



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

**HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI OLUŞTURULMUŞ YENİDOĞAN SIÇANLARDA
TROMBOSİT UYARICI FAKTÖR ANTAGONİSTİ UYGULAMASININ
BİLİŞSEL VE MOTOR YETİLER ÜZERİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Zekeriya BÜYÜKDERELİ
UZMANLIK TEZİ

Danışman
Prof. Dr. Aytuğ ATICI

MERSİN – 2008



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

**HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI OLUŞTURULMUŞ YENİDOĞAN SIÇANLARDA
TROMBOSİT UYARICI FAKTÖR ANTAGONİSTİ UYGULAMASININ
BİLİŞSEL VE MOTOR YETİLER ÜZERİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Zekeriya BÜYÜKDERELİ
UZMANLIK TEZİ

Danışman
Prof. Dr. Aytuğ ATICI

**Bu tez, BAP-TF. DTB (ZB) 2006-I (TU) kodlu proje olarak
Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir**

MERSİN - 2008

TEŐEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince zaman, emek ve bilgilerini benden esirgemeyen saygıdeğer hocalarıma; tez çalışmalarımın her aşamasında bana destek olan, bilgisinden en yüksek düzeyde yararlandığım tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Aytuğ Atıcı' ya, katkıları için Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Hüseyin Beydağı ve Araştırma Görevlisi Bora Reşitoğlu' na; Çocuk Nörolojisi Bilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Çetin Okuyaz' a; Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Ayşe Polat' a; Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Ali Naycı'ya; Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Lülüfer Tamer' e, Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Arzu Kanık ve Araştırma Görevlisi Mehmet Ali Sungur' a; Neonatoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Sayın Yard. Doç. Dr. Ali Haydar Turhan'a; Fizyoloji Anabilim Dalı, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı çalışanlarına; tüm mesai arkadaşlarıma; Deneysel Araştırma Laboratuvarı çalışanları Veteriner Hekim Hasan Basri Kırbaş ve tekniker Mehmet Acioğlu' na; yaşamıma pembe rengi ve güzel umutları katan, tüm hayatımı paylaştığım, desteklerini her zaman hissettiğim, sevgili eşim Berna ve kızım Begüm' e; yaşamımın daha güzel olması adına bütün enerjileri ile uzun yıllar çaba sarf eden annem Jale Hanım ve babam Eşref Bey' e, en içten duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Zekeriya Büyükdereli

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	5
İNGİLİZCE ÖZET.....	7
GİRİŞ VE AMAÇ.....	9
GENEL BİLGİLER.....	11
Hipoksik İskemik Beyin Hasarı.....	11
HİBH ve Hücre Ölüm Mekanizmaları.....	12
HİBH' de Klinik Bulgular.....	16
HİBH Tanısı.....	18
HİBH' de Tedavi.....	20
HİBH' de Prognoz.....	33
Sıçanların Bilişsel ve Lokomotor Yetilerinin Değerlendirilmesi.....	34
Artı Labirent.....	35
Açık Alan.....	36
Morris Su Tankı.....	37
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	40
Histopatolojik Değerlendirme.....	47
Biyokimyasal Değerlendirme.....	49
Davranış Deneyi Uygulamaları ve Değerlendirme.....	49
Artı Labirent Deneyi.....	50
Açık Alan Deneyi.....	50
Morris Su Tankı Deneyi.....	50
Uzak Hafıza Deneyi.....	50
Yakın Hafıza Deneyi.....	52
İstatistiksel Yöntemler.....	53
BULGULAR.....	55
Apoptoz Bulguları.....	55
TUNEL Yöntemiyle Beyindeki Apoptotik Hücrelerin Değerlendirilmesi.....	55
Kaspaz-3 İmmünohistokimya Yöntemiyle Beyindeki Apoptotik Hücrelerin Değerlendirilmesi.....	58
Malondialdehid Düzeyi.....	60
Artı Labirent Deneyi Bulguları.....	61

Açık Alan Deneyi Bulguları.....	62
Morris Su Tankı Deneyi Bulguları.....	64
TARTIŞMA.....	72
KAYNAKLAR.....	82
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	95
RESİMLER DİZİNİ.....	97
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	98
GRAFİKLER DİZİNİ.....	100
TABLolar DİZİNİ.....	101
EKLER.....	102

ÖZET

Perinatal dönemde meydana gelen hipoksik iskemik beyin hasarı (HİBH) mortalite ve süregen nörolojik hasarın başlıca nedenlerindedir. Hipoksik-iskemi ve reperfüzyon sonrasında gelişen apoptozun şiddeti (apoptotik nöron yüzdesi) serebral hasarlanmanın bir göstergesidir. HİBH' nin yeri ve genişliğine göre serebral palsy, nöbetler, öğrenme güçlükleri, görme ve işitme kaybı, motor kusurlar gibi pek çok kalıcı klinik durum gelişebilmektedir.

Hipoksi ve iskemiye takiben reperfüzyon dönemine geçmeden verilecek tedaviler ile hasarı önleme ya da azaltma mümkün olabilir. Trombosit uyarıcı faktör (platelet activating factor-PAF) antogonisti olan ABT-491 ile nöronal hasarlanmanın engellenebileceği önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Sıçanlar üzerinde yapılan bu çalışmada akut dönemde nöron hasarlanmasının önlenmesinin uzun dönemde bilişsel ve motor yetiler üzerine olan etkisi araştırıldı.

Çalışmaya alınan sıçanlar üç gruba ayrıldı. Grup A (n:30) ve B (n:30)' deki sıçanlara orta hat kesisi yapılarak sağ karotid arterleri bağlandı. Bu sıçanlar %8 oksijen içeren hipoksi odacığında bir saat bekletildi. Hipoksi sonrası grup A' dakilere ABT-491 (0.4mg/kg) ve grup B' dekilere serum fizyolojik (SF) periton içi yolla (intraperitoneal, ip) verildi. Grup C' deki sıçanların (n:30) ise karotid arterleri bulundu, fakat bağlanmadı. Bu sıçanlara hipoksi de uygulanmadı (Sham grubu). Her gruptan yedi sıçan hipoksi sonrası ikinci saatte dekapite edilerek beyinde apoptotik nöron sayısı ve serum malondialdehid (MDA) düzeylerine bakıldı. Kalan sıçanların uzun dönemdeki bilişsel ve motor yetileri davranış deneyleri (artı labirent, açık alan ve Morris su tankı) ile değerlendirildi. Deneylerin bittiği 16. haftada tüm sıçanlar dekapite edilerek beyin ağırlıkları ölçüldü ve beyinleri makroskopik olarak incelendi.

TUNEL ve Kaspaz-3 yöntemi ile boyanan apoptotik hücre sayısının grup B' deki sıçanlarda diğer gruptakilere göre anlamlı bir şekilde fazla olduğu saptandı ($p<0.001$). Plazma MDA düzeyi de grup B' deki sıçanlarda daha yüksekti ancak, gruplar arası karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Doğumdan sonraki altıncı haftada artı labirent deneyi ile değerlendirilen öğrenme yetisinin grup B' deki sıçanlarda daha zayıf olduğu, ancak bu durumun istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü.

Doğumdan sonraki 10. haftada lokomotor aktivite açık alan deneyi ile değerlendirildi. Grup B' deki sıçanların ortalama hareket hızları ve birim zamanda

katettikleri mesafe diğer iki gruba gore daha düşuk bulundu, ancak bu durumun da istatistiksel bir oneminin olmadığı anlaşıldı.

Sıçanların uzak (reference) ve yakın (working) hafıza yetileri Morris su tankı deneyleri ile sırasıyla 12 ve 14. haftalarda değerlendirildi ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Deneyin sonlandırıldığı 16. haftada en düşuk ortalama beyin ağırlığı grup B' deki sıçanlarda saptandı, ancak gruplar arası karşılaştırma sonuçları istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı.

Sonuç olarak oluşturduğumuz hipoksi-iskemi modelinde bir saatlik hipoksinin sıçanların beyinde nöronal apoptozu artırarak hasar oluşturduğu, akut donemde oluşan bu hasarın bir PAF antagonisti olan ABT-491 uygulaması ile azaltılabildiği gosterildi. Ancak gorece kısa olan bu hipoksik surecin uzun donemde sıçanların öğrenme, lokomotor aktivite, uzak ve yakın hafıza yetilerini önemli ölçüde bozmadığı anlaşıldı. Benzer deneylerin daha uzun sureli (rneğin iki saat) hipoksi uygulamasından sonra tekrarlanması ve ABT-491' in bilişsel ve motor yetiler üzerine olabilecek muhtemel etkilerinin değerlendirilmesinin gerekli olduğu kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: ABT-491, apoptoz, hayvan davranış deneyleri, hipoksik iskemik beyin hasarı.

ABSTRACT

The effect of platelet activating factor antagonist on cognitive and motor functions in neonatal rat model of hypoxic and ischemic brain injury

Hypoxic ischemic brain injury (HIBI) is one of the leading cause of acute mortality and chronic neurologic damage in neonatal period. Transient and permanent clinical situations such as cerebral palsy, seizures, difficulty of learning occurs depending the location and severity, of HIBI.

Interventions before the reperfusion period may ameliorate the harmful effects of hypoxia and ischemia. ABT-491, a highly potent and selective platelet activating factor (PAF) antagonist was shown to be beneficial in decreasing [neuronal damage (cell death and apoptosis)] after hypoxic-ischemic insult.

The aim of this study was to evaluate the effect of ABT-491 (0.4mg/kg) on long term cognitive and motor functions in a neonatal rat model of HIBI.

Seven-day-old Wistar rats were subjected to right common artery ligation and hypoxia (92% nitrogen and 8% oxygen) for one hour. They were treated either with ABT-491 (n: 30) or saline (n: 30) immediately after hypoxia. In sham group (n: 30), neither ligation nor hypoxia were performed. Seven rats from each group were sacrificed at two hours after hypoxia to evaluate neuronal apoptosis and measure plazma malondialdehyd (MDA) levels [neuronal apoptosis was evaluated by the terminal-transferase mediated dUTP biotin nick-end-labeling (TUNEL) and caspase-3 staining methods]. Cognitive and motor functions were evaluated by using elevated plus maze, open field arena and Morris water maze settings. At the end all rats were sacrificed and brains were evaluated macroscopically.

The number of apoptotic neurons in saline group was significantly higher compared to groups ($p < 0.001$). The mean plasma MDA level was higher in hypoxic rats treated with saline, but the difference between the groups was not significant.

Learning ability at six weeks, loco-motor activity (movement speed and total distance) at 10 week, reference and working memory functions at 12-14 weeks were weaker among rats in saline group compared to rats in ABT-491 and sham groups, but the differences did not reach statistically significance.

In conclusion, this study showed that neuronal apoptosis was diminished by ABT-491, administered soon after hypoxic-ischemic insult. We believe this relatively short period of hypoxia (one hour) caused mild HIBI which did not cause significant

deterioration in learning, locomotor and memory functions. Further studies with longer periods of hypoxia (i.e: 2 hours) should be planned to evaluate possible effects of PAF antagonists on cognitive and motor functions after hypoxic-ischemic insult.

Keywords: ABT-491, animal behavioral tests, apoptosis, hypoxic ischemic brain injury.

GİRİŞ VE AMAÇ

Hipoksik iskemik beyin hasarı (HİBH) perinatal dönemdeki ölümlerin ve nörolojik hasarın başlıca nedenlerinden birisidir^{1,2}. HİBH' de iskemi daha önemli bir rol oynar. Hipoksi ve iskemiye takiben başlayan reperfüzyon dönemi ağır hasarın oluştuğu en kritik evredir. Bu dönem başlamadan yapılacak tedaviler ile HİBH' yi önleme ya da azaltma mümkün olabilir³.

Hipoksik-iskemi ve reperfüzyon sonrasında gelişen apoptozun şiddeti (apoptotik nöron yüzdesi) serebral hasarlanmanın bir göstergesi olabilir. HİBH gelişmiş hastalarda hasarın yeri ve genişliğine göre serebral palsy, nöbetler, öğrenme güçlükleri, görme ve işitme kaybı, motor kusurlar gibi pek çok kalıcı klinik durum gelişebilmektedir⁴.

Yenidoğanın HİBH modellerinde, hasarı önlemek için bu güne kadar çok çeşitli farmakolojik ajanlar ve yöntemler kullanılmıştır. PAF' ın çeşitli çalışmalarda HİBH patogenezinde önemli bir mediatör olarak rol oynadığı bildirilmektedir^{5,6,7}. PAF HİBH' de zarar görmüş membran lipidlerinden açığa çıkan ürün olup merkezi sinir sisteminde sıklıkla nöron ve mikroglialarda, daha az olmak üzere de astrosit ve merkezi sinir sistemi endotelinde sentezlenebilmektedir^{8,9}. PAF merkezi sinir sisteminde sinaptik mesaj taşıyıcı, transkripsiyonel uyarıcı, normal beyin gelişiminde yön belirleyicilik gibi farklı nöronal aktivitelere sahiptir^{9,10}. Zamanında ve zamanından önce doğan bebeklerde PAF, iskemik beyin dokusunda yoğunlaşarak proinflamatuvar etki gösterir¹¹. Yapılan bazı çalışmalarda PAF antagonistlerinin nöron koruyucu etkisinin olabileceği de ileri sürülmüştür⁶. Buradan hareketle yenidoğan sıçanlarda HİBH modeli oluşturarak, PAF antagonistisi olan ABT-491' i koruyucu ve tedavi edici amaçla kullandığımız bir çalışmada, hipoksi-iskemi ve reperfüzyon sonrası gelişen nöronal hasarlanmanın önemli bir oranda engellenebildiğini göstermiştik⁷. Ancak nöronal apoptozun azaltılmasıyla erken dönemde elde edilen başarının uzun dönemdeki etkileri bilinmemektedir. Hipoksi süresi ile sıçanların bilişsel ve motor yetilerinin etkilenme derecesi arasındaki ilişki ve dolayısıyla çeşitli tedavi yaklaşımlarının uzun dönemdeki etkileri tam olarak değerlendirilememektedir.

Sıçanların bilişsel (öğrenme, uzak-yakın hafıza) ve lokomotor (hareket hızı, yüzme hızı, birim zamanda katettiği yol vb.) yetileri çeşitli yöntemlerle ölçülebilmektedir. Bunlardan bazıları rotarot testi, sekiz kollu ışınal (radyal) labirent, T labirent, yükseltmiş artı labirent, açık alan ve Morris su tankıdır.

ABT-491' in deneysel olarak kullanımı ile ilgili az sayıda çalışma vardır.

Bilgilerimize göre, HİBH oluşturulan hayvan modellerinde ABT-491' in hücresel düzeydeki etkilerini gösteren yayımlanmış sadece bir çalışma bulunmaktadır⁷. ABT-491 kullanılarak azaltılan apoptozun bilişsel ve motor yetiler üzerine etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, HİBH oluşturulan yenidoğan sıçan modelinde güçlü bir PAF reseptör antagonisti olan ABT-491' in nöronal apoptozu azaltması ile uzun dönemde bilişsel ve lokomotor yetiler üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

GENEL BİLGİLER

Hipoksik İskemik Beyin Hasarı

Hipoksi kanda oksijeninin normalden az olmasıdır. Hipoksi durumunda kan beyin, kalp ve adrenal beze toplanır; akciğer, böbrek, barsak ve ciltten uzaklaşır. Hipoksi ani ve ciddi ise, kompensasyona zaman tanıyorsa, öncelikle talamus ve beyin sapı hasar görür, ventrikül çevresindeki beyaz cevherde nekroz gelişir, bir dereceye kadar korteks korunur¹². Otopsi çalışmaları ve farklı yaş gruplarında manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ile yapılan incelemeler, gelişmekte olan beyinde seçilmiş bölgelerde hasar geliştiğini göstermektedir¹³. İskemi ise bir doku veya organdaki kan akımının azalması veya kesilmesini ifade eder. İskemi durumunda dokuya yeterince oksijen ve besin maddeleri gidemeyeceğinden hipoksik duruma göre daha ağır bir hasar meydana gelir.

Hipoksi ve iskemi serebral palsinin (SP) en önemli nedenlerindendir^{1,2}. HİBH' nin yeri ve genişliğine göre SP' ye ek olarak nöbetler, öğrenme güçlükleri, görme ve işitme kaybı, motor kusurlar gibi pek çok kalıcı klinik durum gelişebilmektedir⁴.

HİBH' nin gelişmiş toplumlarda görülme insidansı 1000 canlı doğumda 0.4-3.7, buna bağlı ölüm ve nörolojik hasar gelişme insidansı ise 1000 canlı doğumda 0.2-1.3 olarak bildirilmektedir¹⁴. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde SP görülme sıklığının birbirine benzer düzeyde olduğu, ancak SP nedenlerinin değişiklik gösterdiği belirtilmiştir. Gelişmekte olan ülkelerde erken doğuma bağlı SP sıklıkla gelişmiş ülkelerde doğum sırasında asfiksi ve kan uyuşmazlıkları gibi nedenlere bağlı SP' nin sık olduğu bildirilmiştir¹⁵. Yapılan bir çalışmada SP sıklığının gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerde birbirine benzer oranda olduğu ancak, gelişmiş ülkelerde spastik tetraplejik tip SP' nin daha sık görüldüğü belirtilmiştir¹⁶. Az gelişmiş ülkelerde ise hemiplejik ve ataksik tip SP' nin sık olduğu bildirilmiştir¹⁷.

Asfiksi plasenta veya akciğerden gaz değişiminin tam kesilmesi sonucu hipoksemi ve hiperkapninin neden olduğu durumdur. Bu dönemde beyin kan dolaşımı yeniden düzenlenir. Beyin ön kısmında dolaşım bozulur, burada beyin korteksi etkilenir. Ancak arka kısmında dolaşım korunur. Asfiksi anne, göbek kordonu, plasenta ve fetus ile ilişkili pek çok sorun nedeniyle oluşabilmektedir.

