasında HİBH oluşturulmuş sıçanlarda topiramate verilen grubun yükseltiyi bulma sürelerinin sham grubuyla benzer olduğu ve hipoksi iskemi uygulanıp tedavi almayanlara göre ise istatistiksel olarak anlamlı derecede daha kısa olduğu tespit edilmiştir⁶⁷. Bizim çalışmamızda da davranış deneyleri açık alan ve morris su tankı testi ile yapıldı^{67,138,139,141}. LEV'in HİBH ve SE oluşturulmuş sıçanlarda apoptozisi azalttığı az sayıda çalışmada gösterilmesine karşın, bu ilacın geç dönemde davranış deneylerine olan etkileri araştırılmamıştır. Çalışmamızda açık alan deneyinde grupların katettikleri mesafeyi ve hareket hızlarını incelediğimizde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 5). Gelecekteki çalışmalarda HİBH'nin lokomotor etkilerini daha iyi değerlendirmek amacıyla daha ağır hipoksi veya açık alanda kalma süresinin arttırılması planlanabilir.

Morris su tankı testinde ise grupların ilk dört günde yükseltiyi bulma süreleri incelendiğinde tüm gruplar günler ilerledikçe bu süreyi anlamlı olarak düşürmekteydi. Yükseltiyi bulma süresi, 1. gün ile 4. gün arasındaki yükseltiyi bulma süresi farkı ve 5. gün yükseltinin olduğu doğru kadranında geçirilen süre bakımından sham grubu ile LEV 200 mg/kg uygulanan grup 4 sıçanların sonuçları benzerdi. Bu gruplarla grup 2 ve 3 arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark vardı. Bu bulgularla LEV dozunun arttırılmasının sıçanlarda öğrenme yetilerine olumlu katkıda bulunduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca HİBH'nin tedavisinde LEV kullanımının hem nöbet kontrolüne hem de doğrudan ya da dolaylı olarak öğrenme yetilerine olumlu katkısının olacağını düşündürmektedir. Bizim çalışmamızdan farklı olarak Brandt ve ark. çalışmasında ise status epileptikus oluşturulmuş sıçanlarda morris su tankı ve açık alan testi ile yapılan davranış deneylerinde LEV'in kontrol grubuna göre olumlu bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir¹⁵⁹. Bu sonuç bizim çalışmamızda tespit edilen olumlu etkilerin nöbet kontrolünden çok HİBH'ni azaltıcı etkisi ile ilişkilendirilmesi gerektiğini düşündürmüştür.

Beyin ve Vücut Ağırlığı

Çalışmamızın 16. haftasını tamamlamış sıçanlarda vücut ağırlıkları, beyin ağırlıkları ve beyin ağırlığının vücut ağırlığına oranı değerlendirildi. En yüksek beyin

ağırlığı ve beyin ağırlığının vücut ağırlığına oranı grup 1 ve grup 4 sıçanlarda saptandı, ve grup 2 ve 3'ten anlamlı derecede daha yüksek olarak tespit edildi. Ortalama vücut ağırlığı ise en yüksek grup 1'deki sıçanlarda saptandı ve grup 3'ten anlamlı derecede daha yüksekti. Çalışmamızda HİBH oluşturulmuş sıçanlarda LEV'in doz bağımlı olarak beyin ve vücut ağırlığına olumlu etkisinin olduğu tespit edildi. Bu durum HİBH'nin şiddeti azaldıkça beslenme güçlüğü ve ilişkili olarak malnütrisyonun da azaldığını düşündürmektedir. Kim ve ark. çalışmasında SE oluşturulmuş yenidoğan sıçanlarda MK-801, fenitoin ve valproik asidin hem apoptotik nöron sayısını arttırdığı hem de büyüme geriliği yaptığı, LEV'in yüksek dozlarda bile (500-1500 mg/kg) böyle bir etkide bulunmadığı gösterilmiştir⁷⁶.

Son zamanlarda yapılmış klinik çalışmalarda yenidoğan nöbetlerinin tedavisinde LEV'in önemli bir yan etki yapmadan nöbetleri kontrol altına aldığı gösterilmiştir. LEV'in tedavi dozunun birkaç kat üstünde dahi nöron ölümüne neden olmaması, nöbet tedavisinde geleneksel olarak kullanılan fenobarbital, fenitoin, valproik asit gibi diğer antiepileptik ilaçlara göre önemli bir üstünlüktür^{11,12,62,76,77}. Kim ve ark. çalışmasında SE oluşturulmuş yenidoğan sıçanlarda MK-801, fenitoin ve valproik asidin apoptozise neden olduğu tespit edilirken, LEV'in tedavi dozundan çok daha yüksek dozlarda bile apoptozise neden olmadığı gösterilmiştir⁷⁶. Bizim çalışmamızda da LEV'in yüksek dozlarda (200 mg/kg) nöron koruyucu etkisinin daha belirgin olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlarla LEV yüksek dozlarda bile nöron koruyucu etkisinin devam etmesi ve güven aralığının geniş olması nedeniyle yenidoğan nöbetlerinde ve HİBH'nda kullanılabileceğini düşünüyoruz.

