



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

**HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI OLUŞTURULMUŞ  
YENİDOĞAN SIÇANLARA ÇOK YÖNLÜ ASTROSİT KÖK  
HÜCRE İLE BİRLİKTE FİBROBLAST BÜYÜME  
FAKTÖRÜ- 2 VERİLMESİNİN BİLİŞSEL VE MOTOR  
YETİLER ÜZERİNE ETKİLERİ**

**UZ. DR. YALÇIN ÇELİK  
YAN DAL UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. AYTUĞ ATICI**

**MERSİN - 2011**



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

**HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI OLUŞTURULMUŞ  
YENİDOĞAN SIÇANLARA ÇOK YÖNLÜ ASTROSİT KÖK  
HÜCRE İLE BİRLİKTE FİBROBLAST BÜYÜME  
FAKTÖRÜ- 2 VERİLMESİNİN BİLİŞSEL VE MOTOR  
YETİLER ÜZERİNE ETKİLERİ**

**UZ. DR. YALÇIN ÇELİK  
YAN DAL UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. AYTUĞ ATICI**

Bu tez, BAP-TF DTB (YÇ) 2009-8 TU kodlu proje olarak Mersin  
Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

**MERSİN - 2011**

## TEŞEKKÜR

Yandal uzmanlık eğitimimin süresince engin tecrübe ve bilgisinden en üst düzeyde yararlandığım, gece gündüz demeden zamanını ve emeğini benden esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Aytuğ Atıcı'ya, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerine, tez çalışmalarımıdaki katkılarından dolayı Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Hüseyin Beydağı'na ve araştırma görevlisi Bora Reşitoğlu'na, Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. İsmail Ün'e, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Necat Yılmaz'a, Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Ayşe Polat'a, Beyin Cerrahisi Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Celal Bağdatoğlu'na ve Yrd. Doç. Dr. Ahmet Dağtekin'e, Biyoistatistik Anabilim Dalı araştırma görevlisi Mehmet Ali Sungur'a, Deneysel Araştırma Laboratuvarı sağlık teknikeri Mehmet Acioğlu'na, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı ve Neonatoloji Bilim Dalı doktor, hemşire ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Ayrıca yandal uzmanlık eğitimim süresince beni çoğu zaman beklemek zorunda kalan, desteğini ve sevgisini esirgemeyen sevgili eğim Sultan'a ve tez çalışmalarımın başladığı dönemde dünyaya gelen oğlum Çınar'a en içten duygularıyla teşekkür ederim.

**Uzm Dr. Yalçın Çelik**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	5
İNGİLİZCE ÖZET.....	7
GİRİŞ VE AMAÇ.....	9
GENEL BİLGİLER.....	11
Perinatal Hipoksik İskemik Ensefalopati.....	11
Tanım.....	11
Epidemiyoloji.....	11
Fizyopatoloji .....	11
Hipoksik İskemik Ensefalopatide Nöropatolojik Bulgular .....	17
Hipoksik İskemik Ensefalopatide Klinik Belirti ve Bulgular .....	18
Hipoksik İskemik Ensefalopati Tanısı.....	20
Biyokimyasal İncelemeler.....	21
Elektrofizyolojik İncelemeler .....	22
Görüntüleme Yöntemleri .....	23
Hipoksik İskemik Ensefalopatide Tedavi .....	25
Destek Tedavisi .....	25
Konvülziyonların Tedavisi .....	26
Soğutma Tedavisi .....	27
Deneysel Tedavi Yöntemleri.....	29
Kök Hücre Nakli.....	29
N-asetil Sistein .....	29
Allopurinol .....	30
Magnezyum Sülfat.....	30
Ksenon .....	30
Melatonin .....	31
Eritropoetin.....	31
Alfa-2 Agonistler .....	32
Önkoşullama ve Ardkoşullama .....	32
Kalsiyum Kanal Kapatıcıları .....	33
Desferoksamin .....	33

Nitrik oksit Sentaz Baskılayıcıları .....	33
İndometazin .....	33
Sitokin Baskılayıcıları .....	34
Hiperbarik Oksijen Tedavisi .....	34
Büyüme Faktörleri.....	34
Fibroblast Büyüme Faktörleri .....	35
Fibroblast Büyüme Faktörü-2 .....	35
Merkezi Sinir Sisteminde Fibroblast Büyüme Faktörü 2'nin Etkileri .....	39
Örselenmeye Bağlı Oluşan Beyin Hasarında Fibroblast Büyüme Faktörü 2'nin Etkileri.....	39
Hipoksi ve İskemiye Bağlı Oluşan Beyin Hasarında Fibroblast Büyüme Faktörü 2'nin Etkileri.....	40
Sıçanların Bilişsel ve Lokomotor Yetilerinin Değerlendirilmesi....	40
Açık Alan Testi .....	41
Morris Su Tankı Deneyleri .....	42
<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER .....</b>	<b>43</b>
Hipoksik İskemik Beyin Hasarının Oluşturulması .....	44
Deney Planı ve Uygulama Takvimi .....	45
Astrosit Hücre Kültürünün Hazırlanması .....	47
BrdU Pozitif Çekirdeğe Sahip Hücrelerin Gösterilmesi .....	47
Motor Korteksin Yerinin Belirlenmesi .....	49
Çok Yönlü Astrosit Kök Hücre Verilmesi .....	49
Fibroblast Büyüme Faktörü- 2'nin Verilmesi .....	49
Sıçanlara Nakledilen İşaretli Astrositlerin İmmünofloresan Yöntemle Gösterilmesi .....	49
Histopatolojik Değerlendirme .....	50
Davranış Deneyleri.....	51
İstatistiksel Yöntemler .....	52
<b>BULGULAR.....</b>	<b>53</b>
Apoptoz Bulguları .....	53
Çok Yönlü Astrosit Kök Hücre Verilmesinin Üçüncü Gününde Verilen Hücrelerin Yerleşimlerinin Değerlendirilmesi .....	57
Çok Yönlü Astrosit Kök Hücre Verilmesinden İki Hafta Sonra	

Hücrelerin Yerleşimlerinin Değerlendirilmesi.....	58
Açık Alan Deneyi Bulguları.....	60
Morris Su Tankı Öğrenme ve Hafıza Deneyi Bulguları.....	62
Sıçanların Beyin Ağırlıkları ve Makroskopik İnceleme.....	65
Sıçanların Vücut Ağırlıkları.....	66
TARTIŞMA .....	67
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	74
KAYNAKLAR .....	76
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	91
RESİMLER DİZİNİ .....	93
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	95
TABLolar DİZİNİ.....	96

## ÖZET

Perinatal hipoksik iskemik ensefalopati tüm dünyada yenidoğan ölümlerinin ve sakatlıklarının önde gelen nedenlerinden biridir. Hipoksik iskemik ensefalopati tedavisinde son yıllarda uygulanmaya başlanan soğutma tedavisi ile olumlu sonuçlar alınmakla birlikte bu tedavi yöntemi bütün bebekler için yeterince etkili değildir. Yakın zamanda yapılan hayvan çalışmalarında kök hücre verilmesinin beyin hasarını azalttığı ve işlevsel testlerde iyileşme sağladığı bildirilmiştir. Ayrıca az sayıda yapılan hayvan deneyinde iskemik beyin hasarının fibroblast büyüme faktörü- 2 (FBF- 2) uygulaması ile azaldığı bildirilmiştir. Biz de bu çalışma ile hipoksik iskemik beyin hasarı oluşturduğumuz yenidoğan sıçanlara çok yönlü astrosit kök hücre ile birlikte FBF-2 vererek beyin hasarının azalıp azalmadığını, işlevsel testlerde iyileşme olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

Çalışmaya yedi günlük sıçan yavruları (n:78) alındı ve rastlantısal olarak dört gruba ayrıldı. Sham Grubu (Grup S, n: 15) dışındaki bütün sıçanlar sağ karotid arterleri bağlandıktan sonra iki saat süreyle %8 oksijen içeren hipoksi odacığında tutuldular. Bir gruba (Grup AF, n: 24) hipoksi- iskemiden beş gün sonra motor korteks içine çok yönlü astrosit kök hücresi, periton içine FBF-2 verilirken, diğer bir gruba (Grup A, n: 22) motor korteks içine çok yönlü astrosit kök hücresi ve periton içine fosfatlı tuz tamponu verildi. Hipoksik iskemik beyin hasarı oluşturulan üçüncü gruba (Grup M, n: 17) ise motor korteks içine taze hücre kültürü sıvısı (medium) verildi. Grup A ve AF'den kök hücre verilmesi işleminden üç gün ve iki hafta sonra üçer sıçan dekapite edilerek işaretli hücrelerin yerleşimleri incelendi. Tüm gruptaki sıçanlara açık alan, Morris su tankı öğrenme ve hafıza deneyleri yapıldı. 14. haftada bütün sıçanlar tartıldı ve her gruptan üçer sıçan dekapite edilerek beyinleri makroskopik olarak incelendi ve tartıldı.

Grup A ve AF'de kök hücre verildikten üç gün sonra işaretli hücrelerin enjekte edilen yerde buldukları saptandı. İki hafta sonra ise kök hücrelerin hipokampus çevresindeki hasarlı alanlara göç ettikleri görüldü. Açık alan davranış deneyinde lokomotor aktivitesi en iyi olan Grup S'iken bunu sırasıyla Grup AF, A ve M takip ediyordu. Ancak gruplar aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Öğrenme ve hafıza deneylerinin üçüncü ve dördüncü gününde Grup S'deki sıçanlar yükseltiyi bulmada en başarılı iken bunu sırasıyla Grup AF, M, A'dakiler izliyordu. Her iki günde de Grup A'daki sıçanlar, Grup S'dekilerden istatistiksel olarak anlamlı

derecede daha başarısızdı (sırasıyla p:0.01, 0.007). 14. haftada gruplar vücut ve beyin ağırlıkları yönünden ağırdan hafife doğru sırasıyla S, AF, A ve M olarak sıralanmaktaydı. Grup S'deki sıçanların vücut ağırlıkları diğer gruplardakilerden anlamlı şekilde fazlaydı ( $p<0,001$ ).

Sonuç olarak hipoksik iskemik beyin hasarı oluşturulmuş sıçanlarda çok yönlü astrosit kök hücre verilmesi ile kök hücreler hasarlı beyin alanına göçmüş ancak beyin hasarında belirgin bir azalma ve işlevsel testlerde iyileşme olmamıştır. Çok yönlü astrosit kök hücre ile birlikte FBF- 2 verilmesi ise beyin hasarının azaltılmasında ve işlevsel testlerde istatistiksel önemlilik düzeyine ulaşmasa da olumlu etkiler sağlamıştır. Buna göre hipoksik iskemik beyin hasarı tedavisinde FBF- 2'nin yararlı olabileceğini ve farklı dozların uygulandığı yeni çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

**Anahtar kelimeler:** Fibroblast büyüme faktörü, hipoksik iskemik ensefalopati, kök hücre tedavisi.



## ABSTRACT

### **The Effects of Fibroblast Growth Factor-2 Administration in Addition to Pluripotent Astrocytic Stem Cell Transplantation on Cognitive and Motor Functions in a Rat Model of Neonatal Hypoxic Ischemic Brain Injury**

Perinatal hypoxic ischemic encephalopathy is one of the major causes of neonatal mortality and disability worldwide. In the previous studies therapeutic hypothermia was found to be effective in some, but not all, of the hypoxic ischemic encephalopathy cases. Recent studies showed that transplantation of stem cells successfully reduced brain damage and improved functional outcome after neonatal hypoxic-ischemia in animals. Additionally in a few number of animal studies fibroblast growth factor-2 was found to be effective in decreasing ischemic brain injury. The aim of this study was to evaluate the effects of pluripotent astrocytic stem cells (PASCs) together fibroblast growth factor-2 (FGF-2) on brain damage and functional outcomes of neonatal rat pups in an experimental setting of hypoxic ischemic brain injury (HIBI).

Seven-day-old male Wistar rat pups (n:78) were included in the study. They were divided into four groups randomly. Except Sham Group (Grup S, n:15) all the rats were subjected to right common carotid artery ligation and hypoxia (92% nitrogen and 8% oxygen). A group of rats (Group AF, n=24) were given PASCs into the motor cortex together with FGF-2 into the peritoneum five days after hypoxic ischemia. An other group (Group A, n: 22) was given PASCs into motor cortex together with phosphate buffered saline (PBS) into the peritoneum. And the last group (Group M, n: 17) received fresh cell culture solution (medium) into the motor cortex. Three rats from Groups A and AF were sacrificed at the 3<sup>rd</sup> and 14<sup>th</sup> days of intracerebral injection to check the presence and location of PASCs. Motor and cognitive functions were evaluated by using open field arena and Morris water maze settings in all groups. All the rats were weighted at the 14<sup>th</sup> week, three rats from each group were sacrificed, all brains were weighted and examined macroscopically.

In Groups A and AF the labeled PASCs were detected only around injection site on 3<sup>rd</sup> day after grafting and then observed to migrate from the injection site to hippocampus on 14<sup>th</sup> day after transplantation. Regarding the motor functions, the

distance covered by the rats in Sham Group was longer compared to the rats in Groups AF, A and M, but the differences were not significant. On third and fourth days Morris water maze test, rats in Group S were more successful in terms of learning and memory functions compared to rats in groups AF, M and A. But the difference was significant only between the groups S and A on both of the days ( $p: 0.007$ ,  $p:0.01$  respectively).

The mean body and brain weights were highest in Group S and followed by groups AF, A and M at postnatal 14<sup>th</sup> week. But only mean body weight of rats in Group S was significantly higher compared to the rats in other groups ( $p<0,001$ ).

In conclusion; PASCs survived and migrated to the damaged area after transplantation to the motor cortex in a rat model of HIBI. But these cells failed to improve motor and cognitive functions in our settings. Although FGF-2 administration in addition to PASCs transplantation slightly increased motor and cognitive functions compared to PASCs transplantation alone, the difference was not significant. FGF-2 treatment alone may be effective in the treatment of HIBI and more studies using different doses of this drug are needed.

**Key words:** Fibroblast growth factor, hypoxic ischemic encephalopathy, stem cell treatment.

## GİRİŞ VE AMAÇ

Perinatal hipoksik iskemik ensefalopati (HİE) tüm dünyada yenidoğan ölümlerinin ve sakatlıklarının önde gelen nedenlerinden biridir<sup>1</sup>. Gelişmiş ülkelerde HİE sıklığı 1000 canlı doğumda iki olarak bildirilmekle birlikte gelişmekte olan ülkelerde çok daha sık görüldüğü düşünülmektedir<sup>2</sup>. Yakın zamana kadar HİE'de destek tedavisi dışında bir tedavi seçeneği bulunmazken son yıllarda uygulanmaya başlanan soğutma tedavisinin etkinliği artık genel kabul görmektedir<sup>1</sup>. Ancak soğutma tedavisi ile ilgili de önemli sorunlar bulunmaktadır. Yapılan çalışmaların hemen hepsinde yalnızca 35 gebelik yaşından büyük bebekler soğutulmuştur, bunun altındaki bebeklere ne yapılacağı önemli bir sorundur. Yine yapılan çalışmaların hepsinde ilk altı saat içinde ulaşılabilen bebekler çalışmalara alınmış ve soğutulmuştur<sup>3-7</sup>. Bu durumda geç dönemde yakalanan bebeklere nasıl bir tedavi uygulanacağı yine önemli bir sorundur. Daha da önemlisi soğutma tedavisinden ağır derecede HİE'li bebeklerin pek fayda görmedikleri bildirilmiştir<sup>3</sup>. Yakın zamanda yayınlanan çok merkezli randomize kontrollü bir çalışmada ise soğutma tedavisinin ölüm veya ağır sakatlıkları sadece %15 oranında azaltabildiği gösterilmiştir<sup>7</sup>. Bütün bunların gösterdiği gibi HİE'de soğutma tedavisi yararlıdır ancak tüm hasta grupları için yeterince etkili ve kullanılabilir değildir. Bu durumda tek başına veya soğutma tedavisine ek olarak yapılacak yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Hipoksik iskemik beyin hasarı (HİBH) oluşturulan hayvanlarda kök hücre, hiperbarik oksijen, N-asetil sistein, eritropoetin, indometazin, melatonin, desferoksamin, ksenon, büyüme faktörleri verilmesi gibi çok sayıda tedavi yöntemi üzerinde çalışmalar sürdürülmektedir<sup>8</sup>. Son yıllarda yapılan çalışmalarda HİBH oluşturulan yenidoğan hayvanlara kök hücrelerin verilmesiyle beyin hasarının azaldığı ve işlevsel testlerde iyileşme olduğu bildirilmiştir<sup>9-11</sup>. Yakın zamana kadar, verilen kök hücrelerin çoğalarak ve farklılaşarak doğrudan beyin hasarını azalttıkları düşünülürken, günümüzde kök hücrelerin bu etkileri daha çok salgıladıkları çeşitli faktörler aracılığıyla sağladıkları düşünülmektedir<sup>9</sup>. HİE tedavisinde insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IBF-1), epidermal büyüme faktörü (EBF), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BKNF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEBF) ve fibroblast büyüme faktörü-2 (FBF-2) gibi çeşitli büyüme faktörlerinin kullanılması ile ilgili çalışmalar da yapılmaktadır<sup>12-15</sup>. Yapılan az sayıda çalışmada iskemik beyin hasarı

oluşturulan sıçanlara FBF-2 verilmesi ile beyinde hücre çoğalmasının arttığı, nöronlara, astrositlere ve oligodendrositlere farklılaşmanın uyarıldığı gösterilmiştir<sup>16-17</sup>.

Bilgilerimize göre HİBH oluşturulmuş sıçanlarda çok yönlü astrosit kök hücre (ÇYAKH) ile birlikte FBF-2 uygulanan bir çalışma şu ana kadar yapılmamıştır. Biz bu çalışma ile HİBH oluşturduğumuz yenidoğan sıçanlara ÇYAKH ile birlikte FBF-2 vererek beyin hasarının azalıp azalmadığını, işlevsel testlerde iyileşme olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

## GENEL BİLGİLER

### Perinatal Hipoksik İskemik Ensefalopati

#### Tanım

Kanda veya dokuda oksijenin yokluğuna anoksi, yetersizliğine ise hipoksi denir. Yetersiz kan akımı sonucunda doku veya organlara oksijen ile birlikte diğer gerekli maddelerin ulaşamaması ise iskemi olarak isimlendirilir<sup>18</sup>. Oksijenle birlikte özellikle glikozun dokulara ulaşamaması nedeniyle tek başına hipoksiye göre iskemi daha önemli sorunlara neden olur<sup>19</sup>. Doğum öncesinde, doğum sırasında veya doğum sonrasında yaşanan hipoksik iskemik olaylar sonucunda bebekte anormal nörolojik bulguların varlığı perinatal hipoksik iskemik ensefalopati (HİE) olarak tanımlanır<sup>18</sup>. Yaşanan hipoksi ve iskeminin ağırlığına ve süresine bağlı olarak HİE hafif, orta veya ağır derecede olabilir<sup>18</sup>.

#### Epidemiyoloji

HİE yenidoğan ölümlerinin ve sakatlıklarının önde gelen nedenlerinden olup hastaya aileye ve topluma ağır yükler getirmektedir<sup>20</sup>. Tüm dünyada yılda dört milyon kadar bebek yenidoğan döneminde kaybedilmektedir ve bunların dörtte birinde neden HİE'dir<sup>19</sup>. Doğum öncesi ve doğum sırasındaki izlem yöntemlerindeki gelişmelere rağmen halen gelişmiş ülkelerde HİE sıklığı 1000 canlı doğumda 2 olarak bildirilmektedir<sup>2</sup>. Gelişmekte olan ülkelerde ise çok daha sık olarak görülmektedir. HİE tanısı alan bebeklerden %10-15'i yenidoğan döneminde ölmekte, %10-15'inde serebral palsy gelişmekte ve %40 kadarında bilişsel bozukluklar, nöromotor gelişme geriliği, nöbetler, işitme bozuklukları, körlük gibi önemli sakatlıklar gelişmektedir<sup>21-23</sup>.

#### Fizyopatoloji

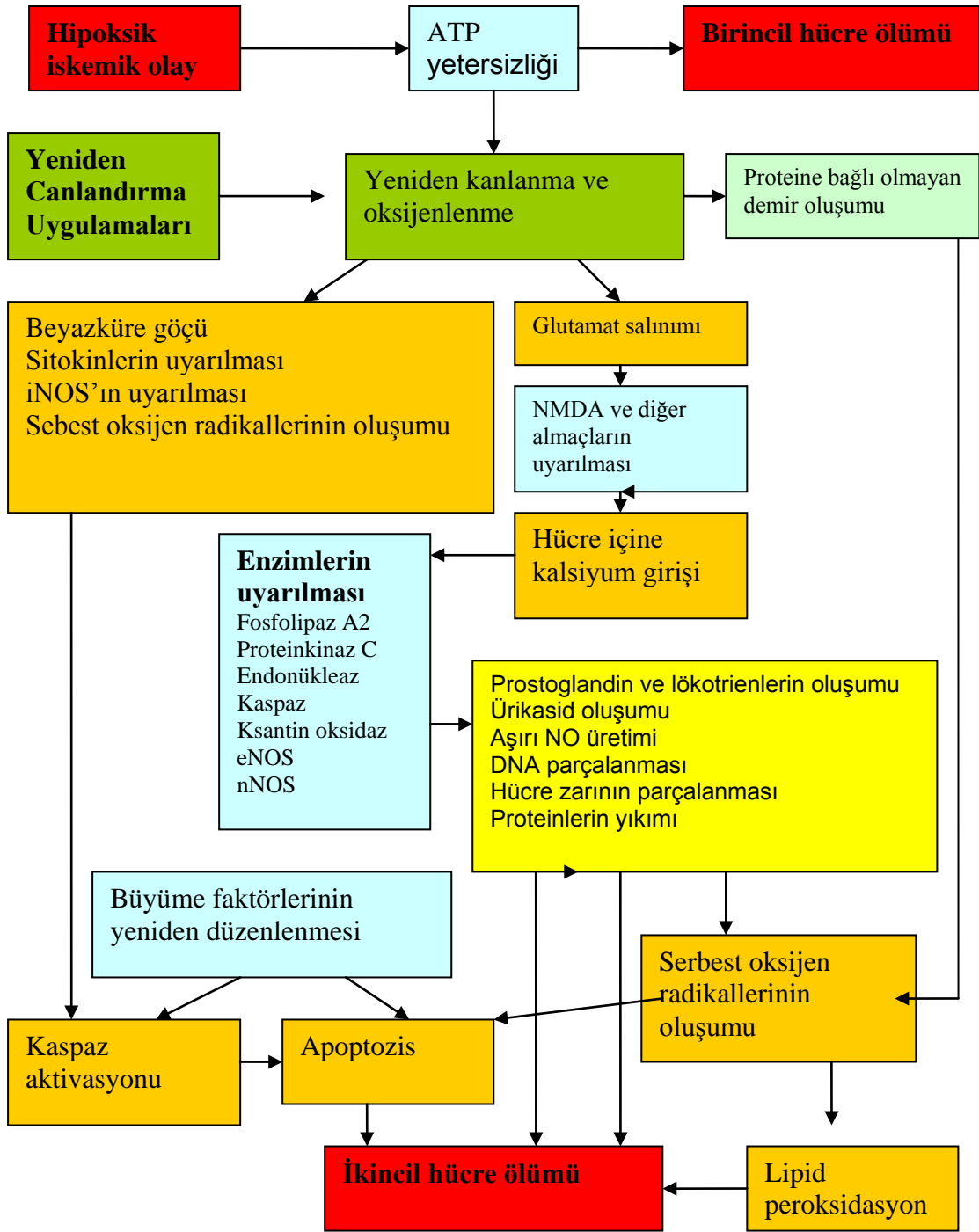
Perinatal hipoksik iskemik olayların %50'si doğum öncesinde, %40'ı doğum sırasında, %10 kadarı ise doğum sonrasında gelişmektedir<sup>19</sup>. HİE sıklıkla beş nedene bağlı olarak gelişmektedir.

- 1) Göbek kordonu ile sağlanan kan akımının kesintiye uğraması
  - a. Kordon sarkması
  - b. Kordon dolanması
  - c. Kısa kordon
- 2) Plasentadan gaz alış verişinin bozulması
  - a. Plasentanın yerinden ayrılması (ablasyo plasenta)

- b. Plasentanın doğum yoluna yerleşmesi (plasenta previa)
  - c. Plasenta gelişim bozuklukları
  - d. Plasentada yangısal değişikliklerin olması
- 3) Plasentanın anne yüzünün yetersiz kanlanması
- a. Annede hipotansiyon, şok
  - b. Hipertansiyon
  - c. Diyabet
  - d. Uzamış doğum eylemi
  - e. Anormal uterus kasılması
- 4) Annenin oksijenizasyonunun bozulması
- a. Kalp damar sistemi hastalıkları
  - b. Akciğer hastalıkları
  - c. Ağır anemi
  - d. Annenin diğer kronik hastalıkları
- 5) Yenidoğan akciğerinin yeterince havalanamaması ve fetal dolaşımdan neonatal dolaşıma geçişte başarısızlık

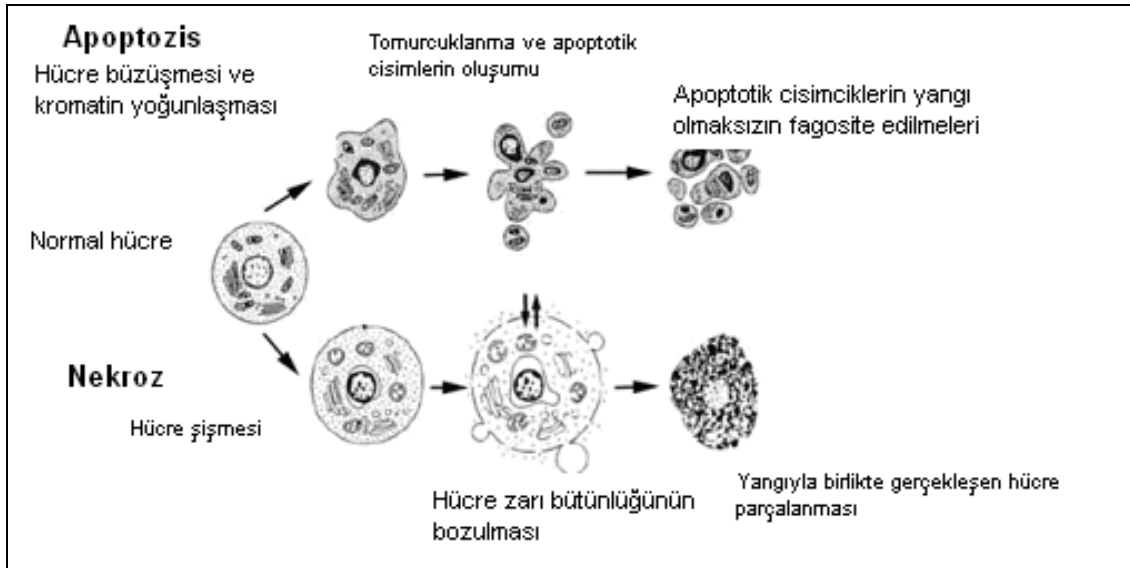
HİE'nin nedenleri farklı olsa da nöropatolojik sonuçları benzerdir. Beyin hasarının ağırlığı ve dağılımı neden olan olayın şiddeti ve süresi, gebelik yaşı ile ilişkilidir. Büyük çocuk ve erişkin beynine göre gelişimini tamamlamamış beyin hipoksik iskemik olaylara karşı daha dirençlidir<sup>18</sup>. Hipokampus, beyincik ve korteksin bazı katmanları hipoksi iskemiyeye daha hassastır. Sinir sisteminin olgunlaşma derecesi ile hipoksik iskemik olaydan etkilenme şekli değişir. Erkendoğan bebeklerde daha çok ventrikül çevresinde lökomalazi ve kanamalar görülürken, zamanında doğanlarda seçici nöronal nekroz, parasagittal beyin hasarı (parieto-okspital), bölgesel ve çoklu bölgesel beyin hasarı daha sıktır<sup>18</sup>.

Hipoksik iskemik olaylara karşı en duyarlı hücreler nöronlardır. Hipoksi ve iskemiye bağlı olarak gelişen hücresel hasarın kesin mekanizmaları tam olarak açıklanamasa da ardışık biyokimyasal olayların HİE'nin patogenezinde rol oynadığı bilinmektedir (Şekil 1). Erken dönemde hipoksi ve iskemi sonrasında adenozin trifosfat (ATP) eksikliği ve protein biyosentezinin baskılanmasına bağlı olarak hücre ölümü olmaktadır<sup>20</sup>.