Asfiksi Riskini Artıran Durumlar

A. Anneye ile İlgili Durumlar

- a. Anne yaşının 16' dan küçük ya da 40' tan büyük olması
- b. Düşük sosyoekonomik düzey

- c. Kronik hastalıklar (diabet mellitus, hipertansiyon, tüberküloz, sistemik lupus eritematosuz gibi)
- d. Ağır anemi
- e. Perinatal enfeksiyonlar
- f. Annede tiroid hastalıkları
- g. Alkol ve uyuşturucu alışkanlığı
- h. Magnezyum ya da antikonvülzan kullanımı

B. Göbek Kordonu ile İlgili Durumlar

- a. Kordon dolanması
- b. Kordon sarkması
- c. Kısa kordon
- d. Anormal yerleşim

C. Plasenta ile İlgili Durumlar

- a. Kalsifikasyon
- b. Anormal yerleşim
- c. Gelişim bozuklukları
- d. İnflamatuvar değişiklikler
- e. Ödem veya infarkt olması

D. Fetusla İlgili Durumlar

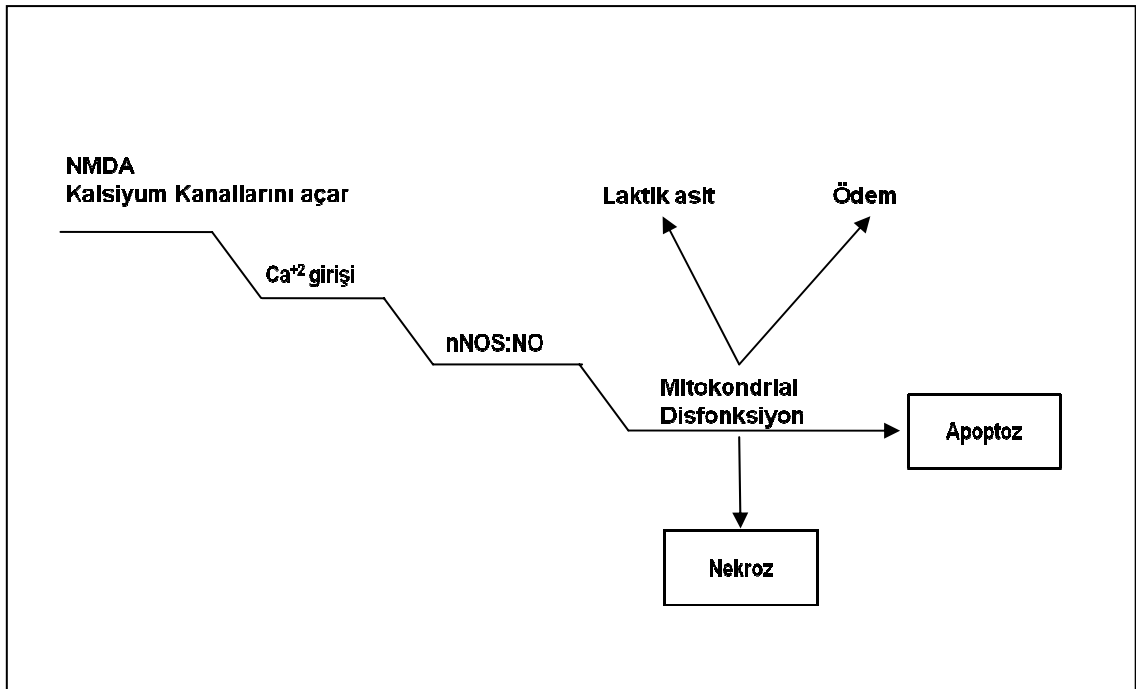
- a. Çoğul gebelikler
- b. Zamanından önce ya da sonra doğum
- c. Fetal anomaliler
- d. Anemi
- e. Yüksek ya da düşük doğum ağırlığı
- f. Fetal enfeksiyonlar.

HİBH ve Hücre Ölüm Mekanizmaları

Hipoksik-iskemik dönemi takiben gelişen beyin hasarı uzun dönemde geriye dönüşsüz bir durumdur¹⁸. Henüz olgunlaşmamış beynin hipoksi ve iskemiye yanıtı erişkinin beyninden farklıdır¹⁹. Hipoksinin başlangıçta oluşturduğu nekrotik hasarın yanı sıra reperfüzyonun, glutamat ve nitrik oksit nörotoksitesinin, serbest radikal oluşumunun, hücre içinde kalsiyum (Ca²⁺) birikiminin ve nihayetinde gelişen apoptozun beyinde geri dönüşsüz hasara yol açtığı bilinmektedir^{20,21}.

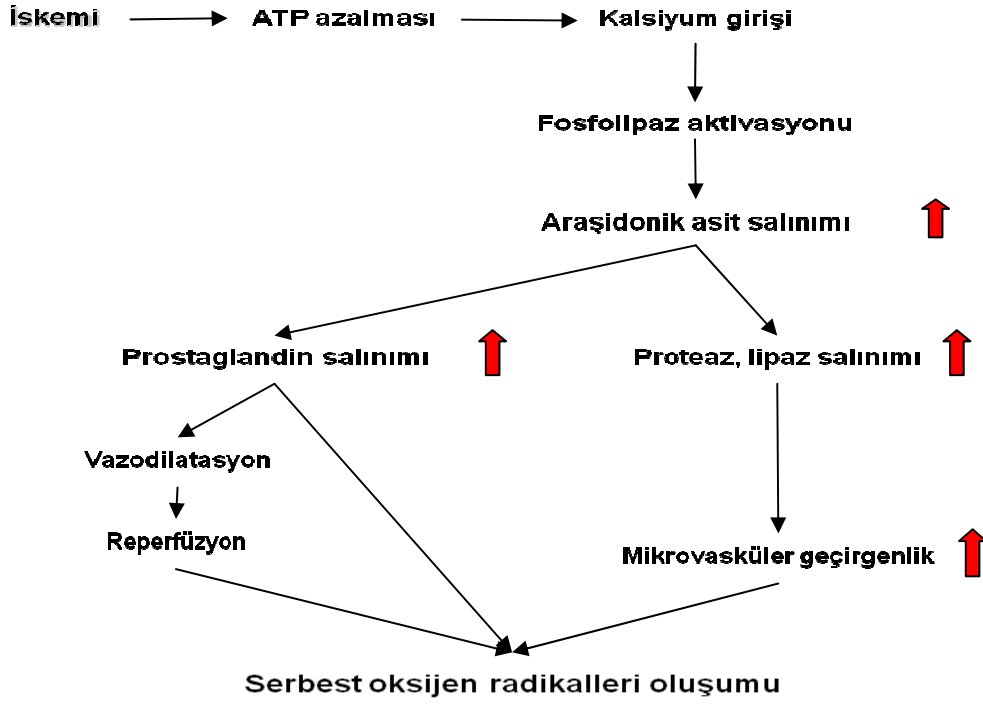
Hipoksi ve iskemiye takiben başlayan reperfüzyon dönemi ağır hasarın oluştuğu evredir. Bu dönem başlamadan yapılacak tedaviler ile beyin hasarını önleme ya da azaltma mümkün olabilir³.

HİBH' de hücre ölüm nekroz ve/veya apoptoz ile olur²². Bu iki mekanizmada en belirgin fark apoptozda inflamasyon olmamasıdır. HİBH başta glutamat olmak üzere diğer pek çok faktörü uyararak, hücre içine N-Metil D-Aspartat (NMDA) reseptörleri aracılığıyla Ca^{+2} girişini artırır. Böylece hücreyi ölüme götüren olaylar zinciri başlamış olur (Şekil 1)²³.



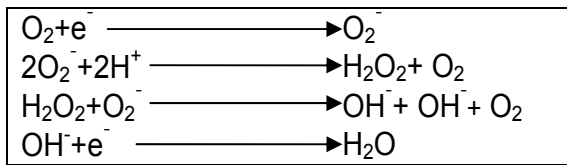
Şekil 1: HİBH' de Nekroz ve Apoptoz Oluşumu²³.

Hipoksik-iskemi durumunda özellikle dört hücre içi sistem etkilenir. Hücre zarı bütünlüğü, adenosin trifosfat (ATP) oluşumu, protein sentezi ve genetik yapının bozulması sonucu hücre hasar ortaya çıkar. Hücre içi kalsiyum artması ile fosfolipaz A₂ uyarılır ve araşidonik asit salınır, böylece hücre zarı hasarı oluşur. Proteazların uyarılması ile de yapısal ve zar proteinleri yıkılır. Lipazların uyarılması ile lipid peroksidasyonu olur. Prostaglandinler salınır, mikrovasküler geçirgenlik ve vazodilatasyon artar. Endonükleazlar uyarılır ve genetik yapı bozulur. Son olarak nitrik oksit sentetaz (NOS) uyarılması ile serbest oksijen radikalleri üretimi artar (Şekil 2).



Şekil 2: HİBH' de Serbest Oksijen Radikalleri Oluşumu.

Hipoksi-iskemi sonrası ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil (OH^-) ve serbest nitrik oksit (NO) radikalleridir (Şekil 3), en reaktif ve zararlı olan ise OH^- radikalidir²⁴. Yenidoğan beyinde antioksidanların eksik olması hasarın daha da ağır olmasına neden olur.



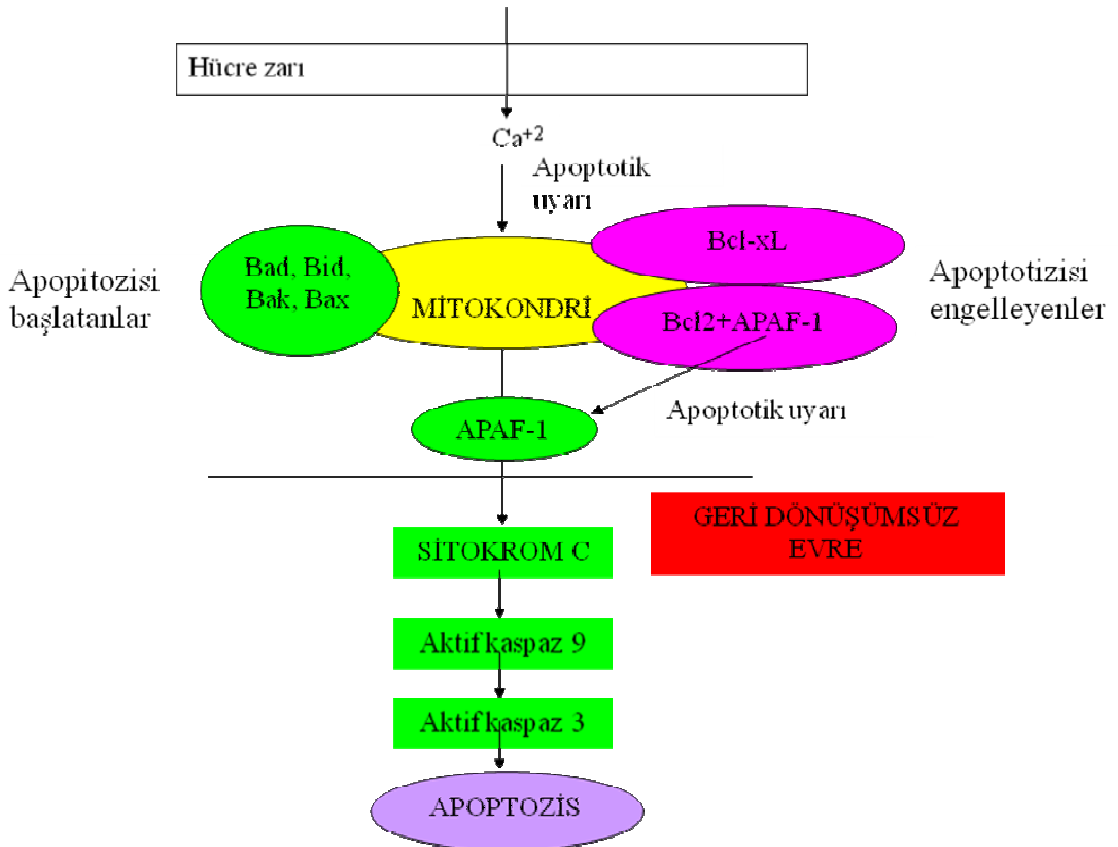
Şekil 3: Serbest Oksijen Radikalleri Oluşumu ve Zararsız Hale Getirme Yolakları.

Mutasyona uğramış veya hasarlanmış hücre genellikle yaşamamayı tercih eder. Sonuçta malign hale gelebilecek olan bu hücrelerin bir kısmı başta apoptoz olmak üzere hücre ölüm mekanizmaları ile ortadan kaldırılırlar. Memeli hücrelerinde, muhtemelen deoksiribonükleaz-I (DNAaz-I) aracılığı ile düzenlenen nükleer DNA'nın degradasyonu, apoptozun en erken kanıtlarından biridir. Apoptozun hücre içinde oluşturduğu harabiyet, büyük oranda proteaz kaskadı sonucu meydana gelir. Tek başına proteazın, çoklu

proteaz aktivasyonuna öncülük ettiği bir amplifiye proteaz kaskadı, apoptozun morfolojik değişikliklerini açıklayabilir (hücre-hücre ve hücre-matriks teması kaybı, piknozis, kromatin marjinasyonu, karyoreksiz ve membran tomurcuklanması). Hücrelerin yaşamı ve ölümü arasındaki dengenin korunması oldukça önemlidir. Uygunsuz hücre ölümünü önleyen faktörler de en az apoptoz kadar bu dengenin sağlanmasında rol oynar. Apoptozu başlatan ve engelleyen genler bu dengenin sağlanmasında önemlidir. En iyi tanımlanmış antiapoptotik gen bcl-2' dir (Şekil 4).

Apoptozu başlatan ve engelleyen faktörler:

- a. Bcl-2 grubu proteinler:
 - Apoptozu engelleyen genler : Bcl-2, Bcl-xL,
 - Apoptozu başlatan genler : Bad, Bak, Bax,
- b. APAF: Apoptotik proteaz aktive edici faktördür.
- c. CASPASE: Sistein içeren aspartat özgün proteazdır.



Şekil 4: Apoptoz Oluşumu ve Genlerin Etkisi.

Apoptoz bu faktörlerin karmaşık olan etkileşimi ile ve şekil 4' de görüldüğü gibi gerçekleşmektedir. Apoptoz ve nekroz yoluyla meydana gelen hücre ölümü arasında önemli farklar bulunmaktadır. Bu farklar Tablo 1' de özetlenmiştir.

Tablo 1: Apoptoz-Nekroz Arasındaki Farklar.

NEKROZ	APOPTOZ
HÜCRE İÇİ DENGELERİN KAYBI	BAŞLANGIÇTA ÖNEMLİ BİR DEĞİŞİKLİK YOK
HÜCRE ZARI GEÇİRGENLİĞİNDE ARTMA	BAŞLANGIÇTA HÜCRE ZARI GEÇİRGENLİĞİ ETKİLENMEZ
POTASYUM KAYBI, SODYUM GİRİŞİ, ZAR POTANSİYELİNDE DÜŞME	SODYUM GİRİŞİ YOK, POTASYUM İÇERİĞİ DEĞİŞMEZ
STOPLAZMİK YAPILARIN TÜMÜNDE ŞİŞME	SİTOZOL YOĞUNLAŞMASI
MİTOKONDRI VE DİĞER ORGANELLERDE YIKIM	ORGANELLER GENELDE SAĞLAM
HÜCRESEL ENERJİDE TÜKENME	HÜCRESEL ENERJİDE TÜKENME YOK
DÜŞÜK MAKROMOLEKÜLER SENTEZ	MAKROMOLEKÜLER SENTEZ AKTİVASYONU
BİTİŞİK HÜCRELER ETKİLENİR	SADECE İLGİLİ HÜCRELER ETKİLENİR
KROMATİN AĞINDA GEVŞEME	KROMATİN AĞINDA YOĞUNLAŞMA
PASİF ATROFİ	AKTİF DEJERENASYON

HİBH' de Klinik Bulgular

HİBH' de klinik bulgular hipoksi ve iskeminin ağırlığına, süresine ve bebeğin gebelik yaşına göre değişkenlik gösterir. HİBH hipotonisi, konvülsiyonu ve bilinç değişikliği olan bebeklerde düşünülmelidir. Olguların büyük bir çoğunluğunda beyin dışındaki diğer organlar da etkilenir. En sık etkilenenler sırasıyla böbrekler, kalp, akciğerler, karaciğer ve barsaklardır.

HİBH, Sarnat ve Sarnat tarafından 1976' da önerilen elektroensefalogram (EEG) bulgularının da kullanıldığı bir evreleme sistemi ile bulgularının ağırlığına göre üç farklı evreye ayrılır²⁵ (Tablo 2). Bu evreleme sistemi birçok modern evreleme yöntemine de temel olmuştur. En ağır form olan evre III HİBH' de ilk 12 saatte stupor, koma, periyodik

solunum, solunum yetmezliği, hipotoni, spontan hareketlerde azalma ve konvülziyon mevcuttur. 12-24 saat arasında ağır vakalarda genellikle koma devam ederken bazı vakalarda uyanıklık halinde iyileşme görülür. Ancak bu dönemde şiddetli konvülziyonlar ve apne atakları mevcuttur. 24-72 saat içinde durumu ağır olan bebeklerde bilinç giderek kötüleşir, koma, solunum durması ve beyin sapı fonksiyon bozuklukları görülür. Bebeklerin çoğu bu dönemde kaybedilir. 72 saatin sonunda hayatta kalan bebeklerde emme-yutma ve dil hareketlerinde sorunlar ortaya çıkabilir.

Tablo 2: Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Sarnat ve Sarnat Evrelemesi²⁵

Bulgu	Evre I	Evre II	Evre III
Bilinç düzeyi	Hiperalert	Letarjik	Stupor, koma
Kas tonusu	Normal	Hipotonik	Flask
Postür	Normal	Fleksiyon	Deserebre
DTR, Klonus	Hiperaktif	Hiperaktif	Alınmaz
Myoklonus	Mevcut	Mevcut	Yok
Moro refleksi	Mevcut	Mevcut	Alınmaz
Pupiller	Midriatik	Miyotik	Anizokorik
Nöbet	Yok	Var	Sık
EEG	Normal	Düşük Voltaj-nöbet Aktivitesi	Burst supresyonu, izoelektrik aktivite
Süre	<24 saat	≤24 saat, 14 gün≥	Günler , haftalar
Sonuç	İyi	Değişken	Ölüm ya da ağır sekel

Yaşamın ilk günü aktivitesi azalmış, üç günden fazla küvözde kalması gereken, beslenmesi sorunlu, zayıf emen, solunum zorluğu olan bebeklerde morbiditenin arttığı görülmüştür. HİBH olması muhtemel bir bebekte, tanının hızla konması, klinik bulguların doğru yorumlanması ve hipoksik iskeminin ağırlık derecesinin saptanması, ortaya çıkabilecek komplikasyonların önceden tahmin edilmesine yardımcı olur. HİBH sonucunda ağır nörolojik hasar gelişebileceğine işaret eden bulgu ve belirtiler aşağıda sıralanmıştır.

- İlk beş dakikada solunumun başlamaması
- Beşinci dakika Apgar skorunun dördün altında bulunması
- İlk 12 saatte nöbet öyküsü ve/veya dirençli nöbetlerin varlığı
- Evre III HİBH olması

- Ağızdan beslenmeye doğumu takiben bir haftada geçilememesi
- Anormal EEG bulguları olması ve yedi güne kadar EEG' nin normale dönmemesi
- Yenidoğan döneminde anormal beyin tomografi ve MRG bulguları saptanmasıdır.

HİBH tanısı konan bir bebek üçüncü düzeyde yenidoğan yoğun bakım hizmeti veren bir merkezde takip edilmelidir. Bu bebeklerin yaşamsal bulgularının, sıvı ve elektrolit düzeylerinin dengede tutulması mortalite ve morbiditeyi azaltmaktadır.

HİBH Tanısı

Yenidoğanda özellikle de zamanından önce doğan bebekte hipoksik hasarın klinik ve nörolojik bulguları tanımlayıcı olmadığı için gelişmiş tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Nörofizyolojik monitörizasyon ve görüntüleme yöntemleri HİBH tanısında önemli katkılar sağladığı gibi prognoz hakkında da önemli ipuçları vermektedir. HİBH tüm bu yöntemler ile tetkik edilirken ayırıcı tanıda merkezi sinir sistemi (SSS) enfeksiyonları, metabolik hastalıklar, organik asit metabolizması bozuklukları ve nörodejeneratif hastalıklar da akla gelmelidir.