Sonuç olarak bu çalışma ile LEV'in HİBH oluşturulmuş yenidoğan sıçanlarda erken dönemde apoptotik nöron sayısını TUNEL yöntemiyle LEV 100 mg/kg ve 200 mg/kg uygulanan gruplarda, Kaspaz-3 yöntemiyle ise sadece 200 mg/kg uygulanan grupta azaltarak nöron koruyucu etkide bulunduğu histopatolojik olarak gösterilmiştir. Geç dönemde ise doz bağımlı olarak davranış deneylerine olumlu katkısının olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma ile LEV'in nöron koruyucu etki mekanizmasından birinin de hipoksi iskemi ve yeniden kanlanma döneminde oluşan GPO ve SOD gibi antioksidan enzimleri arttırması olabileceği gösterilmiştir. Bu sonuçlarla LEV HİBH'lı yenidoğanlarda hem hipoksi iskemiye bağlı hasarı önlemede hem de nöbet kontrolünde güvenle kullanılabilecek bir ilaç olabileceği ve bu konuda ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmüştür. Bu çalışma bizim

bilgilerimize göre LEV'in HİBH oluşturulmuş yenidoğan hayvan modelinde nöron koruyucu etkinliğini histopatolojik, biyokimyasal ve geç dönemde davranış deneyleriyle gösteren ilk çalışmadır.

SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Apoptotik nöron sayısının TUNEL yöntemiyle LEV 100 mg/kg ve 200 mg/kg uygulanan gruplarda, Kaspaz-3 yöntemiyle ise yalnızca LEV 200 mg/kg uygulanan grupta SF uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha az olduğu tespit edildi.
2. Plazma MDA düzeyi SF uygulanan grupta en yüksek düzeyde idi ve sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p=0,02$). LEV uygulanan gruplarda (grup 3 ve grup 4) ise plazma MDA düzeyi azalmakla birlikte fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.
3. Plazma katalaz düzeyi en yüksek LEV 100 mg/kg uygulanan sıçanlarda tespit edilirken, gruplar arası karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.
4. Plazma GPO düzeyi en yüksek LEV 200 mg/kg uygulanan grupta saptanırken, diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık mevcuttu (sırasıyla $p<0,001$, $p=0,003$ ve $p=0,013$).
5. Plazma SOD düzeyi en yüksek LEV 200 mg/kg uygulanan grupta saptanırken, diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu tespit edildi (sırasıyla $p=0,033$, $p=0,030$ ve $p<0,001$).
6. Açık alan deneyinde sıçanların ortalama katettiği mesafe ve hareket hızları gruplar arası karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (sırasıyla $p=0,087$ ve $p=0,08$).
7. Morris su tankı öğrenme ve hafıza deneylerinde yükseltiyi bulma süresi, 1. gün ile 4. gün arasındaki yükseltiyi bulma süresi farkı ve 5. gün yükseltinin olduğu doğu kadranında geçirilen süre bakımından sham grubu ile LEV 200 mg/kg uygulanan grup 4 sıçanların sonuçları benzerdi. Bu gruplarla grup 2 ve 3 arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı.
8. En yüksek beyin ağırlığı ve beyin ağırlığının vücut ağırlığına oranı grup 1 ve grup 4 sıçanlarda saptandı ve grup 2 ve grup 3'e göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu tespit edildi.
9. En yüksek ortalama vücut ağırlığı grup 1'deki sıçanlarda, en düşük ortalama vücut ağırlığı grup 3'teki sıçanlarda tespit edildi. Ortalama vücut

ağırlığı grup 1'de grup 3'ten istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,045$).

10. Sonuç olarak bu çalışma ile LEV'in HİBH oluşturulmuş yenidoğan sıçanlarda erken dönemde apoptotik nöron sayısını azaltarak nöron koruyucu etkide bulunduğu histopatolojik olarak gösterilmiştir. Geç dönemde ise doz bağımlı olarak davranış deneylerine olumlu katkısının olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma ile LEV'in nöron koruyucu etki mekanizmasından birinin de hipoksi iskemisi ve yeniden kanlanma döneminde oluşan GPO ve SOD gibi antioksidan enzimleri arttırması olabileceği gösterilmiştir.
11. Bu sonuçlarla LEV HİBH'lı yenidoğanlarda hem hipoksi iskemisiye bağlı hasarı önlemede hem de nöbet kontrolünde güvenle kullanılacak bir ilaç olabileceği ve bu konuda ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma bizim bilgilerimize göre LEV'in HİBH oluşturulmuş yenidoğan hayvan modelinde nöron koruyucu etkinliğini histopatolojik, biyokimyasal ve geç dönemde davranış deneyleriyle gösteren ilk çalışmadır.

KAYNAKLAR

1. Wilkinson DJ. Cool heads: ethical issues associated with therapeutic hypothermia for newborns. *Acta Paediatr* 2009; 98:217-20.
2. 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.
3. Hill A. Hypoxic-Ischemic Cerebral Injury in the Newborn. In: Swaiman KF, Ashwal S, Ferriero DM (eds). *Pediatric Neurology*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier, 2006:279-297.
4. Mwaniki MK, Atieno M, Lawn JE, Newton CR. Long-term neurodevelopmental outcomes after intrauterine and neonatal insults: a systematic review. *Lancet*. 2012; 379:445-52.
5. Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet* 2005; 365:663-70
6. Bonfold E, Krainc D, Ankarcrona 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 U S A* 1995; 92:7162-6.
7. Edwards AD, Brocklehurst P, Gunn AJ, et al. Neurological outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: synthesis and meta-analysis of trial data. *BMJ*. 2010; 340:c363.
8. Menkes JH and Sarnat HB Perinatal Asphyxia and Trauma. In: Menkes JH, Sarnat HB, Maria BL (eds). *Child Neurology*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2006:367-433.
9. Kelen D, Robertson NJ. Experimental treatments for hypoxic ischaemic encephalopathy. *Early Hum Dev*. 2010; 86:369-77.
10. Kabakus N, Ay I, Aysun S, et al. Protective effects of valproic acid against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *J Child Neurol* 2005; 20:582-87.
11. Liu C, Lin N, Wu B, Qiu Y. Neuroprotective effect of memantine combined with topiramate in hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Res*. 2009; 1282:173-82.