**Şekil 1: Perinatal hipoksi iskemisi sonucunda beyin hücrelerini ölüme götüren fizyopatolojik olaylar (ATP: Adenozin trifosfat, iNOS: İmmün hücrelerdeki nitrik oksit sentaz, eNOS: Endotel hücrelerindeki nitrik oksit sentaz, nNOS: Nöronlardaki nitrik oksit sentaz, NMDA: N- metil D- aspartat, NO: Nitrik oksit, DNA: Deoksiribonükleik asit).**

Yeniden canlandırma sonrası döneme denk gelen yeniden kanlanma döneminde ise serbest oksijen radikalleri (SOR) salınımı, nitrik oksit (NO) üretimi, yangısal reaksiyonlar, uyarıcı ve baskılayıcı nörotransmitter dengesizliği oluşmakta ve ikinci dalga hücre ölümü meydana gelmektedir. Son yıllarda yeniden kanlanma döneminde meydana gelen hücre ölümünün patogeneizde daha önemli rol oynadığına işaret edilmekte ve tedavi seçeneklerinin bu dönemde etkili olması beklenmektedir<sup>20</sup>. Bu dönemin hipoksik iskemik olaydan iki saat sonra başladığı ve 48 saate kadar uzayabildiği düşünülmektedir. HİBH'de hücre ölümü nekroz, apoptoz veya her iki şekilde olabilmektedir<sup>24</sup>. Nekrotik hücre ölümü hücrenin şişmesi, zar bütünlüğünün bozulması, hücre içeriğinin salınması ve bunun sonucunda yangı oluşması ve fagositoz ile gerçekleşir. Apoptotik hücre ölümü ise kromatinin yoğunlaşması, hücrenin büzülmesi ile gerçekleşir ve yangı eşlik etmez<sup>25</sup> (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'de apoptozisin nekroza göre daha önemli olduğu gösterilmiştir.



**Şekil 2: Apoptozis veya nekroz ile hücre ölümü.**

Apoptozis dış etkenlerle veya genetik faktörlerle hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma ile gerçekleşen aktif bir süreçtir ve hücrenin intiharı



olarak tanımlanabilir. Vücutta fizyolojik olarak gerçekleşen apoptozis doku ve organların farklılaşmasında ve olgunlaşmasında önemli rol oynar. Örneğin el ve ayak parmak taslakları arasındaki dokunun ortadan kaldırılması, erkeklerde Müller kanalının yok edilmesi, âdet döngüsü gibi pek çok olayda apoptozis rol oynamaktadır<sup>26-27</sup>. Hücre yaşlanması, dışarıdan gelen fiziksel veya kimyasal uyarılar, hücre enerji ihtiyacının karşılanamaması, bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (bcl-2), proteinler (p53), hatta organeller dahi apoptozisi başlatabilir. Apoptozis sürecini Bcl-2 gen ailesi, kaspazlar ve apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (APAF-1) olmak üzere başlıca üç ana bileşen etkiler. Apoptoz bu faktörlerin karmaşık olan etkileşimi ile gerçekleşmektedir.

HİE fizyopatolojisinde önemli rol oynayan etkenler başlıca altı başlık halinde incelenebilir.

#### **a) Uyarıcı Aminoasitlerin Nörotoksitesisi**

Oksijen eksikliği beyinde oksidatif fosforilasyonda azalmaya sebep olur. Artan oksijensiz solunum ile yeterli ATP üretilemez. Hücre zarındaki iyon pompaları (Na, K ve Ca) enerji eksikliği nedeniyle iyon dengesini sağlayamaz. Hücre zarı uyarılır ve nöronun presinaptik bölgesinden başta glutamat olmak üzere uyarıcı aminoasitler salınır<sup>28</sup>. Glutamatın nörotoksik etkileri yapay ortamda ve canlıda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Glutamat nöron zarında bulunan NMDA (N-metil D- aspartat), AMPA (alfa amino 3-OH 5 metil 4- isoksazol propanat) ve kainate almaçlarını uyarır<sup>29</sup>. AMPA ve kainate almaçlarının uyarılması ile hücre depolarize olur. Hücre içine sodyum, klor ve su girerek osmotik hücre parçalanması gerçekleşir. NMDA almaçlarının uyarılması ise hücre içine kalsiyum girişini artırır. Kalsiyum bağımlı enzimlerin (proteaz, lipaz, endonükleaz, fosfolipaz, proteinkinaz, nitrik oksit sentaz) tetiklenmesiyle hücre hasarı ve apoptozis oluşur<sup>30</sup>.

#### **b) Enerji Eksikliği**

Nöronların enerji ihtiyacı birincil olarak ATP yoluyla sağlanır. ATP üretimi temel olarak mitokondriler içinde ve oksidatif fosforilasyonla oluşur. Nöronlar glikojen depolayamazlar ve sürekli glikoza gereksinimleri vardır. Hipoksik iskemik olayda oksijen eksikliği yanında glikoz eksikliği de yetersiz ATP yapımına neden olur. 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 apoptozis olur<sup>20</sup>. Anaerobik glikolizin artmasıyla laktat birikir ve pH'nın düşmesi nöronal hasarı daha da artırır<sup>19</sup>.

### **c) Serbest Radikal Hasarı**

Serbest oksijen radikalleri doku ve organlarda sürekli salınan ve bir yandan da çeşitli yollarla temizlenen ürünlerdir. Beyin çoklu doymamış fosfolipidler açısından zengin olduğundan serbest radikallere karşı oldukça duyarlıdır. Yeniden kanlanma döneminde oluşan serbest oksijen radikalleri (hidroksil radikali, süperoksit radikali, hidrojen peroksit, hipoklorit iyonu, nitrik oksit, peroksinitrit) hücre zarındaki lipidleri, hücre iskeletindeki proteinleri, nükleik asitleri okside ederek hücre hasarına ve apoptozise neden olurlar<sup>30</sup>. Yenidoğan beyninde zaten yetersiz olan antioksidanlar nedeniyle hasar daha da ağır olur<sup>28</sup>.

### **ç) Nitrik Oksit**

Nitrik oksit normalde merkezi sinir sisteminde fizyolojik mesaj ileten zayıf bir serbest radikaldir. Nöronal olgunlaşmadan ve doğum sonrası kortikal plastisiteden sorumludur. Nitrik oksit sentaz (NOS) ile arjinin sitrülline dönüşürken oluşur. Hipoksik iskemik olaylar sonrasında özellikle yeniden kanlanma döneminde NOS ileri derecede aktive olur ve aşırı miktarda NO oluşumuna neden olur. Farklı NOS çeşitleri vardır. Nöronlarda NOS-I (nNOS), immün hücrelerde NOS-II (iNOS), damar endotel hücrelerinde NOS-III (eNOS) bulunur. Beyinde nNOS uyarılması ile oluşan fazla NO uyarıcı aminoasitlerin serbestleşmesine, glutamat almaçlarının kolay uyarılabilir olmasına, peroksinitrit oluşumuna, hücre içi serbest kalsiyumun artışına ve mitokondriyal hasar ile hücre ölümüne neden olur<sup>31</sup>.

### **d) Yangısal Mediyatörler**

Özellikle yeniden kanlanma döneminde yoğun sitokin (TNF, IL-1, IL-6, PAF vb.) salınımı olur. Böylece damar geçirgenliği artar, bölgesel kan akımı bozulur, beyaz kürelerin damar duvarına yapışması kolaylaşır, serbest oksijen radikallerinin salınımı artar, büyüme faktörlerinin salınımı ile yeni damar yapımı artar<sup>32</sup>.

### **e) Genlerin ve Transkripsiyon Faktörlerinin Aktivasyonu**

Hipoksik iskemik olay özel transkripsiyon faktörlerinin aracılığıyla fibroblast büyüme faktörleri, endotelyal büyüme faktörü, eritropoetin, vasküler endotelyal büyüme faktörü gibi gen gruplarını yeniden düzenlenmesine neden olur. Sonuçta hipoksi ve iskemi ile başlayan biyokimyasal olaylar nekroz ve apoptozis ile nöron ölümüne neden olur<sup>33</sup>.

## **Hipoksik İskemik Ensefalopatide Nöropatolojik Bulgular**

HİBH olayın şiddetine, süresine, etkilediği alanın genişliğine, gebelik yaşına, bölgesel damarsal faktörlere ve NMDA almaçlarının dağılımına göre farklılık gösterir.

**Ödem:** Beyin dokusunda 24- 48 saat içinde ödem gelişebilir. Ödemden başlıca iki mekanizmayla sorumludur. İlki hücre zarında meydana gelen işlevsel bozulma ile sodyum ve suyun hücre içine girmesi ve sitotoksik ödem gelişmesidir. İkinci mekanizma ise kan beyin engelinin geçirgenliğinin artması ve kapiller sızma ile hücreler arası sıvı birikimi olmasıdır<sup>34</sup>.

**Seçici Nöronal Nekroz:** Bu durum daha çok zamanında doğan bebeklerde görülür. Ağırlıklı olarak serebral ve serebellar korteks, hipokampus, talamus, bazal ganglionlar, beyin sapı ve spinal kordun ön boynuz hücreleri etkilenir. Olayın başlangıcından 24- 36 saat içinde değişiklikler başlar. Seçici nöronal nekroza bağlı olarak geç dönemde serebral atrofi ve multikistik ensefalomalazi gelişir<sup>34</sup>.

**Bazal Ganglion ve Beyin Sapı Hasarı:** Yapılan deneysel çalışmalarda bu tip zedelenmenin süregen kısmi hipoksi-iskemiden çok, ıvegen tam hipoksi-iskemi sonrasında geliştiği gösterilmiştir. En az görülen nöropatolojik lezyon olup genellikle zamanında doğan bebeklerde gözlenir. Nöronal nekroz, gliosis ve hipermyelinizasyon bazal ganglion, talamus ve serebral kortekste mermer görünümüne neden olur. Otopside bazal ganglionlarda saptanan bu mermerimsi görünüm status marmoratus olarak isimlendirilir<sup>35</sup>.

**Parasagittal Serebral Nekroz:** Serebral korteks ve subkortikal beyaz madde nekrozunu ifade eder. Hipoksik iskemik zedelenme ön, orta ve arka serebral arterler arasındaki vasküler yataktan parasagittal yayılım gösterir ve sıklıkla simetrik yapıdadır. Serebrovasküler otopregülasyonun bozulması bu alanlarda belirgin iskemi ile sonuçlanır. Yenidoğan döneminde bu zedelenme hipotoni ve kuvvetsizlik bulgularıyla kendini gösterir ve bu bulgular üst ekstremitede alt ekstremiteye göre daha belirgindir. Uzun dönemde ise spastik kuadriparezi, konuşma bozukluğu ve göz hareketlerinde bozukluk ile sonuçlanır<sup>35</sup>.

**Bölgesel ve Çoklu Bölgesel İskemik Beyin Nekrozu:** Beyin parankiminde infarktlara bağlı oyuklar oluşur. Tek bir oyuk varsa bu poreensefalik kist, çok sayıda oyuk varsa multikistik ensefalomalazi olarak isimlendirilir. En sık etkilenen bölge orta serebral arterin suladığı alandır. Genellikle tek taraflıdır. Hipoksik iskemik ensefalopatili yenidoğanların %15-20'sinde görüldüğü bildirilmektedir.

Erkendoğanlarda sıklıkla bu durum çoklu bölgesel yapıdadır. Yenidoğan döneminde, üst ekstremitede güçsüzlük, asimetrik moro refleksi, hemiparezi, fokal konvülziyonlar, uzun dönemde ise spastik hemiparezi, kuadriparezi, bilişsel bozukluklar ve nöbetler görülür<sup>2</sup>.

**Periventriküler Lökomalazi:** Erkendoğan bebeklerde hipoksi ve iskemiye bağlı en sık görülen lezyondur. Erkendoğanlarda ventrikül çevresindeki beyaz madde damarlar açısından oldukça zengindir ve iskemiye ve kanamaya karşı oldukça hassastır<sup>35</sup>. Hafif olgularda küçük gliosis alanları, ventriküllerde genişleme ve miyelin azalması görülür. Daha 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.

### **Hipoksik İskemik Ensefalopatide Klinik Belirti ve Bulgular**

HİE'de klinik belirti ve bulgular yaşanan hipoksi ve iskeminin şiddetine, süresine, bebeğin gebelik yaşına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Genellikle hipoksik iskemik ensefalopati süreci doğum sonrasında 12 saatlik dilimler halinde incelenir<sup>35-36</sup>.

**İlk 12 Saatlik Dönem:** Ağır olgularda ilk 12 saatte stupor, koma, düzensiz solunum, solunum yetmezliği, hipotoni, yenidoğan reflekslerinde baskılanma, kendiliğinden hareketlerde azalma vardır. Ağır olguların %50-60'ında ilk 6-12 saat içinde konvülziyon görülür. Pupillanın ışığa yanıtı başlangıçta tamdır. Hafif olgularda pupilla genellikle geniş ve uyarılabilirken, ağır olgularda dar veya ışığa duyarlı değildir<sup>18</sup>.

**12- 24 Saatlik Dönem:** Bu dönemde ağır olgularda koma devam ederken hafif vakalarda bilinç durumunda bir miktar iyileşme görülür. Uyanıklığın artması ile beraber konvülziyonlar, apne, huzursuzluk, titreme benzeri klinik belirtiler artabilir<sup>35</sup>.

**24- 72 Saatlik Dönem:** Ağır olgularda 24- 72 saat içinde beyin ve beyin sapı işlevleri bozular, bilinç giderek kötüleşir, pupil ışık tepkisi ve okülosefalik tepki alınamaz, koma gelişir, solunum durması olur ve bu dönemde bebeklerin çoğu kaybedilir<sup>19</sup>.

**72. Saatten Sonraki Dönem:** 72 saatten sonra hayatta kalan olgularda günler, haftalar içerisinde bir miktar düzelme olur. Bilinç düzeyinde kısmen iyileşme olmakla birlikte hafif bir stupor hali devam eder, emme, yutma ve dil hareketlerinde sorunlar ortaya çıkar. Genellikle beslenmede sorunlar yaşanır. Bazal ganglion

tutulumu olan hastalarda tonus artışı belirgin olmakla birlikte çoğu hastada ekstremitelerde yaygın tonus azalması olur<sup>34</sup>.

Perinatal hipoksik iskemik olaylar çoğunlukla beyin dışındaki organları da etkiler. Akciğerlerde surfaktan yapımının baskılanmasına bağlı olarak respiratuvar distres sendromu gelişebilir. Doğum öncesi başlayan hipoksi mekonyum aspirasyonu sendromu ile sonuçlanabilir. Akciğerde ödem, kanama, pulmoner hipertansiyon ve devamlı fetal dolaşım gelişebilir<sup>37</sup>. Kalpte miyokard iskemisine bağlı olarak konjestif kalp yetmezliği, hipotansiyon, ritim bozukluğu, mitral ve triküspit kapak yetmezliği görülebilir. Perinatal hipoksi-iskemi takiben böbrek kanlanması azalır, akut tubuler nekroz, kortikal veya meduller hasar sonucunda böbrek yetmezliği gelişebilir. Olguların çoğunda oligüri gelişir, üre ve kreatinin değerlerinde yükselme görülür<sup>6</sup>. Hematüri ve renal ven trombozu gelişebilir. Barsaklarda yaşanan hipoksi ve iskemi sonucunda nekrotizan enterekolit görülebilir. Sıklıkla karaciğer enzimlerinde yükselme ve pıhtılaşma testlerinde bozulma olur. Ağır olgularda adrenal yetmezlik, adrenal bezlerde kanama, uygunsuz antidiüretik hormon (ADH) salınımı görülebilir. Ayrıca trombositopeni, deri altı yağ dokusu nekrozu ve hipoglisemi, hipokalsemi, hiponatremi gibi metabolik sorunlarla sık karşılaşılır<sup>37</sup>.

Modifiye Sarnat sınıflaması günümüzde hipoksik iskemik ensefalopatinin evrelemesinde en sık kullanılan sınıflamadır. Bu sınıflamaya göre olgular hafif, orta ve ağır olarak sınıflandırılmaktadır<sup>18</sup> (Tablo 1).

**Tablo 1: Hipoksik İskemik Ensefalopatide Modifiye Sarnat Sınıflaması<sup>18</sup>.**

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

### **Hipoksik İskemik Ensefalopati Tanısı**

Perinatal HİE'nin tanısında öykü ve fizik muayene oldukça önemlidir. Öyküde doğum öncesi dönem, doğum süreci ve doğum sonrası dönemle ilgili ayrıntılı bilgiler alınmalıdır. Bebeğin fiziksel incelemesinin özellikle de nörolojik muayenesinin dikkatli bir şekilde yapılması HİE tanısının konmasına, ağırlığının belirlenmesine ve erken dönemde tedavinin başlanmasına yardımcı olacaktır. Amerikan Obstetrik ve Jinekoloji Derneği 2004 yılında aşağıda yer alan tanı ölçütlerinin kullanılmasını önermiştir<sup>37-38</sup>.

Tanı için bulunması zorunlu tutulan ölçütler:

1. Göbek kordonundan alınan arteriyel kan gazında metabolik asidozun varlığı (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 varlığı,

3. Enfeksiyon, travma, kanama bozuklukları, genetik bozukluklar gibi ensefalopatiye neden olabilecek diğer nedenlerin dışlanması.

Hipoksik iskemik ensefalopatiye özgün olmayan ek ölçütler:

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

HİE tanısının konması kadar ağırlığının belirlenmesi de önemlidir. Hafif HİE çoğu zaman tedavi gerektirmeden kısa zamanda düzelmekte ve önemli sakatlıklara neden olmamaktadır. Ağır HİE ciddi seyretmekte ve var olan tedavi yöntemlerine rağmen ağır sakatlıklara neden olmaktadır. Orta derecede HİE'li bebeklerin ise bir kısmı tedaviden yarar görürken ve önemli sakatlıklar gelişmezken, diğer kısmında önemli sakatlıklar gelişmektedir<sup>39</sup>. Orta derecede HİE'nin bu kadar farklı şekilde sonuçlanabilmesi evreleme için yaygın olarak kullanılan Sarnat ve Sarnat sınıflamasının yetersiz olduğunu düşündürmektedir. Erken dönemde tanının konması ve hangi hastaların tedaviden yarar göreceklarının belirlenmesi oldukça önemlidir. Öykü ve fiziksel inceleme her zaman HİE tanısının konması ve tedaviden fayda görece hasta grubunun belirlenmesi için yeterli olmamaktadır, bu nedenle elektrofizyolojik, biyokimyasal ve radyolojik yöntemlerden de yararlanılmaya çalışılmaktadır.

### **Biyokimyasal İncelemeler**

HİBH'nin varlığını, şiddetini, başlama zamanını, prognozunu gösterebilen ve klinik kullanımda olan bir biyokimyasal test şu an için bulunmamaktadır<sup>39</sup>. Günümüzde bu amaçla kan, idrar veya beyin omurilik sıvısında bakılabilecek biyokimyasal belirteçlerle ilgili araştırmalar devam etmektedir. Bunlar arasında idrarda protein S-100B, laktat, kreatinin; serumda IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-9, IL-12, IL-13, TNF- $\alpha$ , nöron spesifik enolaz (NSE), laktat, beyine özgü kreatin kinaz (CK-BB), proteine bağlı olmayan demir, glial fibriler asidik protein (GFAP), iyonize kalsiyum; beyin omurilik sıvısında (BOS) GFAP, NSE, miyelin bazik protein (MBP),

protein S-100B, IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , bulunmaktadır. Yakın zamanda hipoksik iskemik ensefalopatili bebeklerde araştırılan biyokimyasal belirteçlerin incelendiği bir toplu bir çözümlene yayınlanmıştır<sup>39</sup>. Bu toplu çözümleneye ileriye dönük araştırmalar ve en az 12 aylık takip sonucunda bebeklerin değerlendirildiği çalışmalar dâhil edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde IL-6'nın hem kordon kanında, hem de serumda bakılmasının prognoz açısından pozitif tahmin değerinin yüksek olduğu bildirilmiştir. Özellikle kordon kanında bakılabilmesi erken tanı için önemli bir avantaj gibi görünmektedir. Bunun dışında serumda IL-1beta, beyin omurilik sıvısında IL-1beta ve NSE klinik kullanım için uygun gibi görünmektedir. Ayrıca idrar protein S-100B'nin de prognozu gösterme açısından ümit verici olduğu bildirilmiştir<sup>39</sup>.

### **Elektrofizyolojik İncelemeler**

#### **a) Elektroensefalogram**

Elektroensefalogram (EEG) hipoksik iskemik ensefalopatinin tanısı, evrelemesi ve prognozunun ön görülebilmesi için oldukça önemlidir. Ayrıca klinik olarak tanınması güç olabilen gizli konvülsiyonların tanı ve tedavisinde de oldukça önemlidir. Hafif HİE'de genellikle EEG normaldir. Orta HİE de düşük voltaj veya nöbet aktivitesi sık gözlenir. Ağır HİE de ise nöbet aktivitesi veya sürekli izoelektrik hatta çizecek kadar baskılanma görülebilir<sup>18</sup>.

#### **b) Amplitüd-Entegre Elektroensefalogram**

Son yıllarda uygulanmaya başlanan amplitüd-entegre elektroensefalogram (aEEG) ile geleneksel EEG'den farklı olarak daha az sayıda elektrot kullanılarak ve daha kolay bir şekilde hasta başında sürekli olarak beynin elektriksel aktivitesi izlenebilmektedir<sup>40</sup>. Yakın zamanda yayınlanan bir toplu çözümlenmede HİE'li bebeklerde yapılan aEEG'nin %91 duyarlılık ve %88 özgünlükle uzun dönemli sonuçları öngörebildiği bildirilmiştir (4). Bu toplu analizin işaret ettiği gibi erken dönemde aEEG hangi hastalara nöron koruyucu tedavi yöntemlerinin uygulanması gerektiğini göstermesi açısından oldukça önemli bir yöntemdir.

Bazı merkezler soğutma uygulanacak HİE'li bebekleri belirlerken aEEG'yi bir ölçüt olarak alırlarken diğerleri almamaktadır<sup>3-4</sup>. aEEG'yi soğutma için bir ölçüt olarak alan merkezler orta veya ağır derecede aEEG bozukluğu varlığında soğutma tedavisini uygulamaktadırlar<sup>3</sup>. Yapılan çalışmalarda orta derecede aEEG bozukluğu olan olguların soğutma tedavisinden daha fazla yarar gördükleri gösterilmiştir<sup>3</sup>. Ağır



derecede aEEG bozukluğu olan olguların ise prognozlarının daha kötü olduğu ve soğutma tedavisinden belirgin fayda görmedikleri bildirilmiştir<sup>3</sup>.

### **c) Uyarılmış Elektriksel Potansiyeller (işitsel, görsel ve somatosensöryel)**

Beyin sapının işitsel ve görsel uyarılmış potansiyelleri HİE'li bebeklerin izleminde ve prognozlarının belirlenmesinde kullanılabilir. Somato-sensöryel uyarılmış potansiyeller (SEP) de prognoz hakkında önemli ipuçları sağlayabilir. HİE geliştikten sonraki 24 saat içinde median sinir kullanılarak yapılan SEP'in normal bulunması hastanın prognozunun iyi olacağını göstermektedir<sup>34</sup>.

### **Görüntüleme Yöntemleri**

#### **a) Kranial Ultrasonografi**

Hasta başında uygulanabilmesi, zararsız ve güvenilir olması nedeniyle HİE'li hastalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bazal ganglion ve talamus hasarları, ventrikül içi, ventrikül çevresi kanamalar, ventrikül çevresinde oluşan lökomalaziler, bölgesel veya çoklu bölgesel iskemik hasarlar fontanelden yapılan ultrasonografi ile tanınabilir. Perinatal HİE'li bebekte erken dönemde beyin ekodansitesinin artması, temel anatomik yapıların ayırt edilememesi, sulkusların silinmesi ve ventriküllerin basıya uğramış olması beyin ödemi düşündürür. Zamanında doğan bebeklerde ilk 24 saatte yarık şeklinde ventrikül görülmesi beklenen bir bulgu olup, bunun 36 saatten sonra devam etmesi normal olmayan bir durumdur. HİE'li bebeklerde önceleri çevresel kortikal hasarı değerlendirmek ultrasonografi ile mümkün değilken son zamanlarda daha yüksek derecede çözünürlüğü olan propların kullanımı ile kortikal ekodansitedeki artış kolaylıkla gösterilebilmektedir<sup>34</sup>.

#### **b) Renkli Dopler Sonografi**

Bu yöntem ile beyin arter kan akım hızı ve beyin kan hacmi ölçülerek tanı ve prognoz hakkında fikir edinilebilmektedir. Ön serebral arterden yapılan ölçümlerde diyastol sonu kan akım hızının sistolik kan akım hızına oranının 0,55'den küçük olmasının HİE'li bebeklerde prognozun kötü olacağını gösterdiği bildirilmiştir<sup>34</sup>.

#### **c) Bilgisayarlı Tomografi**

Hipoksi-iskemi sonrasında beyinde ortaya çıkan dansite azalması ve zamanında doğan bebeklerde daha sık olarak rastlanan parasagittal infarktlerin gösterilmesinde bilgisayarlı tomografi (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<sup>34</sup>.

### **ç) Manyetik Rezonans Görüntüleme**

Günümüzde perinatal HİE'li bebeklerde beyin hasarının derecesini ve özelliklerini en iyi gösteren görüntüleme yöntemi manyetik rezonans görüntüleme (MRG) dir<sup>41</sup>. Detaylı yapısal bilgi sağlaması HİE'ye yaklaşımda ve prognoz tahmininde önemli gelişmeler sağlamıştır. Ayrıca MRG yönteminin iyonize radyasyon içermemesi de tercih sebebi olmuştur. MRG ile miyelinizasyonda gecikme, korpus kallosumda incelmeye ile birlikte kortikal atrofi, bazal ganglionlarda uzun süre devam eden sinyal değişiklikleri ve beyaz cevher patolojilerini göstermek daha kolaydır ve bunlar kötü prognozu gösterirler. HİE'nin erken dönemlerinde oluşan beyin ödeminin bir hafta içinde düzeldiği ve yerini korteks, beyaz cevher, bazal ganglionlar ve kapsüle internanın arka bacağında saptanan anormal sinyallere bıraktığı seri MRG tetkikleri ile gösterilmiştir. Bu değişikliklerin ağır HİE ve kötü prognoz ile birlikte olduğu saptanmıştır. Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada soğutma tedavisi uygulanan ve uygulanmayan hastaların beyin MRG bulguları karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada soğutma tedavisi ile gri ve beyaz cevher anormalliklerinin azaldığı ve soğutma uygulanan grupta daha fazla sayıda normal MRG'nin bulunduğu bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonunda deneysel nöron koruyucu tedavilerin etkinliklerinin belirlenmesinde MRG'den yararlanılabileceği öne sürülmüştür<sup>41</sup>.

### **d) Difüzyon Ağırlıklı Manyetik Rezonans Görüntüleme**

Difüzyon ağırlıklı manyetik rezonans görüntüleme yöntemiyle dokudaki suyun moleküler hareketlerinden kaynaklanan görüntüler elde edilir. Duyarlılığı standart MRG'ye göre daha yüksektir. En önemli özelliği doğumdan sonra erken dönemde beyaz cevher hasarını, ventrikül çevresinde oluşan lökomalazi ve diğer hasarları gösterebilmesidir. Hasarın erken dönemde gösterilmesi tedavi gerektiren hasta grubunun erken dönemde belirlenmesini sağlayabilir. Ancak teknik nedenlerden dolayı erken dönemde kullanılması zordur<sup>34</sup>.

### **e) Manyetik Rezonans Spektroskopi**

Hücresel düzeyde metabolik değişiklikleri gösterebilen bir görüntüleme yöntemidir. Bu yöntemle hipoksi-iskeminin erken ve geç bulgularını detaylı bir şekilde değerlendirmek ve bunları prognoz ile ilişkilendirmek mümkündür. Manyetik rezonans spektroskopi ile <sup>31</sup>P kullanılarak fosfokreatinin (PCr) ve inorganik fosfat (Pi) ölçümü yapılabilmektedir. PCr/Pi oranı beyindeki fosforile enerji durumunu gösterir, HİE'li bebeklerde bu oranın düşük olması kötü prognoza işaret eder<sup>34</sup>.

### **f) Proton Manyetik Rezonans Spektroskopisi**

HİE'li bebeklerin beyinlerinde laktat oranında artış ve N-asetil-aspartat (Naa) düzeyinde düşüş olduğu bu yöntemle saptanmıştır. Naa/kreatinin veya Naa/kolin oranındaki düşüklüğün kötü prognozu yansıttığı gösterilmiştir<sup>34</sup>.

### **g) Near- infrared Spektroskopisi**

Hasta başında kullanılabilen, invazif olmayan bir tanı yöntemi olup, bu yöntemle beyininoksi ve deoksi hemoglobin düzeyinin belirlenmesi mümkün olmaktadır<sup>42</sup>. HİE'li bebeklerde prognoz tahmininde kullanılmasına yönelik araştırmalar devam etmektedir<sup>42-46</sup>.

### **Hipoksik İskemik Ensefalopatide Tedavi**

Gebe ve yenidoğan izleminde önemli gelişmeler kaydedilmesine rağmen HİE tüm dünyada yenidoğan ölümlerinin ve sakatlıklarının önde gelen nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir ve istenen derecede etkili bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır<sup>47-50</sup>. Var olan tedavi yöntemlerinden özellikle soğutma tedavisinin etkinliği kanıtlanmış olmasına rağmen tüm hasta grupları için yeterince etkili gibi görünmemektedir<sup>9</sup>. Bu nedenle yeni tedavi yöntemleri ile ilgili araştırmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir.