Biyokimyasal Testler

HİBH tanısında birçok biyokimyasal testten yararlanılmaktadır. Bunlardan bazıları aşağıda belirtilmiştir.

- Kord kanı pH' sının 7.1' in altında olması
- Beyin-omurilik sıvısının (BOS) artmış protein düzeyi ve laktat/piruvat oranı
- Plazma laktat oranında artış
- N-asetil-aspartat (Naa) düzeyinde düşüş
- Naa/kreatinin veya Naa/kolin oranında düşüklük
- Artmış kreatin kinaz (CK), CK-MB, ürik asit, amonyak düzeyleri
- Son zamanlarda CK' nin beyine özgün izoenzimi (CK-BB) üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. HİE sonrası altı saat içinde ölçülen CK-BB düzeylerinin ölen veya ağır hasarlı olan bebeklerde çok daha yüksek olduğu saptanmıştır.
- BOS' un laktat dehidrogenaz ve hidrosibütirat dehidrogenaz, plazmanın ise hipoksantin, vasopressin, eritropoietin düzeylerinde artış saptanmıştır.
- BOS' da nöron-özümlen enolaz, glial fibriller asidik protein ve eksitatör aminoasitlerin ölçümünün tanıdaki değeri halen araştırılmaktadır.
- Son yıllarda HİBH ile serum malondialdehid düzeyleri arasında bir ilişki olduğu saptanmıştır. Bir çalışmada zamanında doğmuş ve HİBH gelişmiş bebeklerin serum-BOS MDA düzeyleri, BOS/serum MDA oranı kontrol grubu ile karşılaştırılmış, HİBH olan

grupta her iki değer de yüksek bulunmuştur. HİBH aęırlařtıķça serum düzeyinin daha belirgin şekilde arttığı tespit edilmiştir. HİBH gelişen bebeklerde MDA düzeyinde artış olacağı ve düzey ne kadar yüksekse HİBH' nin o kadar ağır olduğu ileri srlmřtr²⁶.

Elektrofizyolojik ve Nörofizyolojik testler

Elektroensefalogram (EEG): Burst supresyonu, elektro-serebral aktivite azalması, düşük voltaj paterni, çok odaklı keskin dalgalar ağır serebral etkilenimi gösterir ve kötü prognoza işaret eder. Klinik bulgular olmasa elektrografik nöbetlerin değerlendirmesi için şüpheli vakalarda EEG yapılması nerilmektedir^{27,28}.

Beyin sapının işitsel ve görsel uyarılmış potansiyelleri (BAİP ve GUP) lm: Bu yol ile HİBH' nin ağırlık derecesi hakkında yorum yapılabilir. Somato-sensorial uyarılmış potansiyeller (DUP) de nörolojik prognoz hakkında önemli ipuçları sağlayabilir. HİBH geliştikten sonraki 24 saat içinde median sinir kullanılarak yapılan SEP' in normal bulunması hastanın prognozunun %94 duyarlılıkla iyi olacağını göstermektedir.

Nörofizyolojik ve Nöroradyolojik testler

Kraniyal Ultrasonografi (US): Bu yöntem ile peri-intraventricüler kanama ve periventricler lökomalazi tanıları kolayca konabilir. Kanama sonrası ventricler dilatasyon ve hidrosefali gelişimi takibinde US oldukça yararlıdır.

Renkli Doppler Sonografi: Serebral arterlerdeki kan akım hızlarının ve serebral kan hacminin ölçümü tanı ve prognozun belirlenmesi açısından önemli ipuçları vermektedir. Near-infrared spektroskopiy yöntemi ile HİBH' li bebeklerde serebral otoregülasyonun bozulduğu gösterilmiştir.

Bilgisayarlı Tomografi (BT): Hipoksi ve iskemi sonrasında beyinde ortaya çıkan dansite azalması veya zamanında doğan bebeklerde daha sık olarak rastlanan parasagittal infarktlerin gösterilmesinde BT oldukça yararlıdır.

Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG): MRG ile miyelinizasyonda gecikme, korpus kallosumda incelme ile birlikte kortikal atrofi, bazal ganglionlarda uzun süre devam eden sinyal değişiklikleri ve beyaz cevherdeki bozuklukları göstermek daha kolaydır ve bunlar kötü prognozu gösterirler.

Manyetik Rezonans Spektroskopiy (MRS): Bu yöntemle hipoksi ve iskeminin erken ve geç bulgularını detaylı bir şekilde değerlendirmek ve bunları prognoz ile ilişkilendirmek mümkündür. MRS ile ³¹P kullanılarak fosfokreatinin (PCr) ve inorganik fosfat (Pi) lm yapılabilir. PCr/Pi oranı beyindeki fosforile enerji durumunu gösterir, asfiktik bebeklerde bu oranın düşük olması kötü prognoza işaret eder.

Proton MRS: HİBH' li bebeklerin beyinlerinde laktat oranında artış ve Naa düzeyinde düşüş olduğu bu yöntemle saptanmıştır. Naa/kreatinin veya Naa/kolin oranındaki düşüklüğün kötü prognozu yansıttığı gösterilmiştir.

HİBH' de Tedavi

HİBH oluştuktan sonra uygulanan tedavilerde istenen başarının elde edilememesi bu konu ile uğraşanlarda hayal kırıklıkları meydana getirmiştir. Bu nedenle HİBH oluşumunun önlenmesi ile ilgili çalışmalar güncelliğini korumaktadır. Doğum öncesi bakımın kalitesinin artırılması, yüksek riskli gebelerde en uygun doğum zamanının belirlenmesi ve doğumların uzmanlar tarafından yaptırılması HİBH gelişiminin önlenmesinde önemli rol oynayacaktır. Tüm çabalara rağmen HİBH önlenememişse aşağıdaki tedavi yöntemlerinden bebek için uygun olan seçilmeli ve uygulanmalıdır.

- Solunumun sağlanması
- Beyin dolaşımının sağlanması
- Normal kan şekeri düzeyinin sağlanması
- Nöbetlerin kontrolü
- Beyin ödeminin kontrolü
- Diğerleri

1. Solunumun Sağlanması

Oksijen ve karbondioksit normal sınırlarda tutulmalıdır. Hipoksi kontrol edilmediğinde serebral hasar derinleşmektedir.

2. Beyin Dolaşımının Sağlanması

HİBH' de beyin otoregülasyonu bozulmuştur. Beynin dolaşımı, kan basıncı ile pasif olarak sağlanır. Kan basıncı düştüğünde beyin dolaşımı azalır ve hasar artar. Bu nedenle sistemik basınç normal sınırlarda tutulmalıdır^{29,30,31}. Duktus Arteriosus'un açık olması durumunda çalma sendromu nedeni ile beyin dolaşımı azalır. Bu nedenle duktus arteriosus açıklığı uygun şekilde tedavi edilmelidir³². Bradikardinin eşlik ettiği apnelerde de beyin kan akımı azalacağından apneye neden olabilecek durumlar ortadan kaldırılmalı, gerekiyorsa metilksantin tedavisi uygulanmalıdır³³. Polisitemi hiperviskositeye neden olarak dolaşımı bozar ve beyinde enfarktlara neden olabilir, bu nedenle varlığı durumunda tedavi edilmelidir.

3. Kan Şeker Düzeyinin Ayarlanması

HİBH tedavisi sırasında en uygun kan şekeri düzeyinin ne olduğu tartışmalıdır³⁴. Hiperglisemi oluşturulması ile hipoksik dokuya yeterli substrat sağlanarak enerji yetersizliğinin önlenilebileceği ve hasarın azaltılabileceği iddia edilmiştir^{35,36}. Diğer yandan

bazı hayvan deneyleri hipergliseminin hipoksik dokudaki laktat seviyesini artırarak hasarı arttırdığını ortaya koymaktadır. Ancak klinik kanıtlar tartışmalıdır^{37,36}. Yenidoğan döneminde sınırda hipogliseminin bile uzun dönemli bilişsel bozukluklara neden olduğu bildirilmektedir³⁸. Bu nedenlerle geçerli güncel yaklaşım hastalarda normoglisemi sağlanmasıdır.

4. Nöbetlerin Kontrolü

HİBH sonrası sıklıkla nöbetler ortaya çıkar. Nöbetler yeni hasarlara yol açabileceği için hızla durdurulmalıdır³². Nöbetlerin tedavisinde öncelikle varsa hipoglisemi, hipokalsemi ve diğer elektrolit dengesizliklerinin düzeltilmesi gerekmektedir. Nöbet tedavisinde ilk seçenek olarak fenobarbital ve ikinci sırada ise fenitoin önerilmektedir³⁹. Yenidoğan döneminde başlanan antiepileptik tedavinin, aynı dönemde yapılan nörolojik çalışmaların normal bulunması halinde erken dönemde kesilmesi önerilmektedir. EEG' de anormal bulguların saptandığı, ancak nöbetin tekrarlamadığı durumda tedavinin EEG normal olana dek sürdürülmesi¹², EEG' de anormal bulguların ve nöromotor gelişimde bozukluğun sürmesi halinde ise tedavinin daha uzun süreyle uygulanması önerilmektedir^{12,40}. HİBH yönünden riskli yenidoğanlara klinik nöbetleri olmasa bile EEG yapılması, subklinik nöbet tespit edilmesi durumunda da tedavi edilmesi önerilmektedir^{27,28}. Hekimlerin yenidoğan nöbetlerinin tanı, tedavi ve takibi sırasındaki tercihlerinin değerlendirildiği bir çalışmada HİBH nedeniyle oluşan nöbetlerin tedavisi için pek çok farklı uygulama yapıldığı ve antiepileptik tedavinin ortalama 10 ± 8.9 hafta (1-52 hafta) sürdürüldüğü tespit edilmiştir³⁹.

5. Beyin Ödemi Tedavisi

HİBH nedeniyle gelişen beyin ödemi ciddi bir sorundur. Bu güne dek tedavisi için mannitol, steroid, idrar söktürücü gibi ilaçlar ve baş yükseltme gibi fiziksel uygulamalar kullanılmıştır.

Hipoksiyi takiben hemen 1gr/kg/doz' da mannitol verilen 130 hipoksik bebekte, hipoksiden 2 saat sonra mannitol verilen 95 bebeğe göre ölüm ve sekel oranları daha düşük bulunmuştur⁴¹. Asfiksik doğum öyküsü olan, zamanında doğmuş on bebeğe intrakranyal, serebral ve sistemik basınçları takip edilerek %20 mannitol uygulanan bir çalışmada, uygulamayı takiben 40. dakikada kafa içi basıncının azaldığı ve bu etkinin dört saat sürdüğü ileri sürülmüştür⁴².

Kafa içi kan basıncı 10 mmHg' nin üzerine çıkan HİBH' li bir grup bebeğe 4mg deksametazon uygulama sonrası 1.saatte kafa içi basıncının düştüğü, ancak sistemik arteriyel kan basıncının da düşmesi nedeniyle beyin dolaşımına olumlu etkisinin olmadığı

görülmüştür. Dekametazonun kan basıncını artırıcı etkilerinin 24-48. saatlerde ortaya çıkacağı bu nedenle HİBH' nin başlangıcında beyin ödemi azaltıcı etkisinin olmadığı bildirilmiştir⁴².

HİBH oluşturulmuş sıçanlara mannitol tedavisi uygulanarak beyin ödemi ve nöron hasarını önleyici etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada, mannitol tedavisinin HİBH' den koruyucu etkisinin yok denebilecek kadar az olduğu sonucuna varılmıştır⁴³.

Başın yükseltilmesi, idrar söktürücü ilaçlar ve hiperventilasyonun beyin damarlarındaki direnci artırdığı ve beyin ödemi tedavisinde etkili olabileceği gösterilmiştir. Ancak tüm bu uygulamaların HİBH' li fetus ve yenidoğanda, nörolojik sonuçları iyileştirmediği saptanmıştır^{42,44,45}.

6. Diğer Tedavi Yöntemleri

a. Hipotermi Uygulanması

Hipotermi beyin enerji metabolizmasını, glutamat salınımını, nitrik oksit üretimini ve iskemik dokunun depolarizasyonunu azaltır, apoptozu baskılar^{46,47,48}. Buna paralel olarak beyin içi ısının 2-3°C azaltılması ile iskemik beyin hücreleri metabolizmasında azalma ve kısmen nöron koruyucu etki oluştuğu gösterilmiştir^{47,49}.

Yapılan çalışmalarda vücudun soğutulması ile koagülasyon bozuklukları, vasokonstriksiyon, ventilasyon-perfüzyon bozukluğu, oksijen dissosiasyon eğrisinde sola kayma, kalbin kasılma gücünde azalma, kan viskozitesinde artma, doku dolaşımında azalma ve sepsis riskinde artma gibi yan etkiler oluştuğu bildirilmiştir⁵⁰.

Sıçanlarda hipoksik-iskemik hasarı takiben reperfüzyon döneminde rektal sıcaklığın 36-37°C, striatal beyin sıcaklığının ise 33, 34, 36 ve 39°C' de tutulduğu bir çalışmada metabolik aktivite yönünden gruplar arasında fark bulunmazken, hipokampustaki CA1 hücrelerinde beyin sıcaklığı 36°C olduğunda görülen iskemik hasar bulgularının, 34°C' de görülmediği saptanmıştır⁴⁹.

Bir grup HİBH' li hastanın başına orta soğuklukta sıvı ile dolu tüpleri sararak seçici baş soğutması yapılan, farklı iki gruba da hafif ve orta düzeyde sistemik hipotermi uygulandığı bir çalışmada, lokal hipotermi uygulamasının sistemik hipotermi uygulamasında görülen komplikasyonlara neden olmadığı saptanmıştır. Bu nedenle HİBH tedavisinde seçici baş soğutması uygulanmasının yararlı olabileceği ileri sürülmüştür⁴⁸. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda sadece baş soğutulmasının HİBH' yi yeterince önleyemediği, sistemik ve kontrollü hipotermi uygulaması ile daha iyi sonuçlar alındığı bildirilmiştir^{51,52}.

b. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR) Oluşumunun Engellenmesi

Hücre içi Ca^{+2} artışı fosfolipaz A_2 'yi uyarır. Bu uyarı SOR oluşumuna neden olan bir grup enzimi aktive eder (Şekil 5). Ayrıca ATP yıkım yolunda ve arjinin-üre dönüşümü sırasında da SOR üretilir. Bu sistemlerdeki enzimlerin uyarılmalarının engellenmesi ile HİBH'nin tedavi edilebileceği ileri sürülmüştür^{23,53}.

I. Fosfolipid Yıkım Yolunda Etkili Olanlar

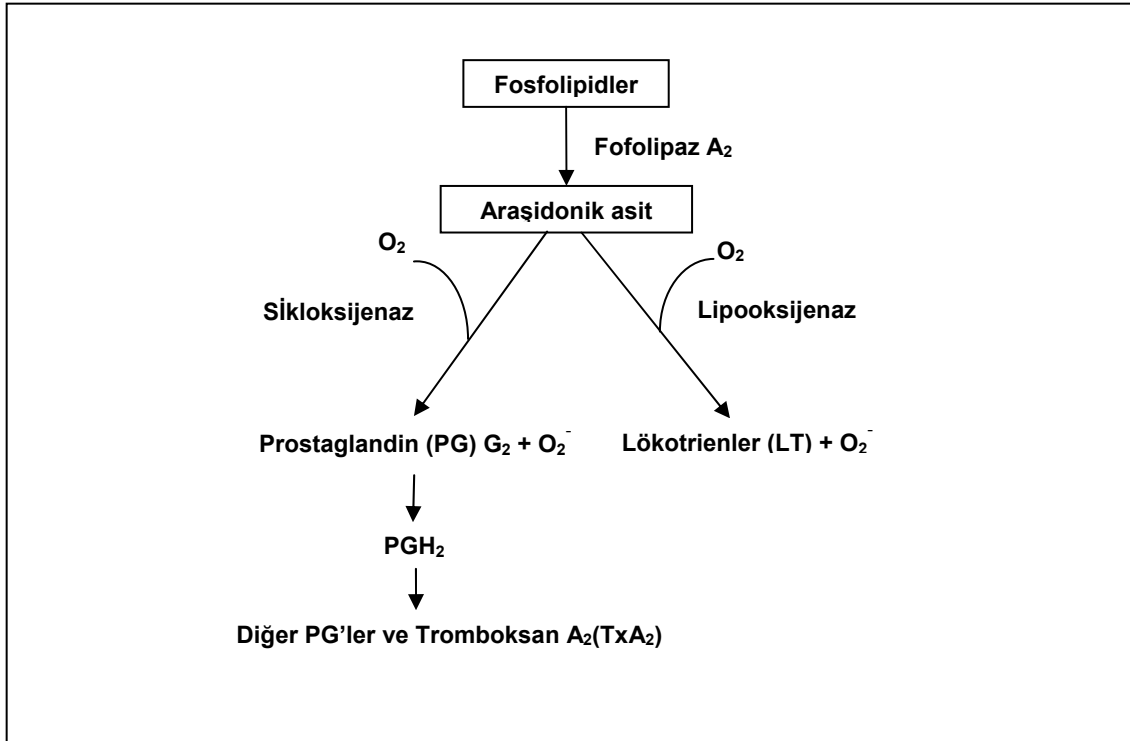
Fosfolipaz A_2 , siklooksijenaz (SO) ve lipooksijenaz (LO) inhibitörleri SOR üretimini önlemektedir (Şekil 5).

• Fosfolipaz A_2 İnhibitörleri

Fosfolipaz A_2 inhibitör etkileri olan antimalaryal ilaçlar, E vitamini, karbamazepin, lityum ve kolin derivelerinin yan etkileri konusunda yeterli bilgi bulunmamaktadır⁵⁴.

• Siklooksijenaz (SO) İnhibitörleri

Domuzlar üzerinde yapılan bir çalışmada HİBH öncesi beyin içine siklooksijenaz inhibitörü (indometazin), PGH_2 - TxA_2 inhibitörü (SQ 29.548) ve superoksit dismutaz (SOD) tedavileri uygulanmış, infarkt alanındaki vasodilatasyonu indometazinin kısmi, SQ 29.548'in tam olarak azalttığı ve SOD'un da benzer etkiler gösterdiği saptanmıştır⁵⁵.