12. Katz I, Kim J, Gale K, Kondratyev A. Effects of lamotrigine alone and in combination with MK-801, phenobarbital, or phenytoin on cell death in the neonatal rat brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 322:494-500.
13. Johnston MV, Fatemi A, Wilson MA, Northington F. Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care. *Lancet Neurol.* 2011; 10:372-82.
14. Costa C, Martella G, Picconi B, et al. Multiple mechanisms underlying the neuroprotective effects of antiepileptic drugs against in vitro ischemia. *Stroke.* 2006; 37:1319-26.
15. Ramantani G, Ikonomidou C, Walter B, Rating D, Dinger J. Levetiracetam: safety and efficacy in neonatal seizures. *Eur J Paediatr Neurol.* 2011; 15:1-7
16. Khan O, Chang E, Cipriani C, et al. Use of intravenous levetiracetam for management of acute seizures in neonates. *Pediatr Neurol.* 2011; 44:265-9.
17. 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.
18. Levene MI, de Vries L. Hypoxic-ischemic encephalopathy. In: Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh MC (eds). *Neonatal-Perinatal Medicine.* 8th ed. Philadelphia: Elsevier, 2006:938-56.
19. Verklan MT. The chilling details: hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Perinat Neonatal Nurs* 2009; 23:59- 68.
20. Marlow N, Budge H. Prevalence, causes, and outcome at 2 years of age of newborn encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2005; 90:193-4.
21. Cowan F. Outcome after intrapartum asphyxia in term infants. *Semin Neonatol* 2000; 5:127-40.
22. Al-Macki N, Miller SP, Hall N, Shevell M. The spectrum of abnormal neurologic outcomes subsequent to term intrapartum asphyxia. *Pediatr Neurol* 2009; 41:399-405.
23. Vanucci RC, Palmer C. Hypoxia-ischemia neuropathology, pathogenesis and management. In: Fanaroff AA, Martin RJ (eds). *Neonatal perinatal medicine,* 7th ed. Philadelphia: Mosby Publ. 2002:847-67.
24. Volpe JJ. Perinatal brain injury: from pathogenesis to neuroprotection. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2001; 7:56–64.

25. Shalak L, Perlman JM. Hypoxic-ischemic brain injury in the term infant-current concepts. *Early Hum Dev* 2004; 80:125- 41.
26. Martin LJ. Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury. *Int J Mol Med* 2001; 7:455-78.
27. Brambrink AM, Price AC, Kaiser A, et al. Neuronal death in newborn striatum after hypoxia-ischemia is necrosis and evolves with oxidative stress. *Neurobiol Dis.* 2000; 7:169-91.
28. Edwards AD, Mehmet H. Apoptosis in perinatal hypoxic–ischemic cerebral damage. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1996; 22:494-8.
29. Yager JY, Brucklacher RM, Vannucci RC. Cerebral energy metabolism during hypoxia-ischemia and early recovery in the immature rats. *Am J Physiol* 1992; 262:672-7.
30. Jensen FE. Perinatal hypoxic-ischemic brain injury: Maturation-dependent relation to epilepsy. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 1997; 3:85-95.
31. Mishra OP, Fritz KI, Delivoria-Papadopoulos M. NMDA receptor and neonatal hypoxic brain injury. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2001; 7:249–53.
32. Vexler ZS, Ferriero DM. Molecular and biochemical mechanisms of perinatal brain injury. *Semin Neonatol.* 2001; 6:99-108.
33. Fatemi A, Wilson MA, Johnston MV. Hypoxic-ischemic encephalopathy in the term infant. *Clin Perinatol.* 2009; 36:835-58.
34. Grow J, Barks DE. Pathogenesis of hypoxic–ischemic cerebral injury in the term infant: current concepts. *Clin Perinatol* 2002; 29:585-602.
35. Wyatt J. Applied physiology: brain metabolism following perinatal asphyxia. *Current Paediatrics* 2002; 12:227-231.
36. Perlman JM. Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury. *Clin Ther.* 2006; 28:1353-65.
37. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem.* 1993; 268:12231-34.
38. Förstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, et al. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol.* 1991; 42:1849–57.
39. Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol.* 1998; 56:359-84.

40. Palmer C. Hypoxic–ischemic encephalopathy. Therapeutic approaches against microvascular injury, and role of neutrophils, PAF, and free radicals. *Clin Perinatol* 1995; 22:481-517.
41. Berger R, Garnier Y. Perinatal brain injury. *J Perinat Med*. 2000; 28:261-85.
42. Can G. Perinatal asfiksi. In: Yurdakök M, Erdem G (eds). *Neonatoloji*. 1. baskı. Ankara: Alp Ofset, 2004:719-29.
43. Little DM, Kraus MF, Jiam C, et al. Neuroimaging of hypoxic-ischemic brain injury. *NeuroRehabilitation*. 2010; 26:15-25
44. Volpe JJ. Hypoxic-ischemic encephalopathy: clinical aspects. In: Volpe JJ (eds). *Neurology of the Newborn*. 5th ed. Philadelphia: Elsevier, 2008:400-80.
45. Gomella TL. *Neonatology*. 6th ed. Newyork: Mc Graw Hill Medical, 2009:624-36.
46. American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG). Neonatal encephalopathy and cerebral palsy: executive summary. *Obstet Gynecol*. 2004; 103:780-1.
47. Ramaswamy V, Horton J, Vandermeer B, et al. Systematic review of biomarkers of brain injury in term neonatal encephalopathy. *Pediatr Neurol*. 2009; 40:215-26.
48. Kumar A, Ramakrishna SV, Basu S, Rao GR. Oxidative stress in perinatal asphyxia. *Pediatr Neurol* 2008; 38:181-5.
49. Şimşek F. Serbest Oksijen Radikalleri, Antioksidanlar ve Lipit Peroksidasyonu. *T Klin Pediatri* 1999; 8:42-47.
50. Okuyaz Ç. Çocuk Nörolojisinde Nörofizyolojik Tanı Yöntemleri. In: Gökçay E, Sönmez FM, Topaloğlu H, Tekgül H, Gürer YKY (eds). *Çocuk Nörolojisi*. 2. baskı. Ankara: Anıl Matbaacılık, 2010:21-31.
51. Spitzmiller RE, Phillips T, Meinzen-Derr J, Hoath SB. Amplitude- integrated EEG is useful in predicting neurodevelopmental outcome in full-term infants with hypoxic–ischemic encephalopathy: a meta-analysis. *J Child Neurol* 2007; 22:1069-78.
52. Rutherford M, Malamateniou C, McGuinness A, et al. Magnetic resonance imaging in hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Hum Dev*. 2010; 86:351-60.