### **Destek Tedavisi**

Tüm perinatal hipoksik iskemik ensefalopatili bebeklerin %90 kadarı doğum öncesi dönemde ve doğum sırasında, %10 kadarı ise doğum sonrası dönemde hipoksik iskemik olayla karşı karşıya kalırlar<sup>19</sup>. Bu nedenle yenidoğanın yeniden canlandırılması konusunda deneyimli en az bir, mümkünse iki kişinin doğum odasında bulunması ve gerektiğinde etkin bir şekilde solunum ve dolaşım desteği sağlamaları oldukça önemlidir. Doğumu takiben etkin bir şekilde uygulanan solunum ve dolaşım desteği bebeğin hipoksik-iskemik olaya maruz kalmasını önleyebilir veya başlamış olan hipoksik-iskemik olayın süresini ve şiddetini azaltabilir. Hipoksi beyin hasarına neden olurken, hiperoksi de istenmeyen sonuçlara neden olabilmektedir. Yaşamın ilk saatlerinde ciddi hiperoksiye maruz kalınması beyinde oksidatif hasara ve uzun dönemde kötü nörolojik sonuçlara neden olmaktadır<sup>51</sup>. Bu nedenle günümüzde zamanında doğan bebeklerin yeniden canlandırılmasında başlangıçta oda havası ile solunum desteği %100 oksijene göre tercih edilmektedir<sup>52</sup>.

HİE'li bebeklerde yeniden canlandırma uygulamalarının ardından gerekiyorsa solunum desteğine etkin şekilde devam edilmelidir. Karbondioksit normal sınırlar

içerisinde tutulmalıdır. Karbondioksit düşüklüğü vazokonstriksiyona neden olarak var olan hipoksik iskemik hasarın artmasına neden olabilir. Karbondioksitin fazlalığı ise vazodilatasyona ve beyin kanamasına neden olabilir. Hipotansiyon açısından bebek yakından takip edilmeli gerekiyorsa sıvı ve inotrop desteği verilmelidir. Sıvı desteği uygulanırken uygunsuz ADH salınımı ve beyin ödemi açısından dikkatli olunmalıdır. Hipoglisemi, hipokalsemi, hiponatremi, hipomagnezemi, metabolik asidoz, böbrek yetmezliği ve konvülsiyonlar açısından bebek yakından izlenmeli ve uygun şekilde tedavi edilmelidir<sup>53</sup>.

### **Konvülsiyonların Tedavisi**

Orta ve ağır derecede HİE'li bebeklerde ilk saatlerden itibaren sıklıkla konvülsiyonlar görülür<sup>47</sup>. Yapılan hayvan ve insan çalışmalarında konvülsiyonların sadece bir bulgu olmadığı, var olan HİBH'yi arttırdığı gösterilmiştir<sup>54-56</sup>. Ayrıca hipoksik iskemik ensefalpatili bebeklerde görülen konvülsiyonların şiddeti ile beyin hasarı arasında bağımsız bir ilişkinin olduğu da gösterilmiştir<sup>56</sup>. Bu nedenle HİE'li bebeklerde konvülsiyonların etkili bir şekilde tedavi edilmesi beyin hasarının artmasını engelleyebilir<sup>8</sup>. Fenobarbital HİE'li yenidoğanlarda en sık tercih elden antikonvülzandır<sup>36</sup>. Önkoruyucu olarak fenobarbitalin kullanılıp kullanılmaması halen tartışma konusudur ve daha fazla çalışmaya ve uzun dönemli sonuçlara ihtiyaç vardır<sup>36,47,57-60</sup>. Son yıllarda yapılan hayvan çalışmalarında topiramatin ve levetirasetamin HİBH'de nöron koruyucu etkilerinin olduğu bildirilmiştir<sup>61</sup>.

Topiramat erişkinlerde ve çocuklarda epilepsi tedavisinde sık kullanılan bir glutamat karşıtı ilaçtır<sup>62-63</sup>. Yapılmış olan hayvan çalışmalarında tek başına veya soğutma tedavisi ile birlikte topiramat verilmesi ile iskemik beyin hasarının azaldığı gösterilmiştir<sup>64-67</sup>. Topiramatin AMPA, kainat almaçlarını baskılayarak, voltaj bağımlı sodyum ve kalsiyum kanallarını kapatarak ve aşırı glutamat salınımını engelleyerek nöron koruyucu etkiler gösterdiği düşünülmektedir. Yakın zamanda yayınlanan bir insan çalışmasında HİE'li bebeklere soğutma tedavisi ile birlikte topiramat verilmiş ve kısa dönemli sonuçlar incelenmiştir<sup>61</sup>. Çalışmanın sonucunda soğutma tedavisi ile birlikte topiramat verilmesinin güvenli olduğu bildirilmiştir ancak etkinliğin değerlendirilmesi için uzun dönemli sonuçların beklenmesi gerekecektir.

Levetiracetam yakın zamanda epilepsi tedavisinde kullanılmaya başlanan bir ilaçtır<sup>60</sup>. Konvülsiyonları kontrol altına alması yanında nöron koruyucu etkisinin de olduğu bildirilmektedir<sup>68</sup>. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada orta beyin arterinin bağlanmasıyla oluşturulan beyin hasarı levetiracetam verilmesi ile azalmıştır<sup>69</sup>.

Yakın zamanda yayınlanan bir başka çalışmada yenidoğan konvülsiyonlarının tedavisinde kullanılmış ve önemli bir yan etki olmadan konvülsiyonları kontrol altına almıştır<sup>70</sup>. Levetiracetam tedavi dozunun birkaç kat üstünde dahi nöron ölümüne neden olmamaktadır ve bu konvülsiyon tedavisinde geleneksel olarak kullanılan fenobarbital, fenitoin, valproat gibi ilaçlara göre önemli bir üstünlüktür<sup>71</sup>. Levetiracetamın perinatal hipoksik iskemik ensefalopati tedavisinde kullanılması için daha fazla araştırma gerekli gibi görünmektedir.

### **Soğutma Tedavisi**

Son yıllarda uygulanmaya başlanan soğutma tedavisi ile ölüm oranlarının azaldığı ve olumlu nörogelişimsel sonuçların elde edildiği bildirilmektedir. Soğutmanın bu etkiyi beyin metabolizma hızını, uyarıcı aminoasit salınımını, apoptozisi, NO üretimini, lipid peroksidasyonunu azaltarak ve serbest radikal hasarını sınırlandırılarak yaptığı düşünülmektedir<sup>72</sup>.

Soğutma tedavisi tüm vücut soğutma veya seçici baş soğutma tedavisi şeklinde uygulanabilmektedir<sup>73-74</sup>. Tüm vücut soğutma yönteminde bütün vücut soğutularak rektal sıcaklığın 33- 34°C arasında tutulması hedeflenmektedir. Baş soğutma tedavisinde ise özellikle başa soğutma uygulanmakta ve böylece beyine daha etkili soğutma uygulanabileceği varsayılmakta ve rektal sıcaklığın biraz daha yüksekte (34- 35°C) tutularak soğutmanın sistemik yan etkilerinden kaçınılması hedeflenmektedir<sup>73-74</sup>. Her iki yöntemde de mümkün olan en erken zamanda soğutmaya başlanmakta ve 72 saat boyunca soğutmaya devam edilmektedir. Bazı merkezler tüm vücut soğutma yöntemini tercih ederken bazıları da seçici baş soğutma yöntemini tercih etmektedirler ancak henüz hangi yöntemin daha üstün olduğuna dair yeterli kanıt bulunmamaktadır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada kısa dönem sonuçları açısından her iki yöntem arasında fark bulunamamıştır<sup>73</sup>. Şu ana kadar HİE'de soğutma tedavisi uygulanan dört büyük randomize kontrollü çalışma yayınlanmıştır.

Gluckman ve arkadaşlarının yaptıkları çok merkezli randomize kontrollü çalışmada hipoksik iskemik ensefalopatili 234 bebekten 112'sine seçici baş soğutma tedavisi uygulanırken, 118'sine yalnızca destek tedavisi uygulanmıştır<sup>3</sup>. Çalışmaya alınma ölçütleri arasına aEEG de alınmıştır. Soğutmaya bağlı gelişebilecek yan etkiler incelendiğinde baş soğutma uygulanan bebeklerin bir kısmında kafa derisinde şişlik gelişmiş ancak soğutmanın bitirilmesinin ardından kısa sürede düzelmiştir. Kafa derisinde şişlik dışında seçici baş soğutma tedavisine

bağlı ciddi bir yan etki olmamıştır. Bebekler 18 aylık olduklarında değerlendirilmişlerdir. Olgular orta derecede aEEG bozukluğu olanlar ve ağır derecede aEEG bozukluğu olanlar olarak iki gruba ayrılarak incelenmiştir. Orta derecede aEEG bozukluğu olanların seçici baş soğutma tedavisinden fayda gördükleri saptanmış ve bu grupta ağır derecede nörolojik sakatlıkların görülme oranı azalmıştır. Ağır derecede aEEG bozukluğu olanların ise seçici baş soğutma tedavisinden belirgin bir yarar görmedikleri sonucuna varılmıştır<sup>3</sup>.

Shankaran ve arkadaşlarının yaptıkları randomize kontrollü çalışmada hipoksik iskemik ensefalopatili 208 bebekten 102'sine tüm vücut soğutma tedavisi uygulanırken, 106'sına yalnızca destek tedavisi uygulanmıştır. Çalışmaya alınma ölçütleri arasında aEEG alınmamıştır. Soğutmaya bağlı gelişebilecek istenmeyen yan etkiler açısından her iki grup arasında fark bulunmamıştır. Bebekler 18 aylık olduklarında soğutma uygulanan grupta ölüm veya orta- ağır derecede nörolojik sakatlık görülme oranı anlamlı derecede azalmıştır<sup>4</sup>.

Azzopardi ve arkadaşlarının yaptıkları çok merkezli randomize kontrollü çalışmada hipoksik iskemik ensefalopatili 325 bebekten 163'ne tüm vücut soğutma tedavisi uygulanırken, 162'sine yalnızca destek tedavisi uygulanmıştır<sup>5</sup>. Çalışmaya alınma ölçütleri arasında aEEG de alınmıştır. Soğutmaya bağlı gelişebilecek istenmeyen yan etkiler açısından her iki grup arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Bebekler 18 aylık olduklarında değerlendirilmişlerdir. Olgular henüz iki gruba ayrılmadan önce yapılan aEEG'lerine göre karşılaştırıldıklarında aEEG'si ağır derecede bozuk olanlarda, orta derecede bozuk olanlara göre ölüm veya ağır derecede nörolojik bozukluk görülme oranı belirgin olarak artmıştır. Tüm vücut soğutma tedavisi uygulanan grupta ölüm veya ağır nörolojik sakatlık görülme oranında anlamlı bir azalma olmamıştır ancak ikincil nörogelişimsel değerlendirme sonuçlarında olumlu etkiler gözlenmiştir<sup>5</sup>.

Bu üç çalışmayı içeren toplu çözümlemede soğutma tedavisi ile ölüm veya ağır nörolojik sakatlık görülme oranı anlamlı derecede azalmıştır. Ayrıca soğutma tedavisi uygulanan gruplarda nörogelişimsel testlerde daha iyi sonuçlar alınmış ve nörolojik sakatlık olmadan yaşam oranları da artmıştır<sup>6</sup>.

Çok yakın zamanda Jakobs ve arkadaşlarının yayınladıkları çok merkezli, randomize kontrollü çalışmada 221 orta veya ağır derecede HİE'li bebek çalışmaya alınmış ve bunlardan 110'nuna tüm vücut soğutma tedavisi uygulanırken 111'ine yalnızca destek tedavisi uygulanmıştır. Soğutma tedavisi uygulanan bebeklerde iki

yaşında ölüm veya ağır nörolojik sakatlık oranı %15 azalmıştır ve nörolojik sakatlık olmadan yaşam oranları artmıştır<sup>7</sup>.

### **DeneySEL tedavi yöntemleri**

#### **a) Kök Hücre Tedavisi**

Son yıllarda kök hücre tedavisi erişkinlerde Huntington hastalığı, Parkinson hastalığı ve inmesi olan hastalarda klinik olarak uygulanmaya başlanmıştır<sup>10</sup>. HİBH'de de kök hücre tedavisi gündeme gelmiş ve bununla ilgili deneysel çalışmalar yapılmaya başlanmıştır.

Yedi günlük sıçan yavrularında yapılan bir çalışmada HİBH oluşturulduktan sonra çok yönlü astrosit kök hücreleri verilmiş ve bu hücrelerin hasarlanmış beyin alanına göç etikleri ve nöronlara ve astrositlere dönüştükleri gösterilmiştir<sup>75</sup>. HİBH oluşturulmuş sıçanlara mezankimal kök hücrelerin (MKH) verildiği bir çalışmada MKH verilmesi ile sıçanlarda beyin hasarının azaldığı ve işlevsel testlerde iyileşme olduğu bildirilmiştir<sup>11</sup>. Bir başka araştırmada MKH verilmesi ile nöronların, oligodendrositlerin ve astrositlerin daha fazla çoğaldığı, mikrogliaların çoğalmasının ise baskılandığı saptanmıştır. Mikrogliaların yangısal süreçte önemli rol oynamaları nedeniyle azalmalarının olumlu sonuçlar sağlayacağı düşünülmüştür. Bu çalışmanın sonuçları incelendiğinde MKH verilmesi ile hasarlı beyin alanı azalmış ve davranış testlerinde işlevsel iyileşme gösterilmiştir<sup>9</sup>.

#### **b) N-asetil Sistein**

N-asetil sistein kan beyin bariyerinden ve plasentadan kolaylıkla geçebilmesi, yan etkisinin az olması ve nöron koruyucu etkilerinin olması nedeniyle oldukça dikkat çeken bir ilaçtır<sup>8</sup>. Glutasyon öncülü gibi hareket ederek oksidan radikallerinin, apoptozisin ve yangının oluşumunu baskılar<sup>8</sup>. Erişkin inme modelinin oluşturulduğu çalışmalarda oksijen radikallerini temizlediği, yangıyı ve NO üretimini baskıladığı böylece yeniden kanlanma döneminde oluşan hasarı azalttığı gösterilmiştir<sup>76</sup>. Yenidoğan sıçan çalışmalarında 200mg/kg dozunda N-asetil sistein verilmesinin hipoksi ve iskemiye karşı beyni koruduğu gösterilmiştir<sup>77</sup>. HİBH oluşturulmuş yedi günlük sıçanlarda hipotermi ile birlikte N-asetil sistein verilmesi ile hasar alanı azalmış, miyelin yapımı artmış ve işlev testlerinde iyi sonuçlar alınmıştır<sup>78</sup>.

#### **c) Allopurinol**

HİBH'nin oluşumunda özellikle yeniden kanlanma döneminde serbest oksijen radikalleri önemli rol oynarlar. Ksantin oksidaz süperoksit üretiminde önemli rol oynayan bir enzimdir. Bir ksantin oksidaz baskılayıcısı olan allopurinolün HİBH'de

kullanımıyla ilgili çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Yenidoğan sıçanlarda yapılan bir çalışmada hipoksi iskemi oluşturulmasını takiben 15. dakikada allopurinol verilmesinin beyin hasarını azalttığı gösterilmiştir<sup>79</sup>. İnsanlarda da HİE'de allopurinol tedavisi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Yakın zamanda yayınlanan bir toplu çözümlenmede allopurinolün hipoksik iskemik ensefalopatide önemli derecede yararlı etkisi olduğuna dair bir kanıt bulunamamıştır<sup>80</sup>. Bu konuda daha geniş ve soğutma ile birlikte uygulanacak araştırmalara gereksinim olduğu düşünülmektedir<sup>8</sup>.

#### **ç) Magnezyum Sülfat**

Magnezyum sülfat gebeliğe ikincil gelişen hipertansiyon tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır ve bu amaçla kullanıldığında yenidoğanlar üzerine de olumlu etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Preeklampsi nedeniyle magnezyum sülfat verilen gebelerin bebeklerinin doğum sonrasında yenidoğan yoğun bakım ünitelerine daha az yattıkları ve daha az entübasyon gereksinimlerinin olduğu saptanmıştır<sup>81</sup>.

Magnezyumun bir uyarıcı aminoasit olan glutamatın NMDA reseptörlerini baskılayarak hücre içine kalsiyum girişini engellediği ve böylece nöron ölümünü önlediği düşünülmektedir<sup>82</sup>. Yenidoğan sıçanlarda yapılan bir çalışmada magnezyum sülfatın orta derecede HİBH tedavisinde etkili olduğu ancak ağır HİBH'de etkili olmadığı bildirilmiştir<sup>83</sup>. Yakın zamanda yayınlanan bir insan çalışmasında orta ve ağır dercede hipoksik iskemik ensefalopatili yenidoğanlara magnezyum sülfat tedavisi verilmiştir. Bu çalışmanın kısa dönem sonuçları incelendiğinde magnezyum sülfatın olumlu etkilerinin olduğu bildirilmiştir<sup>82</sup>. Soğutma ile birlikte magnezyum sülfat tedavisinin uygulanacağı çalışmalara ihtiyaç var gibi görünmektedir.

#### **d) Ksenon**

Ksenon anesteziye kullanılan ve yakın zamanda nöron koruyucu etkilerinin olduğu anlaşılan bir gazdır<sup>84</sup>. Bu etkiyi uyarıcı bir aminoasit olan glutamatın NMDA almaçlarına yarışmasız olarak bağlanarak yaptığı düşünülmektedir. Yenidoğan sıçanlarda oluşturulan hipoksi-iskemi sonrasında ksenon verilmesinin yararlı etkileri olduğu gösterilmiştir<sup>85</sup>. Ayrıca soğutma tedavisi ile birlikte ksenon verilmesinin daha fazla yararlı sonuçlar sağladığı bildirilmiştir<sup>86</sup>. Bu olumlu özelliklerine rağmen çok pahalı olması ve tamamen kapalı bir ventilatör devresi gerektirmesi klinik kullanımını güçleştirmektedir<sup>8</sup>. Son zamanlarda yapılan deneysel çalışmalarda



argon gazının da benzer nöron koruyucu etkilerinin olduğu, ayrıca daha ucuz olduğu bildirilmektedir<sup>87</sup>.

#### **e) Melatonin**

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) triptofandan üretilen ve hipofiz bezinde, retinada, mide-barsak sisteminde bulunan doğal bir serbest radikal temizleyicisidir<sup>8</sup>. Ayrıca glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimler üzerine uyarıcı etki yapar<sup>17</sup>. Kan beyin bariyerini kolayca geçer ve beyinde özgün almaçlarına bağlanır. Yapılan çalışmalarda melatoninin oksijen radikallerini temizlediği, yangıyı ve apoptozisi engellediği ve nöron koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir<sup>88-89</sup>. Sıçan inme modeli oluşturularak yapılan bir çalışmada hipoksi- iskemiden 30 dakika önce periton içine tek doz melatonin verilmesi ile beyindeki hasar alanı azalmıştır<sup>90</sup>. Koyunlarda göbek kordonu bağlanarak oluşturulan hipoksi iskemide gebe koyuna melatonin verilmesi ile fetal beynin serbest radikal hasarına karşı korunduğu gösterilmiştir<sup>91</sup>. İnsanlarda yapılan bir çalışmada hipoksik iskemik ensefalopatili yenidoğanlara melatonin verilmesi ile serum malondialdehit ve nitrit/nitrat düzeyinin düştüğü ve melatonine bağlı herhangi bir yan etkinin gözlenmediği bildirilmiştir<sup>92-93</sup>. Soğutma tedavisi ile birlikte melatonin verilmesi ile ilgili çalışmalara ihtiyaç var gibi görünmektedir.

#### **f) Eritropoetin**

Eritropoetin glikoprotein yapısında bir hormon olup en önemli işlevi eritrosit yapımını kontrol etmektir<sup>8,94-95</sup>. Gebeliğin erken döneminde fetus karaciğerinde daha sonraki dönemlerde ise böbreğin tubulusları etrafında yer alan kılcıl damarların endotel hücreleri tarafından sentezlenir<sup>8,94-95</sup>. Geçmişte erkendoğanların anemisinde kullanılmıştır<sup>95-96</sup>. HİE'li bebeklerin göbek kordonu kanında eritropoetin düzeyinin yüksek olduğu saptanmış ve bu nedenle onarım mekanizmaları ile ilişkisinin olabileceği düşünülmüştür<sup>97</sup>. Eritropoetin doğrudan nöron koruyucu etkisinin yanında, nöron çoğalmasını ve yeni damar yapımını uyarıcı, glutamat toksisitesini önleyici, apoptozisi, yangıyı ve serbest radikal hasarını baskılayıcı etkileri saptanmıştır<sup>8,94</sup>. Yenidoğan sıçan çalışmalarında HİBH sonrasında erken dönemde kullanılmasının yararlı etkileri olduğu gösterilmiştir<sup>98-99</sup>.

Yakın zamanda yayınlanan bir insan çalışmasında perinatal HİE tedavisinde eritropoetin denenmiştir. Bu çalışmada orta veya ağır derecede HİE'li 167 bebek çalışmaya alınmıştır. Bebeklerden 83'üne ilk 48 saat içinde eritropoetin verilirken

84'üne yalnızca destek tedavileri uygulanmıştır. Eritropoetin günaşırı olarak, 52 olguya 300 U/kg, 31 olguya 500 U/kg dozunda iki hafta süreyle verilmiştir. Bu çalışmada eritropoetine bağlı önemli bir yan etki olmamıştır. Olgular 18. ayda değerlendirildiklerinde eritropoetin tedavisi ile ölüm oranında azalma olmazken, ağır nörolojik sakatlık oranı azalmıştır. Eritropoetin verilen orta derecede HİE'li bebekler tedaviden fayda görürlerken, ağır derecede HİE'li bebekler tedaviden fayda görmemişlerdir. Eritropoetin farklı dozları karşılaştırıldığında aralarında etki ve yan etki açısından anlamlı fark bulunmamıştır<sup>100</sup>.

#### **g) Alfa-2 Agonistler**

Alfa-2 agonistlerden klonidinin ve deksmedetomidinin nöron koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir<sup>101-103</sup>. Klonidin hipertansiyon tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Deksmetomidin klonidine göre sekiz kat daha güçlü olarak alfa-2 almaçlara bağlanır<sup>8</sup>. Deksmetomidinin HIBH oluşturulmuş hayvanlarda hasarlı beyin alanını azalttığı ve nöromotor işlevlerde iyileşme sağladığı gösterilmiştir<sup>103</sup>. Deksmetomidin ağrı kesici ve yatıştırıcı etkileri nedeniyle çocuklarda ve yenidoğanlarda kullanılabilir<sup>104</sup>. Bu nedenle HİE'li bebeklerde soğutma tedavisi ile birlikte deksmedetomidin verilerek yeni araştırmalar yapılabilir.

#### **ė)  nkoşullama ve Ardkoşullama**

Hücre, doku ve organlar hasara neden olabilecek bir olay veya etkenle karşılaştıklarında bunlara karşı koruyucu mekanizmalar geliştirirler. Böylece olay tekrarladığında daha az hasarla atlatılabilir. Ağır hipoksik iskemik olaydan saatler veya günler önce öldürücü derecede olmayan hipoksi-iskemi uygulanmasının ( nkoşullama) hücre ölümünü azaltabileceği gösterilmiştir<sup>105</sup>. Hipoksik iskemik önkoşullama iç kaynaklı nöron koruyucu faktörlere ve mekanizmalara yeni bir bakış açısı getirmesi nedeniyle önemlidir. Ancak perinatal dönemde yaşanan hipoksik iskemik olayların önceden tahmin edilememesi bu yöntemin klinikte kullanılmasını mümkün kılmamaktadır<sup>8</sup>. İskemiye takip eden yeniden kanlanma döneminde kan akımının hızlı ve aralıklı olarak kesintiye uğratılması iskemik ardkoşullama olarak isimlendirilir<sup>106</sup>. Yakın zamanda yayınlanan bir araştırmada HİBH oluşturulmuş 10 günlük sıçanlarda ardkoşullama ile beyin hasarının azaldığı ve işlev testlerinde iyi sonuçlar alındığı bildirilmiştir<sup>107</sup>. Bu konuda daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

## **h) Kalsiyum Kanal Kapatıcıları**

HİBH tedavisinde nöronlara kalsiyum girişini engelleyerek hasarın azaltılmasına yönelik çok sayıda araştırma yapılmıştır<sup>48</sup>. Kalsiyum kanal kapatıcılarından özellikle nicardipin ve flunarizin ile hayvan çalışmaları yapılmıştır<sup>108-109</sup>. Nicardipin ile HİE'li zamanında doğan bebeklerde yapılan klinik bir çalışma ciddi hipotansiyon gelişmesi üzerine sonlandırılmıştır<sup>110</sup>.

## **i) Desferoksamin**

Desferoksamin klinikte sık kan verilmesini gerektiren kan hastalıklarında demir birikimini önlemek amacıyla kullanılan ve kan beyin bariyerini geçebilen bir demir bağlayıcısıdır<sup>111</sup>. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada yedi günlük sıçanlarda oluşturulan hipoksi-iskeminin hemen ardından desferoksamin uygulanması beyin ödemi ve hasar alanını azaltmıştır<sup>112</sup>. Yapılan başka hayvan çalışmalarında da desferoksaminin nöronları oksidatif hasara karşı koruduğu ve HİBH'yi azalttığı gösterilmiştir<sup>111,113-114</sup>. Ancak HİE'li bebeklerde kullanılabilmesi için daha fazla hayvan çalışmasının yapılmasına ve uzun dönemli etkilerinin incelenmesine ihtiyaç vardır.

## **i) Nitrik Oksit Sentaz Baskılayıcıları**

Yeniden kanlanma döneminde aşırı miktarda üretilen nitrik oksitin HİBH oluşumundaki rolü bilindiğinden, nitrik oksit sentaz baskılayıcılarının tedavide kullanılması ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır<sup>115-121</sup>. Seçici olmayan bir NOS baskılayıcısı olan nitro-L-argininin HİBH oluşturulmuş sıçanlarda kullanılması ile beyin hasarının azaldığı bildirilmiştir<sup>115</sup>. Yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada yedi günlük sıçanlara hipoksi- iskemi oluşturulmasının hemen ardından 50 mg/kg L-NAME (N-Nitro-L-Arginin Metil Ester) verilmiştir. Bu çalışmada L-NAME verilen grupta apoptotik hücre sayısının azaldığı saptanmış ancak işlev testlerinde iyileşme bulunamamıştır<sup>122</sup>.

## **j) İndometazin**

HİBH oluşturularak yapılan hayvan çalışmalarında siklooksijenaz enzim baskılayıcısı olan indometazinin verilmesi ile beyin hasarının azaldığı bildirilmiştir<sup>123-124</sup>. Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada yedi günlük sıçanlarda HİBH oluşturularak indometazinin nöronal apoptozis üzerine etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada indometazin verilen sıçanlarda apoptozisin önemli derecede azaldığı bildirilmiştir<sup>123</sup>.

### **k) Sitokin Baskılayıcıları**

Hipoksik iskemik olaydan sonra başlayan yeniden kanlanma döneminde TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, PAF gibi yangısal sitokinler yoğun olarak salınırlar ve HİBH'yi arttıırırlar<sup>48</sup>. Bu nedenle yangıyı arttııran sitokinlerin baskılanmasının oluşacak hasarı azaltabileceği düşünölmektedir. Son yıllarda bu amaçla bir TNF- $\alpha$  baskılayıcısı olan etanersept ile ilgili çalışmalar yapılmış ve nöron koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir<sup>122,125</sup>. Yakın zamanda yapılmış bir araştırmada HİBH oluşturulmuş yedi günlük sıçanlara etanersept verilmesi ile apoptozisin azaldığı gösterilmiştir<sup>122</sup>. Yangısal süreçte önemli rol oynayan bir başka sitokin olan trombosit uyarıcı faktörün baskılanması da hipoksi-iskemiye karşı nöronları korumaktadır. Trombosit uyarıcı faktör baskılayıcısı olan ABT-491'in HİBH'ye karşı koruyucu olduğu yenidoğan sıçanlarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir<sup>126-127</sup>. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü baskılayıcısı olan trapidilin de HİBH'ye karşı koruyucu etkilerinin olduğu yenidoğan sıçanlarda gösterilmiştir<sup>128</sup>.

### **l) Hiperbarik Oksijen Tedavisi**

İskemik kas hastalıklarının tedavisinde hiperbarik oksijenin aralıklı olarak uygulanmasının ödemi ve nekrozu azalttığı geçmiş yıllarda gösterilmiştir<sup>129</sup>. Yenidoğan sıçan yavrularında yapılan bir çalışmada hipoksi-iskemi oluşturulduktan bir saat sonra hiperbarik oksijen tedavisi (HBO) uygulanmıştır. Bu çalışmada HBO ile beyin hasarının azaldığı, işlevsel testlerde iyileşme olduğu bildirilmiştir<sup>130</sup>. Ancak HBO'nun bu etkileri nasıl sağladığı açık değildir. Yakın zamanda yapılan başka bir çalışmada HBO tedavisinin hipoksik iskemik olaydan ne kadar zaman sonraya kadar etkili olduğu araştırılmıştır. Bu çalışmada HİBH oluşturulmuş sıçanlara hipoksik iskemik olaydan üç, altı, 12 ve 24 saat sonra HBO tedavisi uygulanmıştır. Üç, altı, 12 saat sonra uygulanan HBO tedavisi ile beyin hasarında azalma ve davranış testlerinde iyileşme olduğu bildirilmiştir. 24 saat sonra HBO uygulanmasının ise etkinliğinin çok az olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak HBO tedavisinin ilk 12 saat içinde uygulanmasının beyin hasarını azalttığı ve davranış testlerinde iyileşme sağladığı bildirilmiştir<sup>131</sup>.