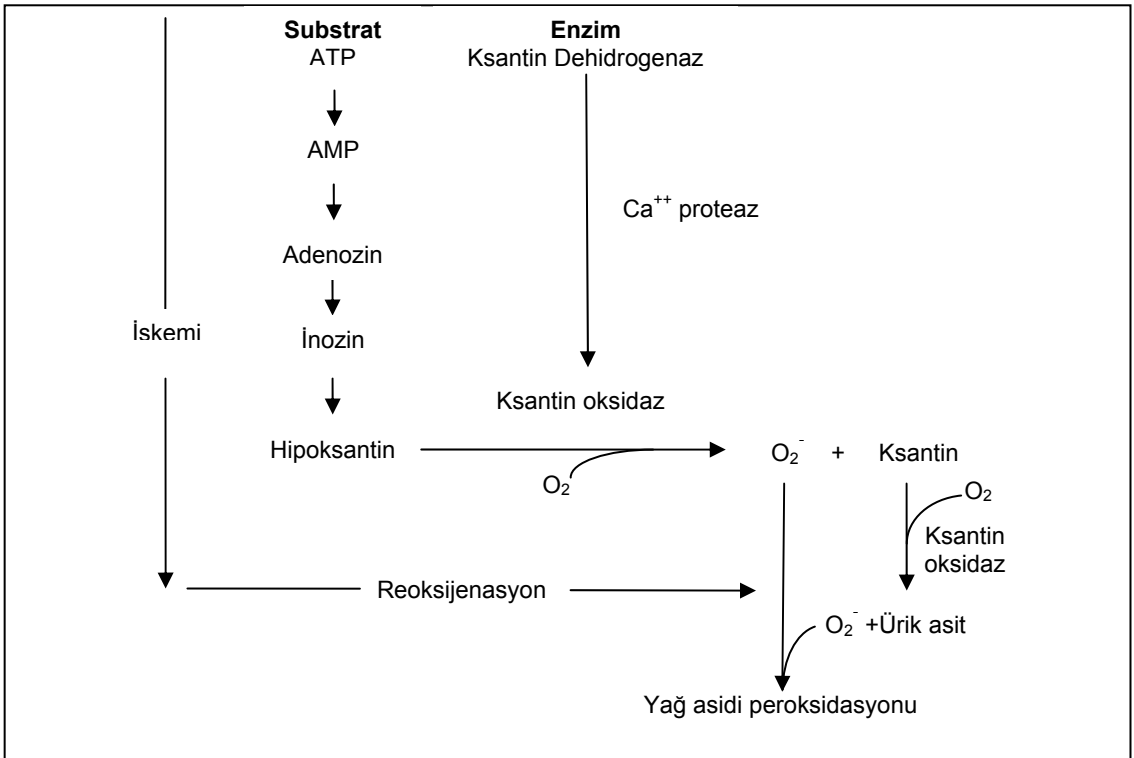
Şekil 5: Fosfolipid Yıkımı ile SOR Üretimi.

- **Lipooksijenaz (LO) İnhibitörleri**

Hipoksik iskemiye takiben sıçan kortikal nöron hücrelerinde 5-lipooksijenaz (5-LO) aktivasyonu gerçekleşir. Bu da NMDA reseptörünü uyarır. 5-LO baskılayıcı kafeik asitin glutamat salınımını azalttığı, nöron hücresinin yaşam süresini uzattığı gösterilmiştir⁵⁶.

II. ATP Yıkım Yolunda Etkili Olanlar

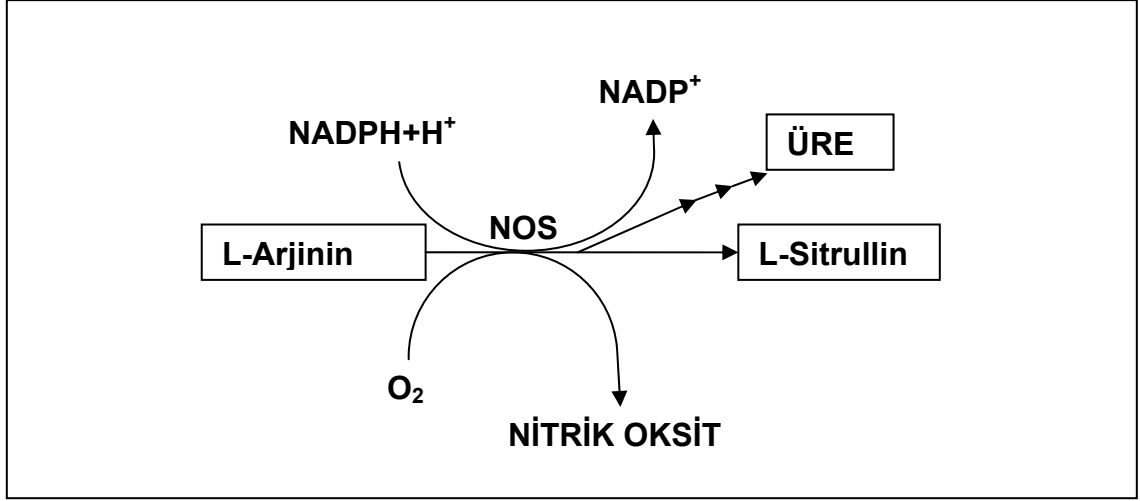
Ksantin oksidaz enziminin iskemi sırasında SOR oluşumuna neden olduğu (Şekil 6), ksantin oksidaz inhibitörü olan allopurinolün HİBH' yi takiben ortaya çıkan SOR üretimini engellediği bilinmektedir⁵⁷. Allopurinol tedavisinin seçilmiş vakalarda uygulanabileceği ileri sürülmektedir.



Şekil 6: ATP Yıkımı ile Hipoksantin, Ksantin ve SOR oluşumu.

III. Arjinin-Üre Dönüşüm Yolunda Etkili Tedaviler

Nitrik oksit sentetaz (NOS) baskılanması: NOS' un arjininden sitrullin oluşumunu katalizlediği, bu reaksiyon sırasında NO oluştuğu bilinmektedir (Şekil 7). NOS uyarılmasının apoptozu aktive ettiği gösterilmiştir⁵⁸. NO' nun deneysel çalışmalarda fokal serebral iskemiye yol açtığı ve bu hasarın NOS inhibitörleri verilerek önlenebileceği gösterilmiştir⁵⁹. N-nitro-L-Arjinin (7 nitroindazole) NOS' u baskılayarak NO oluşumu önlemekte, bu da birçok enzimatik reaksiyonu ve SOR oluşumunu önlemektedir^{23,24}.



Şekil 7: Arjinin Üre Döngüsünde NO Üretimi.

c. Oluşmuş Olan SOR' un Temizlenmesi

I. Antioksidan Enzimler

Glutasyon peroksidaz (GP), SOD ve katalaz, SOR ilişkili hasarda çok önemli üç antioksidan enzimdir^{60,61}. Bu enzimlerin uyarılması ile ortamdaki süperoksit, hidroksil ve hidrojen peroksit göreceli olarak daha zararsız formlarına çevrilir. Zamanında doğmuş, asfiksi öyküsü olan yenidoğanlardan alınan kan örneklerinde, üç enzimin de plazma düzeyleri evre III HİBH olan grupta kontrol grubuna göre belirgin şekilde yüksek bulunmuş, sonuçta bu üç enzimin serum düzeylerine bakılarak HİBH' nin ağırlığı hakkında bir fikir edinilebileceği gösterilmiştir. Bu enzimlerin HİBH tedavisinde etkili olabileceği de düşünülmektedir²⁶.

II. SOR' u Nötrale Eden Diğer Ajanlar

▪ Selenyum (Se)

Etki mekanizması halen çok açık olmamakla birlikte bir çalışmada antioksidan etkisini GP' yi aktifleştirerek, lipid peroksidasyonunu azaltma üzerinden yaptığı gösterilmiştir⁶².

▪ E vitamini:

Yağda eriyen çok güçlü bir antioksidandır. Se ile birbirlerini tamamlayıcı etki gösterdikleri iddia edilmektedir⁶³. E vitamininin hücre membranında oksidanlara bağlı oluşan lipid peroksidasyonunu önlediği, eksikliğinde ise glutasyon peroksidaz aktivasyonunun etkilenmediği gösterilmiştir⁶².

▪ N- Asetilsistein (NAS):

Hipoksik-iskemi ve reperfüzyonu takiben oluşan SOR trombosit agregasyonuna neden olmaktadır. Hayvan hipoksik-iskemi modellerinde NAS' ın metalloproteinaz aktivitesini baskılayarak trombosit agregasyonunu azalttığı saptanmıştır⁶⁴.

▪ **Askorbik asit (ASA):**

ASA' nın bir elektron vericisi ve serbest radikal temizleyicisi olduğu saptanmıştır⁶⁵. Beyin korteksi ve nöral hücre kültüründe yüksek doz uygulanmasının toksik etki yaptığı gösterilmiştir⁶⁶.

d. Glutamatın Zararlı Etkilerini Azaltıcı Tedaviler

Glutamat beyin hücrelerinin en önemli uyarıcısıdır. Glutamatın zararlı etkileri glutamat taşıyıcı proteinlerin baskılanması ya da aktive edilmesi ve glutamat reseptörlerinin kapatılması ile önlenmektedir.

I. Glutamat Taşıyıcı Proteinlerin Etkileri

Glutamat taşıyıcı proteinlerin diğer adı eksitatör aminoasit taşıyıcı proteindir (EAAT). Normal beyin gelişimi için hem anne karınıdayken hem de doğum sonrası EAAT' ler gereklidir⁶⁷. EAAT aktivasyonunda azalmanın hücre ölümü artışı ve ayrıca psikoza⁶⁸, aktivasyonda artışın ise ciddi nörolojik ve psikolojik bozukluklara⁶⁹ neden olduğu gösterilmiştir. Hipoksik-iskemik durumu takiben 12. saatte glutamat taşıyıcı proteinlerin salınımının iskemik alan ve etrafında azaldığı, ancak 72. saatte ise bu alanda glutamat taşıyıcı proteinlerin yoğun olarak tespit edildiği bildirilmiştir. EAAT' lerin hem nöron koruyucu hem de nöron öldürmede etkili olabileceği ileri sürülmüştür⁷⁰.

II. Glutamat reseptör kapatıcılarının kullanımı

NMDA, kainat ve α -Amino-3-Hidroksi-5-Metil İzoksazol Propiyonat (AMPA) isimleri verilen temel olarak üç tip glutamat reseptörü vardır. Akut enerji yoksunluğu hücre dışı glutamatın aşırı salınımına ve iyonotropik glutamat reseptörleri olan NMDA, AMPA ve kainat reseptörlerinin kontrolsüz aktivasyonuna neden olmaktadır^{71,72} (Şekil 8). Bu durumda enerji bağımlı glutamat geri alımı engellenmekte ve hücre içi kalsiyum yoğunluğu artmaktadır. Bu reseptörleri kapatıcı tedaviler glutamatın uyarıcı etkisini önleyerek HİBH' yi azaltabilir.

▪ **N-Metil D-Aspartat (NMDA) Reseptör Kapatıcıları**

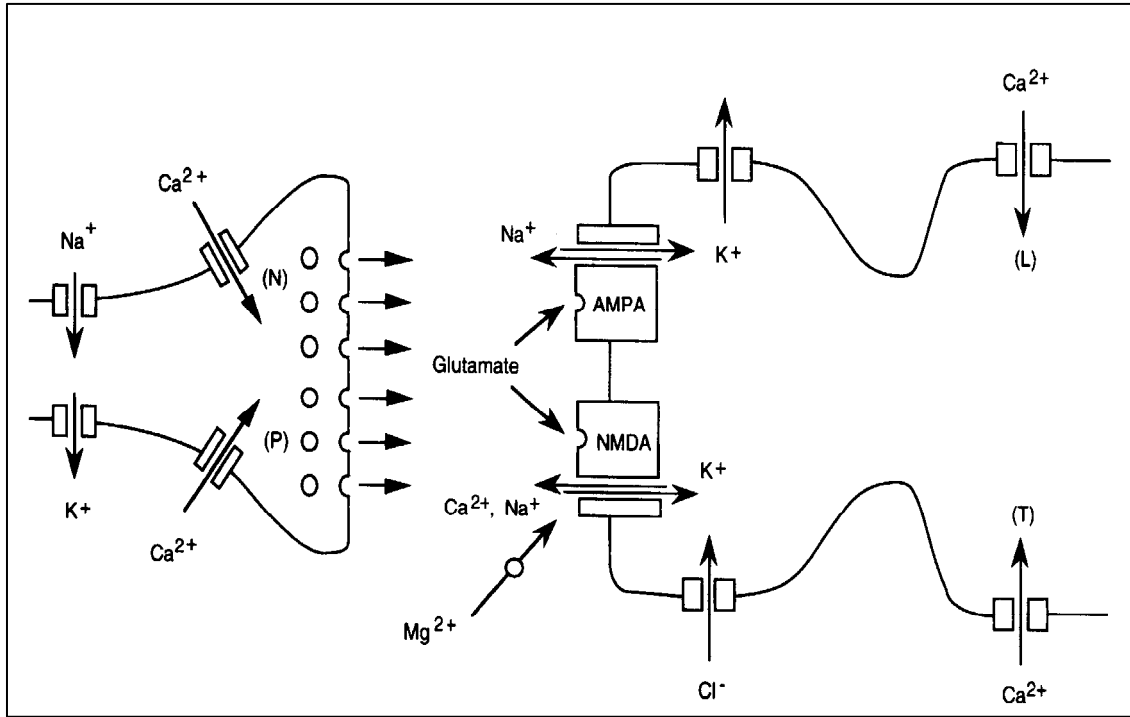
Hipoksi ve iskemi sonrasında fazla miktarda salınan glutamat NMDA reseptörleri yoluyla hücre içine kalsiyum girmesine neden olmakta, nekroz ve apoptoz artmaktadır (Şekil 8). MK-801, magnezyum (Mg^{+2}) ve dizosilpin NMDA reseptör kapatıcı olarak tanımlanmıştır. MK-801 maddesinin sıçanlarda hipoksik hasardan hemen sonra verilenlerde %90 ve iki saat sonra verilenlerdeyse %75 oranında koruma sağladığı

gösterilmiştir. MK-801 son derece toksik olması nedeniyle şimdilik klinik kullanımı mümkün değildir^{23,73}.

Magnezyumun da NMDA iyon kanallarını baskıladığı, hipoksik-iskemiye takiben sistemik uygulandığında nöronal hasarı azalttığı deneysel olarak gösterilmiştir⁷⁴.

▪ **α -Amino-3-Hidroksi-5-Metil İzoksazol Propiyonat (AMPA) Reseptör kapatıcıları**

Bu reseptörler voltaj bağımsız olarak çalışırlar ve aktivasyonu sonucunda sodyum hücre içersine girerken potasyum ise hücre dışına çıkar. Quisqualat reseptörleri olarak da bilinirler. AMPA reseptör aktivasyonu ile erken dönemde, hücre içi sodyum birikerek sitotoksik ödem ve hücre içi asidoz oluşturur. HİBH oluşturulmuş yenidoğan sıçanlarda bu reseptörün topiramet⁷⁵ ve nitrosülfoilbenzoquinoksalindion⁷⁶ (NBQX) kullanılarak kapatılması ile HİBH' nin azaltılabileceği gösterilmiştir (Şekil 8).



Şekil 8: Glutamat, Mg^{+2} , Ca^{+2} , NMDA ve AMPA Reseptör Etkileşimi.

▪ **Kainat reseptörleri**

AMPA reseptörleri ile iyi ayırt edilemediğinden AMPA/KA veya non-NMDA olarak adlandırılırlar. Kainat reseptörlerinin aktivasyonu ile hücre içindeki magnezyum hücre dışına çıkar. Hücre içi magnezyumdaki düşüş, magnezyum iyonunu kofaktör olarak kullanan enzimatik reaksiyonlarda bozulmaya, glikoliz, oksidatif fosforilasyon ve protein

sentezi gibi metabolik olayların etkilenmesine neden olur. Magnezyumun ayrıca NMDA reseptör kapatacıcı etki ile nörotoksisiteden koruyucu etkisi olduğundan, hücre içi seviyesindeki azalma nöronal hasarın şiddetlenmesine yol açmaktadır. Bunlara ek olarak, magnezyumun düşüşü hücre içi kalsiyum aktivasyonunun şiddetlenmesine neden olarak, ikincil hasarın büyümesine yol açar (Şekil 8).

e. Nöronal Büyüme Hormonu Tedavisi

Temel fibroblast büyüme faktörünün (bFGF) periton içine tekrarlayan dozlarda uygulanmasının nöronal hasarı azalttığı gösterilmiştir. bFGF1 ve insülin benzeri büyüme hormonu (Insulin-like growth factor, IGF-1) bu grup içinde ilk 30 dakikada en etkili olanlardır^{23,77}.

Nöronal büyüme hormonu (Neuronal Growth Factor, NGF) ventrikül içine verildiğinde tedavi edici etkisi olduğu gösterilmiştir⁷⁸. NGF' nin apoptotik hücrelerde bulunan terminal transferaz nick end labeling (TUNEL) reseptörü üzerinden etki ettiği, SF verilen gruba kıyasla NGF verilen grupta nöronal hücrede NOS aktivasyonunun ve apoptozun daha az olduğu saptanmış, NGF' nin HİBH tedavisinde etkili olabileceği ileri sürülmüştür⁷⁹.

f. Kaspazların (caspase) Baskılanması:

Kaspazlar (caspase; cysteine-containing aspartate specific protease) aktif merkezlerinde sistein içeren ve sitoplazmada inaktif halde bulunan enzimlerdir. Bilinen 14 adet kaspaz mevcuttur. Kaspaz 2,8,9,10 başlatıcı ve 3,6,7 ise efektör kaspazlar olarak bilinmektedir^{22,80}. Sitokrom c' nin sitoplazmaya salınması ve prokaspaz 9' u uarması ile apoptoz başlar²². Bu enzimler, özgün aspartik asit kalıntılarından sonra belirli proteinleri parçalar ve bu parçalanma sonucunda diğerleri de aktive olarak proteolitik bir süreci başlatır. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar²². Kaspazların baskılanması ile apoptozun önlenmesi ve HİBH'nin azaltılabileceği düşünülmektedir.

g. Kök Hücre Nakli Uygulanması

Hipoksik sıçanlara vasküler endotelial büyüme hormonu ve nöral kök hücre tedavisinin damar içi (intravenöz, i.v.) yoldan uygulandığı bir çalışmada, iki maddeyi aynı anda alan grupta, tek madde uygulanan ve madde verilmeyen gruplara göre daha yüksek proangiogenetik etki gözlenmiş, HİBH' nin azaltılabileceği ileri sürülmüştür⁸¹.

Fetal sıkıntı nedeniyle sezeryan ile doğurtulan bebeklerle, fetal sıkıntı olmadan sezeryanla doğurtulan bebeklerin göbek kordonu kanları CD34 hücre sayısı bakımından karşılaştırıldığında, fetal sıkıntısı olanlarda CD34 hücrelerin belirgin şekilde arttığı saptanmıştır⁸².