53. 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.
54. Glass HC, Ferriero DM. Treatment of hypoxic-ischemic encephalopathy in newborns. *Curr. Treat Options Neurol* 2007; 9:414–423.
55. Grafe MR, Woodworth KN, Noppens K, Perez- Polo JR. Long-term histological outcome after post-hypoxic treatment with 100% or 40% oxygen in a model of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Int J Dev Neurosci* 2008; 26:119-124.
56. Scafidi J, Gallo V. New concepts in perinatal hypoxia ischemia encephalopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2008; 8:130-138.
57. Vannucci RC, Yager JY. Glucose, lactic acid, and perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Pediatr Neurol* 1992; 8:3-12.
58. Glass HC, Glidden D, Jeremy RJ, et al. Clinical neonatal seizures are independently associated with outcome in infants at risk for hypoxic-ischemic brain injury. *J Pediatr* 2009; 155:318–23.
59. Wirrell EC, Armstrong EA, Osman LD, Yager JY. Prolonged seizures exacerbate perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Pediatr Res* 2001; 50:445–54.
60. Bassan H, Bental Y, Shany E, et. al. Neonatal seizures: dilemmas in workup and management. *Pediatr Neurol* 2008; 38:415-21.
61. Gilroy J. Epilepsy. *Basic Neurology*. Third Ed. Detroit: Mc Graw-Hill 2000; 85-121.
62. Bittigau P, Sifringer M, Genz K, et al. Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99:15089-94
63. Clancy RR; Neurology Group on Neonatal Seizures. The newborn drug development initiative workshop: Summary proceedings from the neurology group on neonatal seizures. *Clin Ther*. 2006; 28:1342-52.
64. Hayakawa T, Hamada Y, Maihara T, Hattori H, Mikawa H. Phenytoin reduces neonatal hypoxic-ischemic brain damage in rats. *Life Sciences* 1994; 54:387-92.
65. Shank RP, Gardocki JF, Streeter AJ, Maryanoff BE. An overview of the preclinical aspects of topiramate: pharmacology, pharmacokinetics, and mechanism of action. *Epilepsia* 2000; 41(Suppl 1):3-9.

66. Guerrini R, Parmeggiani L. Topiramate and its clinical applications in epilepsy. *Expert Opin Pharmacother* 2006; 7:811-23.
67. Noh MR, Kim SK, Sun W, et al. Neuroprotective effect of topiramate on hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Exp Neurol*. 2006; 201:470-8.
68. Edmonds HL Jr, Jiang YD, Zhang PY, Shank R. Topiramate as a neuroprotectant in a rat model of global ischemia-induced neurodegeneration. *Life Sci* 2001; 69:2265-77.
69. Schubert S, Brandl U, Brodhun M, et al. Neuroprotective effects of topiramate after hypoxia-ischemia in newborn piglets. *Brain Res* 2005; 1058:129-36.
70. Filippi L, Poggi C, la Marca G, et al. Oral topiramate in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy treated with hypothermia: a safety study. *J Pediatr* 2010; 157:361-6.
71. Fitton A, Goa KL. Lamotrigine: An update of its pharmacology and therapeutic use. *Drugs* 1995; 50: 691-713.
72. Shuaib A, Mahmood RH, Wishart T, et al. Neuroprotective effects of lamotrigine in global ischemia in gerbils. A histological, in vivo microdialysis and behavioral study. *Brain Res*. 1995; 702:199-206.
73. Papazisis G, Kallaras K, Kaiki-Astara A, et al. Neuroprotection by lamotrigine in a rat model of neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2008; 11:321-9.
74. Holland KD. Efficacy, pharmacology, and adverse effects of antiepileptic drugs. *Neurol Clin* 2001; 19:313-45.
75. Mora A, González-Polo RA, Fuentes JM, Soler G, Centeno F. Different mechanisms of protection against apoptosis by valproate and Li⁺. *Eur J Biochem*. 1999; 266:886-91.
76. Kim JS, Kondratyev A, Tomita Y, Gale K. Neurodevelopmental impact of antiepileptic drugs and seizures in the immature brain. *Epilepsia*. 2007;48 Suppl 5:19-26.
77. Belcastro V, Pierguidi L, Tambasco N. Levetiracetam in brain ischemia: clinical implications in neuroprotection and prevention of post-stroke epilepsy. *Brain Dev*. 2011; 33:289-93.
78. Mazarati AM, Baldwin R, Klitgaard H, Matagne A. Anticonvulsant effects of levetiracetam and levetiracetam-diazepam combinations in experimental status epilepticus. *Epilepsy Res* 2004; 58:167-74.