### **m) Büyüme Faktörleri**

HİBH oluşturulmuş hayvan çalışmalarında çeşitli büyüme faktörleri ile tedaviler denenmiştir (12-15). En çok insülin benzeri büyüme faktörü- 1 (IBF- 1), epidermal büyüme faktörü (EBF), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BKNF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEBF) ve fibroblast büyüme faktörleri üzerinde durulmaktadır.

## **Fibroblast Büyüme Faktörleri**

Fibroblast büyüme faktörleri polipeptit yapılı büyüme faktörlerinin büyük bir ailesini oluşturmaktadır<sup>132</sup>. 23 çeşit fibroblast büyüme faktörü (FBF) tanımlanmıştır ancak bunların tamamı tüm omurgalı canlılarda bulunmaz. Örneğin insanlarda FBF-15, sıçanlarda ise FBF-19 bulunmaz<sup>133-134</sup>. En çok bilinen FBF'ler asidik FBF ve bazik FBF'dir. Asidik FBF'nin izoelektrik noktası 4,5- 6 iken, bazik FBF'nin izoelektrik noktası 9,6- 9,8'dir<sup>135</sup>. Asidik FBF; aFBF veya FBF-1, bazik FBF ise; bFBF veya FBF-2 olarak ifade edilebilir<sup>136</sup>.

FBF'ler hücre içerisinde çekirdekte ve stoplazmada bulunurlar. Hücrenin ölümü veya hasara uğraması durumunda dışarı salınırlar<sup>137</sup>. Parakrin veya otokrin mekanizmayla almaçlara bağlanarak etki gösterirler<sup>138</sup>. Dışarı salınan FBF molekülleri heparan sülfat proteoglikanlara (HSPG) bağlanarak korunur ve hücreler arası sıvıda FBF-HSPG olarak saklanırlar<sup>139</sup>. FBF'ler hücre yüzeyinde bulunan tirozin kinaz almaçlarına bağlanarak etkilerini gösterirler. FBF'lere cevap veren tüm hücre tipleri özgün FBF hücre yüzey almaçları (FBFA) taşırlar. Dört tip FBFA (FBFA1- FBFA4) bulunmaktadır. FBF'nin almaçlara bağlanmasında heparin veya heparan sülfat proteoglikanların kolaylaştırıcı etkileri bulunmaktadır. Aynı HSPG birden fazla FBF'ye bağlanabilmektedir<sup>140-141</sup>.

## **Fibroblast Büyüme Faktörü- 2**

FBF-2 ilk kez sığır hipofizinden elde edilmiştir<sup>142</sup>. Dört nanometre çapında, hidrofobik dizilerin iç kısmında, yüklü dizilerin ise yüzeyde yer aldığı 146 aminoasitlik bir polipeptit zincirden oluşur<sup>143</sup>. Uçlarda amino ve karboksil terminali, ortada ise merkezi kısım yer alır. FBF-2 yapısında  $\beta$ -yaprakları olarak isimlendirilen şerit şeklinde 12 adet aminoasit dizisi bulundurur. Birinci ile ikinci  $\beta$ -yaprakları ve 10 ile 11.  $\beta$ -yaprakları arasında heparin bağlanma bölgeleri bulunur<sup>132</sup>.

FBF-2 ilk olarak fibroblastlarda hücre bölünmesini uyarıcı bir faktör olarak tanımlanmıştır. Ancak sonraki yıllarda çok sayıda hücrenin, dokunun ve organın büyümesinde, yenilenmesinde ve işlevlerini yerine getirmesinde önemli bir faktör olduğu anlaşılmıştır. FBF-2 sinir hücrelerinin yaşamlarını sürdürmelerini sağlar, yeni damar yapımını, mezodermal şekillenmeyi, hücre bölünmesini, hücre göçünü uyarır, yara iyileşmesini hızlandırır<sup>144</sup>. Kısacası FBF-2'nin yaşamın devamını sağlayan önemli etkileri vardır. FBF-2'nin yokluğu olgunlaşmış normal hücrelerin apoptozisi ile sonuçlanırken, FBF-2 verilmesi apoptotik uyarılara karşı hücrenin

yaşamını sürdürmesini sağlar. FBF-2'nin farklı hücre, doku ve organlar üzerine olan etkileri tablo 2 ve 3 de verilmiştir<sup>135</sup>.

**Tablo 2: FBF-2'nin normal hücrelerde yaşamın devamını sağlayan ve apoptozisi önleyen etkileri<sup>135</sup>.**

Hücre/ doku/ organ	FBF-2'nin etkisi	Açıklama
Damar endotel hücreleri	Koruyucu	Apoptozise karşı koruyucu
Damar düz kas hücreleri	Koruyucu	FBF-2 yokluğu apoptozis ile sonuçlanır
Kalp miyosit hücreleri (sıçanlarda)	Lipopolisakkaritlere karşı koruyucu	Lipopolisakaritler iNOS üzerinden apoptozisi aktive etmektedir
Fibroblast	Koruyucu	Bcl-2 artışı üzerinden etki
Hipokampusta bulunan nöronlar	Glutamatla ilişkili hücre ölümüne karşı koruyucu	
Oligodendrosit	Koruyucu	
Yenidoğan schwan hücreleri (sıçanlarda)	Koruyucu	cAMP tarafından apoptozisin aktive edilmesini önler
Astrositler	Koruyucu	
Retina epitel hücreleri	Koruyucu	Endojen FBF-1'i arttırarak etkili olabilir
Karotid cisimciği kromaffin hücreleri (perinatal dönemdeki sıçanlarda)	Koruyucu	FBF-2 ile birlikte ve düşük oksijen yoğunluğu bu hücrelerin yaşamlarını sürdürmelerini sağlar
Astrosit öncül hücreleri	Koruyucu	
Oligodendroglia öncül hücreleri	Koruyucu	Apoptozisi önler
Lensin epitelyum hücreleri	Koruyucu	Apoptozisi önler
Gonad hücreleri	Koruyucu	
Midenin enterokromaffin benzeri hücreleri	Koruyucu	
Overin granüloza hücreleri (sıçanlarda)	Kendiliğinden başlayan apoptozisi önler	Tirozin kinaza bağlı bir mekanizma ile

**Tablo 3: FBF-2'nin hücre çoğalması ve hücre dönüşümü üzerine olan etkileri<sup>135</sup>.**

<b>Hücre/ doku/ organ</b>	<b>FBF-2'nin etkileri</b>	<b>Açıklama</b>
İç kulağın duysal epitel hücreleri	Hücre çoğalması ve farklılaşması üzerine farklı etkiler	FBF-2 hücre çoğalmasını baskımlarken öncül hücrelerin olgun hücrelere dönüşümünü uyarır
Osteoblastlar	Hücre çoğalması ve farklılaşması üzerine farklı etkiler	Farklılaşmış hücrelerde apoptozisi arttırırken, immatür hücrelerde çoğalmayı uyarır
Nöral retina (gelişim döneminde)	Apoptozisi arttırır	Nöral retinanın gelişim aşamasında potansiyel ölümcül etkileri var (civciv embriyosunda)
Miyofibroblast (damak gelişimi sırasında)	Apoptozisi arttırır	FBF-2 damakta skar oluşumu sırasında apoptozisi arttırır
Podositler	Hasarı arttırır	Glomeruloskleroza ve protein geçirgenliğini arttırır
Gelişen kalp (fare embriyosu)	Apoptozisi baskılar	FBF-2 ventrikül myokardında ve endokardiyal yastıkta apoptozisi baskılar
Parmaklar arası hücreler (embriyo)	Koruyucu	Parmaklar arası bölgeye FBF verilmesi ile bu alanda hücre ölümü ve doku hasarlanması yavaşlar
Kortekste bulunan nöronlar (sıçan embriyosu)	Koruyucu	Apoptozisi önler
Sempatik nöronlar	Koruyucu	Nörotrofinlere karşı duyarlılığın devamını sağlar



## **Merkezi Sinir Sisteminde Fibroblast Büyüme Faktörü 2'nin Etkileri**

Merkezi sinir sisteminde (MSS) en yaygın olarak bulunan fibroblast büyüme faktörlerinden biri FBF-2'dir<sup>145</sup>. Doğum öncesi ve doğum sonrası dönemde MSS de FBF-2 yaygın olarak bulunmaktadır<sup>146</sup>. FBF-2'nin ulak RNA'sı korteks, hipokampus, striatum, talamus, sustantia nigra, olfaktor bulbus, pons, medulla oblongata, motor ve duysal çekirdekler, hipofiz bezinin ön ve arka bölümlerinde saptanmıştır<sup>147-152</sup>. FBF-2 yalnız nöronlarda değil glial hücrelerde de bulunmaktadır<sup>153</sup>. Doğum sonrası birinci ve dördüncü günlerde piramidal nöronlarda, doğum sonrası dördüncü günde ise astrositlerde FBF-2 varlığı gösterilmiştir<sup>150</sup>. FBF-2 diğer FBF'ler gibi özgün FBFA'lara bağlanarak etki gösterir<sup>134</sup>. Erişkin merkezi sinir sisteminde FBFA-1, FBFA-2 ve FBFA-3 diensefalon ve telensefalonda yüksek miktarda bulunurken diğer alanlarda daha düşük düzeyde bulunur. FBF-2 hipokampusta yaygın olarak bulunan FBFA-1'e yüksek çekimle bağlanır<sup>154</sup>.

MSS'de FBF-2'nin hücrelerin çoğalmasında, büyümelerinde, yaşamlarını sürdürmelerinde, farklılaşmalarında önemli işlevleri bulunmaktadır<sup>134-155</sup>. FBF-2 embriyonal dönemde farklı zamanlarda farklı etkiler gösterebilmektedir. Yapılan bir çalışmada 15.5 günlük sıçan embriyosunun beynine ventrikül içi FBF-2 verildiğinde nöronların, 20.5 günlük sıçan embriyosuna verildiğinde ise glial hücrelerin çoğaldığı gösterilmiştir<sup>156</sup>. Doğum sonrası dönemde de dışarıdan FBF-2 verilmesinin nöron yapımını arttırdığı gösterilmiştir<sup>157</sup>. Deri altından verilen FBF-2'nin hipokampusta nöron çoğalmasını uyardığı saptanmıştır<sup>158</sup>. Yenidoğan sıçanlara anti FBF-2 uygulayarak iç kaynaklı FBF-2'nin baskılandığı bir çalışmada hipokampusta nöron çoğalmasının %50 oranında azaldığı gösterilmiştir. Erişkin hipokampusundaki nöronal kök hücrelerin çoğalması için de FBF-2'nin gerekli olduğu gösterilmiştir. FBF-2 embriyonal dönemde ve doğum sonrası erken dönemde daha çok nöronların, erişkin dönemde ise glial hücrelerin çoğalmasını uyarılmaktadır. Ayrıca FBF-2 nöronları serbest radikallere, nitrik okside, hipoglisemiye, uyarıcı aminoasitlere, hipoksiye ve iskemiye karşı da korur. MSS yaralanmaları sonrasında onarım sürecinde FBF-2 önemli rol oynar.

## **Örselenmeye Bağlı Oluşan Beyin Hasarında Fibroblast Büyüme Faktörü 2'nin Etkileri**

FBF-2'nin örselenmeye bağlı oluşan beyin hasarının onarılmasında önemli işlevleri olduğuna dair çok sayıda kanıt bulunmaktadır<sup>155,158-160</sup>. Yapılan bir çalışmada 10 günlük sıçanlarda iki taraflı motor korteks hasarı oluşturulduktan

sonra yedi gün boyunca günlük 10 ng/gr dozunda FBF-2 deri altına verilmiş. FBF-2 verilen sıçanlarda hasarlı beyin alanlarının azaldığı ve bilişsel aktivitelerinin iyileştiği saptanmıştır<sup>155</sup>.

Yapılan başka bir çalışmada yine 10 günlük sıçanlarda iki taraflı motor korteks hasarı oluşturulmuştur. Hasarın oluşturulmasının ardından bir gruba yedi gün boyunca günlük 10 ng/gr dozunda FBF-2 deri altı yoldan uygulanmıştır. FBF-2 verilen grupta nöroblastların lezyon alanına göç ettiği ve lezyon alanını doldurdukları görülmüştür. FBF-2 verilmeyen grupta ise yeni hücrelerin ventrikülün hemen altında ve striatumda kaldıkları, hasarlı alana göçmedikleri saptanmıştır. Sonuç olarak FBF-2'nin hasarlı alana hücre göçünü uyardığı, hasarlı beyin alanını azalttığı ve davranış deneylerinde olumlu sonuçlar sağladığı gösterilmiştir<sup>160</sup>.

### **Hipoksi ve İskemiye Bağlı Oluşan Beyin Hasarında Fibroblast Büyüme Faktörü 2'nin Etkileri**

Beynin diğer bölgelerindeki nöronlara göre hipokampusta yer alan nöronlar iskemik zedelenmeye karşı daha hassastırlar<sup>161</sup>. Hipokampusta yaşanan iske mi hızlı bir şekilde nöronların ölümüne yol açar ve bu FBF-2 gibi bir takım nöron koruyucu büyüme faktörleriyle önlenabilir<sup>134</sup>.

Wei ve arkadaşları sıçanlarda orta beyin arterini bağladıklarında iç kaynaklı FBF-2 yapımının arttığını göstermişlerdir<sup>162</sup>. Bu da iske mi sonrasında FBF-2'nin nöron koruyucu etkilerinin olduğunu düşündürmektedir.

Bir araştırmada 18 günlük sıçan embriyolarının korteksinden alınan nöronlar kültür ortamına konmuş ve bu hücreler hipoksiye maruz bırakıldıklarında FBF-2 yapımının iki buçuk kat arttığı bulunmuştur. Ayrıca dışarıdan FBF-2 verilmesi ile hipoksiye bağlı nöron ölümünün azaldığı gösterilmiştir. Bu nedenle FBF-2'nin hipoksik stres durumunda nöronları koruyucu bir faktör olduğu sonucuna varılmıştır<sup>163</sup>.

Jin-qiao ve arkadaşları iskemik beyin hasarı oluşturdukları sıçanlara FBF-2 verdiklerinde beyinde hücre çoğalmasının ve farklılaşmasının arttığını göstermişlerdir<sup>16</sup>.

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

Günümüzde pek çok davranış deneyi modeli ile sıçanların bilişsel ve lokomotor işlevleri değerlendirilebilmektedir. Bununla birlikte var olan davranış modellerinin hiçbirinin % 100 güvenilirlikleri bulunmamaktadır. Bilim ve teknolojideki

ilerlemelerle hayvan davranış deneyi modelleri giderek istenen ideal düzeye ulaşabilecektir<sup>127</sup>.

Davranış deneylerinin sıçanların nöromotor gelişimlerini tamamladıkları 80- 85. günlerden sonra yapılması önerilmektedir. Davranış deneylerinde cinsiyete bağlı önemli farklılıklar oluşabilmektedir bu nedenle çalışmalarda genellikle erkek sıçanlar tercih edilmektedir<sup>127</sup>.

Çalışmaya alınacak sıçanların daha önceden yavrulayan ve önceki yavrulara bakmış olan bir anneden alınmaları önemlidir. Aksi durumda çalışmaya alınan sıçanların anne tarafından bakılmama ve ölme riski olabilecektir. Tüm sıçanlar benzer sürede annelerinden ayrılmalı, benzer şekilde beslenmeli ve benzer sayıda sıçan aynı kafese konmalıdır. Böylece nöromotor gelişimlerini etkileyebilecek diğer faktörler mümkün olduğunca azaltılmalıdır. Sıçanlar davranış deneylerinin yapılacağı laboratuvara bir veya 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 gurup için aynı kişi olması, aynı renk giysi giymesi, aynı parfümü kullanması, her zaman aynı yerde durması gibi faktörlere de dikkat edilmelidir<sup>127</sup>.

Sıçanların bilişsel ve motor yetilerinin değerlendirilmesinde Holeboard, Morris su tankı, açık alan, rotator düzeneği, T labirent, yükseltilmiş artı labirent testi gibi testler kullanılabilir.

### **Açık Alan Testi**

Sıçanların duygusal durumunu, anksiyete davranışlarını, otonom işlevlerini, lokomotor aktivitelerine değerlendirmek amacıyla kullanılmaktadır<sup>164</sup>. İlk kez 1934 yılında Hall ve arkadaşları tarafından daire tabanlı olarak tanımlanmış ancak günümüzde kare, dikdörtgen şekillerde kullanılmaktadır. Düzeneğin zemini çeşitli sayıda, eşit büyüklükte, kare şeklinde kutucuğa bölünmüştür. Çalışmaya alınan sıçan bu düzeneğe 2- 20 dakika süreyle bırakılır. Hayvanın tek başına bilmediği bir ortama bırakılması agorofobi denilen geniş alan korkusunu tetikler ve anksiyete davranışı görülür. Dolaşılacak alanın sayısı çevreyi araştırıcılığın ölçüsü olarak değerlendirilir. Donakalma sıçanın hiçbir hareket yapmadan donup kaldığı, çevresi ile ilişkisini kestiği durumdur. Şahlanma sıçanların ön pençelerini kaldırıp arka bacakları üzerinde kaldıkları pozisyonudur. Çevreyi araştırıcılığın belirtisi olarak kabul edilir<sup>164-165</sup>. Anksiyete için; şahlanma sayısı, kaçınma sayısı ve süresi, kenarda kare

geçme sayısı, merkezde kare geçme sayısı incelenir. Otonom fonksiyonlar için kaşınma, gaita çıkarma sayısına bakılır. Lokomotor aktivite için kare geçme sayısı, donakalma süresi, katettiği yol ve hız hesaplanır. Veri kayıtları bilgisayar programları aracılığıyla yapılabileceği gibi gözle takip edilerek ve süreölçer kullanılarak da yapılabilir<sup>127</sup>.

### **Morris Su Tankı Testi**

Sıçanların öğrenme ve hafıza çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Morris su tankı testi ile hafıza ve öğrenme değerlendirilebilir. Genellikle silindirik şeklinde bir su tankı kullanılır ve içine 21- 26°C sıcaklıkta su doldurulur, oda sıcaklığı 23 ±1°C'ye ayarlanır<sup>127</sup>. 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 su tankı hayali olarak dört kadrana bölünür. Bir kadrana gizli yükselti sabit olacak şekilde yerleştirilir. Her gün sıçanlar sırasıyla farklı bir kadrandan yüzleri su tankının duvarına bakacak şekilde bırakılırlar ve gizlenmiş sabit yükseltiyi bulmaları beklenir. Sıçanlar suya her bırakıldıklarında yükseltiyi bulmaları için beklenen süre eşit olmalıdır ve bu süre 30-180 saniye arasında belirlenebilir. Eğer gizli yükselti bulunamaz ise deneyi uygulayan kişi tarafından sıçan yönlendirilerek gizli yükseltiyi bulması sağlanır. Yükselti üzerinde bekleme süresi her sıçan için eşit olmak üzere üç saniye ile 30 saniye arasında belirlenebilir. Gün geçtikçe sıçanların gizli yükseltinin yerini öğrenerek daha kısa sürede bulmaları beklenir<sup>127</sup>. Hafıza deneyleri beş ile 13 gün arasında sürdürülebilmektedir<sup>165-166</sup>. Deneyin son gününde yükselti yerinden çıkarılarak, eskiden yükseltinin bulunduğu yerde sıçanların ne kadar süre geçirdikleri incelenir<sup>127</sup>.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

**Çalışma Ekibi:** Bu çalışma Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Fizyoloji, Farmakoloji, Histoloji- Embriyoloji, Patoloji ve Beyin Cerrahisi Anabilim Dalları tarafından yürütülmüştür. Çalışma Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı ve Fizyoloji Anabilim Dalı Davranış Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

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

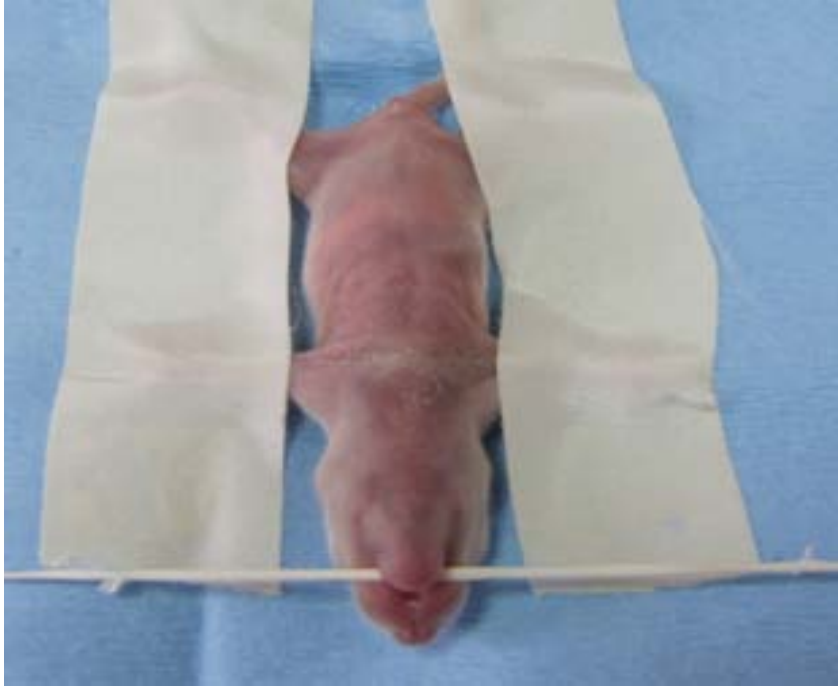
**Gereçler:** Deney sırasında mikroskop, deri ve deri altı dokuların açılması ve dekapitasyon için pens, bistüri, sağ karotid arterin bağlanması ve derinin kapatılması için 6-0 ipek ve portegü, ilaç ve sıvı uygulamaları için 10µl ve 100µ l'lik Hamilton enjektörü, hipoksi odacığı, %8 oksijen %92 azot 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, sretil örtü ve eldivenler kullanıldı. Lokomotor aktivite ölçümü için kare şeklinde ve zemini 100x100cm, kenar yüksekliği 40 cm, iç yüzeyi siyah olan bir açık alan deney kutusu kullanıldı. Öğrenme ve hafızanın değerlendirilmesi için ise daire şeklinde 150cm 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 yapılana kadar Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında tutuldu. 24. günden itibaren anne yanından ayrılarak her kafeste 4- 5 adet sıçan olacak şekilde ayrı kafeslere alındı. Davranış deneylerinden iki gün önce hayvanlar ortama uyum sağlamaları için Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Hayvan Davranış Deneyleri Laboratuvarına alındılar.

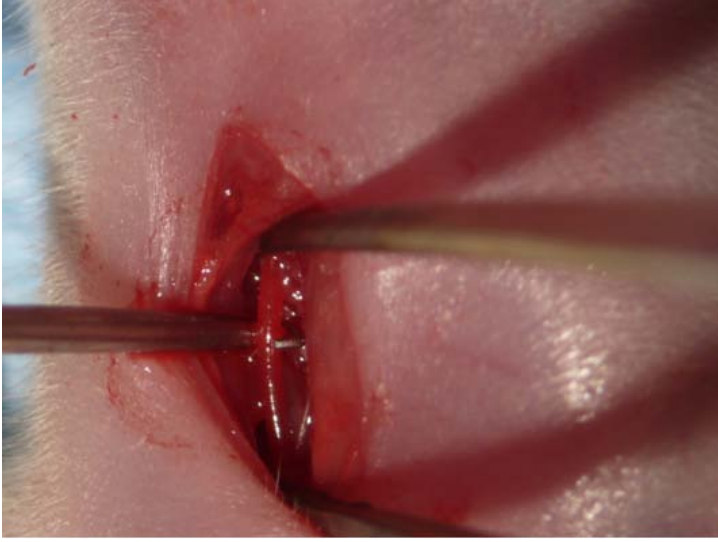
### **Hipoksik İskemik Beyin Hasarının Oluşturulması**

Çalışmaya alınan yedi günlük sıçan yavrularına isofluran inhalasyon anestezisi uygulandı. Sıçanların sırtları masaya sabitlenecek şekilde kol ve bacaklarından flaster ile masaya yapıştırıldı (Resim 1). Boyun orta hattan kesilerek mikroskop altında sağ karotid arter bulundu (Resim 2). Sham Grubu hariç diğer tüm sıçanların sağ karotid arterleri bağlandı (Resim 3). Bu işlemten sonra Sham Grubu dışındaki

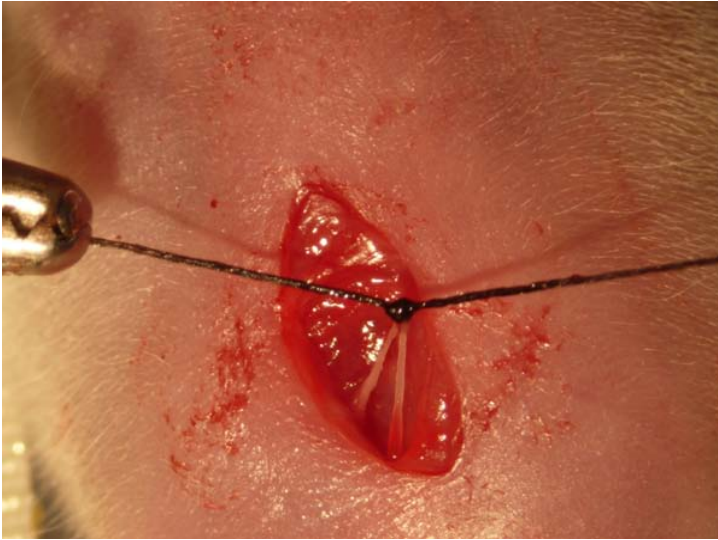
tüm sıçanlar hipoksi odacığına alındı. Hipoksi odacığının sıcaklığı ve oksijen oranı sürekli olarak izlendi. Odacık sıcaklığının  $33,5 \pm 0,5$  °C ve oksijen düzeyinin ise % 8 olması sağlandı. İki saatlik hipoksi süreci sonrasında sıçanlar odacıktan çıkartıldı ve anne yanına verildi. Oluşturulan HİBH'nin gösterilmesi ve nöronal apoptozisin değerlendirmesi için iki saatlik derlenme süreci sonrasında her gruptan üçer sıçan 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 apoptoz değerlendirildi.



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



**Resim 2: Sağ karotid arterin bulunması.**



**Resim 3: Sağ karotid arterin bağlanması.**

### **Deney Planı ve Uygulama Takvimi**

78 adet yedi günlük Wistar cinsi sıçan yavruları rastlantısal olarak dört gruba ayrıldı. Sham Grubu dışındaki tüm sıçanlarda HİBH oluşturuldu.

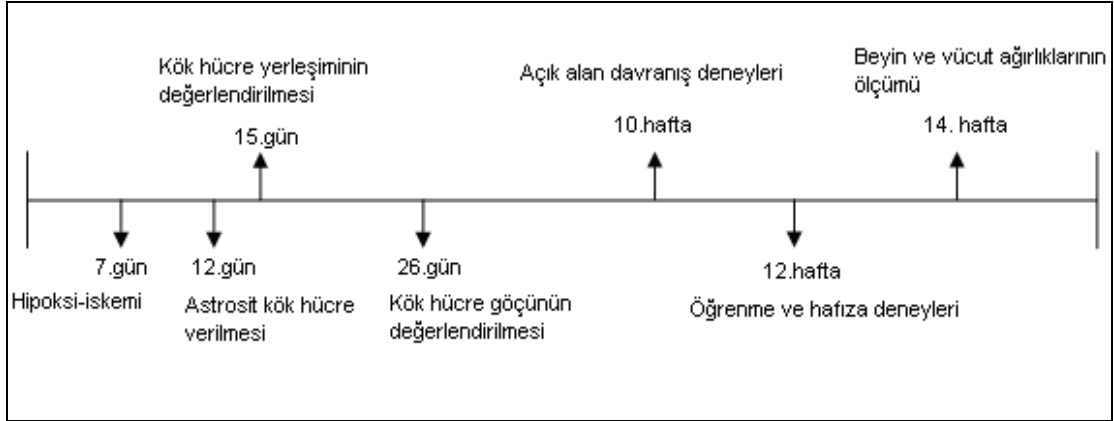
Grup M (n=17): HİBH oluşturulduktan beş gün sonra motor korteks içine astrosit bulunmayan taze hücre kültürü sıvısı (medium) verilen grup (Medium Grubu).

Grup A (n=22): HİBH oluşturulduktan beş gün sonra motor korteks içine BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridine) ile işaretlenmiş çok yönlü astrosit kök hücresi ve periton içine fosfat tampon solüsyonu verilen grup (Astrosit Grubu).

Grup AF (n=24): HİBH oluşturulduktan beş gün sonra motor korteks içine BrdU ile işaretlenmiş çok yönlü astrosit kök hücresi ve periton içine fibroblast büyüme faktörü-2 verilen grup (Astrosit + FBF Grubu).

Grup S (n=15): Anestezi sonrasında boyun diseksiyonu yapılarak sağ karotid arteri bulunan ancak bağlanmayan, hipoksi uygulanmayan ve boyun diseksiyonu işleminden beş gün sonra motor korteks içine iğne batırılan grup (Sham Grubu).