Hipoksik iskemik hasar oluşturulmuş sıçanlara rekombinant insan granulosit koloni uyarıcı faktör verilmesi sonrası sıçanların yaşam sürelerinin uzadığı, infarkt alanını küçüldüğü, infarkt alanında marjinal zonda CD34 hücreleri arttığı saptanmıştır⁸³.

h. Deksametazon Tedavisi

Deksametazonun süperoksit radikal üretimi, lipid peroksidasyonu, peroksinitrit ilişkili doku hasarı ve bcl-2 protein ekspresyonu üzerine etkisi olmadığı, apoptozu HİBH' yi takiben DNA yıkımını artıran proteinlerin sentezini baskılayarak azalttığı saptanmıştır. HİBH' yi sınırlamada etkili olabileceği iddia edilmiştir⁸⁴.

i. Glikolitik Yol Öncü Maddeleri Uygulanması

Aerobik/anaerobik glikolizde bir substrat ve aynı zamanda fosfoenolpruvattan piruvata dönüşümde güçlü bir uyarıcı olan Fruktoz 1,6 bifosfatın periton içine verilmesi ile HİBH tedavisi denenmiştir. Bu tedavinin beyaz cevher ölümünün olduğu alanlarda gelişen kortikal ölü hücre plaklarını azalttığı, ancak ilk 24 saatte beyin dokusunda laktik asiti artırması nedeniyle HİBH' yi artırabileceği tespit edilmiştir⁸⁵.

j. Eritropoetin (EPO) Uygulanması

Eritropoetin hangi mekanizmayla apoptozu azalttığı kesin olarak bilinmemektedir. Hipoksiyi takiben i.p. yoldan eritropoetin uygulandığı bir çalışmada, EPO verilen grupta hipoksik-iskemik beyin dokusunda proapoptotik düzenleyici genler bax ve DP5' in artmış olan etkilerinin, antiapoptotik gen bcl-2 ürünlerinin artırılması yoluyla tersine çevrildiği görülmüştür. Sonuçta eritropoetin apoptozu önleyebileceği ileri sürülmüştür⁸⁶.

HİBH oluşturulan sıçanlara EPO tedavisi verilmesini takiben 24 saat boyunca düzenli bir şekilde beyin lipid peroksidasyon ve antioksidan enzim düzeylerinin ölçüldüğü bir çalışmada, EPO tedavisi alan grupta glutatyon peroksidaz düzeyi belirgin şekilde yüksek bulunmuş, EPO' nun antioksidan enzim aktivasyonu yolu ile nöron koruyucu etki gösterdiği ileri sürülmüştür⁸⁷.

k. Kalsiyum Kanal Kapatıcıları Uygulanması

Voltaj kapılı Ca^{+2} kanallarını kapatıcı ilaçların kullanımı ile kalsiyumun hücre içine girişinin önlenebileceği, dolayısıyla hem nekroz hem de apoptozu tetikleyen mekanizmaların baskılanabileceği ileri sürülmüştür⁸⁸. Bir çalışmada serum iyonize

kalsiyum düzeyi düşük olan yenidoğanlarda, HİBH ve diğer organ hasarlarının daha az olduğu bildirilmiştir⁸⁹. Ancak kalsiyum kanal kapatıcıların uygulanması ile ciddi kan basıncı düşüklüğü geliştiğinden dikkatle kullanılmalıdır.

I. Magnezyum Sülfat Tedavisi:

Magnezyumun NMDA reseptörlerini kapatarak Ca^{+2} un hücre içine girişini engellediği ve HİBH' yi azalttığından daha önce bahsedilmişti.

Doğum öncesi fetal sıkıntı bulguları tespit edilen, 35. gebelik haftasından önce doğmuş, 10. dakika APGAR skoru altıdan az olan ve doğumunu takiben henüz 12 saat geçmemiş bir grup bebeğe intravenöz Mg-sülfat ($MgSO_4$) infüzyon tedavisi uygulanmış, tedavinin üç ve altıncı saatleri arasında bebeklerin kendiliğinden solumaya başladıkları tespit edilmiştir. Yüksek doz i.v. magnezyum uygulanan hastalarda ciddi kan basıncı düşüklüğü ve kalp yetmezliği geliştiği görülmüş, ancak düşük doz tedavi uygulandığında bu yan etkiler saptanmamıştır⁹⁰.

Yapılan pek çok çalışmada Mg^{+2} uygulamanın nöron koruyucusu etkisi yanında kan basıncını düşürücü ve solunum sıkıntısı yapıcı yan etkilerinden bahsedilmektedir. Ancak son yıllarda yapılmış bir çalışmada ağır hipoksisi olan zamanında doğmuş 40 bebeğe, doğumu takiben 30 ile 60. dakikalar arasında 250mg/kg, 24 ve 48. saatlerde 125mg/kg olmak üzere toplam üç kez damar içi $MgSO_4$ verilmiş, yan etkiler açısından takip edildiği 72 saat boyunca kontrol grubu ile HİBH' li bebekler arasında farklılık saptanmamıştır. Serum Mg^{+2} düzeyinin 2 mmol/L' den düşük olması durumunda yan etki gözlenmeyeceğinden, HİBH tedavisinde i.v. $MgSO_4$ tedavisinin kullanılabileceği ileri sürülmektedir⁹¹.

m. Tanshinon Uygulanması

İnvitro olarak hücre kültüründe hipoksik iskemik hasar oluşturulmuş beyin hücrelerinde, tanshinon uygulama sonrası laktat dehidrogenaz aktivitesinde belirgin bir azalma olduğu, hücrelerin yaşam sürelerinin uzadığı gösterilmiş, tanshinonun nöron koruyucu etkisi olduğu iddia edilmiştir⁹².

n. Nikotinamid Uygulanması

Yenidoğan sıçanlarda HİBH oluşturularak 500mg/kg nikotinamid tedavisi uygulanmış ve hasarlı beyin dokusu miktarını azalttığı gösterilmiştir. ATP kaybına engel olduğu, antiinflamatuvar etkileri, ayrıca beyinde $PGF2\alpha$ ' yı azaltarak lipid peroksidasyonunu önlediği, kaspaz 3 aktivitesini azaltarak apoptozu baskıladığı gösterilen nikotinamidin; HİBH gelişen yenidoğan bebeklerde yeni bir tedavi seçeneği olduğu ileri sürülmüştür⁹³.

o. Östrodiol Uygulanması

Gama aminobutirik asit reseptörünü seçici olarak kapatan muscimol ile hipokampüs hücrelerinde deneysel olarak hasar oluşturulan ve hasar sonrası östrodiol tedavisinin denendiği bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada östrodiol verilen hayvanlardan 2-24. saatlerde hipoksik iskemik hasarın azaldığı, 24-48. saatler arasında ise laktat dehidrogenaz düzeyi ve hasarda artış saptanmıştır. Sonuçta bu tedavinin nöron koruyucu etkisi olmadığı söylenmiştir⁹⁴.

p. Morfin Uygulanması

Morfin birkaç değişik reseptör üzerinden sistemlerde farklı etkilere neden olabilen bir ajandır. Öncesinde morfin ($\geq 3\mu\text{M}$) uygulanmış ve takiben deneysel olarak hipoksi oluşturulmuş bir grup denekte, Purkinje hücrelerinin yaşam süresi değerlendirilmiş, morfin uygulanan grupta, hücre yaşam süresinin daha uzun olduğu gösterilmiştir. Naloksan gibi seçici olmayan opioid antagonistlerinin bu etkiyi azalttığı tespit edilmiştir. Morfinin HİBH tedavisinde etkili olabileceği, ancak bu etkinin doz bağımlı ($\geq 3\mu\text{M}$) olduğu ileri sürülmüştür⁹⁵.

r. Sodyum Kanal Kapatıcıları Uygulanması

İskemi-reperfüzyon yolu ile oluşan hücresel hasarda hücre içi sodyum (Na) artışının anahtar bir rolü olduğu ileri sürülmüştür. Hücrenin enerji gereksiniminin artması membrandaki Na/K-ATPaz' ı uyarır ve hücre içi sodyum artar. Bunu takiben Ca^{+2}/Na değiştirici kanal aracılığıyla sodyum hücre dışına atılırken Ca^{+2} hücre içine girer. Kalsiyum hücre içi asidoz gelişimine, sitotoksik ödeme ve glutamat toksisitesine neden olmaktadır. Diğer yandan hücre içindeki yüksek sodyum düzeyi reperfüzyon sırasında SOR üretiminde artışa ve HİBH' nin daha ağır olmasına neden olmaktadır. İskemi sırasında voltaj duyarlı Na kanallarının kapatılmasının nöron koruyucu etkisi olduğu ileri sürülmüştür⁹⁶.

Geçmiş yıllarda yapılmış pek çok çalışmada kullanılan voltaj bağımlı Na kanal kapatıcıların hipotansiyona ve anestezik yan etkilere neden olduğu bildirilmiştir. Ancak bir çalışmada bu etkinin kullanılan ilaçların yeterince seçici olmaması ve Na kanalları ile birlikte Ca^{+2} kanallarını da kapatmasına bağlı geliştiği ileri sürülmüştür. Voltaj bağımlı Na kanalı seçiciliği yüksek bir ajan olan BIII-890CL hayvanlara uygulanmış, kan basıncını düşürme ve anestezik gibi yan etkilerin gözlenmediği, motor yetileri bozmadan nöron koruyucu etki gösterdiği bildirilmiş ve faz I çalışmaların yapılması önerilmiştir⁹⁷.

s. Endotelin Reseptör Kapatıcı Uygulanması

Endotelin HİBH' de önemli rolü olduğu bilinen bir maddedir. Endotelin

reseptörlerini kapatıcı maddeler, hücre kültürlerinde üretilmiş normal ve hipoksik fare astrosit hücrelerine uygulanmış, apoptoz ve sitolizi azalttığı gösterilmiştir. Diğer yandan benzer etkinin tüm reseptörler için geçerli olmadığı da gösterilmiştir⁹⁸. Endotelin reseptörlerini kapatıcı maddelerin etkilerinin anlaşılması için daha çok çalışma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

t. Koagülasyonun Baskılanması

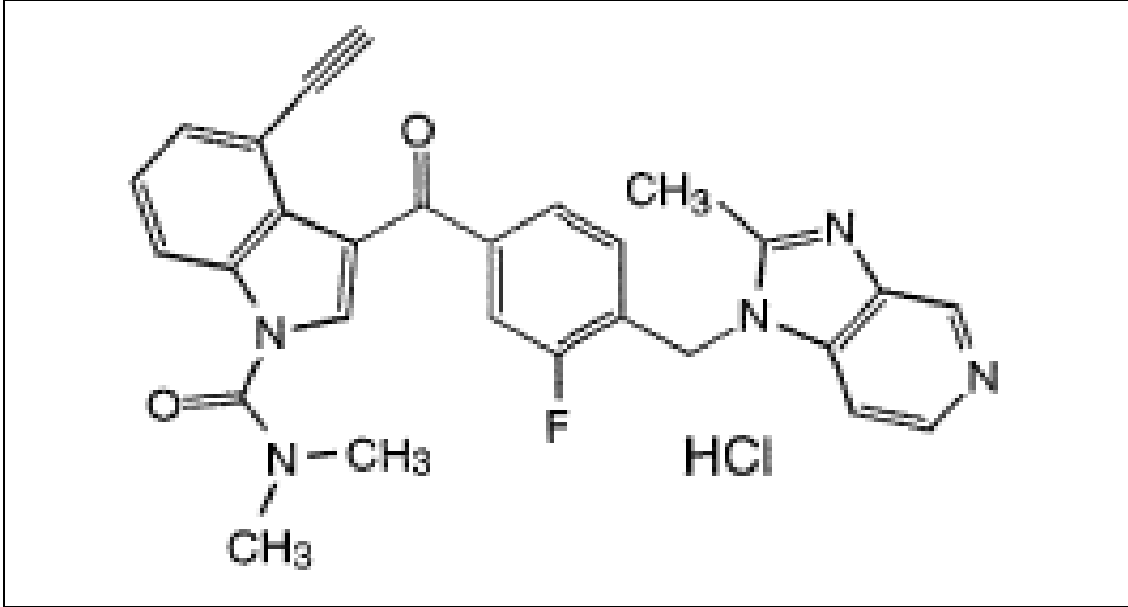
Son yıllarda yapılan çalışmalar, değişik uyarılar sonucunda beyinde PAF ve doymamış yağ asitlerinin sentezlendiğini göstermektedir⁹⁹.

Yenidoğanlarda PAF iskemik beyin dokusunda yoğunlaşarak proinflamatuvar etki gösterir¹⁰⁰. İskemi-reperfüzyon sonrası gelişen nöronal hasarlanmada önemli bir mediatör olarak rol oynayan PAF' ın, hücreler üzerindeki istenmeyen etkileri reseptör düzeyinde engellenebilir. HİBH oluşturulan yenidoğan sıçanlarda PAF reseptör antagonistlerinin etkilerini gösteren az sayıda çalışma dikkati çekmektedir. Yapılan bir çalışmada WEB 2170' in sadece hipoksi öncesi etkili olduğu; hipoksi sonrası verilmesinin hasarı engellemediği bildirilmiştir¹⁰¹. BN 5202' in ise gerek hipoksi öncesi gerekse sonrası verildiğinde etkili olmadığı gözlenmiştir¹⁰¹. Diğer bir çalışmada hipoksiden hemen önce ve sonra BN 50730 kullanılmış, bunun hem doku kaybını azalttığı hem de öğrenme ve hafıza yetilerini koruduğu izlenmiştir¹⁰². Diğer taraftan hipokampal nöronlarda yapılan bir çalışmada; PAF' ı inaktive eden PAF asetil hidrolazın, NMDA ile uyarılmış apoptozu azalttığı ve nöroprotektif etki sağladığı gözlenmiştir¹⁰³. Böylece PAF asetil hidrolazın eksitotoksisite, epileptik beyin hasarı, kafa travması, inme, glokom ve nörodejeneratif hastalıklar gibi olaylarda PAF antagonistlerine karşı alternatif olabileceği ileri sürülmüştür¹⁰⁴.

Önemli bir mediyatör olan PAF' ın astım, alerjik rinit, sepsis, pankreatit, inflamatuvar barsak hastalığı ve iskem-reperfüzyondaki rolüyle ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar PAF reseptör antagonistlerinin kullanılmasının yararlı olacağı fikrini gündeme getirmiş ve PAF reseptör antagonistlerinin araştırılması ve geliştirilmesiyle ilgili çalışmalarda artış gözlenmiştir^{105,106}.

ABT-491 (4-etinil-N,N-dimetil-3-[3-floro-4-[(2-metil-1H-imidazo-[4,5c] piridin-1il) metil]benzoil]1H-indol-1-karboksamid hidroklorid) çok güçlü bir PAF reseptör antagonistidir (Şekil 9). Bu molekül imidazopiridin-indol içeren reseptör antagonistlerinden içeren ABT-299' in indol kısmı ile BB-882' nin imidazopiridin kısmının birleşmesinden sentez edilmektedir¹⁰⁷. Literatürde ABT-491' in kullanımıyla ilgili sınırlı sayıda çalışma olmakla beraber^{107,108} HİBH' de kullanımıyla ilgili tek bir çalışma

yapılmıştır. Bu çalışmada PAF reseptör antagonisti ABT-491' in hipoksi öncesi veya sonrası periton içine uygulanmasının apoptotik hücre sayısını anlamlı oranda düşürdüğü tespit edilmiş, yenidoğanın HİBH' sinde nöronal apoptozu azaltarak koruyucu ve/veya tedavi edici etkileri olabileceği ileri sürülmüştür⁷.



Şekil 9: ABT-491.

HİBH' de Prognoz

HİBH' de prognoz metabolik sorunların, kalp ve solunum sistemi komplikasyonlarının tedavisine, bebeğin kaçınıcı gebelik haftasında doğduğuna ve HİBH'nin ağırlığına bağlıdır. Ağır HİBH koma, apne, okulosefalik refleks yokluğu ve dirençli nöbetlerle karakterize ve kötü prognozlu bir durumdur. Doğumu takiben 20. dakikada APGAR skorunun çok düşük olması ve kendiliğinden solunumun olmaması, ikinci haftada anormal nörolojik bulguların sebat ediyor olması ölüm veya bilişsel ve motor yetilerde ciddi bozukluğun gelişeceğini göstermektedir. Klinik bulgulara ek olarak EEG anormallikleri ve MRG' de patolojik görünüm saptanması da kötü prognozu destekler. Hastaların nöromotor sorunlarının erken ortaya konması, nöromotor gelişmeyi destekleyici tedavi ve fiziksel aktiviteye erken başlanması prognozda daha iyi sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır¹⁰⁹. HİBH' nin ağırlığının önemli prognostik faktör olması, HİBH' yi önlemeye yönelik tedavileri ön plana çıkarmaktadır.

HİBH' yi ve olumsuz etkilerini önlemeye yönelik tedavilerin sonuçlarını, sıçanların

bilişsel ve lokomotor yetilerini değerlendirerek göstermek mümkündür. Bu yetiler, çeşitli hayvan davranış deneyleriyle değerlendirilebilmektedir.

Sıçanların Bilişsel ve Locomotor Yetilerinin Değerlendirilmesi

Sıçanların bilişsel ve lokomotor yetilerinin değerlendirilmesinde bugüne dek tanımlanmış pek çok hayvan davranış deneyi (HDD) modeli mevcuttur. HDD' ler ile sıçanlarda anksiyete, otonom fonksiyonlar, öğrenme, hafıza ve lokomotor aktivite gibi pek çok özelliğin değerlendirilmesi yapılmaktadır. Bilimsel yeterlilik ölçütlerinin tümüne aynı anda sahip olan bir HDD modeli yoktur ve bu modellerin çoğu %100 kesinlikte sonuç sağlayamamaktadır. Ancak bilimsel teknolojiadaki gelişmelerle birlikte HDD' ler giderek daha ideal ölçütlerde yapılabilmektedir.

Öngörüşel Yeterlilik (Predictive Validity): Deney hayvanlarından elde edilen sonuçlar ile klinik araştırmalardan elde edilen sonuçların ilişkisini kapsar. Hayvan deneylerinde elde edilen ilaç etkileri klinik çalışmalarda da gözlenmelidir.

Görüntüşel Yeterlilik (Face Validity): Burada hayvan modelinin insandaki hastalık belirtilerini ne ölçüde taklit ettiği önemlidir. Bir HDD modeli insandaki belirtileri taklit ettiği ölçüde bilimsel yeterliliğe sahiptir.

Yapısal Yeterlilik (Constructive Validity): Bu kriter hastalığa neden olan klinik koşul ile hastalığın oluşması arasındaki teorik ilişki hakkındadır. Bir davranışsal model insanda hastalığa neden olan risk faktörlerini kapsadığı ve bunların hastalığa olan katkılarını doğru biçimde yansıtabildiği ölçüde bilimsel yeterliliğe sahiptir.

Davranış deneylerinin sıçanların çevresel (nöromotor) gelişimin tamamlandığı 80-85. günlerden sonra yapılması önerilmektedir¹¹⁰. Ancak sıçanların doğumu takiben kaç haftalık olduğu belirtilen ya da belirtilmeyen pek çok çalışmada, deneylerin ortalama 180-400 gr ağırlığındaki erişkin erkek sıçanlarla yapıldığı bildirilmiştir^{111,112,113}.

Bu deneylerde sıçanların cinsiyetlerine göre farklı davranışlar sergilediği tespit edilmiştir¹¹⁴. Özellikle uzaysal (spatial) öğrenmenin değerlendirilmesinde erkek cinsiyetin daha uygun olduğu saptanmıştır^{115,116,117}. Bu durumun hormonal farklılık ve hipokampus gelişimdeki farktan kaynaklandığı ileri sürülmüştür¹¹⁵. Son yıllarda yapılan pekçok çalışmada bu nedenle erkek sıçan kullanılmıştır^{111,112,118,119}.