79. Patsalos P.N. Pharmacokinetic profile of levetiracetam: toward ideal characteristics, *Pharmacol Ther* 2000; 85:77-85.
80. Verrotti A, D'Adamo E, Parisi P, Chiarelli F, Curatolo P. Levetiracetam in childhood epilepsy. *Paediatr Drugs*. 2010; 12:177-86.
81. <http://www.ganfyd.org/index.php?title=Levetiracetam>. Erişim Tarihi: 01.05.2012
82. Patsalos P.N. Clinical Pharmacokinetics of Levetiracetam. *Clin Pharmacokinet* 2004; 43:707-724.
83. Deckers CL, Genton P, Sills GJ, Schmidt D. Current limitations of antiepileptic drug therapy: a conference review. *Epilepsy Res*. 2003; 53:1-17.
84. Lynch BA, Lambeng N, Nocka K, et al. The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:9861-6.
85. Glauser TA, Mitchell WG, Weinstock A, et al. Pharmacokinetics of levetiracetam in infants and young children with epilepsy. *Epilepsia*. 2007; 48:1117-22.
86. Major P, Greenberg E, Khan A, Thiele EA. Pyridoxine supplementation for the treatment of levetiracetam-induced behavior side effects in children: preliminary results. *Epilepsy Behav*. 2008; 13:557-9.
87. Peake D, Mordekar S, Gosalakkal J, et al. Retention rate of levetiracetam in children with intractable epilepsy at 1 year. *Seizure*. 2007; 16:185-9.
88. Hanon E, Klitgaard H. Neuroprotective properties of the novel antiepileptic drug levetiracetam in the rat middle cerebral artery occlusion model of focal cerebral ischemia. *Seizure*. 2001; 10:287-93.
89. Oliveira AA, Almeida JP, Freitas RM, et al. Effects of levetiracetam in lipid peroxidation level, nitrite-nitrate formation and antioxidant enzymatic activity in mice brain after pilocarpine-induced seizures. *Cell Mol Neurobiol*. 2007; 27: 395-406.
90. Fürwentsches A, Bussmann C, Ramantani G, et al. Levetiracetamin the treatment of neonatal seizures: a pilot study. *Seizure* 2010; 19:185–9.
91. Abend NS, Gutierrez-Colina AM, Monk HM, Dlugos DJ, Clancy RR. Levetiracetam for treatment of neonatal seizures. *J Child Neurol*. 2011; 26:465-70.
92. Drury PP, Bennet L, Gunn AJ. Mechanisms of hypothermic neuroprotection. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2010; 15:287-92.

93. Zheng T, Rossignol C, Leibovici A, et al. Transplantation of multipotent astrocytic stem cells into a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Brain Res.* 2006; 1112:99-105.
94. van Velthoven CT, Kavelaars A, van Bel F, Heijnen CJ. Nasal administration of stem cells: a promising novel route to treat neonatal ischemic brain damage. *Pediatr Res.* 2010; 68:419-22.
95. van Velthoven CT, Kavelaars A, van Bel F, Heijnen CJ. Mesenchymal stem cell treatment after neonatal hypoxic-ischemic brain injury improves behavioral outcome and induces neuronal and oligodendrocyte regeneration. *Brain Behav Immun.* 2010; 24:387-93.
96. Çelik Y, Atıcı A. Hipoksik iskemik beyin hasarı oluşturulmuş yenidoğan sıçanlara çok yönlü astrosit kök hücre ile birlikte fibroblast büyüme faktörü- 2 verilmesinin bilişsel ve motor yetiler üzerine etkileri. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Anabilim Dalı Yan Dal Uzmanlık Tezi, 2011.
97. Saliba E, Rousset C, Potin J, et al. Inflammation, cytokines and perinatal brain injury. *Biol Neonate* 2002; 82:291-302.
98. Oygür N, Sönmez Ö, Saka O, Yeğin O. Predictive value of plasma and cerebrospinal fluid TNF-alpha and IL-1 Beta concentrations on outcome of fullterm infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1998; 79:F190-193.
99. Özkan A, Atıcı 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. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Anabilim Dalı Yan Dal Uzmanlık Tezi, 2009.
100. Bozlu G, Atıcı 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.
101. Büyükdereli Z, Atıcı A. Hipoksik İskemik Beyin Hasarı Oluşturulmuş Yenidoğan Sıçanlarda Trombosit Uyarıcı Faktör Antagonisti Uygulamasının Bilişsel ve Motor Yetiler Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, 2008.
102. 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.
103. Hoffman DJ, Marro PJ, McGowan JE, Mishra OP, Delivoriapapadopoulos M. Protective effect of MgSO₄ infusion on NMDA receptor binding characteristics during cerebral cortical hypoxia in the newborn piglet. *Brain Research* 1994; 644:144-149.
 104. Bhat MA, Charoo BA, Bhat JI, et al. Magnesium sulfate in severe perinatal asphyxia: a randomized, placebo-controlled trial. *Pediatrics* 2009; 123:764-9.
 105. Spandou E, Soubasi V, Papoutsopoulou S, et al. Neuroprotective effect of long-term MgSO₄ administration after cerebral hypoxia-ischemia in newborn rats is related to the severity of brain damage. *Reprod Sci* 2007; 14:667-677.
 106. Chaudhari T, McGuire W. Allopurinol for preventing mortality and morbidity in newborn infants with suspected hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008; (2):CD006817.
 107. Chan E, Obaid L, Johnson ST, Bigam DL, Cheung PY. N-acetylcysteine administration improves platelet aggregation in hypoxia-reoxygenation injury. *Proc West Pharmacol Soc* 2007; 50:53-7.
 108. Wang X, Svedin P, Nie C, et al. N-acetylcysteine reduces lipopolysaccharide-sensitized hypoxic-ischemic brain injury. *Ann Neurol* 2007; 61:263-71.
 109. Jatana M, Singh I, Singh A, Jenkins D. Combination of systemic hypothermia and n-acetylcysteine attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Pediatr Res* 2006; 59:684-9.
 110. Saito Y, Yoshida Y, Akazawa T, Takahashi K, Niki E. Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants. *J Biol Chem* 2003; 278:39428-34.
 111. Kumral A, Tüzün F, Oner MG, et al. Erythropoietin in neonatal brain protection: The past, the present and the future. *Brain Dev* 2011; 33:632-43.
 112. Lee MY, Kuan YH, Chen HY, et al. Intravenous administration of melatonin reduces the intracerebral cellular inflammatory response following transient focal cerebral ischemia in rats. *J Pineal Res* 2007; 42:297-309.
 113. Miller SL, Yan EB, Castillo-Meléndez M, Jenkin G, Walker DW. Melatonin provides neuroprotection in the late-gestation fetal sheep brain in response to umbilical cord occlusion. *Dev Neurosci* 2005; 27:200-10.