Grup A ve AF'den astrosit kök hücre verilmesi işleminden üç gün ve iki hafta sonra üçer sıçan dekapite edilerek işaretli hücrelerin yerleşimleri incelendi. Tüm gruptaki sıçanlara 10. haftada açık alan, 12. haftada öğrenme ve hafıza deneyleri yapıldı. 14. haftada her gruptan üçer sıçan dekapite edilerek beyin ağırlıkları ölçüldü ve makroskopik olarak incelendi. Kalan sıçanların verilen kök hücrelere bağlı tümör gelişim riski açısından takip edilmeleri ve kendiliğinden ölümleri durumunda otopsilerinin yapılması planlandı. Deney uygulama takvimi Şekil 3'te gösterilmiştir.



**Şekil 3: Deney uygulama takvimi.**

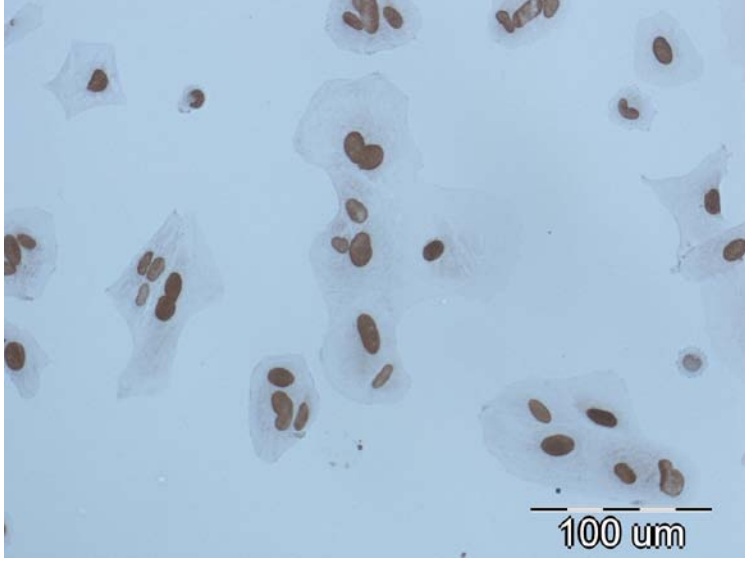


### **Astrosit Hücre Kültürünün Hazırlanması**

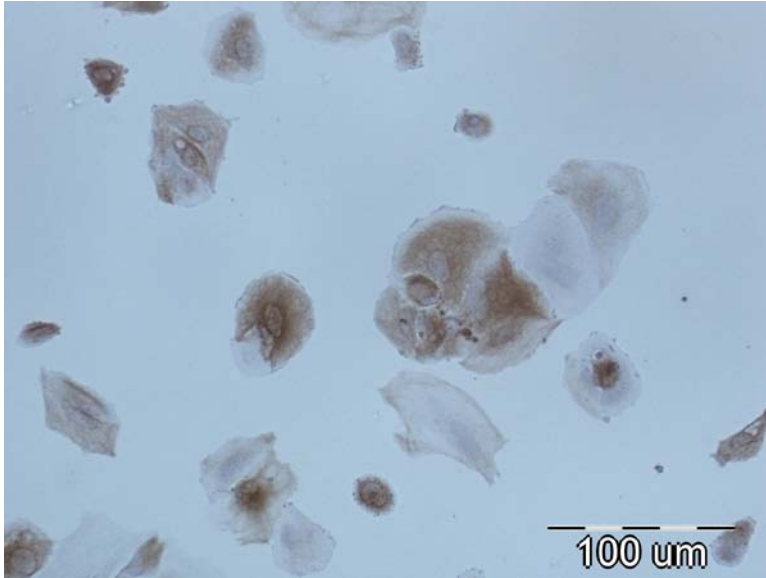
Astrosit hücre kültürünün hazırlanması için Wistar cinsi bir günlük erkek sıçan yavruları alındı. Sıçan yavruları karbondioksit odasında öldürülerek % 70 etanol dolu kaba konuldu. Kafatasları kesilerek kafatası içeriği dışarıya alındı ve medium ile yıkanarak kan ve diğer dokulardan temizlendi. Olfaktor lob, beyincik, bazal ganglionlar uzaklaştırıldı. Beynin kalan korteks kısmı medium ile dilüe edildi ve ekim yapıldı. 16 gün sonra hücrelerin sıkışık duruma geldikleri görüldü. Astrositleri işaretlemek amacıyla hasat dönemine kadar mediauma BrdU eklendi. Hasat için hücreler Trypsin-EDTA ile kaldırılarak sayım yapıldı ve 3000 rpm'de 10 dakika çevrildikten sonra üstte kalan kısmı dökülerek 50 .000 hücre olacak şekilde hazırlandı.

### **BrdU Pozitif Çekirdeğe Sahip Hücrelerin Gösterilmesi**

Üretilen hücrelerin BrdU pozitif çekirdeklere sahip olduğunu göstermek için monoklonal fare anti BrdU primer antikoru (Novocastra kat: NCL-BrdU) 1:200 oranında kullanılarak immünohistokimyasal işaretleme yapıldı. Ayrıca bu hücrelerin astrosit olduklarını kanıtlamak için de, sadece astrositlerde bulunan bir ara filaman olan glial fibriler asidik proteine (GFAP) karşı üretilmiş monoklonal fare anti GFAP antikoru (Santa Cruz kat: sc-33673) 1:200 oranında sulandırılarak işaretleme yapıldı. Yapılan işaretlemler incelendiğinde, BrdU antikoru ile boyanan petriplerdeki hücrelerin tamamına yakınının BrdU pozitif çekirdeklere sahip olduğu görüldü. Negatif çekirdek sayısı ise oldukça azdı (Resim 4). GFAP için yapılan işaretlemede ise hücrelerin tamamına yakın kısmında sitoplazmik olarak filamentöz biçimde yoğun GFAP işaretleme rastlandı (Resim 5).



**Resim 4: Kültüre astrositlerde anti BrdU antikoru ve DAB kromojeni kullanılarak yapılan immünohistokimyasal işaretlemede çok sayıda pozitif hücre çekirdeği görülmekte (X200) (BrdU: Bromodeoksiüridin, DAB: Diaminobenzidin).**



**Resim 5: Kültüre astrositlerde anti GFAP antikoru ve DAB kromojeni kullanılarak yapılan immünohistokimyasal işaretleme. Hemen tüm hücrelerin sitoplazmaları filamentöz GFAP proteini tarafından doldurulmuş (X200) (GFAP: Glial fibriler asidik protein, DAB: Diaminobenzidin).**

### **Motor Korteksin Yerinin Belirlenmesi**

Motor korteksin yerinin belirlenmesi amacıyla 12 günlük başka bir sıçana ketamin ile genel anestezi uygulandı. Sıçanın kafatası açılarak beyin ortaya çıkarıldı. Üst ekstremitedeki kasların uyarılması için bipolar iğne elektrotları kullanıldı. BIOPAC MP 100 sistem stimülatörüne bağlanan bu elektrotlar aracılığıyla kaslara 0.5 ms süreli ve 0.5 V şiddetinde kare puls şeklinde bir elektriksel uyaran uygulandı. Bu uyarıya karşı oluşan potansiyel değişiklikler doğrudan korteks üzerine yerleştirilen küçük plaka şeklindeki elektrotlarla kaydedildi. Bu kayıtlar ışığında motor korteksin yeri belirlendi. Sıçanların motor korteksi gözün lateral epikantuslarını birleştiren hattın 2 mm arkası olarak belirlendi.

### **Çok Yönlü Astrosit Kök Hücre Verilmesi**

1 µl'de 50.000 hücre olacak şekilde hazırlanan çok yönlü astrosit kök hücreler 2 µl hacminde (100.000 hücre) sağ beyin yarısının motor korteksi içine Hamilton enjektörü ile verildi.

### **Fibroblast Büyüme Faktörü- 2'nin Verilmesi**

Fibroblast büyüme faktörü- 2 (Recombinant Human FGF basic 146 aa, katalog numarası: 233-FB-025) içerisinde %0.1 oranında sığır albumini bulunan fosfatlı tuz tamponu (PBS- phosphate buffered saline solution) ile mililitrede 10 µg olacak şekilde hazırlandı. AF Grubu'ndaki sıçanlara astrosit kök hücre verilmesi işleminin ardından periton içine 10ng/gr dozunda FBF-2 verildi.

### **Sıçanlara Verilen İşaretli Astrositlerin İmmünofloresan Yöntemle Gösterilmesi**

Çok yönlü astrosit kök hücrelerinin verilmesinden 3 ve 14 gün sonra anestezi altında paraformaldehit ile kardiyak perfüzyon yapıldıktan sonra beyinleri bekletilmeden çıkartıldı. Çıkartılan beyinler hemen fosfatlı tuz tamponunda (PBS) hazırlanan %4'lük paraformaldehit solüsyonuna konarak +4 °C'de 48 saat tespit edildi. Daha sonra %20'lik sükroz solüsyonunda bir gece yine +4 °C'de bekletildikten sonra %0.1 sodyum azid içeren %30'lük sükroz solüsyonuna konuldu. Beyinler önce sağ ve sol yarım kürelere ayrıldı. Hücrelerin verildiği sağ yarım kürelerde ilki enjeksiyonun yapıldığı noktaya, ikincisi hipokampus hizasına denk gelecek biçimde iki noktada koronal düzlemde kesi yapıldı. Elde edilen bu dokulardan enjeksiyon noktası ve hipokampus seviyesinden kriyostat ile 20 µm'lik kesitler adheziv kaplı lamlara alındı. Kesitlere immünofloresan işaretleme yapıldı.

## **Histopatolojik Değerlendirme**

Çıkarılan beyinler sıçanların hangi gruptan olduğunu ve sıçanın hangi karotid arterinin bağlandığını bilmeyen bir patolog tarafından değerlendirildi. Subtalamik çekirdekler, hipokampus ve parietal korteksi temsil eden bir veya iki örnek takip işlemine sokuldu. Hipoksik iskemik hasara daha duyarlı olduğu için bu bölgedeki nöronlar seçildi. Rutin takip işleminde beyin dokuları alkol, ksilol ve parafin solüsyonlarında bekletildiler. Hazırlanan parafin bloklardan elde edilen beş mikron kalınlığındaki kesitler rutin hematoksilen 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 apoptosis detection kit, Biogen, katalog no S7101) uygulandı. Beş mikron kalınlığındaki koronal beyin kesitleri, deparafinizasyon ve alkol takip işlemleri ardından proteinkinaz K ile 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Kromojen olarak 3,3-diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB), zemin boyası için metil yeşili kullanıldı. Kesitler kapama maddesi ile kapatıldı. Pozitif kontrol olarak germinal merkezleri belirgin tonsil kesitleri kullanıldı.

### **Kaspaz- 3 Yöntemi**

Beş mikron kalınlığındaki koronal beyin kesitlerine deparafinizasyon ve alkol takip işlemleri 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**

Koronal beyin kesitleri TUNEL yöntemi ve Kaspaz immünohistokimyasal boyama işlemlerinden sonra ışık mikroskopunda değerlendirildi. Her iki beyin yarısı ayrı ayrı değerlendirildi. Her iki taraftaki subtalamik çekirdekler, hipokampus ve parietal korteksteki TUNEL ve Kaspaz ile boyanan 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 =152µm<sup>2</sup>, toplam alan 760 µm<sup>2</sup>) tarandı. TUNEL ve Kaspaz ile boyanan toplam nöronlar sayıldı.

### **Atrofinin Değerlendirilmesi**

Davranış deneylerinin tamamlanmasının ardından 14. haftada her gruptan üçer sıçan dekapite edildi ve çıkarılan beyinler tartıldı ve makroskopik değişiklikler açısından incelendi.

### **Davranış Deneyleri**

Davranış deneylerine başlamadan iki gün önce deneyin uygulanacağı gruptaki sıçanlar davranış deneyleri laboratuvarına getirilerek ortama alışmaları sağlandı. Tüm deneyler süresince sıçanlar aynı araştırmacı tarafından düzeneklere konuldu. Davranış deneyleri tüm gruplara saat 09.00 ile 14.00 arasında yapıldı.

### **Açık Alan Deneyi**

Açık alan davranış deneyi ile sıçanların lokomotor aktivitelerinin değerlendirilmesi amaçlandı. 10. haftasını dolduran sıçanların 100x100cm'lik zeminde beş dakika süreyle kat ettikleri mesafe (cm) ve hareket hızları (cm/sn) kaydedildi.

### **Öğrenme ve Hafıza Deneyleri**

Sıçanlar doğum sonrası 12. haftalarını tamamladıklarında öğrenme ve hafıza deneylerine başlandı ve beş gün süreyle uygulandı. 42 cm derinliği olan tank 22°C sıcaklığındaki su ile dolduruldu. Bilgisayar ekranına aktarılan görüntüde tank batı, kuzey, doğu ve güney olmak üzere dört eşit kadrana ayrıldı. Deneyin ilk dört gününde 15 cm çaplı gizli yükselti 40 cm yüksekliğe ayarlanıp doğu kadrانının orta noktasına yerleştirildi. Deneyin ilk günü tüm sıçanlar batı kadrانından başlayıp saat yönünde ilerleyerek her kadrانından günde bir kez olmak üzere toplam dört kez, başları su tankına dönük olarak suya bırakıldı. Sıçanlar her suya bırakılıştta en geç 60 saniye içinde gizli yükseltiyi bulmaları beklendi. 60 saniyelik sürede yükseltiyi bulamayan sıçanların elle yönlendirilerek yükseltiyi bulmaları ve orada 15 saniye kalmaları sağlandı. Deneyin 2, 3 ve 4. günlerinde atışlar saat yönünde değiştirildi ve her gün farklı bir kadrانından atış yapıldı. Dört gün boyunca her atışta yükseltiyi bulma süreleri (YBS) kaydedildi. Deneyin beşinci günü doğu kadrانındaki gizli yükselti su tankından çıkarıldı. Tüm sıçanlar batı kadrانından suya bırakılarak 60 saniye süreyle suda kalmaları sağlandı. Eskiden yükseltinin bulunduğu doğu kadrانında geçirilen süre (sn) kaydedildi.

## **İstatistiksel Yöntemler**

İstatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) for Windows paket programında yapıldı. Veri sayısının yeterli olduğu durumlarda verilerin ortalama  $\pm$  standart sapma (SS) değerleri hesaplandı ve p değerinin 0.05'in altında olması anlamlı kabul edildi.

Açık alan deneyinde kat edilen mesafe ve hızların karşılaştırılmasında varyans analizi (ANOVA) testinden yararlanıldı.

Öğrenme ve hafıza deneyinde bir, iki, üç ve dördüncü günlerin verileri tekrarlanan ölçümlü varyans analizi (repeated measures ANOVA) testi ile ve beşinci gün verileri ise varyans analizi (ANOVA) testi ile değerlendirildi.

## BULGULAR

Başlangıçta çalışmaya alınan 78 adet yedi günlük sıçan yavrularından altısı çeşitli nedenlerle öldü ve 24'ü planlandığı gibi dekapite edildi. Kalan 48 sıçana davranış deneyleri yapıldı.

Grup M'de deneyin başlangıcında alınan 17 sıçandan ikisi hipoksi-iskemi işlemi sırasında öldü. Üç sıçan hipoksi-iskemi işleminin ardından dekapite edildi. Kalan 12 sıçana davranış deneyleri yapıldı.

Grup A'da başlangıçta alınan 22 sıçandan biri hipoksi-iskemi işlemi sırasında öldü. Üç sıçan hipoksi-iskemi işleminin ardından, üç sıçan kök hücre verilmesinden sonraki üçüncü gün, üç sıçan ise kök hücre verilmesinden iki hafta sonra dekapite edildi. Bir sıçan sonraki günlerde bilinmeyen bir nedenle öldü. Kalan 11 sıçan davranış deneylerine alındı.

Grup AF'de başlangıçta alınan 24 sıçandan ikisi hipoksi-iskemi işlemi sırasında öldü. Üç sıçan hipoksi-iskemi işleminin ardından, üç sıçan kök hücre verilmesinden sonraki üçüncü gün, üç sıçan ise kök hücre verildikten iki hafta sonra dekapite edildi. Kalan 13 sıçan davranış deneylerine alındı.

Grup S'de başlangıçta alınan 15 sıçandan üçü anestezi ve boyun diseksiyonu işlemlerinin ardından dekapite edildi. Kalan 12 sıçan davranış deneylerine alındı.

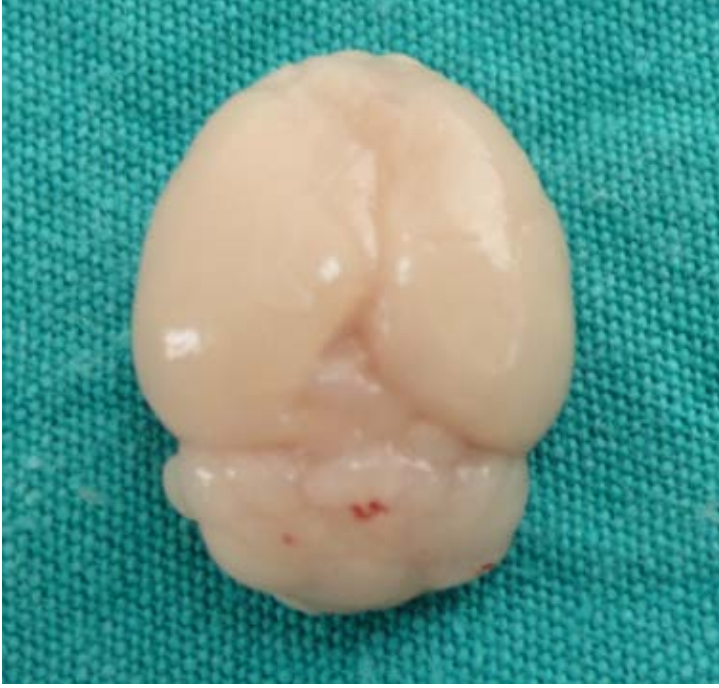
### **Apoptoz Bulguları**

Hipoksi-iskemi uygulamasını takiben dekapite edilen yedi günlük sıçanların beyinleri makroskopik olarak normal görünümdeydi (Resim 6). Yapılan koronal kesitlerde de normal makroskopik bulgular vardı ve kanama, ödem, infarkt alanı saptanmadı. Rutin hematoksilen eozin boyası ile apoptotik nöronlar normal morfoloji gösteren nöronlara göre yuvarlak sınırlı, nükleer kondansasyon ve sitoplazmik büzüşme göstermekteydi. Normal görünümlü nöronlarda TUNEL ile pozitif boyanma gözlenmezken, apoptotik hücrelerin çoğu TUNEL ile nükleer pozitif olarak boyandı. Kaspaz-3 ile apoptotik nöronlarda sitoplazmik ve nükleer pozitif boyanma izlenirken, normal nöronlarda boyanma izlenmedi.

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

Hipoksi-iskemi uygulanan gruplarda (Grup M, A ve AF) TUNEL yöntemi ile saptanan apoptotik hücre sayısı Sham Grubuna (Grup S) göre daha fazlaydı (Resim 7, 8). Hipoksi-iskemi uygulanan gruplarda sağ beyin yarısında sola göre

daha fazla apoptotik hücre gözlenirken, Sham grubunda her iki beyin yarısında benzer şekilde çok az sayıda apoptotik hücre bulunmaktaydı.

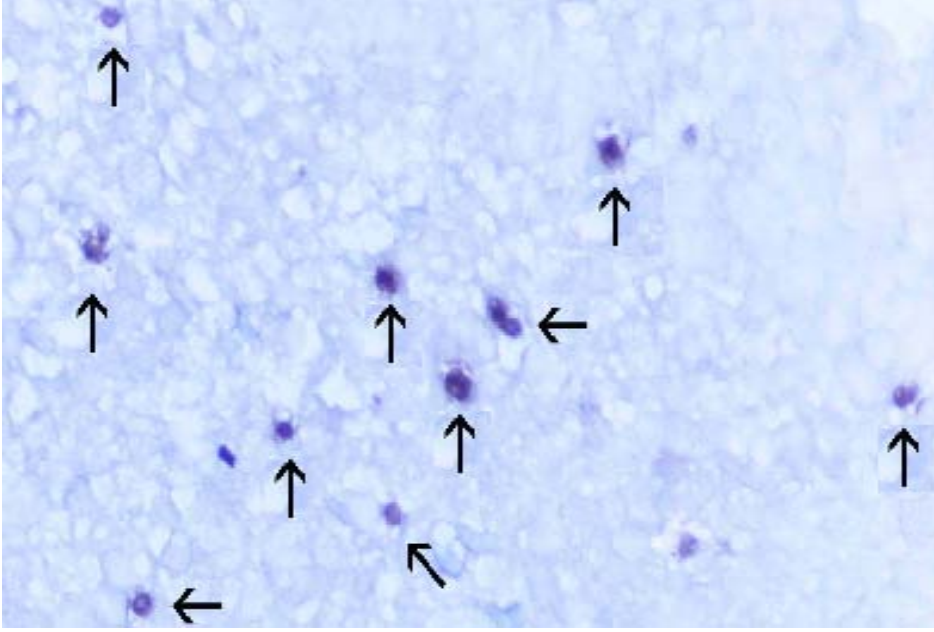


**Resim 6: Doğumu takiben yedinci günde hipoksi iskemi işlemi uygulanan ve ardından dekapite edilen bir sıçanın beyni normal yapıda görünmekte.**

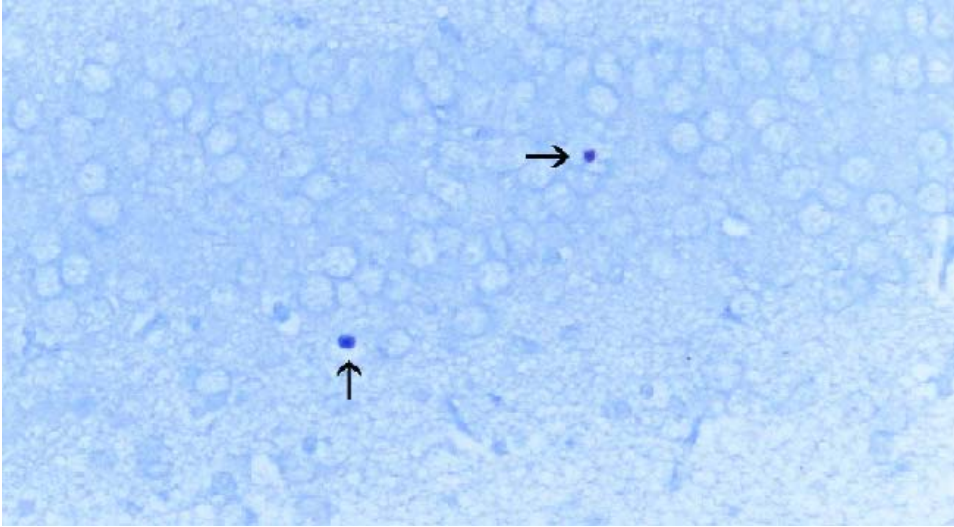
### **Kaspaz-3 İmmünohistokimya Yöntemiyle Beyindeki Apoptotik Hücrelerin Değerlendirilmesi**

Hipoksi-iskemi uygulanan gruplarda (Grup M, A ve AF) Kaspaz-3 İmmünohistokimya yöntemi ile saptanan apoptotik hücre sayısı Sham Grubuna (Grup S) göre daha fazlaydı (Resim 9, 10). Hipoksi- iskemi uygulanan gruplarda sağ beyin yarısında sola göre daha fazla apoptotik hücre gözlenirken, Sham Grubunda her iki beyin yarısında benzer şekilde çok az sayıda apoptotik hücre bulunmaktaydı.

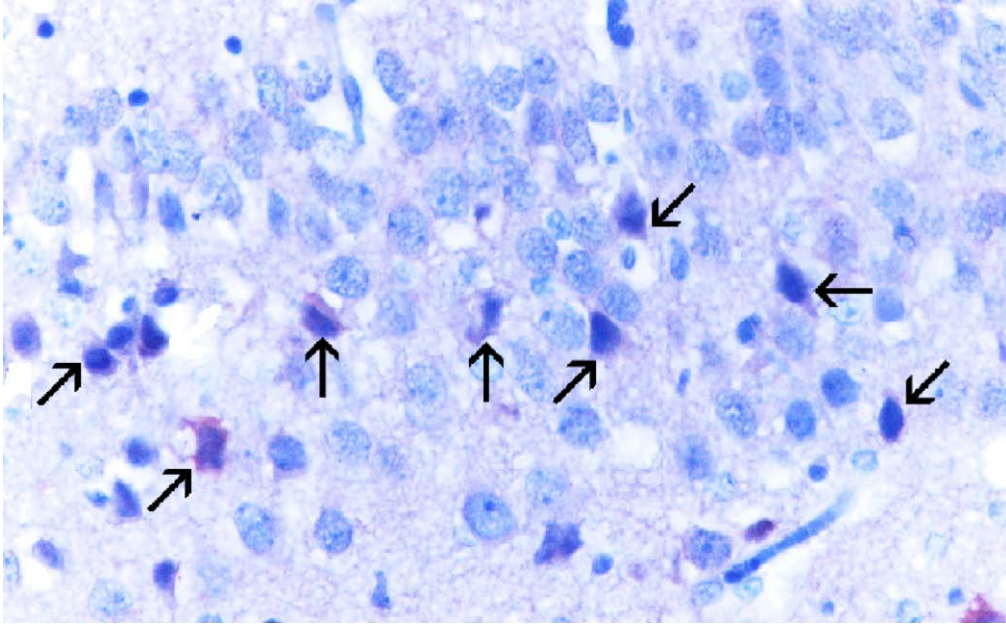




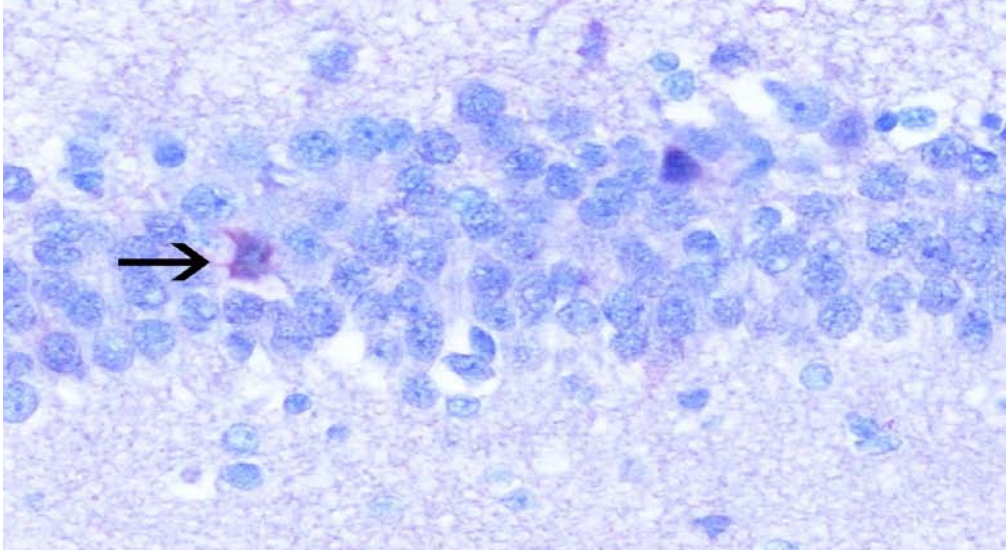
**Resim 7: Hipoksi- iskemi sonrasında erken dönemde beyinde oluşan çok sayıda apoptotik hücre (TUNEL yöntemiyle) görülmekte.**



**Resim 8: Sham grubuna ait bir sıçan beyinde az sayıda apoptotik hücre (TUNEL yöntemi ile) görülmekte.**



**Resim 9: Hipoksi- iskemi sonrasında erken dönemde beyinde çok sayıda apoptotik hücre (Kaspaz- 3 İmmünohistokimya yöntemi ile) görülmekte.**



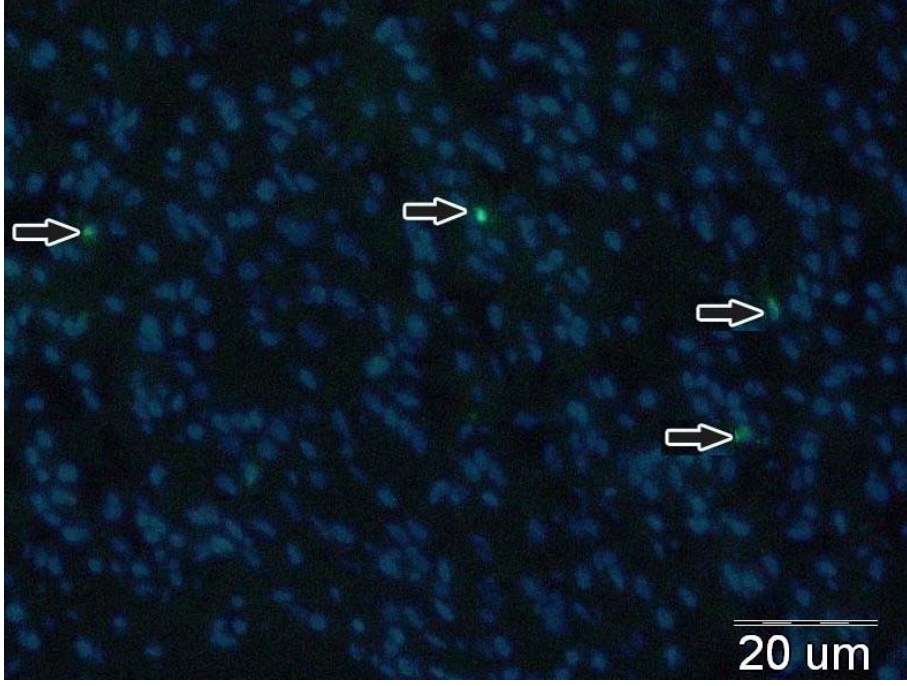
**Resim 10: Sham grubuna ait bir sıçan beyininde az sayıda apoptotik hücre (Kaspaz- 3 İmmünohistokimya yöntemi ile) görülmekte.**

### **Çok Yönlü Astrosit Kök Hücre Verilmesinin Üçüncü Gününde Verilen Hücrelerin Yerleşimlerinin Değerlendirilmesi**

Kök hücre verilmesi işleminin ardından üçüncü günde Grup A ve AF'den dekapite edilen üçer sıçanın beyinleri bütünlükleri bozulmadan çıkarıldı. Beyinler makroskopik olarak incelendiğinde sağ beyin yarıkürelerinin daha küçük olduğu gözlemlendi (Resim 11). Beyin kesitleri incelendiğinde sadece enjeksiyonun yapıldığı bölgede BrdU pozitif çekirdeğe sahip hücreler görüldü (Resim 12).