Tüm HDD' lerin 23 ± 1°C oda sıcaklığında, 12 saatlik gece-gündüz ritminin sağlandığı bir odada ses, ışık, sıcaklık ve bekleme koşullarının standardize edildiği ortamlarda yapılması önerilmektedir. Bu standardizasyonun sağlanabilmesi için tüm hayvan gruplarının deney alanına deney gününden birkaç gün önce getirilmesi, deneylere başlanmadan önce tek tek bekleme kaplarına konmasının gerekliliği

belirtilmektedir.

Deney hayvanlarının tümünün daha önce doğum yapmış, bir gebelikte birbirine yakın sayıda yavru doğuran annelerin yavrularından seçilmesi, doğumdan sonra aynı günde süttten kesilerek anneden ayrılması, anneden ayrılan sıçanların her kafeste eşit sayıda olacak şekilde barındırılması, sıçan yemi ile beslenilmesi gibi temel koşulların sağlanması önerilmektedir. Burada amaç sıçanların davranış deneylerinin yapılacağı tarihte birbirine yakın ağırlıkta olmalarının, nöromotor gelişiminin eşit düzeyde olmasının sağlanmasıdır. Ayrıca daha önce yavru doğurmuş, yavrularına zarar vermediği bilinen annelerin yavrularının seçilmesi ile deneye alınacak sıçanların anne tarafından reddedilme ya da yenmesini önleme amaçlanmaktadır. Sıçanların her zaman aynı araştırmacı tarafından, aynı yöntemle düzeneklere konması, araştırmacının odada her zaman aynı yerde durması, aynı renk kıyafet giymesi ve hatta parfümünü bile deneyler süresince değiştirmemesi önerilmektedir.

Yayınlar değerlendirildiğinde sıçanlarda bilişsel ve motor yetilerin değerlendirilmesi amacıyla kullanılan pek çok farklı düzenek olduğu görülmektedir. Bunlardan bazıları rotarot düzeneği, sekiz kollu ışınsal labirent, T labirent, yükseltilmiş artı labirent, açık alan ve Morris su tankıdır.

Anksiyete, korku, tekrarlayan uygulamalarla öğrenme ve kısa hafıza değerlendirilmesinin artı labirent (AL) deneyi ile doğumdan sonraki altıncı haftada ve iki-üç gün süreyle yapılması önerilmektedir^{120,121,122}.

Sıçanların duygusal durumunu, sedasyonunu, lokomotor aktivitesini ölçmede açık alanın (AA) kullanılması ve çalışmanın doğumu takiben 10. haftada yapılması önerilmektedir^{123,124,125}.

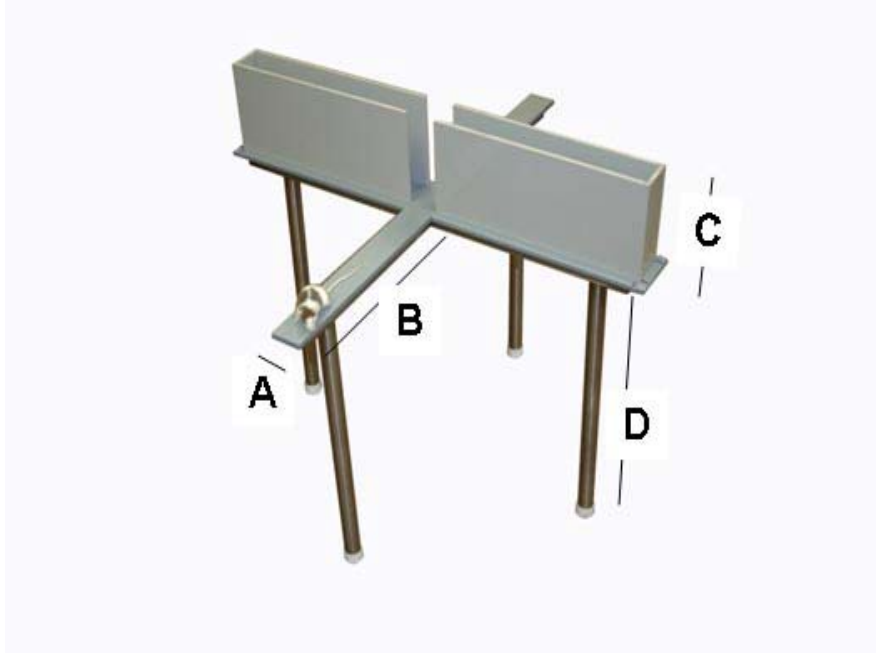
Prof. Richard Morris tarafından tanımlandığından bu yana kemirgenlerin öğrenme ve hafıza çalışmalarında sıkça kullanılan Morris su tankı (MST) düzeneği¹²⁶ ile doğumdan sonraki 12. haftada beş gün süreyle uzak hafızanın (reference memory)^{121,127,128,129,130}, 14. haftada ise dört gün süreyle yakın hafızanın (working memory) değerlendirmesi önerilmektedir^{110,111,131}.

Artı Labirent

Artı labirent ilk olarak 1985 yılında tanımlanmıştır¹²². Bu düzenek ile anksiyete, korku, tekrarlayan uygulamalarla öğrenme ve kısa hafıza değerlendirilebilir. Doğumu takiben beşinci haftadan başlayarak 16. haftaya dek, ardışık iki veya üç gün süreyle günde bir kez, 60 saniye (sn) ile beş dakika (dk) süresince uygulanmaktadır^{120,121,122,132}.

Artı labirent farklı boyutlarda olabilen, yerden belirli bir yükseklikte iki açık, iki

kapalı kolu olan bir düzenektir^{133,134} (Resim 1).



Resim 1: Artı Labirent Düzeneği (*A açık kolun genişliği, B açık kolun uzunluğu, C kapalı kolun duvar yüksekliği, D labirentin yerden yüksekliği*).

Sıçanları kapalı kola koyarak başlanan uygulamalarda açık kola çıkma sürelerinin uzunluğu anksiyete şiddetinin azaldığını gösterir^{135,136}. Açık kola bırakılan sıçanın kapalı kola girme süresinin ardışık günlerde yapılan ölçümü ise öğrenmeyi değerlendirir^{120,132}.

Açık Alan

Açık alan ilk olarak 1934 yılında Hall ve arkadaşları tarafından hayvanların duygusal durumlarını değerlendirmek için tanımlanmıştır¹³⁷. İlk tanımlanan şekli dairesel olup 1971 yılında kare şekli de tanımlanmıştır¹³⁸.

Açık alan, deney hayvanlarının duygusal durumunu, sedasyonunu, lokomotor aktivitesini ölçmede sıkça kullanılan bir düzenektir. Çeşitli boyut ve şekilde (kare, dikdörtgen ve dairesel) olanları vardır. Deney süresi 2-20 dk sürmekle beraber en sık beş dk süreyle ve bir kez uygulanır. Sıçanlar merkeze ya da kenara konarak deney başlatılabilir. Locomotor aktivite birim zamanda çizgi ya da kare geçme sayısı^{123,124,125} veya katedilen mesafe ve hareket hızının ölçümüyle değerlendirilebilir¹²⁴.

Açık alan deneyinde 80x80x50cm boyutlarında gri PVC' den üretilmiş bir kutu kullanılabileceği gibi 100x100x30cm boyutta, zemini 16 eşit kareye bölünmüş ve pleksiglastan hazırlanmış bir kutuda kullanılabilir¹²⁴ (Resim 2).



Resim 2, Açık Alan Düzeneği.

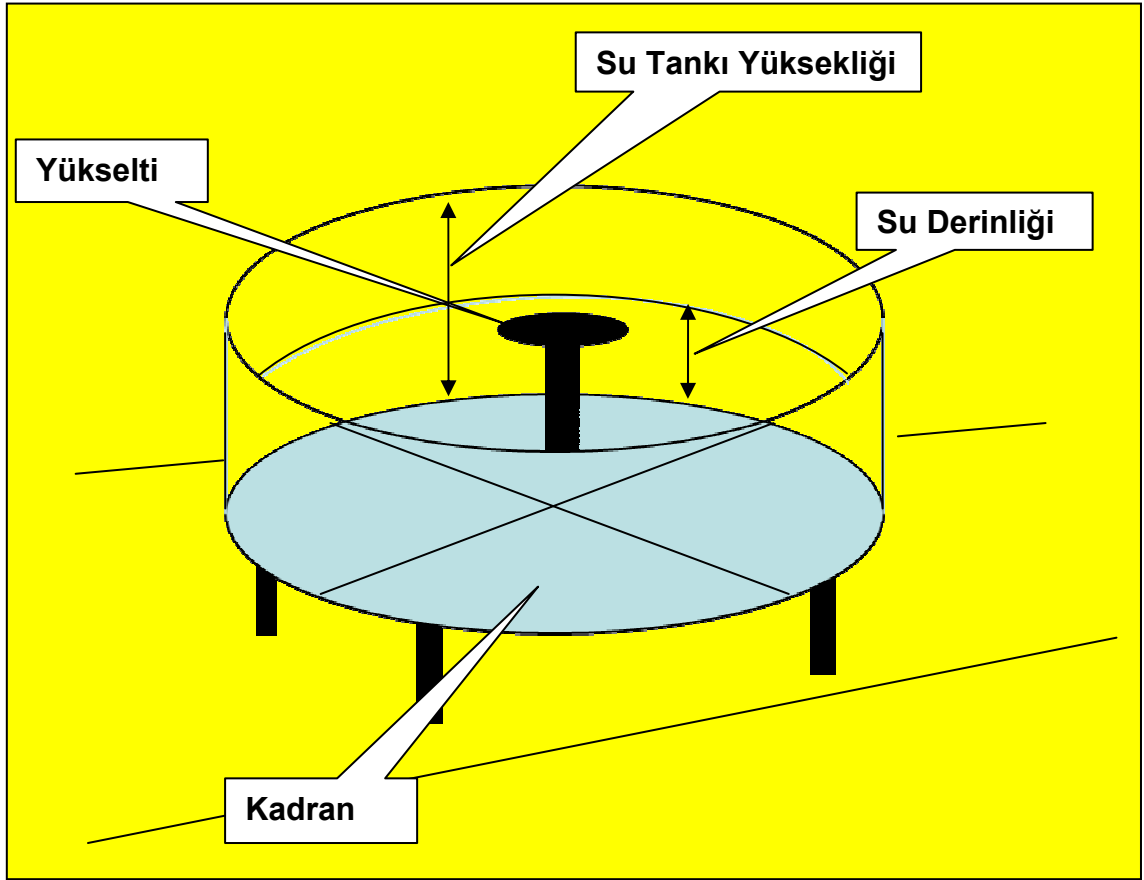
Morris Su Tankı

Su tankı ilk olarak Morris tarafından 1981 yılında¹³⁹ tanımlandığından bu yana kemirgenlerin öğrenme ve hafıza çalışmalarında yaygın olarak kullanılmıştır¹²⁶. MST deneyleri ile uzak hafıza^{113,140,141,142}, yakın hafıza^{110,111,131} ve öğrenme değerlendirilebilir.

Yayınlar incelendiğinde MST' nin silindir şeklinde olduğu, çapının 117 cm' den 210 cm' ye^{130,131,143}, yüksekliğinin 35 cm' den 90 cm' ye^{144,145}, su derinliğinin 24 cm' den 50 cm' ye^{112,131,146} kadar değiştiği görülmektedir. MST içine kare^{111,129,141} veya daire^{112,144} şeklindeki bir yükselti, su yüzeyinin 1-2.5 cm kadar altında hayvan tarafından görülmeyecek bir şekilde yerleştirilerek gizlenir. Deneylerde kullanılan yükselti çapları 8 cm' den¹¹² 15 cm' ye¹⁴⁴ kadar değişmektedir (Şekil 10).

Uzak hafıza deneyi, hayali olarak dört kadrana ayrılmış MST' de, kadrarlardan birine deney boyunca yeri sabit kalacak şekilde yerleştirilen gizli bir yükseltinin, hergün farklı bir kadrandan başlamak kaydıyla ardışık olarak birkaç kez suya bırakılan sıçanlar tarafından günler ilerledikçe daha kısa sürede bulunmasının beklendiği ve deneyin son günü yükseltinin su tankından çıkarılması durumunda ise sıçanların eskiden yükselti olan kadranda geçirdikleri sürenin değerlendirildiği iki aşamalı bir uygulamadır. Uzak hafıza

deneylerinin beş ile 13 gün arasında sürebildiği bildirilmektedir^{127,140,141}.



Şekil 10: Morris Su Tankı.

Yakın hafıza deneyi ise hayali dört kadrana ayrılmış MST' de, hergün farklı bir kadrana yerleştirilerek yeri değiştirilen gizli yükseltinin, hergün farklı bir kadrandan başlamak kaydıyla ardışık olarak birkaç kez suya bırakılan sıçanlar tarafından, hergün değişiklik yapılmasına rağmen gün içindeki atışlar ve günler ilerledikçe daha kısa sürede bulunmasının beklendiği bir uygulamadır. Yakın hafıza deneyleri genellikle dört gün süreyle yapılmaktadır^{110,131}.

MST deneyi sırasında oda sıcaklığının $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ve su sıcaklığının ise 21°C ¹⁴⁵ ile 26°C ^{113,143} aralığında olabileceği pek çok yayında bildirilmiştir. Sıçanlar su tankına her atıldığında, yüzmelerine izin verilen süreler eşit tutulmakta olup, bu süre çeşitli araştırmalarda 30 ile 180 saniye arasında değişmektedir^{140,142,144}. Buna benzer farklılık yükselti üzerinde bekletilme sürelerinde de mevcuttur ve üç saniye¹²⁴ ile 30 saniye^{130,144,146} arasında değişmektedir.

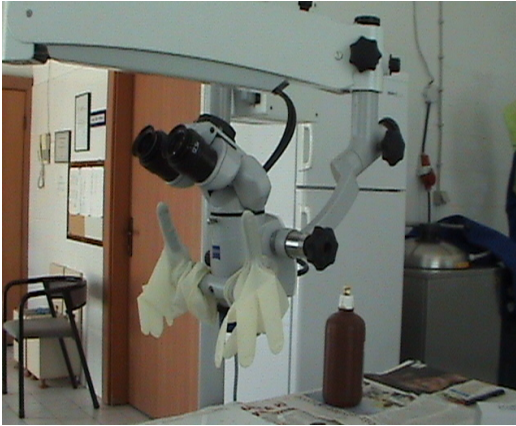
Davranış deneylerinde veri kayıtları, bilgisayar programları aracılığıyla veya kronometre kullanarak sıçanların gözle takibi yoluyla yapılabilmektedir^{124,130,147,148}.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

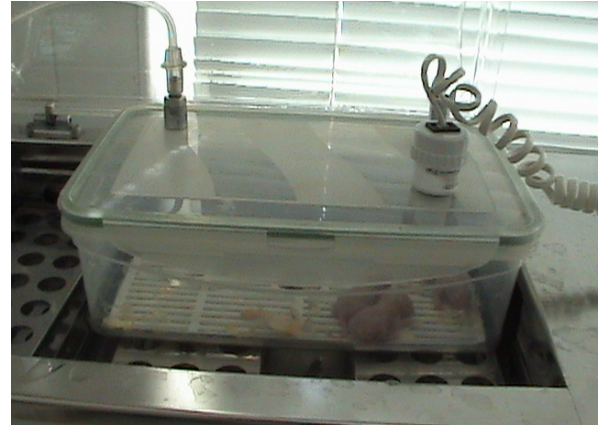
Çalışma Ekibi: Bu çalışma Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Fizyoloji, Çocuk Cerrahisi, Patoloji ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalları tarafından yürütülmüş, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma ve Fizyoloji Anabilim Dalı Davranış Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Etik Komite Onayı: Çalışma için Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'undan onay alınmıştır.

Gereçler: Deney sırasında; diseksiyon için mikroskop (Resim 3) ve çeşitli ebatlarda pens, bistüri, karotid arteri bağlamak için 6-0 ipek, cildin kapatılması için 5-0 ipek ve portegü, ilaç ve SF uygulamaları için enjektörler, hipoksi odacığı (Resim 4), azot ve oksijen tankı, oksimetre, hava iletimi için ara bağlantı hortumları ve T tüp, sıçanların ısıtılması için ısıtıcı su banyosu (benmary), ısının kontrolü için termometre, dekapitasyon için pens ve bistüri, çıkarılan beyinleri korumak için saklama kapları, alınan kan örneklerinin taşınması için buz aküleri, ağırlık ölçümleri için hassas tartı, steril örtü ve eldivenler kullanıldı.



Resim 3: Mikroskop.



Resim 4: Hipoksi Odacığı (25x15x10cm³).

Davranış deneyleri için eni 2.9, boyu 3.9 ve yüksekliği 3.1 metre olan özel bir oda yapıldı. Bu odanın camlarına hem ışık hem de ses yalıtımı için köpük ile izolasyon uygulandı. Oda sıcaklığını sabitlemek için dijital olarak ısıyı ayarlanabilen klima yerleştirildi. Oda sıcaklığı 23°C' de tutuldu. Havalandırmanın sağlanması amacıyla iki adet cam tipi aspiratör kullanıldı. Ayrıca deney sırasında ışık şiddeti ayarlanabilen dört adet halojen lamba kullanıldı. 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ritmi otomatik bir

ayarlayıcı ile sağlandı. Tavana iki adet yüksekliği ayarlanabilir askı yapıldı. Bu askılara iki adet gece ve gündüz kayıt alabilen kamera yerleştirildi. Tüm deneyler Ethovision XT software aracılığı ile kaydedildi^{130,147,148}. Ayrıca olabilecek karışıklıkları önlemek amacıyla her sıçan deney alanına konmadan önce, bir tahta ve asetat kalemi kullanılarak hangi grup, hangi deney, kaçınıcı gün ve kaç numaralı sıçan olduğunu belirten bir not yazıldı ve bu bilgi sıçanın deneyi ile birlikte video kamera ile kaydedildi.

Öğrenmenin değerlendirilmesi için siyah pleksiglastan yapılmış, 50x10 cm boyutlarında dört kola sahip, kollardan ikisinin 50 cm yükseklikte duvarla kapalı olduğu ve yerden yüksekliği 50 cm olan bir artı labirent düzeneği oluşturuldu. Düzeneğin iç yüzeyleri parlamamanın önlenmesi için mat siyah toksik olmayan boya ile boyandı (Resim 5, 6).



Resim 5: Artı Labirentin Yandan Görünüşü.

Lokomotor aktivite ölçümü için siyah pleksiglastan, zemini 100x100cm ve kenarları 40cm yükseklikte bir açık alan deneyi kutusu yapıldı. Kutunun iç yüzeyleri parlamamanın önlenmesi için mat siyah toksik olmayan boya ile boyandı (Resim 7).

Uzak ve yakın hafıza değerlendirilmesi için 150 cm çaplı, 60 cm derinliği olan, sıcaklık ve ışık kontrollü, paslanmaz çelik malzemeden bir su tankı yaptırıldı (Commat Ltd. şti. Ankara/Türkiye) (Resim 8). Bu su tankının içi yüzeyi mikroorganizma ve kir tutmayan, toksik olmayan mat siyah renkte poliüretan özel bir boya ile kaplandı. Su tankı



Resim 6: Artı Labirentin Üstten Görünüşü.



Resim 7: Açık Alanın Üst-yandan Görünüşü.