114. 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.
115. Yoneda S, Ibara S, Kobayashi K, et. al. Low adjusted serum ionized calcium concentration shortly after birth predicts poor outcome in neonatal hypoxicischemic encephalopathy. *J Obstet Gynaecol Res* 2005; 31:57-64.
116. Berger R, Lehmann T, Karcher J, Garnier Y, Jensen A. Low dose flunarizine protects the fetal brain from ischemic injury in sheep. *Pediatr Res* 1998; 44:277-82.
117. Kittaka M, Giannotta SL, Zelman V, et al. Attenuation of brain injury and reduction of neuron-specific enolase by nicardipine in systemic circulation following focal ischemia and reperfusion in a rat model. *J. Neurosurg* 1997; 87:731-7.
118. Levene MI, Gibson NA, Fenton AC, Papathoma E, Barnett D. The use of a calcium-channel blocker, nicardipine, for severely asphyxiated newborn infants. *Dev. Med. Child. Neurol* 1990; 32:567-74.
119. Taskin E, Ozcan K, Canacankatan N, et al. The effects of indomethacin on caspases, glutathione level and lipid peroxidation in the newborn rats with hypoxic-ischemic cerebral injury. *Brain Res* 2009; 1289:118-23.
120. Dean JM, George S, Naylor AS, et al. Partial neuroprotection with low-dose infusion of the alpha2-adrenergic receptor agonist clonidine after severe hypoxia in preterm fetal sheep. *Neuropharmacology* 2008; 55:166-74.
121. Ma D, Hossain M, Rajakumaraswamy N, et al. Dexmedetomidine produces its neuroprotective effect via the alpha 2 adrenoceptor subtype. *Eur J Pharmacol* 2004; 502:87-97.
122. Hamada Y, Hayakawa T, Hattori H, Mikawa H. Inhibitor of nitric oxide synthesis reduces hypoxicischemic brain damage in the neonatal rat. *Pediatr Res* 1994; 35:10-4.
123. Ishida A, Trescher WH, Lange MS, Johnston MV. Prolonged suppression of brain nitric oxide synthase activity by 7- nitroindazole protects against cerebral hypoxic-ischemic injury in neonatal rat. *Brain Dev* 2001; 23: 349-54.
124. Lin S, Fan LW, Rhodes PG, Cai Z. Intranasal administration of IGF-1 attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Exp. Neurol* 2009; 217:361-370.

125. Feng Y, Rhodes PG, Bhatt AJ. Neuroprotective effects of vascular endothelial growth factor following hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Pediatr Res* 2008; 64:370-4.
126. Chiaretti A, Genovese O, Riccardi R, et. al. Intraventricular nerve growth factor infusion: a possible treatment for neurological deficits following hypoxic-ischemic brain injury in infants. *Neurol Res* 2005; 27:741-6.
127. Predescu D, Ihida K, Predescu S, Plade GE. The vascular distribution of the PAF receptor. *Eur J Cell Biol* 1996; 69:86-98.
128. Jin-qiao S, Bin S, Wen-hao Z, Yi Y. Basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation and differentiation of neural stem cells in neonatal rats after ischemic brain injury. *Brain Dev* 2009; 31:331-40.
129. Wang ZL, Cheng SM, Ma MM, et al. Intranasally delivered FGF enhances neurogenesis in adult rats following cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 2008; 446:30-5.
130. Sharp PE, La Regina MC. *The Laboratory Rat*. Florida CRC Press 1998.
131. Dobbing, J. The later development of the brain and its vulnerability. In: Davis JA, Dobbing J (eds). *Scientific Foundations of Pediatrics* (2nd ed). London, Heinemann 1981, pp 744-759.
132. Yücel F, Ünal N, Erçakır M, Güven G. Rat beynindeki yasa bağlı hacim değişikliklerinin Cavalieri yöntemi ile saptanması. *Erciyes Tıp Dergisi* 2003; 25:179-85.
133. Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT, et al. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Neurosci Res*. 1999; 55:158-63.
134. Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in rat. *Ann Neurol*. 1981; 9:131-41.
135. Pereria LO, Arteni NS, Peterson RC, et al. 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.
136. Carli M, Prontera C, Samanin R. Effect of 5-HT_{1A} 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.
137. Lieben CKJ, Oorsouw K, 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. *Behavioural Brain Research* 2004; 151:53-64.
- 138.** Soubrie P. Open field chez le rat: interrelations entre locomotion exploration et emotivite. *J. Pharmacol* 1971; 2:457.
- 139.** Prut I, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology* 2003; 463:3-33.
- 140.** Binder E, Droste SK, Ohl F, Reul JM. Regular voluntary exercise reduces anxiety-related behavior and impulsiveness in mice. *Behavioral Brain Research* 2004; 155:197-206.
- 141.** Morris RGM. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv* 1981; 12:239-60.
- 142.** Eşsizöğlü A, Yıldırım EA, Mengi M ve ark. Kronik immobilizasyon stresine maruz bırakılan sıçanlarda 7-nirtoindazolün anksiyete ve mekânsal bellek üzerine etkileri. *Nöropsikiyatri Arşivi* 2009; 46:157-62.
- 143.** D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev.* 2001; 36:60-90.
- 144.** Arroyo S, Crawford P. Safety profile of levetiracetam. *Epileptic Disord* 2003; 5:S57–63.
- 145.** Calabresi P, Cupini ML, Centonze D, Pisani F, Bernardi G. Antiepileptic drugs as a possible neuroprotective strategy of brain ischemia. *Ann Neurol* 2003; 53:693-702.
- 146.** Niespodziany I, Klitgaard H, Margineau DG. Levetiracetam inhibits the high-voltage-activated Ca²⁺ current in pyramidal neurones of rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 2001; 306:5-8.
- 147.** Angehagen M, Margineau DG, Ben-Menachem E, et al. Levetiracetam reduces caffeine-induced Ca transient and epileptiform potentials in hippocampal neurons. *Neuroreport* 2003; 14:471-5.
- 148.** Green AR, Hainsworth AH, Jackson DM. GABA potentiation: a logical pharmacological approach for the treatment of acute ischemic stroke. *Neuropharmacology* 2000; 39:1438-94.
- 149.** Margineau DG, Klitgaard H. Levetiracetam has not significant caminobutyric acid-related effect on pair-pulse interaction in the dentate gyrus of rats. *Eur J Pharmacol* 2003; 466:255-61.