**Resim 11: Kök hücre verilmesi işleminden üç gün sonra çıkarılan sıçan beyninin sağ yarıküresi daha küçük olarak görülmekte.**



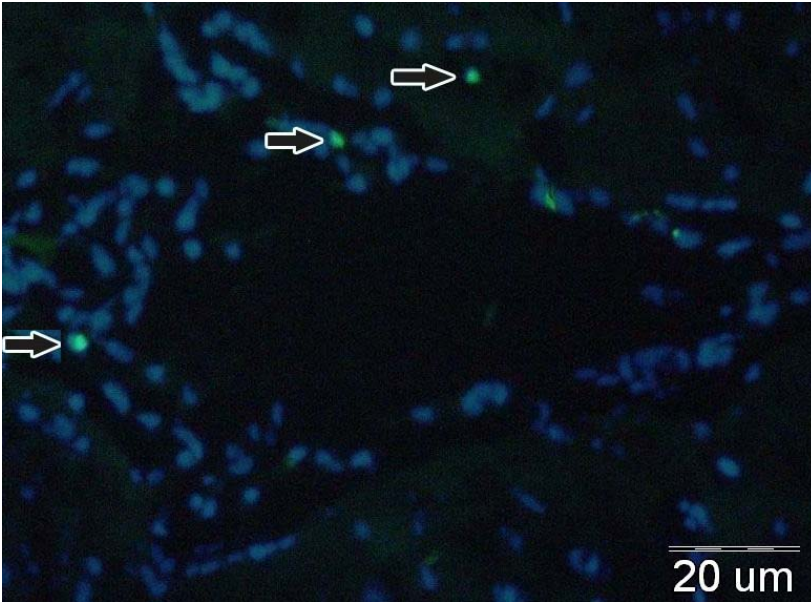
**Resim 12: Çok yönlü astrosit kök hücrelerin verilmesinden üç gün sonra beyindeki enjeksiyon yerinden alınan kesitte BrdU ile işaretli hücreler görülmekte (BrdU: Bromodeoksiüridin).**

### **Çok Yönlü Astrosit Kök Hücre Verilmesinden İki Hafta Sonra Hücrelerin Yerleşimlerinin Değerlendirilmesi**

Kök hücre verilmesi işleminden iki hafta sonra Grup A ve AF'den dekapite edilen üçer sıçanın beyinleri bütünlükleri bozulmadan çıkarıldı. Çıkarılan beyinlerin sağ yarıkürelerinin küçüldüğü ve sınırlarının düzensiz olduğu görüldü (Resim 13). Beyin kesitleri incelendiğinde enjeksiyonun yapıldığı bölgede BrdU pozitif çekirdeğe sahip hiçbir hücre görülmedi. Hipokampusu yakın bölgeden geçen kesitlerde ise BrdU pozitif çekirdeğe sahip hücreler görüldü (Resim 14).



**Resim 13: Kök hücre verilmesi işleminden iki hafta sonra çıkarılan bir sıçan beyinde sağ yarıkürenin küçük ve sınırlarının düzensiz olduğu görülmekte.**



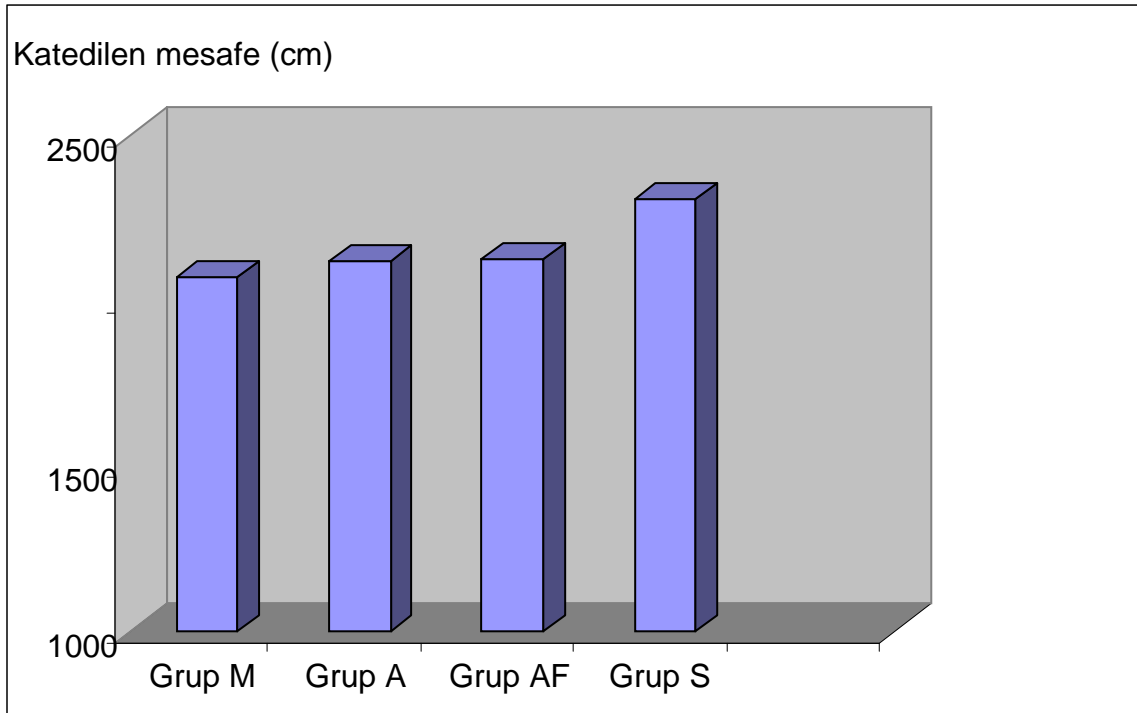
**Resim 14: Çok yönlü astrosit kök hücrelerin verilmesinden iki hafta sonra hipokampusu yakın bölgeden geçen kesitte nekroz alanının çevresine BrdU ile işaretli hücrelerin göç ettikleri görülmekte (BrdU: Bromodeoksiüridin).**

## Açık Alan Deneyi Bulguları

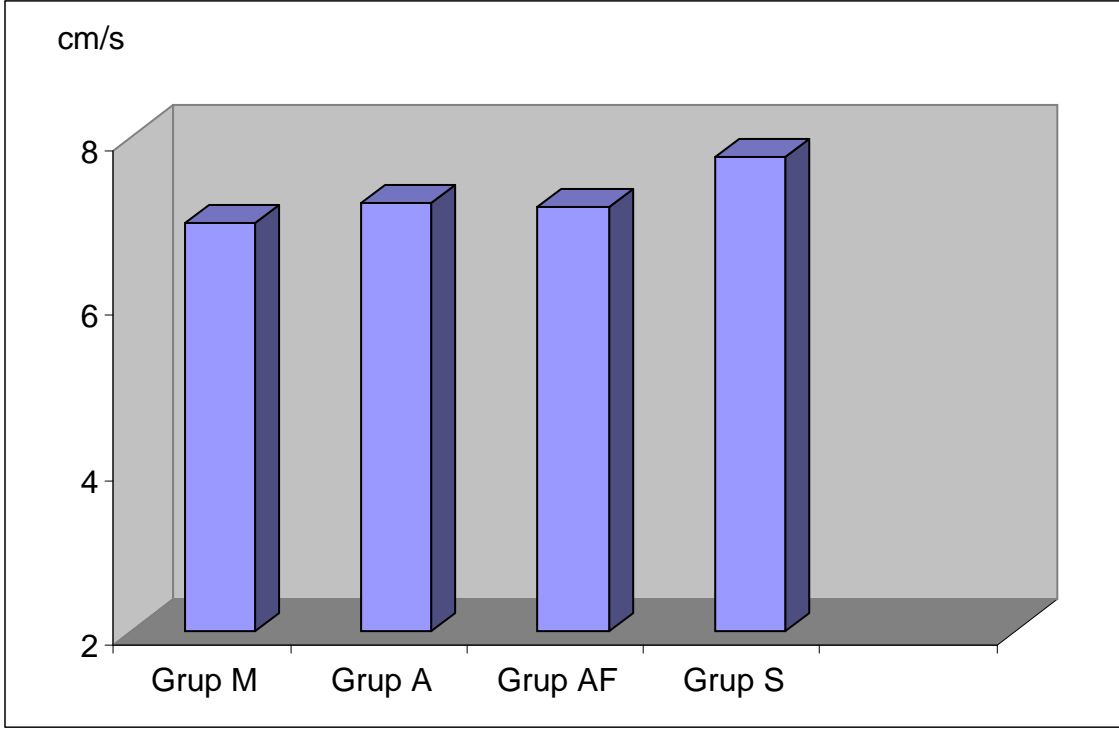
Doğumu takiben 10. hafta sonunda yapılan açık alan deneylerinde katedilen mesafe incelendiğinde en uzun mesafeyi Grup S'nin kat ettiği görüldü. Grup S'yi sırasıyla Grup AF, A ve M takip etmişti ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p=0,87$ ). Grupların hareket etme hızları incelendiğinde en hızlı olan Grup S ve onu takiben sırasıyla Grup A, AF, M idi, ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ( $p=0,86$ ). Grupların katettikleri mesafeler ve hızları Tablo 4, Şekil 4 ve 5 de verilmiştir.

**Tablo 4: Gruplara göre sıçanların katettikleri ortalama mesafeler ve hızlar.**

	Katedilen mesafe (cm)	Hareket hızı (cm/sn)
<b>Grup M</b>	2071± 935	6,95 ± 3,14
<b>Grup A</b>	2120± 585	7,19 ± 1,94
<b>Grup AF</b>	2127± 833	7,15 ± 2,79
<b>Grup S</b>	2305± 458	7,76 ± 1,52
<b>p</b>	0,87	0,86



**Şekil 4: Açık alan deneyinde sıçanların katettikleri mesafelerin gruplara göre dağılımı.**



**Şekil 5: Açık alan deneyinde sıçanların hareket hızlarının gruplara göre dağılımı.**

#### **Morris Su Tankı Öğrenme ve Hafıza Deneyi Bulguları**

Her grup için ayrı ayrı birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü günlerde ortalama yükseltiyi bulma süreleri hesaplandı. Tüm gruplarda ortalama yükseltiyi bulma süreleri gün ilerledikçe istatistiksel olarak anlamlı derecede kısaldı ( $p < 0,001$ ).

Birinci gün grupların yükseltiyi bulma süreleri incelendiğinde yükseltiyi en çabuk Grup S ve ardından sırasıyla Grup M, AF ve A bulmuştu ancak aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p = 0,59$ ).

İkinci günde yükseltiyi en çabuk Grup S ve ardından sırasıyla Grup AF, M ve A bulmuştu ancak aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p = 0,073$ ).

Üçüncü günde yükseltiyi yine en çabuk Grup S ve ardından sırasıyla Grup AF, M ve A bulmuştu. Grup S'deki sıçanlar yükseltiyi  $14.2 \pm 6.0$  saniyede bulurken, diğerleri sırasıyla  $22.9 \pm 14.3$ ,  $26.7 \pm 10.6$ ,  $36.3 \pm 21,9$  saniyede bulmuşlardı. Yükseltiyi en çabuk bulan Grup S'deki sıçanlar ile yükseltiyi en geç bulan Grup

A'daki sıçanlar arasında yükseltiyi bulma süreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ( $p=0,01$ ).

Dördüncü günde yükseltiyi bulma süreleri incelendiğinde yine en çabuk Grup S ve ardından sırasıyla Grup AF, M ve A bulmuştu. Grup S'deki sıçanlar yükseltiyi  $9.2\pm 5.2$  saniyede bulurken, diğerleri sırasıyla  $21.7 \pm 16.1$ ,  $24.0\pm 14.2$ ,  $32.3\pm 22.7$  saniyede bulmuşlardı (Tablo 5, Şekil 6). Yükseltiyi en çabuk bulan Grup S'deki sıçanlar ile yükseltiyi en geç bulan Grup A'daki sıçanlar arasında yükseltiyi bulma süreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ( $p=0,007$ ).

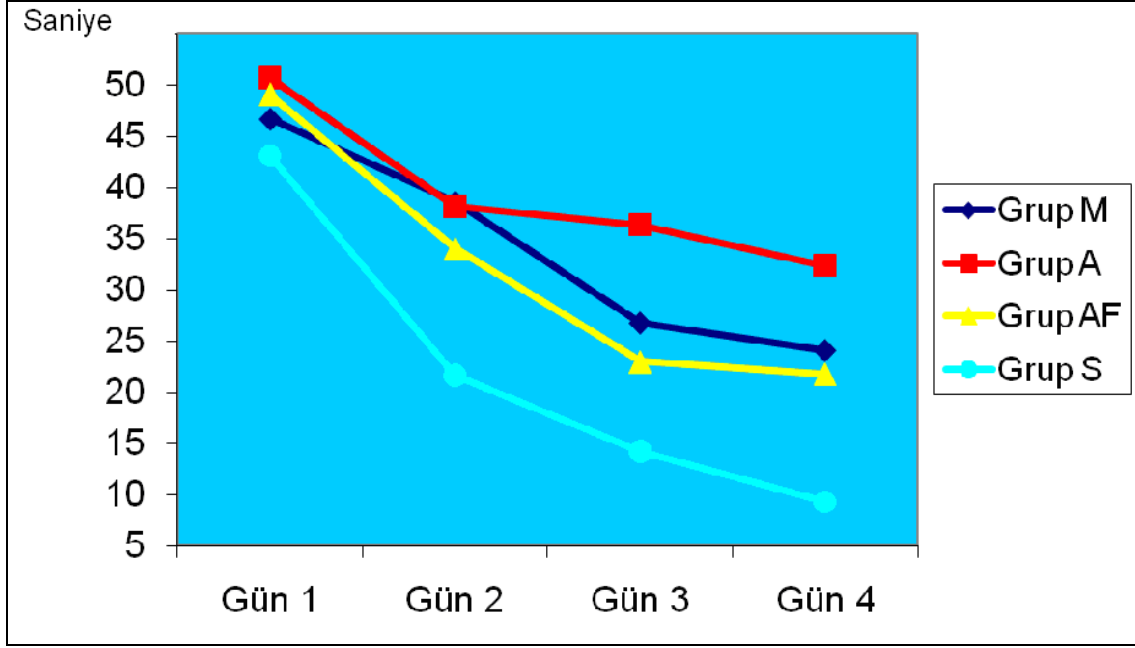
Birinci gün ile dördüncü gün arasındaki yükseltiyi bulma süresi farkı incelendiğinde Grup S'deki sıçanlar en çok öğrenmiş ve 1. güne göre 4. gün  $33.8\pm 14.0$  saniye daha kısa sürede yükseltiyi bulmuştu. Grup S'nin ardından en başarılı olanlar sırasıyla Grup AF ve M idi. Grup A ise en başarısız gruptu ancak gruplar arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0.098$ ) (Şekil 7).

**Tablo 5: Morris su tankı öğrenme ve hafıza deneylerinde grupların günlere göre ortalama yükseltiyi bulma süreleri ve bir ile dördüncü gün arasındaki yükseltiyi bulma süresi farkları.**

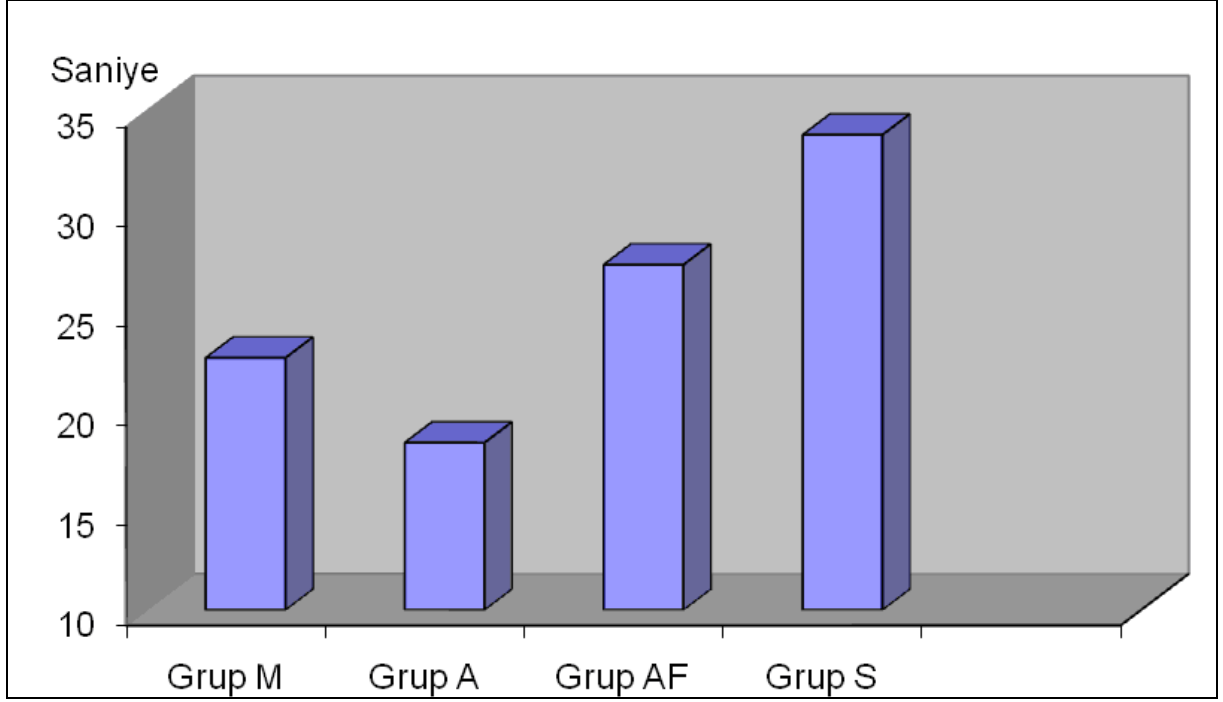
	Yükseltiyi bulma süreleri (saniye)				1- 4.gün arasındaki yükseltiyi bulma süresi farkları
	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	
<b>Grup M</b>	$46,7\pm 11$	$38.5\pm 12$	$26.7\pm 10$	$24.0\pm 14$	$22.6\pm 15$
<b>Grup A</b>	$50,7\pm 10$	$38.1\pm 21$	$36.3\pm 21$	$32.3\pm 22$	$18.3\pm 17$
<b>GrupAF</b>	$49,0\pm 15$	$34.0\pm 15$	$22.9\pm 14$	$21.7\pm 16$	$27.3\pm 12$



<b>Grup S</b>	43,1±10	21.6±7	14.2±6	9.2±5	33.8±14
<b>P</b>	0,596	0,073	0,01	0,007	0.098



**Şekil 6: Morris su tankı öğrenme ve hafıza deneylerinde grupların günlere göre yükseltiyi bulma sürelerinin karşılaştırılması.**

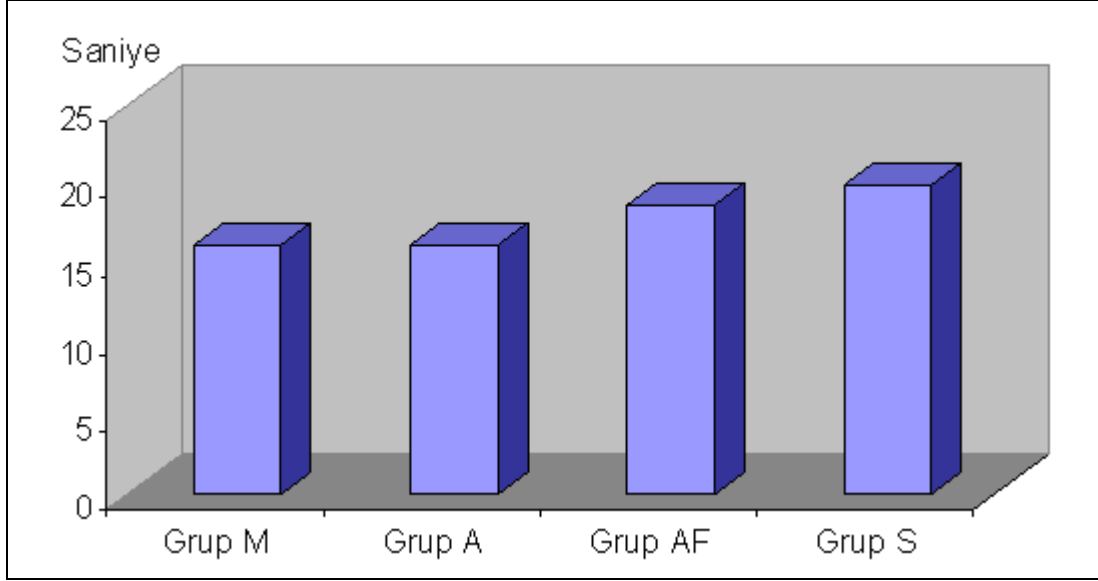


**Şekil 7: Morris su tankı deneyinde bir ile dördüncü gün arasındaki yükseltiyi bulma süresi farkının gruplara göre dağılımı.**

Hafıza deneyinin beşinci gününde sıçanların eskiden yükseltinin olduğu doğru kadranda geçirdikleri süre incelendi. Doğru kadranda en çok zamanı Grup S'deki sıçanların geçirdiği, onu sırasıyla Grup AF ve A'daki sıçanların takip ettiği saptandı. Doğru kadranda en az zamanı ise Grup M'deki sıçanlar geçirmişti, ancak bu süreler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p=0,51$ ) (Tablo 6, Şekil 8).

**Tablo 6: Morris su tankı öğrenme ve hafıza deneyinin beşinci gününde sıçanların gruplara göre doğru kadranda geçirdikleri süreler.**

	Doğru kadranda geçirilen süre (saniye)	p
<b>Grup M</b>	15,93± 4,37	0,51
<b>Grup A</b>	15,96± 7,51	
<b>Grup AF</b>	18,45± 9,04	
<b>Grup S</b>	19,80± 8,06	



**Şekil 8: Morris su tankı öğrenme ve hafıza deneyinin beşinci gününde sıçanların gruplara göre doğu kadranında geçirdikleri süreler.**

#### **Sıçanların Beyin Ağırlıkları ve Makroskopik İnceleme**

Her gruptan 14. haftalarını tamamlamış üç sıçan dekapite edilerek beyin bütünlükleri bozulmadan çıkarıldı. Çıkarılan beyinler makroskopik olarak incelendi. Grup S'ye ait sıçan beyinleri normal olarak izlenirken, doğum sonrası yedinci günde HİBH oluşturulmuş olan Grup M, A ve AF'ye ait sıçan beyinlerinin sağ beyin yarılarının küçülmüş olduğu görüldü (Resim 15). Grup M'ye ait sıçan beyinlerinin sağ yarıküreleri diğer gruplara göre daha küçülmüş ve sınırları daha düzensiz görünümdeydi. Beyin ağırlıklarına bakıldığında Grup S'nin beyin ağırlıklarının en fazla olduğu Grup M'nin ise en az olduğu görüldü (Tablo 7).

**Tablo 7: Gruplara göre sıçanların ortalama beyin ağırlıkları.**

	<b>Miligram</b>
<b>Grup M</b>	1269
<b>Grup A</b>	1357
<b>Grup AF</b>	1427
<b>Grup S</b>	1641

### Sıçanların Vücut Ağırlıkları

Sıçanlar yedi günlük iken çalışmaya alındıklarında ortalama vücut ağırlıkları  $12,5 \pm 0,9$  gram idi ve gruplar arasında anlamlı fark yoktu. Sıçanlar 14. haftada tekrar tartıldıklarında Sham Grubundakiler diğer gruplardakilerden istatistiksel olarak anlamlı derecede daha ağırdı ( $p < 0,001$ ). Diğer gruplar arasında ağırlık açısından anlamlı fark yoktu (Tablo 8).

**Tablo 8: Gruplara göre sıçanların ortalama vücut ağırlıkları.**

	Gram
Grup M	$236,7 \pm 25,8$
Grup A	$240,8 \pm 36,3$
Grup AF	$262,3 \pm 28,8$
Grup S	$300,5 \pm 37,6$
p	$< 0,001$



**Resim 15: 14. haftada her gruptan çıkarılan sıçan beyinlerinden birer örnek makroskopik olarak izlenmekte. Grup S'ye ait sıçan beyni normal olarak izlenirken diğer gruplardaki sıçan beyinlerinin sağ yarıkürelerinin küçüldüğü görülmekte. Grup M'den çıkarılan sıçan beyninin sağ yarıküresinin diğer gruplara göre daha küçük ve sınırlarının daha düzensiz olduğu görülmekte.**

## TARTIŞMA

Tüm dünyada yenidoğan ölümlerinin ve sakatlıklarının önde gelen nedenlerinden biri perinatal dönemde meydana gelen hipoksik iskemik ensefalopatidir<sup>1</sup>. Son yıllarda gebe ve yenidoğan izleminde kaydedilen ilerlemelere karşın görülme sıklığında büyük bir değişiklik olmamıştır ve ne yazık ki istenen düzeyde etkili bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır<sup>1</sup>. Yakın zamana kadar destek tedavisi dışında bir tedavi seçeneği bulunmazken, HİE'nin fizyopatolojisinin daha iyi anlaşılması ile birlikte çok sayıda tedavi yöntemi geliştirilmiştir. Bunlardan arasında N-asetil sistein, allopurinol, magnezyum sülfat, eritropoetin, melatonin, desferoksamin, ksenon, nitrik oksit sentaz baskılayıcıları, kalsiyum kanal kapatıcıları, serbest radikal temizleyicileri, soğutma tedavisi, kök hücre nakli ve büyüme faktörleri tedavileri sayılabilir<sup>8</sup>.

Perinatal HİE'de en önemli sorun nöronların ve glial hücrelerin ölmeleri, buna karşılık beyin ölen hücrelerin yerine yenilerini koyamamasıdır. Bu nedenle tedavi yöntemleri üç ana nokta üzerinde yoğunlaşmıştır. Bunlardan ilki beyin hücrelerinin ölmesinin önlenmesi, ikincisi ölen hücrelerin yerine yenilerinin dışarıdan verilmesi, üçüncüsü ise beyin gerekli yeni hücreleri kendisinin yapması için desteklenmesidir.

Günümüzde doğum öncesi izlem yöntemleri arasında hangi bebeğin hipoksi ve iskemiye maruz kalacağını kesin olarak gösterecek bir yöntem bulunmamaktadır. Bu nedenle zaman zaman doğum öncesi izlemlerinde herhangi bir sorunun olmadığı düşünülen bebeklerde de HİE gelişebilmektedir. Erken dönemde genellikle enerji eksikliği hücrelerin ölümünden sorumlu olmaktadır. Yeniden canlandırma uygulamaları gereken bebeklerde ise yeniden kanlanma ve oksijenlenmeyle birlikte gelişen oldukça karmaşık ve çok sayıda mekanizma hücreleri ölüme götürmektedir. Yeniden kanlanma ve oksijenlenmenin başlamasından hücre ölümünün gerçekleşmesine kadar geçen süre bir bakıma tedavi için önemli bir fırsattır. Bu nedenle deneysel tedavi yöntemlerinin çoğu bu döneme odaklanmaktadır. Günümüzde bu dönemde en etkili olan tedavi yöntemi soğutma tedavisidir. Soğutma tedavisi çok sayıda mekanizma üzerine etki ederek beyin metabolizma hızını, uyarıcı aminoasit salınımını, apoptozisi, NO üretimini ve lipid peroksidasyonunu azaltır, serbest radikal hasarını sınırlandırır ve daha çok nöronun ölmesini engeller<sup>72</sup>. Soğutma tedavisinin etkin olduğu artık tüm dünyada

kabul görmüştür ve birçok klinik tarafından uygulanmaya başlanmıştır<sup>1</sup>. Yakın zamanda yayınlanan bir toplu çözümlenmede soğutma tedavisi ile ölüm ve ağır sakatlıkların azaldığı bildirilmiştir<sup>6</sup>. Ancak soğutma tedavisi ile ilgili de önemli sorunlar bulunmaktadır. Hangi hastaların soğutulacağı, soğutma tedavisine en geç ne zaman başlanabileceği, tüm vücut soğutma mı yoksa seçici baş soğutma mı yapılması gerektiği gibi çok sayıda cevap bekleyen soru bulunmaktadır<sup>1</sup>. Yapılan çalışmaların hemen hepsinde yalnızca 35 haftanın üzerinde gebelik yaşına sahip bebekler soğutulmuştur, bunun altındaki bebeklere ne yapılacağı önemli bir sorundur<sup>3-7</sup>. Yine yapılan çalışmaların hepsinde perinatal asfiksiyi takiben ilk altı saat içinde ulaşılabilen bebekler çalışmalara alınmış ve soğutulmuştur<sup>3-7</sup>. Geç dönemde getirilen bebeklere nasıl bir tedavi uygulanacağı yine önemli bir sorundur. Daha da önemlisi soğutma tedavisinden ağır derecede HİE'li bebeklerin pek fayda görmedikleri bildirilmiştir<sup>3</sup>. Yakın zamanda yayınlanan çok merkezli randomize kontrollü bir çalışmada ise soğutma tedavisinin ağır sakatlıkları sadece %15 oranında azaltabildiği gösterilmiştir<sup>7</sup>. Bütün bunların gösterdiği gibi soğutma tedavisinin etkinliği kanıtlanmıştır ancak tüm hasta grupları için yeterince etkin ve kullanılabilir değildir. Bu durumda soğutma tedavisine ek olarak yapılacak yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç olduğu görülmektedir. Ayrıca yeniden kanlanma döneminde etkili olması beklenen tedavi yöntemlerinin hiçbiri geç dönemde etkili olmayacaklardır.