çevresine görülebilir ve yerleri sabit ipuçları yerleştirildi (ışık, resim vb.) (Resim 9). Su tankı dört eşit kadrana bölündü ve yükseltiyi koymak üzere her kadranın ağırlık merkezi hesaplanarak bulundu. Tüm deneyler boyunca yükseltinin konacağı kadranda yerinin sabit olabilmesi için, paslanmaz galvanizli saçtan yapılmış ve toksik olmayan boya ile boyanmış, kullanılacak yükseltinin ayağına uygun genişlikteki kızaklar, her kadranın daha önce hesaplanmış orta noktasına yapıştırıldı (Resim 10). Su tankı içine taşınabilir, yüzey kaplamasında kullanılan materyal ile kaplanmış siyah renkli, yüksekliği ayarlanabilen, 15 cm çaplı bir yükselti, yapılacak deneye göre uygun kadradaki kızağa ayağı geçirilerek yerleştirildi (Resim 10, 11).



Resim 8: Morris Su Tankı Yandan Görünüşü.



Resim 9: Sabit Görsel İpuçları.



Resim 11: Gizli Yükseltinin Üstten Görünüşü.



Resim 10: Kızaklar ve Yükseltinin Üst-yandan Görünüşü.

Deney Hayvanları: Bu çalışmaya ağırlıkları $11,8 \pm 1,9$ gr olan, Wistar cinsi, 97 adet yedi günlük erkek yavru sıçan dahil edildi (Resim 12). Erken dönemde hipoksinin ve ABT-491' in etkilerini hücresele düzeyde değerlendirmek üzere dekapite edilerek, histopatolojik inceleme yapılan 21 adet ve hipoksi/ilacı uygulamalarını takiben ölen ya da diğere nedenlerden dolayı çalışmadan çıkarılan 19 adet sıçan dışında, canlı kalan 57 sıçana davranış deneyleri uygulandı.

Davranış deney tarihlerine iki gün kalana dek tüm sıçanlar Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanı Laboratuvarı' nda havalandırması, kliması olan, gece-gündüz ritmi otomatik olarak ayarlanan, nemi ölçülen bir odada, annelerinden ayrıldıkları 24. günden itibaren her kafeste 3-4 adet sıçan olacak şekilde ayrı kafeslerde barındırıldı. Sıçanlar ve kafesler toksik olmayan boya kullanılarak numaralandırıldı.



Resim 12: Yedi Günlük Yavru Sıçanlar.

Yöntem

İlaç: ABT-491 (Sigma) 0.4 mg/kg intraperitoneal (i.p.) yoldan 0.2 ml SF içinde verildi.

Hipoksik İskemik Beyin Hasarının Oluşturulması

Yirmiyedi adet anne sıçanın erkek yavruları, rastgele seçilerek üç gruba ayrıldı.

Tüm sıçanlara isofluran emdirilmiş pamuk ile bir iki dk inhalasyon anestezisi verildi. Sıçanlar uyandıkça doz tekrarlandı. İsofluran ile anesteziyi takiben sıçanlar işlem yapılacak masaya dört ayağından flasterle sırt üstü sabitlendi. Ardından boyunda orta hattan kesi yapılarak mikroskop altında sağ karotid arter bulundu. Sham grubu hariç tüm sıçanların karotid arterleri bağlandı.

Tüm yavru sıçanlar derlenme ve beslenme süreci için anne yanında iki saat bırakıldı. Bu sürecin sonunda sham grubu dışındaki sıçanlar bir saat süreyle hipoksi odacığına kondu. Hipoksi odacığının kapağına, içerideki havanın oksijen yüzdesini ölçmek için oksimetre algacı yerleştirildi. Sıçanlar hipoksi odacığına yerleştirildikten sonra hipoksi odacığının kapağı kapatıldı. Hipoksi odacıkları sıçanların ısılarının korunabilmesi için $33 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ' de ısıtılan su içine konuldu. Hipoksi odacığına bir T tüp aracılığı ile %8 yoğunlukta oksijen ve %92 yoğunlukta azot içeren gaz verildi. Hipoksi odacığındaki oksijen yoğunluğu oksimetre ile sürekli takip edilerek %8' lik oran korundu. Bir saatlik hipoksi uygulaması sonunda ilaç veya SF verilen yavru sıçanlar anne yanına kondu. Sham grubu da hipoksi uygulanmamasına karşın annelerinden bir saat süreyle ayrıldı.

Grup A (n: 30) : Hipoksi sonrası ABT-491 i.p. verildi (Toplam 37 olan sıçan sayısından karotid arteri kopan üç ve isofluran anestezisi sırasında ölen dört sıçan düşülmüştür).

Grup B (n: 30) : Hipoksi sonrası SF i.p. verildi.

Grup C (Sham) (n: 30): Sıçanlara anesteziyi takiben sadece boyun diseksiyonu yapılarak karotid arter bulundu, ancak bağlanmadan diseksiyon alanı dikiş ile kapatıldı.

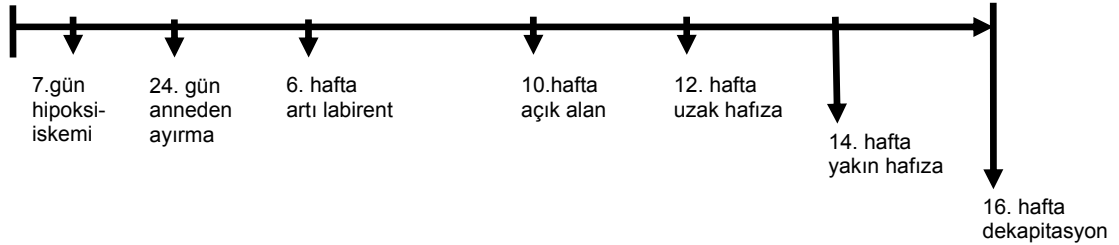
Cerrahi işlem sırasında ve hipoksi odacığında iken her 3 dakikada bir solunum, cilt rengi ve hareketleri yakından izlendi.

A ve B gruplarından 7' şer sıçan i.p. ilaç ya da SF uygulamasını takiben ikinci saatte, C grubundan 7 sıçan iki saatlik derlenme sürecini takiben, MDA ölçümü için kalp içi girişimle kan örneği alındıktan sonra erken dönemde nöronal apoptozu değerlendirmek üzere dekapite edildi. Sonuçta her gruptan 23 sıçan 24 günlük olana kadar anne yanında bırakıldı.

Doğumu takiben 24. gün anneden ayrılan sıçanlar bir numaralı sıçanın baş kısmı, iki numaralı sıçanın sırt kısmı, üç numaralı sıçanın kuyruk kısmı boyanıp, dört numaralı sıçan boyasız bırakılarak 1' den 4' e dek numaralandırıldı. Kafeslere de birden 16' ya dek numara verildi ve tüm sıçanlar her kafeste 3-4 adeti bir arada barınacak şekilde ayrıldı. Bu süreçte grup A' daki sıçanlardan üçü 22 günlükken ve grup B' deki

sıçanların biri de 13 günlükken bilinmeyen bir nedenden öldü. Daha sonraki bir dönemde de Grup B' deki bir sıçanın kafes temizliği yapıldığı sırada yanlışlıkla Grup C' deki iki sıçanın olduğu bir kafese konduğunun fark edilmesiyle her üç sıçan da çalışmaya alınmadı. Ayrıca 10. haftada grup B' den bir, grup C ve grup A' dan ikişer sıçanın gözünde sorun olduğu fark edilince çalışma dışı bırakıldı. Böylece A grubundan 18, B grubundan 20, C grubundan ise 19 sıçan olmak üzere toplam 57 sıçan ile davranış deneyleri tamamlandı.

Sıçanlara doğumu takiben yedinci gün tamamlandığında deneysel hipoksi-iskemi ve ABT-491/SF uygulaması, altıncı hafta tamamlandığında artı labirent, 10. hafta tamamlandığında açık alan, 12. hafta tamamlandığında Morris su tankı-uzak hafıza ve 14. hafta tamamlandığında ise Morris su tankı-yakın hafıza deneylerinin yapılacağı bir deney uygulama takvimi oluşturuldu (Şekil 11).



Şekil 11: Deney Uygulama Takvimi.

Deneyin Bitiriliş Şekli

Deneyin yedinci gününde her bir gruptan rastgele seçilen yedişer sıçana isofluran anestezisi uygulanarak kalp içinden kan örneği alındı ve servikal dislokasyon ile ötenazi uygulandı. Beyin bütünlüklerini bozmadan dekapitasyon yapıldı ve kafatasından çıkarılan beyin örnekleri bekletilmeden %10' luk nötral formaldehid içeren kaplar içerisine konuldu.

Doğumu takiben 16. haftada davranış deneylerini tamamlayan sıçanlara ketamin (80mg/kg/doz) ve ksilazin (8mg/kg/doz) anestezisi i.p. verilerek, servikal dislokasyon ve ötenazi uygulandı. Beyin bütünlükleri bozulmadan dekapitasyon yapıldı ve beyinler ağırlıkları tartıldıktan sonra bekletilmeden %10 formaldehid içine konuldu.

Histopatolojik Değerlendirme

Doğumu takiben yedinci günde deney sonunda çıkarılan beyinlerde TUNEL ve Kaspaz-3 yöntemleri ile immünohistokimyasal olarak "apoptoz" değerlendirildi. Çıkarılan beyinler sıçanların hangi gruptan olduğunu ve sıçanın hangi karotid arterinin bağlandığını bilmeyen bir patolog tarafından değerlendirildi. Bir gecelik formaldehit tespit

işlemi ardından beyin dokularının sağ yarılı doku boyası ile işaretlenerek koronal olarak seri kesitler alındı. Subtalamik nükleuslar, hipokampus ve parietal korteksi temsil eden bir veya iki örnek rutin takip işlemine sokuldu. Hipoksik-iskemik hasara daha duyarlı olduğu için bu bölgelerdeki nöronlar seçildi. Rutin takip işleminde beyin dokuları alkol, ksilol ve parafin solüsyonlarında bekletildiler. Hazırlanan parafin bloklardan elde edilen beş mikron kalınlığındaki kesitler rutin hematoksilin eozin histokimyasal boyası ile boyandı. Preparatlar ışık mikroskopik düzeyde (Nikon Eclipse 80i) incelendi. Koronal kesitlerde rutin boya ile nöronal morfolojik değişiklikler not edildi.

TUNEL Yöntemi

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

Kaspaz-3 Yöntemi

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

Apoptozun Değerlendirilmesi

Sağ yarılı doku boyası ile işaretlenen koronal beyin kesitleri, TUNEL metodu ve Kaspaz immünohistokimyasal boyama işlemlerinden sonra ışık mikroskopunda değerlendirildi. Her iki beyin yarısı ayrı ayrı değerlendirildi ve her iki taraftaki subtalamik nükleuslar, hipokampus ve parietal kortekste TUNEL ve Kaspaz ile immünreaktivite

gösteren nöronlar sayıldı. Sayım için kesitler ışık mikroskopik düzeyde önce küçük büyütmede ve X40 büyütme alanında taranarak sağ ve sol yarı için sayım yapılacak alanlar seçildi. Sayım için uygun 5 alan X400 büyütme (her büyük büyütme =152 μm^2 , toplam alan 760 μm^2) tarandı. TUNEL ve Kaspaz-3 ile pozitif boyanan toplam nöronlar sayıldı.

Atrofinin Değerlendirilmesi:

Tüm deneylerin 16. haftada tamamlanması ile çıkarılan beyinlerin ağırlıkları ve makroskopik olarak HİBH bulguları değerlendirildi.

Biyokimyasal Değerlendirme

Doğumu takiben yedinci günde dekapite edilen sıçanlardan kalp içi girişim yoluyla alınan kan örneklerinde, lipid peroksidasyonunda ikincil ürün olarak oluşan MDA düzeyleri ölçüldü. Grup C' deki bir örnek hemolizli olması nedeniyle çalışma dışı bırakıldı ve deneyin bu aşaması 20 örneğin incelemesi ile tamamlandı.

Aerobik şartlarda örneklerin pH: 3.4' de ve 95°C ısıda tiyobarbitürik asit (TBA) ile inkübasyonu yoluyla MDA varlığı tespit edildi. Oluşan MDA ve TBA pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve renk şiddetinin 532 nm' de spektrofotometrik olarak ölçümü ile lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyleri saptanmaktadır.

Tüplere alınan kan örnekleri 3000 rpm' de 10 dk santrifüj edilerek elde edilen plazma çalışılana kadar -20°C' de saklandı. İşlem yapılacağı gün hazırlanan solüsyonlar 95°C' de 30 dk inkübe edildi. Daha sonra musluk suyunda soğutuldu. 1 ml distile su ve 5 ml n-bütanol: piridin (14/1 oranında hazırlandı) solüsyonu eklendi. Vorteksde karıştırıldı. 4000 rpm.' de 15 dk santrifüje edildi. Üstteki kısmı alınarak spektrofotometrede 532 nm.' de absorpsiyonu okundu. Sonuçların değerlendirilmesinde 1.1.33 tetraetoksiyopropane ile hazırlanan standart eğri kullanıldı ¹⁴⁹.

Davranış Deneyi Uygulamaları ve Değerlendirme

Her deneyden iki gün önce deneyin uygulanacağı gruptaki sıçanlar davranış laboratuvarına getirilerek, tüm sıçanların aynı streslere maruz kalması, ortama alışmaları için eşit süre geçirmeleri sağlandı. Tüm deneyler boyunca sıçanlar aynı araştırmacı tarafından düzeneklere kuyruklarından tutularak konuldu. Bir deneyin tüm gruplara uygulanışı süresince araştırmacı aynı renk kıyafet giydi ve odada aynı yerde durdu. Davranış deneylerine sabah saat 09:00' da başlandı ve en geç saat 14:00' de bitirildi.

Dört adet şeffaf, plastikten yapılmış, talaşsız ve kuru kap bekleme kafesi olarak kullanıldı. Her sıçan düzeneklere konmadan önce 10 dakika süreyle bu kaplarda bekletildi. Hergün deneylerin bitiminde bu kaplar yıkandı. Açık alan ve artı labirent

deneylerinde her sıçanın alana konmasından önce labirentler temizlendi. Su tankının dibinde biriken tüm kirler, hergün deney bitiminde vakumlu bir sistemle temizlendi. Hayvanların barındığı kafesler üç gün aralarla düzenli olarak temizlendi, ancak gerek görüldüğünde daha sık kafes temizliği yapıldı.

Artı Labirent Deneyi

Bu labirent ile öğrenme yetisini değerlendirmek amaçlandı. Tüm sıçanlara altıncı haftanın tamamlanmasını takiben, ardışık üç gün boyunca, günde bir kez ve sabah saat 09:00-13:00 arasında uygulandı.

Günlük uygulamalarda deney süresi 60 sn olarak belirlendi. Sıçanlar ikişer dk arayla labirente kondu. Altmış saniye bitmeden kapalı kollardan birine giren ve bir saniye orada kalan sıçanlar kapalı kolu bulmuş olarak kabul edildi ve giriş süreleri kaydedildi. Deneyin ilk günü 60 sn' de kapalı kola girmeyen sıçanlar da elle yönlendirilip kapalı kola sokularak, tüm sıçanların 10 sn süreyle kapalı kolda kalmaları sağlandı. İki ve üçüncü günlerde elle yönlendirme ve kapalı kolda 10 sn bekletme yapılmadan deney aynen tekrarlandı(Bkz. EK-1). Deney sırasında labirentten düşen sıçan olduğunda, düştüğü yerden tekrar labirente konarak deneye devam edildi. Deney sonlandığında tüm sıçanların ağırlıkları tartıldı.

Açık Alan Deneyi

Bu deneyde lokomotor aktivitenin değerlendirilmesi amaçlandı. Tüm sıçanlara 10. haftayı tamamlamalarını takiben bir gün, bir kez ve 5 dk süreyle, saat 09:00 ile 13:00 arasında uygulandı. Ekrandaki görüntüye göre sağ alt köşe başlangıç alanı olarak seçildi. 100x100cm ölçülerindeki zeminde beş dakika süreyle katettikleri mesafe (cm) ve hareket hızları (cm/sn) kaydedildi (Bkz. EK-1). Deney bitiminde sıçanların ağırlıkları tartıldı.

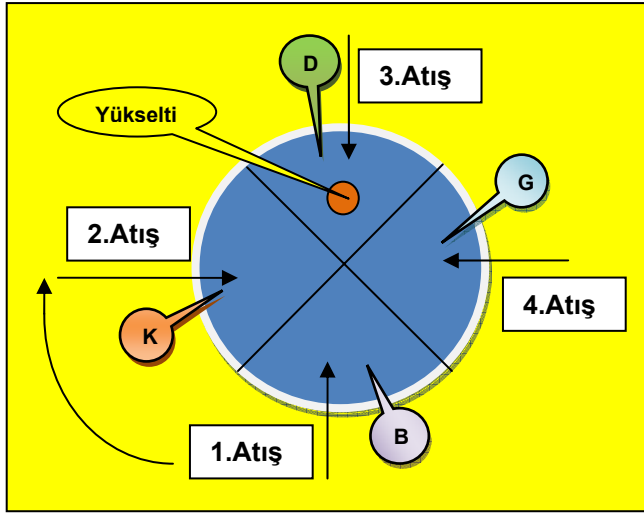
Morris Su Tankı Deneyi

Deneyler sıçanlar doğumu takiben 12. ve 14. haftalarını tamamladığında, hergün saat 09:00-14:00 arasında uygulandı. Bu düzenekte daha önce bahsedilen uzak ve yakın hafıza deneyleri, standart ortam koşullarının sağlandığı bir odada değerlendirildi.

Uzak Hafıza Deneyi

Sıçanlar doğumu takiben 12. haftayı tamamladığında ve beş gün süreyle uygulandı. Bilgisayar ekranındaki görüntü üzerinden su tankı batı, kuzey, doğu ve güney olmak üzere dört eşit kadrana ayrıldı. Tank 42 cm derinlik olacak şekilde ve 22 ± 1 C° sıcaklığında su ile dolduruldu. Deneyin ilk dört gününde 15 cm çaplı yükselti su altında gizlenecek şekilde 40 cm yüksekliğe ayarlanıp, yeri sabit olmak üzere doğu kadrınının

orta noktasına yerleştirildi. Deneyin ilk günü tüm sıçanlar batı kadransından başlanıp saat yönünde ilerleyerek her kadrandan günde bir kez olmak kaydıyla toplam dört kez, başları su tankı duvarına dönük olarak suya bırakıldı (Şekil 12). Her suya bırakılma uygulaması “Atış” olarak adlandırıldı. Sıçanlar her atışta 60 sn süre ile yüzdürüldüler. Bu süre içinde yükselti üzerine çıkan, 5 sn orada kalan sıçanlar deneyin bu aşamasını tamamlamış kabul edildi ve 15 sn süreyle yükselti üzerinde kalmalarına izin verildi. 60 sn içinde yükseltiyi bulamayan sıçanlar elle yönlendirilerek yükseltiyi bulmaları ve 15 sn süreyle yükselti üzerinde kalmaları sağlandı(Bkz. EK-1).