150. Loscher W, Honak D, Bloms-Funke P. The novel antiepileptic drug levetiracetam (ucb L059) induces alterations in GABA metabolism and turnover in discrete areas of rat brain and reduces neuronal activity in substantia nigra pars reticulata. *Brain Res* 1996; 735:208-16.
151. Poulain P, Margineau DG. Levetiracetam opposes the action of GABA-A antagonists in hypothalamic neurones. *Neuropharmacology* 2002; 42:346-52.
152. Madeja M, Margineau DG, Gorji A, et al. Reduction of voltageoperated potassium currents by levetiracetam: a novel antiepileptic mechanism of action. *Neuropharmacology* 2003; 45:661-71.
153. Marini H, Costa C, Passaniti M, et al. Levetiracetam protects against kainic acid-induced toxicity. *Life Sci* 2004; 74:1253-64.
154. Gibbs JE, Cock HR. Administration of levetiracetam after prolonged status epilepticus does not protect from mitochondrial dysfunction in a rodent model. *Epilepsy Res.* 2007; 73:208-12.
155. Yamada T, Yoneyama Y, Sawa R, Araki T. Effects of maternal oxygen supplementation on fetal oxygenation and lipid peroxidation following a single umbilical cord occlusion in fetal goats. *J Nihon Med Sch.* 2003; 70:165-71.
156. Bågenholm R, Nilsson UA, Kjellmer I. Formation of free radicals in hypoxic ischemic brain damage in the neonatal rat, assessed by an endogenous spin trap and lipid peroxidation. *Brain Res.* 1997; 773:132-8.
157. Lazzarino G, Vagnozzi R, Tavazzi B, et al. Di Pierro D, Siragusa P, Belli A, Giuffré R, Giardina B. MDA, oxypurines, and nucleosides relate to reperfusion in short-term incomplete cerebral ischemia in the rat. *Free Radic Biol Med.* 1992; 13:489-98.
158. Ueda Y, Doi T, Takaki M, et al. Levetiracetam enhances endogenous antioxidant in the hippocampus of rats: in vivo evaluation by brain microdialysis combined with ESR spectroscopy. *Brain Res.* 2009; 1266:1-7.
159. Brandt C, Glien M, Gastens AM, et al. Prophylactic treatment with levetiracetam after status epilepticus: lack of effect on epileptogenesis, neuronal damage, and behavioral alterations in rats. *Neuropharmacology.* 2007; 53:207-21.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMPA	α-Amino-3-Hidroksi-5-Metil-4-İzoksazol Propiyonat
aEEG	Amplitüd-entegre Elektroensefalogram
ATP	Adenozin Trifosfat
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
BT	Bilgisayarlı Tomografi
Ca	Kalsiyum
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EEG	Elektroensefalogram
ELISA	Enzim Linked Immune Assay
eNOS	Endotel Hücrelerindeki Nitrik Oksit Sentaz
FBF	Fibroblast Büyüme Faktörü
GABA	Gama amino bütirik asit
GPO	Glutasyon peroksidaz
gr	Gram
HİE	Hipoksik İskemik Ensefalopati
HİBH	Hipoksik İskemik Beyin Hasarı
IL	İnterlökin
iNOS	İmmün Hücrelerdeki Nitrik Oksit Sentaz
K	Potasyum
L-NAME	N-Nitro-L-Arginin Metil Ester
LEV	Levetirasetam
MDA	Malondialdehit
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
Na	Sodyum
NAA	N-Asetil Aspartat
NMDA	N-Metil D-Aspartat
nNOS	Nöronlardaki Nitrik Oksit Sentaz
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
PAF	Platelet Activating Factor
PCr	Fosfokreatinin

Pi	İnorganik Fosfat
SDO	Superoksit dismutaz
SOR	Serbest Oksijen Radikalleri
Sn	Saniye
SS	Standart Sapma
SV2A	sinaptik vezikül proteini 2A
TNF-α	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
TUNEL	Terminal-transferase Mediated dUTP Biotin Nick-End-Labeling