Beynin kendi kendini yenileme yeteneği olduğu ancak yakın zamanlarda gösterilebilmiştir<sup>167</sup>. Hipoksi- iskeminin nöronal kök hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını uyardığı yine yakın zamanda gösterilmiştir<sup>168</sup>. Ancak kendi kendine yapılan bu çoğalma ve farklılaşmanın oldukça sınırlı etkileri vardır ve klinik olarak izlendiği gibi sakatlıkları önleyememektedir. Bu nedenle HİBH'de dışarıdan kök hücre verilmesi gündeme gelmiştir<sup>9</sup>. Son yıllarda erişkin hastalıklarında kök hücre verilmesi ile ilgili çalışmalar yoğun olarak yürütülmektedir. Spinal kord yaralanmaları, Huntington hastalığı, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, multipl skleroz, iskemik beyin hastalıkları gibi erişkin hastalıkları için kök hücre verilmesi deneysel hayvan modellerinde uygulanmıştır<sup>9-10</sup>. Yakın zamanda kök hücre nakli Huntington hastalığı, Parkinson hastalığı ve inmesi olan hastalarda klinik olarak da uygulanmaya başlanmıştır. Bu çalışmalardan alınan ilhamla yenidoğan hayvanlarda HİBH'de kök hücre nakliyle ilgili araştırmalar yapılmaya başlanmıştır.

Kök hücre nakillerinde embriyonal kök hücreler, nöronal kök hücreler, kemik iliği hücreleri, mezankimal kök hücreler, göbek kordonu kanından elde edilen hücreler gibi çeşitli hücreler kullanılabilir<sup>9-10</sup>. Biz bu çalışmada daha önceden yapılan araştırmalarda nöronlara ve glial hücrelere dönüşebildiği gösterilmiş olan çok yönlü astrosik kök hücreleri kullandık.

Yakın zamanda yayınlanan bir araştırmada dokuz günlük fare yavrularına hipoksi- iskemi yapılmış ve ardından beyinde yeni hücre yapımı incelenmiştir<sup>9</sup>. Bu çalışmada hipoksi-iskemi sonrasında beyin kendi kendine hücre yapımının ilk gün baskılandığı, ikinci gün artmaya başladığı ve üçüncü gün ise zirve yaptığı saptanmıştır. Bu da hipoksi-iskemi sonrasında ilk günde hücre ölümünün ön planda olduğunu ve hücre çoğalmasının baskılandığını, ikinci günden itibaren hücre çoğalması için uygun ortamın oluşmaya başladığını ve üçüncü günden sonra uygun ortamın oluştuğunu düşündürür. Biz de çalışmamızda kök hücre naklini bu nedenle hipoksi- iskemiden beş gün sonra yaptık. Gelecekte klinik olarak kök hücre naklinin soğutma ile birlikte yapılabileceği düşünülürse soğutmanın tamamlandığı üçüncü günden sonra kök hücre nakli uygun olacak gibi görünmektedir.

HİBH oluşturulan hayvan çalışmalarında kök hücreler arter, ven, periton, kalp veya beyin içine verilebilmektedir. Kök hücreler ven ya da periton yoluyla verildiklerinde beyine ulaşmaları güç olmaktadır<sup>169,170</sup>. Biz bu nedenle hücreleri beyin içine verdik. Ancak gelecekte yapılacak insan çalışmalarında göbek arteri yoluyla hücrelerin kalbe verilmesi beyine ulaşmaları için uygun bir yol olabilir. Çünkü yapılan hayvan çalışmalarında kalbin içine veya internal karotid artere kök hücre verilmesiyle hücrelerin beyine ulaştıkları gösterilmiştir<sup>170</sup>. HİBH oluşturulmuş dokuz günlük sıçanlara burun içinden mezankimal kök hücrelerin verildiği bir çalışmada da hücrelerin hasarlı beyin bölgesine gittikleri gösterilmiştir<sup>11</sup>. Bu çalışmada MKH verilmesi ile hasarlı beyin alanının azaldığı ve sıçanlarda işlevsel iyileşme olduğu bildirilmiştir. Ancak sıçanların anatomik yapılarının farklı olması nedeniyle hücrelerin insan burnundan verilmesi benzer şekilde sonuçlanamayabilir.

Yedi günlük sıçan yavrularında yapılan bir çalışmada HİBH oluşturulduktan beş gün sonra 1µl içinde 50 bin ÇYAKH beyin içine verilmiştir. Bu hücrelerin hasarlanmış beyin alanına göç etikleri, nöronlara ve astrositlere dönüştükleri gösterilmiştir<sup>75</sup>. Bu çalışmada verilen kök hücrelerin beyin hasarını azaltıp azalmadığı araştırılmamıştır. Ayrıca davranış deneyleri de yapılmadığı için verilen kök hücrelerin işlevsel bir iyileşme sağlayıp sağlamadıkları da incelenmemiştir. Bu

nedenle bu çalışmada verilen çok yönlü astrosit kök hücrelerin gerçek anlamda işe yarayıp yaramadığını söylemek güçtür. Ancak verilen hücrelerin hasarlı beyin alanlarına göçünü, nöronlara ve astrositlere farklılaşmasını göstermesi açısından önemli bir çalışmadır. Biz de HİBH oluşturduğumuz yedi günlük sıçanların beyinleri içine 2 µl içinde 100bin ÇYAKH ver dik ve sıçanlara 10. ve 12. hafta da davranış deneyleri yaptık. Ayrıca 14. haftada sıçanların beyinlerinin makroskopik özelliklerini ve ağırlıklarını değerlendirdik. Verdiğimiz hücrelerin enjeksiyondan üç gün sonra verilen beyin alanında olduklarını gördük. Kök hücre naklinden iki hafta sonra ise enjeksiyon yerinde hiç hücre bulunmazken, hipokampusu yakın alanlarda işaretli hücrelerin olduğunu gördük. Kök hücre verilmeyen gruptan (Grup M) çıkarılan sıçan beyinleri makroskopik olarak incelendiğinde sağ yarımkürelerinin diğer gruplara göre daha fazla küçüldüğü ve sınırlarının düzensizleştiği görüldü, ancak beyin ağırlıkları açısından belirgin bir farklılık yoktu. Davranış deneylerinde ne lokomotor aktivitede ne de öğrenme ve hafıza testlerinde herhangi bir iyileşme bulamadık. Bilgilerimize göre bu iki çalışmanın dışında HİBH oluşturulmuş yenidoğan sıçanlarda kök hücre olarak ÇYAKH'nin verildiği başka bir çalışma yoktur. Bu iki çalışmanın sonuçlarına göre hipoksik iskemik beyin hasarı sonrasında verilen ÇYAKH'ler hasarlı beyin alanına göç etmekte, nöronlara ve astrositlere dönüşmekte ancak işlevsel düzelme sağlayamamaktadırlar. Bu sonuç verilen hücre sayısının az olmasından kaynaklanabileceği gibi verilen kök hücre tipinden ve bu kök hücrelerin salgılayacağı faktörlerin etkilerinin yetersizliğinden de kaynaklanmış olabilir.

Yaptığımız bu çalışmada şaşırtıcı gibi görünen Grup S ile Grup M arasında ölçülebilen davranış öğelerinde istatistiksel farklılık olmayışıdır. Grup M'deki sıçanların açık alan deneyinde kat ettikleri mesafenin Grup S'dekilerden daha az olması gerektiği düşünülebilir. Bizim çalışmamızda geriye dönük olarak video kayıtlarının incelenmesinde Grup M'deki sıçanlar Grup S'dekilere göre anlamsız ve garip hareketler yaparak (kendi etrafında dönme gibi) Grup S'dekilerin kat ettikleri mesafeye ulaştıkları görülmüştür. Başka bir deyişle sıçanlar normal olmayan hareketlerde bulunmuşlar fakat bu durum hız ve kat edilen mesafeye etki etmemişlerdir.

Öğrenme ve hafızanın değerlendirildiği Moris su tankı deneylerinde de Grup M'deki sıçanların Grup S'dekilerden belirgin şekilde daha kötü durumda olması gerektiği düşünülebilir. Ancak çalışmamızda böyle bir durum ortaya çıkmamıştır. Video kayıtlarının geriye dönük olarak incelenmesinde Grup M deki sıçanların



büyük bir kısmının yükseltiyi 60 saniyede bulamadıkları ve elle yönlendirilerek yükseltiyi bulmalarının sağlandığı görülmüştür. Sıçanların yükseltiyi bulmaları için beklediğimiz süreyi diğer bazı çalışmalarda olduğu gibi 120-180 saniye olarak belirleseydik Grup M ve S'deki sıçanlar arasında belki de öğrenme ve hafıza açısından istatistiksel farklılıklar ortaya çıkabilirdi.

Yapılan bir başka çalışmada HİBH oluşturulmuş yedi günlük sıçanlara hipoksi-iskemiden üç gün sonra insan kemik iliğinden alınan mezankimal kök hücreler kalp içerisine verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde verilen MKH'lerin beyne gittikleri ancak hasarlı ve hasarsız beyin alanlarında benzer sayıda dağıldıkları görülmüştür. MKH verilen grupta hasarlı beyin alanının azaldığı ancak bunun doğrudan verilen MKH'lerce sağlanmadığı saptanmıştır. Ayrıca MKH verilen grupta işlevsel iyileşme de görülmüştür. Sonuç olarak MKH verilmesi ile doğrudan olmasa da dolaylı olarak beyin hasarı azalmış, işlevsel iyileşme sağlanmıştır<sup>170</sup>. Bizim çalışmamızda ise verilen kök hücreler hasarlı beyin alanlarına göçmüş, ancak işlevsel testlerde iyileşme olmamıştır. Görüldüğü gibi kök hücrelerin hasarlı beyin alanına göçmeleri ile işlevsel iyileşme sağlamaları arasında doğrudan bir ilişki bulunmamaktadır, muhtemelen kök hücreler dolaylı etkilerle beyin hasarını azaltmakta ve işlevsel iyileşme sağlamaktadırlar.

Velthoven ve arkadaşları HİBH oluşturdukları farelerin beyinlerine hipoksi-iskemiden üç gün sonra bir farenin kemik iliğinden alınmış olan mezankimal kök hücreleri vermişlerdir. MKH verilen grup, medium verilen grupla karşılaştırıldığına nöronların, oligodendrositlerin ve astrositlerin anlamlı derecede daha fazla çoğaldığı, mikrogliaların azaldığı saptanmıştır. Çoğalan hücrelere ikili etiketleme yapıldığında çoğalan hücrelerin tamamına yakınının nakledilen hücreler değil beyin kendi öz hücreleri olduğu gösterilmiştir. Buda nakledilen hücrelerin salgıladıkları bazı faktörlerle beyinde hücre çoğalmasını uyardıklarını düşündürmüştür. Sonuçta bu çalışmada MKH verilmesi ile nöron ve oligodendrosit yapımı artmış, hasarlı beyin alanı azalmış ve yapılan davranış testlerinde işlevsel iyileşme olduğu gösterilmiştir<sup>9</sup>. Bu çalışmanın da gösterdiği gibi HİBH'de kök hücre verilmesinin yararlı etkileri verilen hücrelerin doğrudan hasar alanına oturmaları ve çoğalmaları ile değil muhtemelen salgıladıkları faktörlerle olmaktadır. Bu faktörlerin anlaşılması ve bulunması HİE'nin tedavisinin doğrudan ve daha etkin bir şekilde yapılmasını sağlayabilir. Böylece kök hücre verilmesine gerek kalmayabilir. Bu durumda kök hücre verilmesiyle ilişkili kanser gelişme riski de ortadan kalkacaktır.

Günümüzde HİBH oluşturulmuş hayvan çalışmalarında çeşitli büyüme faktörleri ile tedaviler denenmektedir<sup>12-15</sup>. Yedi günlük sıçanlarda yapılan bir çalışmada burun içine IBF- 1 verilmesi ile nöronların ve oligodendroglial hücrelerin daha fazla çoğaldıkları, apoptozisin baskılandığı ve işlevsel testlerde iyileşme olduğu bildirilmiştir<sup>12</sup>. Bir başka çalışmada HİBH oluşturulan yedi günlük sıçanlara beyin içine BKNF infüzyonu yapılmış ve BKNF'nin nöron koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir<sup>14</sup>. Yakın zamanda yapılan başka bir çalışmada HİBH oluşturulan yedi günlük sıçanlara 5, 10, 20 ve 40ng VEBF beyin ventrikülü içine verilmiştir. Bu çalışmada 10 ve 20ng dozunda VEBF verilmesi ile beyin hasarının azaldığı bildirilmiştir<sup>15</sup>.

Üç günlük sıçan yavrularında iki taraflı karotid arterler bağlanarak iskemik beyin hasarı oluşturulan bir çalışmada 54 sıçana ventrikül içine 10ng/g dozunda FBF-2, 54 sıçana ise serum fizyolojik verilmiştir. 54 sıçan ise Sham Grubuna alınmış ve iki taraflı karotid arterleri bulunmuş ancak bağlanmamıştır. Üç grup dört, yedi ve 14. günlerde subventriküler alanda yeni hücre yapımı açısından karşılaştırılmıştır. FBF-2 verilen grupta her üç günde de diğer gruplara göre yeni hücre yapımının daha fazla olduğu bulunmuştur. Çoğalan hücre tipleri incelendiğinde FBF-2 verilen grupta nöronlar, astrositler ve oligodendrositlerde kontrol grubuna göre daha fazla artış bulunmuştur. FBF-2 verilen grupta çoğalan hücrelerin en büyük bölümünü nöronlar oluşturmuştur. Bu çalışmanın sonucunda yazarlar FBF-2'nin yalnızca hücre çoğalmasını uyarmakla kalmadığını aynı zamanda nöronlara, astrositlere ve oligodendrositlere farklılaşmayı da uyardığını vurgulamışlardır<sup>16</sup>.

Wang ve arkadaşları orta serebral arteri bağlanarak iskemi yapılan erişkin sıçanlara FBF-2'nin sistemik uygulamalardan kaynaklanan istenmeyen etkilerinden kaçınmak amacıyla burundan FBF-2 vermişlerdir. Yapılan bu araştırmanın sonucunda yazarlar burundan FBF-2 uygulamasıyla hücre çoğalmasının ve nöronlara dönüşümün uyarıldığını ve işlevsel testlerde iyileşme olduğunu bildirmişlerdir<sup>17</sup>.

FBF-2'nin nöron koruyucu etkilerinin iyi bilinmesine rağmen HİBH oluşturulmuş yenidoğan hayvanlarda FBF-2'nin verildiği çalışma sayısı oldukça sınırlı sayıdadır. Biz de bu nedenle HİBH oluşturduğumuz yenidoğan sıçanlara ÇYAKH ile birlikte diğer büyüme faktörlerine göre FBF-2'yi vermeyi tercih ettik.

Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada yedi günlük sıçanlarda HİBH oluşturularak gruplara sırasıyla nöronal kök hücre, kondroitinaz ABC, nöronal kök hücre ile birlikte kondroitinaz ABC ve fosfatlı tuz tamponu verilmiştir. Yedi gün sonra sıçan beyinleri çıkarılarak histolojik olarak incelendiğinde tek başına nöronal kök hücre verilen grupta beyin hasarında azalma olmazken, nöronal kök hücre ile birlikte kondroitinaz ABC verilen grupta beyin hasarında anlamlı derecede azalma olmuştur<sup>10</sup>.

Biz yaptığımız bu çalışmada HİBH oluşturduğumuz yenidoğan sıçanlara bir gruba ÇYAKH, bir gruba ÇYAKH ile birlikte FBF-2 ve bir gruba medium verdik. Tek başına ÇYAKH verilen grupta lokomotor aktivite deneyinde, öğrenme ve hafıza deneylerinde, 14. haftada beyin ve vücut ağırlıklarında medium grubu ile oldukça benzer sonuçlar bulduk. Bu sonuçlar bize Grup A'da verilen kök hücrelerin hasarlı beyin alanına göçmelerine rağmen işlevsel olarak önemli derecede bir iyileşme sağlayamadıklarını göstermektedir. Benzer çalışmalar yapılacak olursa daha fazla sayıda ÇYAKH'lerin veya mezankimal kök hücreler gibi başka kök hücrelerin verilmesi denenebilir.

ÇYAKH ile birlikte FBF-2 verilen grubun ise lokomotor aktivitelerinin daha iyi, öğrenme ve hafıza deneylerinin daha başarılı, 14. haftada beyin ağırlıklarının ve vücut ağırlıklarının daha fazla olduğu ve bütün sonuçları ile Sham Grubuna en yakın grup olduğunu saptandık. Sonuçlar istatistiksel açıdan irdelendiğinde anlamlı fark olmasa da ÇYAKH ile birlikte FBF-2 verilen grubun tek başına ÇYAKH veya medium verilen gruptan daha iyi olduğu söylenebilir. Bu çalışmada FBF-2'nin doğrudan mı yoksa dolaylı olarak verilen ÇYAKH'leri uyarması ile mi etkili olduğunu söylemek güçtür. Eğer tek başına FBF-2 verdiğimiz bir grup olsaydı bu konuda yorum yapmak daha kolay olabilirdi.

Sonuç olarak bu çalışma ile yenidoğan sıçanlarda oluşturulan HİBH'de çok yönlü astrosit kök hücre tedavisinin etkili olmadığı ancak kök hücre ile birlikte FBF-2 verilmesinin olumlu sonuçlar sağladığı gösterilmiştir. Hipoksik iskemik beyin hasarında tek başına FBF-2, soğutma tedavisi ile birlikte FBF-2 veya diğer büyüme faktörlerinin verileceği yeni çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Hipoksik iskemik beyin hasarı oluşturulduktan sonra verilen çok yönlü astrosit kök hücrelerin üç gün sonra enjekte edilen yerde buldukları saptandı. İki hafta sonra ise enjekte edilen yerde hiçbir işaretli hücre görülmezken, hipokampus etrafındaki enfarkt alanında işaretli hücrelerin bulunduğu saptandı. Bu nedenle verilen çok yönlü astrosit kök hücrelerin hasarlı beyin alanına göç ettikleri sonucuna varıldı.
2. 10. haftada yapılan açık alan davranış deneyinde lokomotor aktivite açısından başarı durumuna göre gruplar S, AF, A, M olarak sıralanıyordu. Ancak aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Bununla birlikte Grup M'deki sıçanların diğer gruplardaki sıçanlara göre anlamsız bir şekilde hareket ettikleri (kendi etraflarında sürekli dönme gibi) görüldü.
3. 12. haftada yapılan öğrenme ve hafıza deneylerinin üçüncü gününde başarı durumuna göre gruplar S, AF, M, A olarak sıralanıyordu. Grup A istatistiksel olarak anlamlı derecede Grup S'den başarısızdı ( $p= 0.01$ ).
4. 12. haftada yapılan öğrenme ve hafıza deneylerinin dördüncü gününde başarı durumuna göre gruplar S, AF, M, A olarak sıralanıyordu. Grup A Grup S'den istatistiksel olarak anlamlı derecede başarısızdı ( $p= 0.007$ ).
5. 12. haftada yapılan öğrenme ve hafıza deneylerinde bütün gruplardaki sıçanlar birinci günden dördüncü güne kadar her geçen gün yükseltinin yerini istatistiksel olarak anlamlı derecede daha çabuk bulmuşlardı ( $p<0,001$ ). Bu açıdan sırasıyla en başarılı gruplar S, AF, M, A idi. Ancak gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark yoktu.
6. 12. haftada yapılan öğrenme ve hafıza deneylerinin beşinci gününde başarı durumuna göre gruplar S, AF, A ve M olarak sıralanıyordu. Ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.
7. Üç, dört, beş ve altıncı maddelerdeki anlatılan öğrenme ve hafıza deneyi sonuçlarının daha iyi irdelenmesi için sıçanların yükseltiyi bulmaları için beklenen süre ve son gün doğu kadranında geçirdikleri sürelerin 120-180 saniyeye çıkarılabileceği düşünüldü.
8. 14. haftada sıçanların vücut ağırlıkları tartıldığında gruplar ağırdan hafife doğru Grup S, AF, A ve M olarak sıralanıyordu. Grup S'deki sıçanlar diğer

gruplardan anlamlı derecede daha ağırdı. Diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.

9. 14. haftada her gruptan dekapite edilen üçer sıçanın beyin ağırlıkları karşılaştırıldığında ağırdan hafife doğru gruplar S, AF, A ve M olarak sıralanıyordu.
10. Bütün değerlendirme yöntemlerinde Grup A ile M'de (açık alan davranış deneyi, öğrenme ve hafıza deneyleri, beyin ağırlıkları, vücut ağırlıkları) birbirine benzeyen kötü sonuçlar alındı. Bu nedenle Grup A'da verilen çok yönlü astrosit kök hücrelerin hasarlı beyin alanına göçmelerine rağmen önemli derecede işlevsel bir iyileşme sağlayamadıkları sonucuna varıldı. Benzer çalışmalar yapılacak olursa daha fazla sayıda çok yönlü astrosit kök hücrelerin veya mezankimal kök hücreler gibi başka kök hücrelerin verilmesi önerilebilir.
11. Kök hücre ile birlikte FBF- 2 verilen grupta (Grup AF) bütün değerlendirme yöntemlerinde (açık alan davranış deneyi, öğrenme ve hafıza deneyleri, beyin ağırlıkları, vücut ağırlıkları) Sham Grubuna en yakın sonuçlar alındı. Bu nedenle HİBH'de FBF-2'nin yararlı etkilerinin olabileceğini düşünmekteyiz.
12. Tek başına veya soğutma tedavisi ile birlikte FBF-2 verilmesinin HİBH tedavisinde etkili olabileceğini ve bu nedenle bu konuda yeni çalışmalar yapılmasının uygun olacağını düşünmekteyiz.

## 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. [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.
4. Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, et al. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *N Engl J Med.* 2005; 353:1574-84.
5. [Azzopardi D](#), [Brocklehurst P](#), [Edwards D](#), et al. Whole body hypothermia for the treatment of perinatal asphyxial encephalopathy: a randomised controlled trial. *BMC Pediatr* 2008; 8:17.
6. [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. 2010;doi: 10.1136/bmj.c363.
7. Jacobs SE, Morley CJ, Inder TE, et al. Whole-Body Hypothermia for Term and Near-Term Newborns With Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: A Randomized Controlled Trial. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2011; 165:692-700.
8. [Kelen D](#), [Robertson NJ](#). Experimental treatments for hypoxic ischaemic encephalopathy. [Early Hum Dev.](#) 2010; 86:369-77.
9. 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.
10. Sato Y, Nakanishi K, Hayakawa M, et al. Reduction of brain injury in neonatal hypoxic-ischemic rats by intracerebroventricular injection of neural stem/progenitor cells together with chondroitinase ABC. *Reprod Sci.* 2008; 15:613-20.

11. 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.
12. 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.
13. Kirschner PB, Henshaw R, Weise J, et al. Basic fibroblast growth factor protects against excitotoxicity and chemical hypoxia in both neonatal and adult rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 1995; 15:619-623.
14. Galvin KA, Oorschot DE. Continuous low-dose treatment with brain-derived neurotrophic factor or neurotrophin-3 protects striatal medium spiny neurons from mild neonatal hypoxia/ischemia: a stereological study. *Neuroscience* 2003;118:1023- 1032.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
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. Shalak L, Perlman JM. Hypoxic-ischemic brain injury in the term infant-current concepts. *Early Hum Dev* 2004;80:125- 41.
21. 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.
22. Cowan F. Outcome after intrapartum asphyxia in term infants. *Semin Neonatol* 2000; 5:127-40.

23. 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.
24. 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.
25. Edwards AD, Mehmet H. Apoptosis in perinatal hypoxic–ischemic cerebral damage. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1996; 22:494-8.
26. Marshall JC, Malam Z, Jia S. Modulating neutrophil apoptosis. *Novartis Found Symp.* 2007; 280: 53-72.
27. Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997; 88: 347-54.
28. Vannucci SJ, Hagberg H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J Exp Biol* 2004;207:3149-54.
29. Fatemi A, Wilson MA, Johnston MV. Hypoxic-ischemic encephalopathy in the term infant. *Clin Perinatol.* 2009; 36:835-58.
30. Grow J, Barks DE. Pathogenesis of hypoxic–ischemic cerebral injury in the term infant: current concepts. *Clin Perinatol* 2002; 29:585-602
31. Palmer C. Hypoxic–ischemic encephalopathy. Therapeutic approaches against microvascular injury, and role of neutrophils, PAF, and free radicals. *Clin Perinatol* 1995; 22:481-517.
32. Yanasaki Y, Shoozurhara H, Onodera H, et al. Blocking of IL-1 activity is a beneficial approach to ischemia and brain edema formation. *Acta Neurochir* 1995; 60:300-2.
33. Northington FJ, Chavez-Valdez R, Martin LJ. Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol.* 2011; 69:743-58.
34. Can G. Perinatal asfiksi. In: Yurdakök M, Erdem G (eds). *Neonatoloji*. 1. baskı. Ankara: Alp Ofset, 2004:719-29.
35. Apak S. Hipoksik iskemik ensefalopati. In: Dağoğlu T, Ovalı F (eds). *Neonatoloji*. 2. baskı. İstanbul: Nobel Matbaacılık, 2007:651-66.
36. Volpe JJ. Hypoxic-ischemic encephalopathy: clinical aspects. In: Volpe JJ (eds). *Neurology of the Newborn*. 5th ed. Philadelphia: Elsevier, 2008:400-80.



37. Gomella TL. Neonatology. 6th ed. Newyork: Mc Graw Hill Medical, 2009:624-36.
38. American Collge of Obstetricians and Gynecologists (ACOG). Neonatal encephalopathy and cerebral palsy: executive summary. *Obstet Gynecol.* 2004;103:780-1.
39. Ramaswamy V, Horton J, Vandermeer B, Buscemi N, Miller S, Yager J. Systematic review of biomarkers of brain injury in term neonatal encephalopathy. *Pediatr Neurol.* 2009; 40:215-26.
40. 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.
41. Rutherford M, Malamateniou C, McGuinness A, Allsop J, Biarge MM, Counsell S. Magnetic resonance imaging in hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Hum Dev.* 2010; 86:351-60.
42. Toet MC, Lemmers MA, van Schelven LJ, van Bel F. Cerebral oxygenation and electrical activity after birth asphyxia: the irrelation to outcome. *Pediatrics* 2006;117(Suppl. 9):333-9.
43. Meek JH, Elwell CE, Mc Cormick DC, Edwards AD, Townsend JP, Stewart AL, et al. Abnormal cerebral haemodynamics in perinatally asphyxiated neonates related to outcome. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999; 81:110-5.
44. Van Bel F, Dorrepaal CA, Benders MJNL, Zeeuwe PEM, van deBor M, Berger HM. Changes in cerebral hemodynamics and oxygenation in the first 24 hours after birth asphyxia. *Pediatrics* 1993; 92:365-72.
45. Gucuyener K, Beken S, Ergenekon E, et al. Use of amplitude-integrated electroencephalography (aEEG) and near infrared spectroscopy findings in neonates with asphyxia during selective head cooling. *Brain Dev* (in press).
46. Ancora G, Maranella E, Locatelli C, Pierantoni L, Faldella G. Changes in cerebral hemodynamics and amplitude integrated EEG in an asphyxiated newborn during and after cool cap treatment. *Brain Dev* 2009; 31:442–4.
47. Lai MC, Yang SN. Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Biomed Biotechnol* (in press).