RESİMLER DİZİNİ

Resimler	Sayfa No
Resim 1 (Sağ karotid arterin bağlanması için deney masasına sabitlenen yedi günlük yenidoğan sıçan görülmekte).....	46
Resim 2 (Sağ karotid arterin bulunması)	46
Resim 3 (Sağ karotid arterin bağlanması)	47
Resim 4 (Açık Alan Düzenegi).....	52
Resim 5 (Su tankının üstten ve yandan görünümü).....	53
Resim 6 (Uzak hafıza deneyi günlere göre uygulama şeması).....	53
Resim 7 (Doğumu takiben yedinci günde hipoksi iskemi işlemi uygulanan ve ardından dekapite edilen bir sıçanın beyni normal yapıda görünmekte).....	56
Resim 8 (Sham grubuna ait beyin kesitlerinde az sayıda TUNEL-pozitif apoptotik nöron görüldü).....	59
Resim 9 (2. gruba ait beyin kesitlerinde yaygın TUNEL-pozitif apoptotik nöron görüldü)	60
Resim 10 (LEV 100 mg/kg dozda uygulanan 3.gruba ait beyin kesitlerinde TUNEL ile nükleer pozitif boyanma gösteren nöronlar izlenmekte).....	60
Resim 11 (LEV 200 mg/kg dozda uygulanan 4.gruba ait beyin kesitlerinde TUNEL ile nükleer pozitif boyanma gösteren nöronlar izlenmekte).....	61
Resim 12 (Sham grubuna ait beyin kesitlerinde az sayıda Kaspaz-3 pozitif apoptotik nöron görüldü)	64
Resim 13 (2. gruba ait beyin kesitlerinde yaygın Kaspaz-3 ile pozitif boyanan apoptotik nöron görüldü)	65
Resim 14 (LEV 100 mg/kg dozda uygulanan 3.gruba ait beyin kesitlerinde Kaspaz-3 ile sitoplazmik pozitif boyanan nöronlar izlenmekte).....	65
Resim 15 (LEV 200 mg/kg dozda uygulanan 3.gruba ait beyin kesitlerinde Kaspaz-3 ile sitoplazmik pozitif boyanan	

nöronlar izlenmekte).....	66
Resim 16 (On altıncı haftada her gruptan çıkarılan sıçan beyinlerinden birer örnek makroskopik olarak izlenmekte).	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekiller	Sayfa No
Şekil 1 (Perinatal hipoksi iskemi sonucunda beyin hücrelerini ölüme götüren fizyopatolojik olaylar).....	14
Şekil 2 (Apozozis veya nekroz ile hücre ölümü)	15
Şekil 3 (LEV'in kimyasal yapısı)	34
Şekil 4 (LEV molekülü)	34
Şekil 5 (Deney uygulama takvimi)	48
Şekil 6 (TUNEL yöntemi ile beynin sağ yarısında saptanan apoptotik nöronların gruplara göre dağılımı).....	58
Şekil 7 (TUNEL yöntemi ile beynin sol yarısında saptanan apoptotik nöronların gruplara göre dağılımı).....	58
Şekil 8 (TUNEL yöntemi ile beynin sağ ve sol yarısında saptanan apoptotik nöronların gruplara göre dağılımı).....	59
Şekil 9 (Kaspaz-3 yöntemi ile beynin sağ yarısında saptanan apoptotik nöronların gruplara göre dağılımı)	63
Şekil 10 (Kaspaz-3 yöntemi ile beynin sol yarısında saptanan apoptotik nöronların gruplara göre dağılımı)	63
Şekil 11 (Kaspaz-3 yöntemi ile beynin sağ ve sol yarısında saptanan apoptotik nöronların gruplara göre dağılımı)	64
Şekil 12 (Plazma MDA düzeyinin gruplara göre dağılımı)	67
Şekil 13 (Plazma Katalaz düzeyinin gruplara göre dağılımı).....	67
Şekil 14 (GPO düzeyinin gruplara göre dağılımı).....	68
Şekil 15 (SOD düzeyinin gruplara göre dağılımı).....	69
Şekil 16 (Açık alan deneyinde sıçanların katettikleri mesafenin gruplara göre dağılımı)	70
Şekil 17 (Açık alan deneyinde sıçanların hareket hızlarının gruplara göre dağılımı).	70

TABLULAR DİZİNİ

Tablolar	Sayfa No
Tablo 1 (Hipoksik İskemik Ensefalopatide Modifiye Sarnat Sınıflaması)...	22
Tablo 2 (TUNEL yöntemiyle tespit edilen apoptotik nöron sayıları).....	57
Tablo 3 (Kaspaz-3yöntemiyle tespit edilen apoptotik nöron sayıları).....	62
Tablo 4 (Plazma örneklerindeki MDA, GPO, SOD ve katalaz değerleri).	66
Tablo 5 (Açık alan deneyinde sıçanların katettikleri mesafelerin gruplara göre dağılımı)	69
Tablo 6 (Morris su tankı öğrenme ve hafıza deneylerinde grupların günlere göre ortalama yükseltiyi bulma süreleri ve bir ile dördüncü gün arasındaki yükseltiyi bulma süresi farkları).....	72
Tablo 7 (Morris su tankı öğrenme ve hafıza deneyinin beşinci gününde sıçanların gruplara göre doğu kadranında geçirdikleri süreler).....	73
Tablo 8 (Gruplara göre sıçanların ortalama vücut ve beyin ağırlıkları ve beyin ağırlığının vücut ağırlığına oranı ağırlıkları).....	74