48. 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.
49. Glass HC, Ferriero DM. Treatment of hypoxic-ischemic encephalopathy in newborns. *Curr. Treat Options Neurol* 2007; 9:414–423.
50. Gonzalez FF, Ferriero DM. Therapeutics for neonatal brain injury. *Pharmacol. Ther.* 2008; 120:43–53.
51. 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.
52. Perlman JM, Wyllie J, Kattwinkel J, et al. Neonatal resuscitation: 2010 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science with Treatment Recommendations. *Circulation* 2010; 122 (suppl 2):516-538.
53. Scafidi J, Gallo V. New concepts in perinatal hypoxia ischemia encephalopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2008; 8:130-138.
54. Glass HC, Glidden D, Jeremy RJ, Barkovich AJ, Ferriero DM, Miller SP. Clinical neonatal seizures are independently associated with outcome in infants at risk for hypoxic-ischemic brain injury. *J Pediatr* 2009; 155:318–23.
55. Wirrell EC, Armstrong EA, Osman LD, Yager JY. Prolonged seizures exacerbate perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Pediatr Res* 2001; 50:445–54.
56. Miller SP, Weiss J, Barnwell A, Ferriero DM, Latal-Hajnal B, Ferrer-Rogers A, et al. Seizure-associated brain injury in term newborns with perinatal asphyxia. *Neurology* 2002; 58:542–8.
57. Hall R, Hall F, Daily D. High-dose phenobarbital therapy in term newborn infants with severe perinatal asphyxia: a randomized, prospective study with three-year follow-up. *J Pediatr* 1998; 132: 345-8.
58. Ruth V, Virkola K, Paetau R, Raivio K. Early high-dose phenobarbital treatment for prevention of hypoxic-ischemic brain damage in very low birth weight infants. *J Pediatr* 1988; 112:81-6.
59. Singh D, Kumar P, Narang A. A randomized controlled trial of phenobarbital in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2005; 18:391-5.

60. Goldberg R, Moscoso P, Bauer C, Bloom F, Curless R, Burke B, et al. Use of barbiturate therapy in severe perinatal asphyxia: a randomized controlled trial. *J Pediatr* 1986;109:851-6.
61. Filippi L, Poggi C, la Marca G, Furlanetto S, Fiorini P, Cavallaro G, Plantulli A, Donzelli G, Guerrini R. Oral topiramate in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy treated with hypothermia: a safety study. *J Pediatr* 2010; 157:361-6.
62. 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.
63. Guerrini R, Parmeggiani L. Topiramate and its clinical applications in epilepsy. *Expert Opin Pharmacother* 2006; 7:811-23.
64. Yang Y, Shuaib A, Li Q, Siddiqui MM. Neuroprotection by delayed administration of topiramate in a rat model of middle cerebral artery embolization. *Brain Res* 1998; 804:169-76.
65. Lee SR, Kim SP, Kim JE. Protective effect of topiramate against hippocampal neuronal damage after global ischemia in the gerbils. *Neurosci Lett* 2000; 281:183-6.
66. 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.
67. Schubert S, Brandl U, Brodhun M, Ulrich C, Spaltmann J, Fiedler N, et al. Neuroprotective effects of topiramate after hypoxia-ischemia in newborn piglets. *Brain Res* 2005; 1058:129-36.
68. 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.
69. 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.
70. Fürwentsches A, Bussmann C, Ramantani G, Ebinger F, Philippi H, Pöschl J, et al. Levetiracetam in the treatment of neonatal seizures: a pilot study. *Seizure* 2010; 19:185-9.

71. Kim JS, Kondratyev A, Tomita Y. Neurodevelopmental impact of antiepileptic drugs and seizures in the immature brain. *Epilepsia* 2007; 48:19–26.
72. [Drury PP](#), [Bennet L](#), [Gunn AJ](#). Mechanisms of hypothermic neuroprotection. [Semin Fetal Neonatal Med.](#) 2010; 15:287-92.
73. Atıcı A, Çelik Y, Gülaşı S, Turhan AH, Okuyaz Ç. Hipoksik iskemik ensefalopatili yenidoğanlarda seçici baş soğutma tedavisi ile tüm vücut soğutma tedavisinin karşılaştırılması: Erken dönem sonuçlar 19. Ulusal Neonatoloji Kongresi, 17-20 Nisan 2011, Muğla. Bildiri Özetleri Kitabı, 19.
74. Battin MR, Dezoete JA, Gunn TR, Gluckman PD, Gunn AJ. Neurodevelopmental outcome of infants treated with head cooling and mild hypothermia after perinatal asphyxia. *Pediatrics* 2001; 107: 480–84.
75. Zheng T, Rossignol C, Leibovici A, Anderson KJ, Steindler DA, Weiss MD. Transplantation of multipotent astrocytic stem cells into a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Brain Res.* 2006; 1112:99-105.
76. Khan M, Sekhon B, Jatana M, Giri S, Gilg A, Sekhon C, et al. Administration of N- acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a rat model of experimental stroke. *J Neurosci Res* 2004; 76: 519–27.
77. Wang X, Svedin P, Nie C, Lapatto R, Zhu C, Gustavsson M, et al. N- acetylcysteine reduces lipopolysaccharide-sensitized hypoxic-ischemic brain injury. *Ann Neurol* 2007; 61:263–71.
78. 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.
79. Palmer C, Towfighi J, Roberts RL, Heitjan DF. Allopurinol administered after inducing hypoxia-ischemia reduces brain injury in 7-day-old rats. *Pediatr Res* 1993; 33:405–11.
80. Chaudhari T, McGuire W. Allopurinol for preventing mortality and morbidity in newborn infants with suspected hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Sys Rev* 2008; DOI: 10.1002/14651858.
81. 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.

82. [Bhat MA](#), [Charoo BA](#), [Bhat JI](#), [Ahmad SM](#), [Ali SW](#), [Mufti MU](#). Magnesium sulfate in severe perinatal asphyxia: a randomized, placebo-controlled trial. [Pediatrics](#) 2009;123:764-9.
83. Spandou E, Soubasi V, Papoutsopoulou S, et al. Neuroprotective effect of long-term MgSO<sub>4</sub> administration after cerebral hypoxia-ischemia in newborn rats is related to the severity of brain damage. *Reprod Sci* 2007;14:667–677.
84. Franks N, Dickinson R, de Sousa S, Hall A, Lieb W. How does xenon produce anaesthesia? *Nature* 1998; 26:324.
85. Dingley JTJ, Porter H, Thoresen M. Xenon provides short-term neuroprotection in neonatal rats when administered after hypoxia-ischemia. *Stroke* 2006; 37:501–6.
86. Ma D, Hossain M, Chow A, Arshad M, Battson R, Sanders R, et al. Xenon and hypothermia combine to provide neuroprotection from neonatal asphyxia. *Ann Neurol* 2005; 58:182–93.
87. Sanders RD, Ma D, Maze M. Argon neuroprotection. *Crit Care* 2010; 14:117.
88. Lee MY, Kuan YH, Chen HY, Chen TY, Chen ST, Huang CC, 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.
89. Chen HY, Chen TY, Lee MY, et al. Melatonin decreases neurovascular oxidative/nitrosative damage and protects against early increases in the blood–brain barrier permeability after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Pineal Res* 2006; 41:175–82.
90. Lee EJ, Lee MY, Chen HY, Hsu YS, Wu TS, Chen ST, et al. Melatonin attenuates gray and white matter damage in a mouse model of transient focal cerebral ischemia. *J Pineal Res* 2005; 38:42–52.
91. Miller SL, Yan EB, Castillo-Meléndez M, Jenkin G, DW W. Melatonin provides neuroprotection in the late-gestation fetal sheep brain in response to umbilical cord occlusion. *Dev Neurosci* 2005; 27:200–10.
92. Fulia F, Gitto E, Cuzzocrea S, Reiter RJ, Dugo L, Gitto P, Barberi S, Cordaro S, Barberi I. Increased levels of malondialdehyde and nitrite/nitrate in the blood of asphyxiated ewborns: reduction by melatonin. *J Pineal Res*. 2001; 31:343-9.

93. [Levene MI](#). Cool treatment for birth asphyxia, but what's next? [Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed](#). 2010; 95:154-7.
94. Kumral A, Tüzün F, Oner MG, Genç S, Duman N, Ozkan H. Erythropoietin in neonatal brain protection: The past, the present and the future. *Brain Dev* 2011; 33:632-43.
95. Tarcan A. Prematüre anemisi. *J Paediatr Child Health* 2010; 53:298-304.
96. Ohls RK, Ehrenkranz RA, Das A, et al. Neurodevelopmental outcome and growth at 18 to 22 months' corrected age in extremely low birth weight infants treated with early erythropoietin and iron. *Pediatrics* 2004; 114:1287–91.
97. Ruth V, Widness JA, Clemons G, Raivio KO. Postnatal changes in serum immunoreactive erythropoietin in relation to hypoxia before and after birth. *J Pediatr* 1990; 116:950–4.
98. Kellert BA, McPherson RJ, SE J. A comparison of high-dose recombinant erythropoietin treatment regimens in brain-injured neonatal rats. *Pediatr Res* 2007; 61:451–5.
99. Gonzalez FF, McQuillen P, Mu D, Chang Y, Wendland M, Vexler Z, et al. Erythropoietin enhances long-term neuroprotection and neurogenesis in neonatal stroke. *Dev Neurosci* 2007; 29:321–30.
100. Zhu C, Kang W, Xu F, Cheng X, Zhang Z, Jia L, et al. Erythropoietin improved neurologic outcomes in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 2009; 124:218-26.
101. Laudénbach V, Mantz J, Lagercrantz H, Desmots JM, Evrard P. Effects of alpha (2)-adrenoceptor agonists on perinatal excitotoxic brain injury: comparison of clonidine and dexmedetomidine. *Anaesthesiology* 2002; 96:134–41.
102. Dean JM, George S, Naylor AS, Mallard C, Gunn AJ, Bennet L. 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.
103. 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.

104. O'Mara K, Gal P, Ransom JL, et al. Successful use of dexmedetomidine for sedation in a 24-week gestational age neonate. *Ann Pharmacother.* 2009; 43:1707-13.
105. Gidday JM. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7:437-48.
106. Yellon D, Downey J. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* 2003; 83:1113–51.
107. Zhou Y, Fathali N, Lekic T, Ostrowski RP, Chen C, Martin RD, Tang J, Zhang JH. Remote limb ischemic postconditioning protects against neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rat pups by the opioid receptor/Akt pathway. *Stroke.* 2011; 42:439-44.
108. 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; 44:277-282.
109. 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.
110. 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.
111. Papazisis G, Pourzitaki C, Sardeli C, Lallas A, Amaniti E, Kouvelas D. Deferoxamine decreases the excitatory amino acid levels and improves the histological outcome in the hippocampus of neonatal rats after hypoxia-ischemia. *Pharmacol Res* 2008; 57:73-8.
112. Palmer C, Roberts RL, Bero C. Deferoxamine posttreatment reduces ischemic brain injury in neonatal rats. *Stroke* 1994; 25:1039–45.
113. Shadid M, Buonocore G, Groenendaal F, et al. Effect of deferoxamine and allopurinol on non-protein-bound iron concentrations in plasma and cortical brain tissue of newborn lambs following hypoxia–ischemia. *Neurosci Lett* 1998; 248:5–8.
114. Sarco DP, Becker J, Palmer C, et al. The neuroprotective effect of deferoxamine in the hypoxic–ischemic immature mouse brain. *Neurosci Lett* 2000; 282:113–6.

115. Hamada Y, Hayakawa T, Hattori H, Mikawa H. Inhibitor of nitric oxide synthesis reduces hypoxicischemic brain damage in the neonatal rat. *Pediatr Res* 1994; 35:10-14.
116. Ashwal S, Cole DJ, Osborne TN, Pearce WJ. Dual effects of L-NAME during transient focal cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1994; 267:276-84.
117. Groenendaal F, de Graaf RA, van Vliet G, Nicolay K. Effects of hypoxia-ischemia and inhibition of nitric oxide synthase on cerebral energy metabolism in newborn piglets. *Pediatr Res* 1999; 45:827-33.
118. Marks KA, Mallard CE, Roberts I, Williams CE, Gluckman PD, Edwards AD. Nitric oxide synthase inhibition and delayed cerebral injury after severe cerebral ischemia in fetal sheep. *Pediatr Res* 1999; 46:8-12.
119. 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.
120. Tsuji M, Higuchi Y, Shiraishi K, Kume T, Kaike A, Hattori H. Protective effect of aminoguanidine on hypoxicischemic brain damage and temporal profile of brain nitric oxide in neonatal rat. *Pediatr. Res* 2000; 47:79-83.
121. van den Tweel ER, Peeters-Scholte CM, van Bel F, Heijnen CJ, Groenendaal F. Inhibition of nNOS and iNOS following hypoxia-ischaemia improves long-term outcome but does not influence the inflammatory response in the neonatal rat brain. *Dev Neurosci* 2002; 24:389-95.
122. 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 Uzmanlık Tezi, 2009.
123. Taskin E, Ozcan K, Canacankatan N, Satar M, Yapicioglu HY, Erdogan S. 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.
124. Tutak E, Satar M, Zorludemir S, Erdoğan S, Yapicioğlu H, Narlı N. Neuroprotective effects of indomethacin and aminoguanidine in the newborn rats with hypoxic-ischemic cerebral injury. *Neurochem Res*. 2005; 30:937-42.



125. Nijboer CH, Heijnen CJ, Groenendaal F, van Bel F, Kavelaars A. Alternate pathways preserve tumor necrosis factor $\alpha$  production after nuclear factor- $\kappa$ B inhibition in neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Stroke* 2009; 40, 3362-8.
126. 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.
127. Büyükdere 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.
128. Atıcı A, Bozlu G, Turhan AH et al. The role of trapidil on neuronal apoptosis in neonatal rat model of hypoxic ischemic brain injury. *Early Hum Dev* 2008; 84:243-7.
129. Strauss MB, Hargens AR, Gershuni DH, et al. Reduction of skeletal muscle necrosis using intermittent hyperbaric oxygen in a model compartment syndrome. *J Bone Joint Surg Am* 1983; 65:656-62.
130. Calvert JW, Yin W, Patel M, et al. Hyperbaric oxygenation prevented brain injury induced by hypoxia-ischemia in a neonatal rat model. *Brain Res* 2002; 951:1-8.
131. Wang XL, Zhao YS, Yang YJ, Xie M, Yu XH. Therapeutic window of hyperbaric oxygen therapy for hypoxicischemic brain damage in newborn rats. *Brain Res* 2008; 1222:87-94.
132. Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* <http://genomebiology.com/2001/2/3/reviews/3005.3>. Erişim tarihi: 12.06.2011.
133. Yamashita T, Yoshioka M, Itoh N. Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochem. Biophys Res Commun* 2000; 277: 494–8.
134. Zechel S, Werner S, Unsicker K, von Bohlen und Halbach O. Expression and functions of fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in hippocampal formation. *Neuroscientist* 2010; 16:357-73.
135. Chen CH, Poucher SM, Lu J, Henry PD. Fibroblast growth factor 2: from laboratory evidence to clinical application. *Curr Vasc Pharmacol* 2004; 2:33-43.

136. Baird A, Klagsbrun M. The fibroblast growth factor family: an overview. *Ann NY Acad Sci* 1991; 638:11-4.
137. Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin D B. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocrine Rev* 1997; 18:26-45.
138. Okada-Ban M, Thiery JP, Jouanneau J. Fibroblast growth factor-2, *IJBCB* 2000; 32:263-267.
139. Edelman ER, Mathiowitz E, Langer R, Klagsbrun M. Controlled and modulated release of basic fibroblast growth factor. *Biomaterials* 1991; 12:619-626.
140. Nissen NN, Shankar R, Gamelli RL, Singh A, DiPietro LA. Heparin and heparan sulphate protect basic fibroblast growth factor from nonenzymic glycosylation. *Biochem J* 1999; 338:637-642.
141. Çetin M, Çapan Y. bFGF (Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü) ve Formülasyonlarında Yeni Yaklaşımlar Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi 2004; 24:107-24.
142. Gospodarowicz D, Cheng J, Lui GM, Baird A, Bohlen P. Isolation by heparin-sepharose affinity chromatography of brain fibroblast growth factor: Identity with pituitary fibroblast growth factor, *Proc Natl Acad Sci* 1984; 81:6963-71.
143. Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweiger L. Fibroblast growth factor. *Mol Cell Endocrinol* 1986; 46:187–204.
144. Santiago FS, Lowe HC, Day FL, Chesterman CN, Khachigian LM. Early growth response factor-1 induction by injury is triggered by release and paracrine activation by fibroblast growth factor-2. *Am J Pathol* 1999; 154:937-44.
145. Reuss B, von Bohlen und Halbach O. 2003. Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res* 313:139–57.
146. Eckenstein FP. 1994. Fibroblast growth factors in the nervous system. *J Neurobiol* 25:1467–80.
147. Ernfors P, Lonnerberg P, Ayer-LeLievre C, Persson H. Developmental and regional expression of basic fibroblast growth factor mRNA in the rat central nervous system. *J Neurosci Res* 1990; 27:10–5.
148. Bean AJ, Elde R, Cao YH, Oellig C, Tamminga C, Goldstein M, and others. Expression of acidic and basic fibroblast growth factors in the substantia nigra of rat, monkey, and human. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88:10237–41.
149. Grothe C, Zachmann K, Unsicker K. Basic FGF-like immunoreactivity in the developing and adult rat brainstem. *J Comp Neurol* 1991; 305:328–36.

150. Gomez-Pinilla F, Lee JW, Cotman CW. Distribution of basic fibroblast growth factor in the developing rat brain. *Neuroscience* 1994; 61:911–23.
151. Gonzalez AM, Berry M, Maher PA, Logan A, Baird A. A comprehensive analysis of the distribution of FGF-2 and FGFR1 in the rat brain. *Brain Res* 1995; 701:201–26.
152. Grothe C, Janet T. Expression of FGF-2 and FGF receptor type 1 in the adult rat brainstem: effect of colchicine. *J Comp Neurol* 1995; 353:18–24.
153. Eckenstein F, Woodward WR, Nishi R. Differential localization and possible functions of aFGF and bFGF in the central and peripheral nervous systems. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 638:348–60.
154. Ornitz DM, Leder P. 1992. Ligand specificity and heparin dependence of fibroblast growth factor receptors 1 and 3. *J Biol Chem* 1991; 267:16305–11.
155. Monfils MH, Driscoll I, Vandenberg PM, Thomas NJ, Danka D, Kleim JA, Kolb B. Basic fibroblast growth factor stimulates functional recovery after neonatal lesions of motor cortex in rats. *Neuroscience* 2005; 134:1-8.
156. Vaccarino FM, Schwartz ML, Raballo R, et al. Changes in cerebral cortex size are governed by fibroblast growth factor during embryogenesis. *Nat Neurosci* 1999; 2:246–53.
157. Perez JA, Clinton SM, Turner CA, Watson SJ, Akil H. A new role for FGF2 as an endogenous inhibitor of anxiety. *J Neurosci* 2009; 29:6379–87.
158. Cheng Y, Black IB, DiCicco-Bloom E. Hippocampal granule neuron production and population size are regulated by levels of bFGF. *Eur J Neurosci* 2002; 15:3–12.
159. Sun D, Bullock MR, McGinn MJ, et al. Basic fibroblast growth factor enhanced neurogenesis contributes to cognitive recovery in rats following traumatic brain injury. *Exp Neurol* 2009; 216:56–65.
160. Monfils MH, Driscoll I, Kamitakahara H, Wilson B, Flynn C, Teskey GC, and others. FGF-2-induced cell proliferation stimulates anatomical, neurophysiological and functional recovery from neonatal motor cortex injury. *Eur J Neurosci* 2006; 24:739–49.
161. Martone ME, Hu BR, Ellisman MH. Alterations of hippocampal postsynaptic densities following transient ischemia. *Hippocampus* 2000; 10:610–6.

162. Wei OY, Huang YL, Da CD, Cheng JS. Alteration of basic fibroblast growth factor expression in rat during cerebral ischemia. *Acta Pharmacol Sin* 2000; 21:296-300.
163. Sakaki T, Yamada K, Otsuki H, Yuguchi T, Kohmura E, Hayakawa T Brief exposure to hypoxia induces bFGF mRNA and protein and protects rat cortical neurons from prolonged hypoxic stress. *Neurosci Res* 1995; 23:289-96.
164. Carli M, Prontera C, Samanin R. Effect of 5-HT<sub>1A</sub> 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.
165. Eşsizoğlu 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.
166. 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.
167. Bartley J, Soltau T, Wimborne H, et al. BrdU-positive cells in the neonatal Mouse hippocampus following hypoxic-ischemic brain injury. *BMC Neurosci* 2005; 6:15.
168. Yang Z, Covey MV, Bitel CL, Ni L, Jonakait GM, Levison SW. Sustained neocortical neurogenesis after neonatal hypoxic-ischemic injury. *Ann Neurol* 2007; 61:199–208.
169. Pendharkar AV, Chua JY, Andres RH, et al. Biodistribution of neural stem cells after intravascular therapy for hypoxic-ischemia. *Stroke* 2010; 41:2064-70.
170. Lee JA, Kim BI, Jo CH, et al. Mesenchymal stem-cell transplantation for hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rat model. *Pediatr Res* 2010; 67:42-6.

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AMPA</b>	$\alpha$ -Amino-3-Hidroksi-5-Metil-4-İzoksazol Propiyonat
<b>ADH</b>	Antidiüretik Hormon
<b>aEEG</b>	Amplitüd-entegre Elektroensefalogram
<b>APAF-1</b>	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
<b>ATP</b>	Adenozin Trifosfat
<b>BKNF</b>	Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör
<b>BOS</b>	Beyin Omurilik Sıvısı
<b>BrdU</b>	Bromodeoxyuridine
<b>BT</b>	Bilgisayarlı Tomografi
<b>Ca</b>	Kalsiyum
<b>Caspase</b>	Cysteine Containing Aspartate Specific Protease (Sistein İçeren Aspartat Özgün Proteaz)
<b>CK</b>	Kreatin Kinaz
<b>CK-BB</b>	Beyine Özgü Kreatin Kinaz
<b>ÇYAKH</b>	Çok Yönlü Astrosit Kök Hücre
<b>DAB</b>	Diaminobenzidin
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>EBF</b>	Epidermal Büyüme Faktörü
<b>EEG</b>	Elektroensefalogram
<b>eNOS</b>	Endotel Hücrelerindeki Nitrik Oksit Sentaz
<b>FBF</b>	Fibroblast Büyüme Faktörü
<b>FBFA</b>	Fibroblast Büyüme Faktörü alması
<b>GFAP</b>	Glial Fibriler Asidik Protein
<b>gr</b>	Gram
<b>HİE</b>	Hipoksik İskemik Ensefalopati
<b>HİBH</b>	Hipoksik İskemik Beyin Hasarı
<b>HSPG</b>	Heparan Sülfat Proteoglikan
<b>İBF</b>	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
<b>IL</b>	İnterlökin
<b>iNOS</b>	İmmün Hücrelerdeki Nitrik Oksit Sentaz
<b>K</b>	Potasyum

<b>L-NAME</b>	N-Nitro-L-Arginin Metil Ester
<b>MBP</b>	Myelin Bazik Protein
<b>MKH</b>	Mezankimal Kök Hücre
<b>MRG</b>	Manyetik Rezonans Görüntüleme
<b>MSS</b>	Merkezi Sinir Sistemi
<b>Na</b>	Sodyum
<b>Naa</b>	N-Asetil Aspartat
<b>NAS</b>	N-Asetil Sistein
<b>NMDA</b>	N-Metil D-Aspartat
<b>nNOS</b>	Nöronlardaki Nitrik Oksit Sentaz
<b>NO</b>	Nitrik Oksit
<b>NOS</b>	Nitrik Oksit Sentaz
<b>NSE</b>	Nöron Spesifik Enolaz
<b>P</b>	Fosfor
<b>PAF</b>	Platelet Activating Factor (Trombosit Uyarıcı Faktör)
<b>PCr</b>	Fosfokreatinin
<b>Pi</b>	İnorganik Fosfat
<b>SEP</b>	Somato-Sensory Evoked Potentials (Somato-Sensöryel Uyarılmış Potansiyeller)
<b>SOR</b>	Serbest Oksijen Radikalleri
<b>Sn</b>	Saniye
<b>SS</b>	Standart Sapma
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
<b>TUNEL</b>	Terminal-transferase Mediated dUTP Biotin Nick-End-Labeling
<b>VEBF</b>	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
<b>YBS</b>	Yükseltiyi Bulma Süresi

## RESİMLER DİZİNİ

Resimler	Sayfa No
Resim 1 (Sağ karotid arterin bağlanması için deney masasına sabitlenen yedi günlük sıçan yavrusu görülmekte).....	44
Resim 2 (Sağ karotid arterin bulunması) .....	45
Resim 3(Sağ karotid arterin bağlanması) .....	45
Resim 4 (Kültüre astrositlerde anti BrdU antikoru ve DAB kromojeni kullanılarak yapılan immünohistokimyasal işaretlemede çok sayıda pozitif hücre çekirdeği görülmekte).....	48
Resim 5 (Kültüre astrositlerde anti GFAP antikoru ve DAB kromojeni kullanılarak yapılan immünohistokimyasal işaretleme. Hemen tüm hücrelerin sitoplazmaları filamentöz GFAP proteini tarafından doldurulmuş).....	48
Resim 6 (Doğumu takiben yedinci günde hipoksi iskemi işlemi uygulanan ve ardından dekapite edilen bir sıçanın beyni normal yapıda görünmekte).....	54
Resim 7 (Hipoksi- iskemi sonrasında erken dönemde beyinde oluşan apoptotik hücreler (TUNEL yöntemiyle) görülmekte).....	55
Resim 8 (Sham grubuna ait bir sıçan beyinde çok az sayıda apoptotik hücre (TUNEL yöntemi ile) görülmekte).....	55
Resim 9 (Hipoksi- iskemi sonrasında erken dönemde beyinde çok sayıda apoptotik hücre (Kaspaz- 3 İmmünohistokimya yöntemi ile) görülmekte).....	56
Resim 10 (Sham grubuna ait bir sıçan beyininde az sayıda apoptotik hücre (Kaspaz- 3 İmmünohistokimya yöntemi ile) görülmekte) .....	56

<b>Resim 11 (Kök hücre verilmesi işleminden üç gün sonra çıkarılan sıçan beyninin sağ yarıküresi daha küçük olarak görülmekte).....</b>	<b>57</b>
<b>Resim 12 (Çok yönlü astrosit kök hücrelerin verilmesinden üç gün sonra beyindeki enjeksiyon yerinden alınan kesitte BrdU ile işaretli hücreler görülmekte) .....</b>	<b>58</b>
<b>Resim 13 (Kök hücre verilmesi işleminden iki hafta sonra Çıkarılan bir sıçan beyinde sağ yarıkürenin daha küçük ve sınırlarının daha düzensiz olduğu görülmekte).....</b>	<b>59</b>
<b>Resim 14 (Çok yönlü astrosit kök hücrelerin verilmesinden iki hafta sonra hipokampusa yakın bölgeden geçen kesitte nekroz alanının çevresine BrdU ile işaretli hücrelerin göç ettikleri görülmekte ).....</b>	<b>59</b>
<b>Resim 15 (14. haftada her gruptan çıkarılan sıçan beyinlerinden birer örnek makroskopik olarak izlenmekte. Grup S'ye ait sıçan beyni normal olarak izlenirken diğer gruptardaki sıçan beyinlerinin sağ yarıkürelerinin küçüldüğü görülmekte. Grup M'den çıkarılan sıçan beyninin sağ yarıküresinin diğer gruptara göre daha fazla küçüldüğü ve sınırlarının daha düzensiz olduğu görülmekte) .....</b>	<b>66</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekiller	Sayfa No
Şekil 1 (Perinatal hipoksi iskemi sonucunda beyin hücrelerini ölüme götüren fizyopatolojik olaylar).....	13
Şekil 2 (Apopzosis veya nekroz ile hücre ölümü).....	14
Şekil 3 (Deney uygulama takvimi).....	46
Şekil 4 (Açık alan deneyinde sıçanların katettikleri mesafelerin gruplara göre dağılımı) .....	61
Şekil 5 (Açık alan deneyinde sıçanların hareket hızlarının Gruplara göre dağılımı).....	62
Şekil 6 (Morris su tankı öğrenme ve hafıza deneylerinde grupların günlere göre yükseltiyi bulma sürelerinin karşılaştırılması).....	63
Şekil 7 (Morris su tankı deneyinde bir ile dördüncü gün arasındaki yükseltiyi bulma süresi farkının gruplara göre dağılımı) .....	64
Şekil 8 (Morris su tankı öğrenme ve hafıza deneyinin beşinci gününde sıçanların gruplara göre doğu kadranında geçirdikleri süreler).....	65

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablolar</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1 (Hipoksik İskemik Ensefalopatide Modifiye Sarnat Sınıflaması).....</b>	<b>20</b>
<b>Tablo 2 (FBF-2'nin normal hücrelerde yaşamın devamını sağlayan ve apoptozisi önleyen etkileri).....</b>	<b>37</b>
<b>Tablo 3 (FBF-2'nin hücre çoğalması ve hücre dönüşümü üzerine olan etkileri).....</b>	<b>38</b>
<b>Tablo 4 (Gruplara göre sıçanların katettikleri ortalama mesafeler ve hızlar).....</b>	<b>60</b>
<b>Tablo 5 (Morris su tankı öğrenme ve hafıza deneylerinde grupların günlere göre ortalama yükseltiyi bulma süreleri ve bir ile dördüncü gün arasındaki yükseltiyi bulma süresi farkları).....</b>	<b>63</b>
<b>Tablo 6 (Morris su tankı öğrenme ve hafıza deneyinin beşinci gününde sıçanların gruplara göre doğru kadranında geçirdikleri süreler).....</b>	<b>64</b>
<b>Tablo 7 (Gruplara göre sıçanların ortalama beyin ağırlıkları).....</b>	<b>65</b>
<b>Tablo 8 (Gruplara göre sıçanların ortalama vücut ağırlıkları).....</b>	<b>66</b>