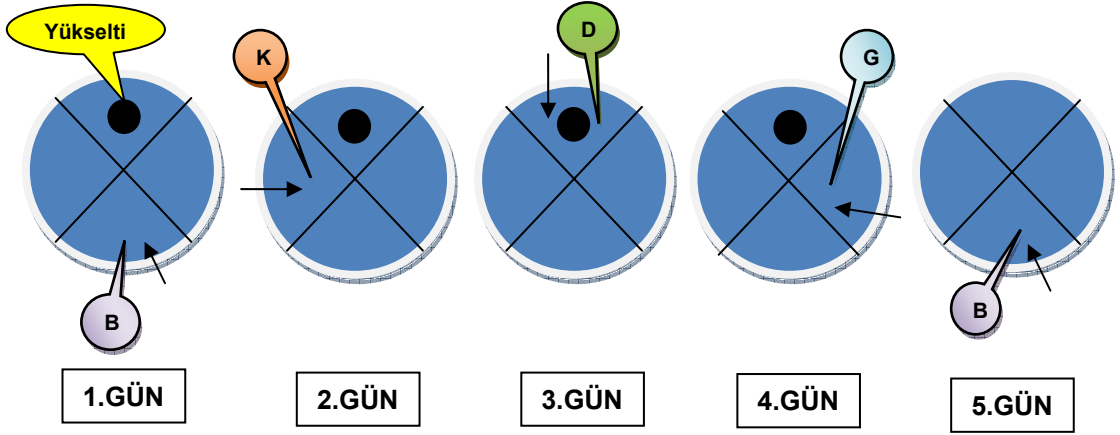


Şekil 12: MST Uzak Hafıza Deneyinde 1. Gün Sıçanların Suya Atılış Şeması. [İlk atış batı kadransından yapılır ve saat yönünde ilerleyerek her sıçan için günlük toplam 4 atışla deney tamamlanır (B batı, K kuzey, D doğu, G güney kadransları)].

Deneyin 2, 3 ve 4. günlerinde saat yönünde ilerleyerek ilk atışların hergün farklı bir kadrandan yapılması sağlandı (Şekil 13). Dört gün süresince her atışta yükseltiyi bulma süresi (YBS) kaydedildi. Her grubun 1., 2., 3. ve 4. günlerdeki ortalama YBS' leri hesaplandı. Bu süreler her grup için kendi içinde birbirleriyle ve her gün için gruplar arasında karşılaştırıldı. Ayrıca 1. gün ile 4. gün arasındaki YBS farkı da gruplar arasında karşılaştırıldı.

Deneyin beşinci günü doğu kadransındaki yükselti su tankından çıkarıldı. Tüm sıçanlar yükseltinin eskiden olduğu kadranın karşısında yer alan batı kadransından bir kez suya bırakıldılar ve 60 sn süreyle yüzdürüldüler (Şekil 13). Bu süre sonunda eskiden yükseltinin olduğu doğu kadransında ortalama geçirdikleri süre (sn), yüzme hızları (cm/sn)

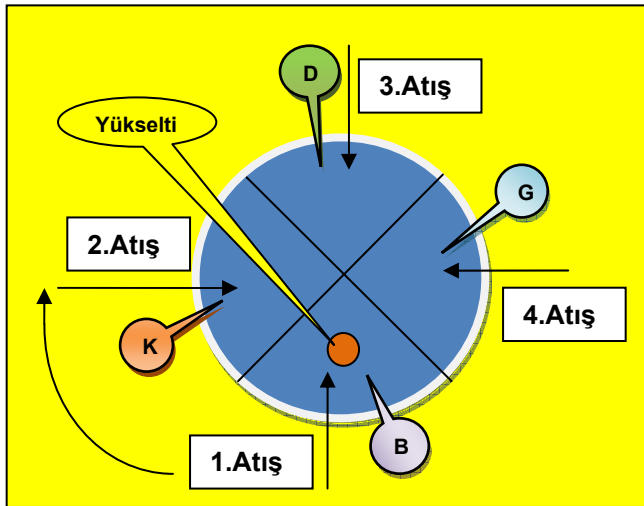
katettikleri mesafeler (cm) kaydedildi ve gruplar arasında karşılaştırma yapıldı (Bkz. EK-1). Deneyin tamamlanmasını takiben sıçanların ağırlıkları ölçüldü.



Şekil 13: MST Uzak Hafıza Deneyi Günlere Göre Uygulama Şeması (B batı, K kuzey, D doğu, G güney kadrantını, oklar ise hergünün ilk atış yapılan kadrantını göstermektedir).

Yakın Hafıza Deneyi

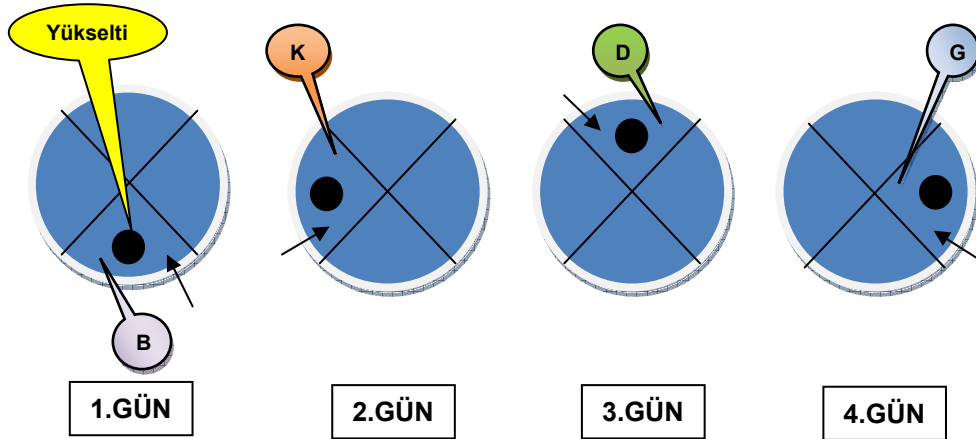
Her sıçan için doğumu takiben 14. haftayı tamamladığında, dört gün süreyle ve günde dört kez atış yapıldı. Oda-su sıcaklığı, su derinliği ve yükseltinin boyu/çapı, ışıklandırma, deney öncesi bekleme süresi ve deneyin yapıldığı saatler uzak hafıza deneyindeki gibiydi. Uzak hafıza deneyinin ilk dört gününe benzer şekilde, sıçanlar suya



Şekil 14: MST Yakın Hafıza Deneyinde 1. Gün Sıçanların Suya Atılış Şeması. [Yükselti batı kadrantına yerleştirilir, ilk atış ta batı kadrantından yapılır ve saat yönünde ilerleyerek her sıçan için günlük toplam 4 atışla deney tamamlanır (B batı, K kuzey, D doğu, G güney kadrantı)]

her atılışlarında 60 sn yüzmelerine ve 15 sn yükselti üzerinde kalmalarına izin verildi (Bkz. EK-1). 60 sn' de yükseltiyi bulamayan sıçanlar da elle yönlendirilerek yükselti üzerine kondu. Uzak hafıza deneyinden farklı olarak her sıçanın iki atışı arasında 5 dakika süre ile beklenildi, hergün ilk atışlar yükseltinin bulunduğu kadrandan yapıldı (Şekil 14) ve yükseltinin yeri saat yönünde ilerleyerek hergün değiştirildi (Şekil 15). İlk atışlara öğrenme atışı ismi verildi. İkinci, üçüncü ve dördüncü atışlar ise uzak hafıza deneyinde olduğu gibi saat yönünde ilerleyerek farklı kadrarlardan yapıldı (Şekil 14)

Her bir grup için, o gruptaki tüm sıçanların dört güne ait 1. atış, 2. atış, 3. atış ve 4. atıştaki ortalama YBS, yüzme hızı ve katedilen mesafe verilerinin alt alta toplanmasıyla her grubun, her parametre için birer tane 1. atış, 2. atış, 3. atış ve 4. atış. ortalama değerleri hesaplandı. Yükseltinin olduğu kadrandan yapılan öğrenme atışları istatistiksel hesaplamalara katılmadı. İkinci, 3. ve 4. atışların ortalama YBS' leri, her grup için kendi arasında ve her bir atışın ortalama YBS' si de gruplar arasında karşılaştırıldı. Deneyin tamamlanmasını takiben sıçanların ağırlıkları tartıldı.



Şekil 15: MST Yakın Hafıza Deneyi Uygulama Şeması. (B batı, K kuzey, D doğu, G güney kadrantını, oklar ise hergünün ilk atış yapılan kadrantını göstermektedir).

İstatistiksel Yöntemler

Bu çalışmadaki tüm veriler ortalama \pm standart sapma (SS) olarak hesaplandı ve P değerinin 0.05'in altında olması anlamlı kabul edildi.

Apoptotik hücre sayısı değerlendirmesinde, beynin bir yarısındaki apoptotik hücre sayılarının gruplar arası karşılaştırılması varyans analizi (ANOVA) testi ile yapıldı. Her boyama yöntemi için, her grubun kendi sağ ve sol beyin yarıları arasındaki apoptotik

hücre sayılarının karşılaştırılmasında eş yapma t testi (Paired Samples t Test) kullanıldı.

Serum malondialdehid düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılmasında varyans analizi (ANOVA) testi yapıldı.

Artı labirent deneyi değerlendirmesinde tekrarlanan ölçümlü varyans analizi (repeated measures ANOVA) testi kullanıldı.

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

Morris su tankında uzak hafıza deneyinde 1, 2, 3 ve 4. günlerin verileri tekrarlanan ölçümlü varyans analizi (repeated measures ANOVA) testi ile ve beşinci gün verileri ise varyans analizi (ANOVA) testi ile değerlendirildi.

Yakın hafıza deneyi verilerinin karşılaştırılmasında tekrarlanan ölçümlü varyans analizi (repeated measures ANOVA) testi kullanıldı.

Deney sonunda beyin ağırlıkları değerlendirmesi varyans analizi (ANOVA) testi ile yapıldı.

Tekrarlanan ölçümlü varyans analizi (repeated measures ANOVA) testinde anlamlı sonuç bulunması durumunda, farklı olan alt grupların belirlenmesi amacıyla Student-Newman-Keuls post hoc testi kullanıldı. Varyans analizi (ANOVA) testinde anlamlı sonuç bulunması durumunda ise Bonferroni post hoc testinden yararlanıldı.

İstatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) for Windows Release 11.5.1, Standard Version paket programında yapılmıştır (SPSS Inc., 1989-2002). Grafik çizimlerinde ikinci bir araç olarak Microsoft Office Standard Edition for Students and Teachers, Microsoft ® Office Excel 2003-2007 modüllerinden yararlanılmıştır.

BULGULAR

Apoptoz Bulguları

Doğumu takiben yedinci günde dekapite edilen sıçanların beyinlerinin her iki yarısı da makroskopik olarak normal görünümdeydi. Ayrıca koronal kesitler yapıldığında da normal makroskopik bulgular mevcut olup; kanama, ödem ve infarkt alanı saptanmadı. Rutin hematoksilen eozin boyası ile apoptotik nöronlar normal morfoloji sergileyen nöronlara göre yuvarlak sınırlı, nükleer kondansasyon ve sitoplazmik büzüşme sergilemekteydi.

Normal morfoloji sergileyen nöronlarda TUNEL ile pozitif boyanma görülmezken; apoptotik morfoloji sergileyen nöronların çoğu TUNEL ile nükleer pozitif olarak boyandı. Kaspaz-3 ile apoptotik olan nöronlarda sitoplazmik ve nükleer pozitif boyanma izlenirken; normal morfoloji sergileyen nöronlarda Kaspaz-3 ile boyanma saptanmadı.

TUNEL Yöntemiyle Beyindeki Apoptotik Hücrelerin Değerlendirilmesi

Beynin sağ yarısında TUNEL yöntemiyle yapılan apoptotik hücre sayılarının değerlendirilmesinde; uygulanan hipoksi-iskemi modeliyle beyindeki apoptotik hücre sayısında artış gözlemlendi. Hipoksi/ABT-491 uygulanan (grup A) ve hipoksi/SF uygulanan (grup B) yavru sıçanlardaki ortalama apoptotik hücre sayıları sırasıyla 10 ± 2 ve 17 ± 4 iken; grup C (sham)' in ortalama apoptotik hücre sayısı 6 ± 1 olarak bulundu (Tablo 3, şekil 16).

Grup B' deki sıçanların beyinlerinin sağ yarısında TUNEL yöntemiyle saptanan ortalama apoptotik hücre sayıları, grup A ve C ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu (sırasıyla $p < 0,001$ ve $p < 0,001$). Hipoksi/ABT-491 uygulanan grup A' daki sıçanların beyinlerinin sağ yarısında TUNEL yöntemiyle saptanan ortalama apoptotik hücre sayıları grup C (sham)' ninki ile karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p = 0,047$) (Tablo 3).

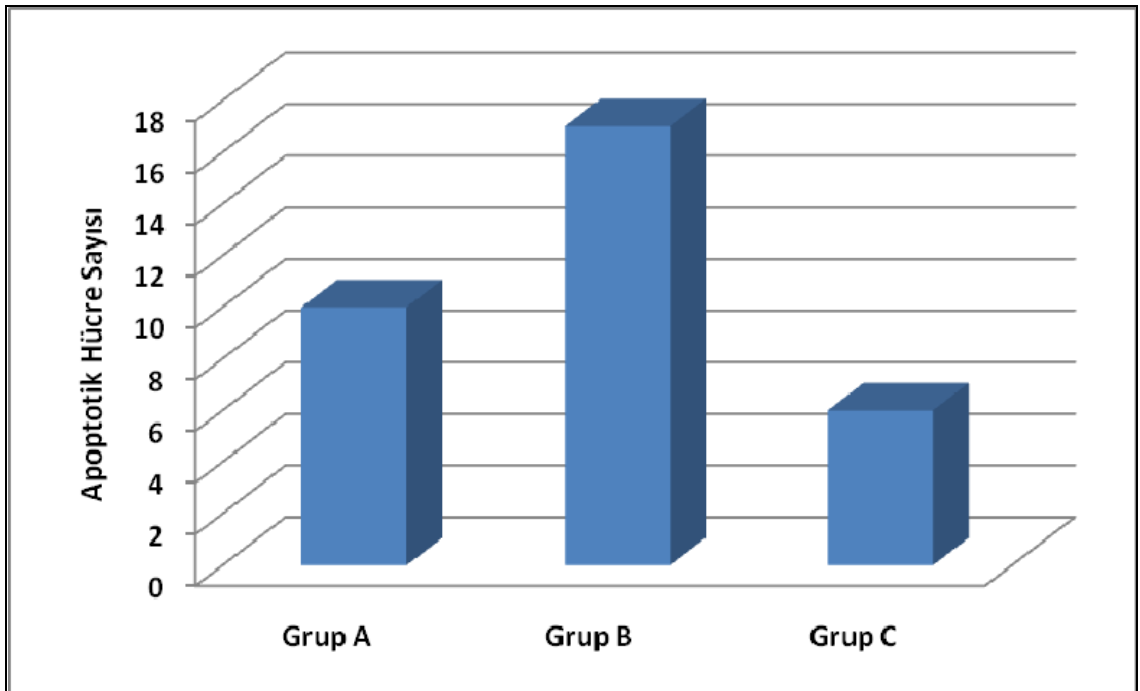
Beynin sol yarısında TUNEL yöntemiyle yapılan apoptotik hücre sayılarının değerlendirilmesinde; grup A ve grup B' deki ortalama apoptotik hücre sayısı sırasıyla 9 ± 2 ve 15 ± 3 olup grup C (sham)' in ortalama apoptotik hücre sayısından (5 ± 1) istatistiksel olarak anlamlı derecede fazlaydı ($p < 0,001$) (Tablo 3, Şekil 17). Grup B' deki sıçanların beyinlerinin sol yarısında TUNEL yöntemiyle saptanan ortalama apoptotik hücre sayıları grup A ile karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0,001$). Grup A' daki sıçanların beyinlerinin sol yarısında TUNEL

yöntemiyle saptanan ortalama apoptotik hücre sayılarının grup C ile karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı ($p=0,022$) (Şekil 17).

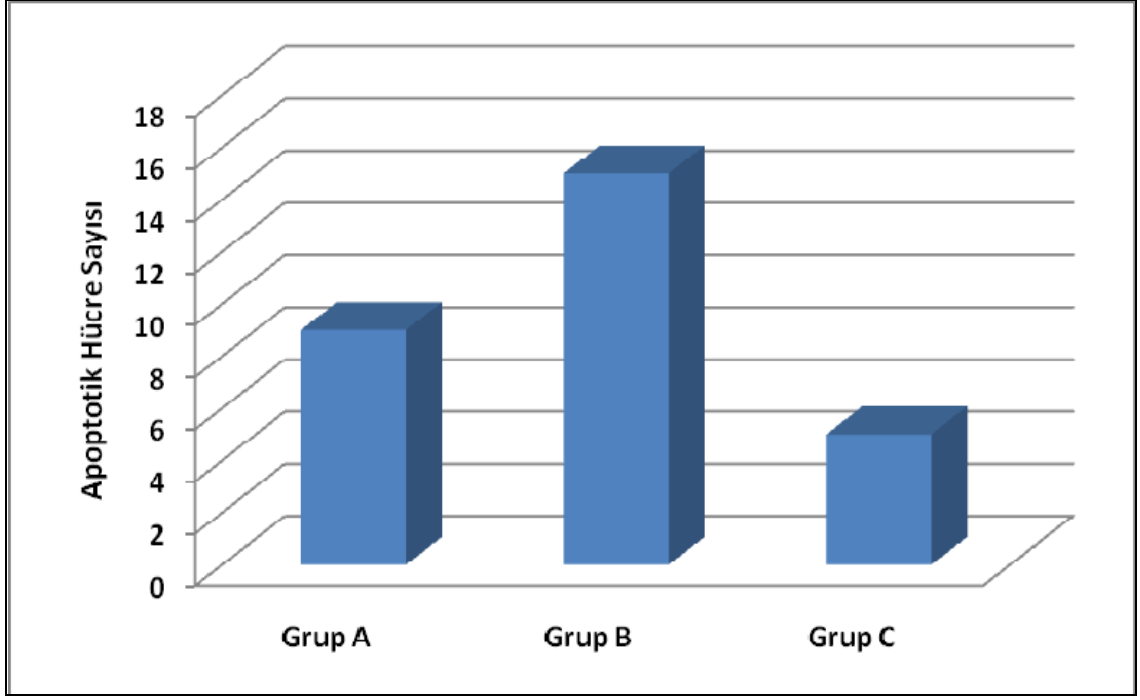
Beynin her iki yarısında TUNEL yöntemiyle yapılan apoptotik hücre sayılarının her bir grup için karşılaştırılmasında; en belirgin fark grup B' de saptanmış olmasına karşın, grupların hepsinde de beyin sağ ve sol yarısındaki apoptotik hücre sayısı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Grup A, B, C sırasıyla $p=0,121$, $p=0,053$ ve $p=0,078$) (Tablo 3, Şekil 18).

Tablo 3: Gruplara Göre TUNEL Yöntemiyle Beynin Sağ ve Sol Yarısındaki Apoptotik Hücre Sayılarının Karşılaştırılması.

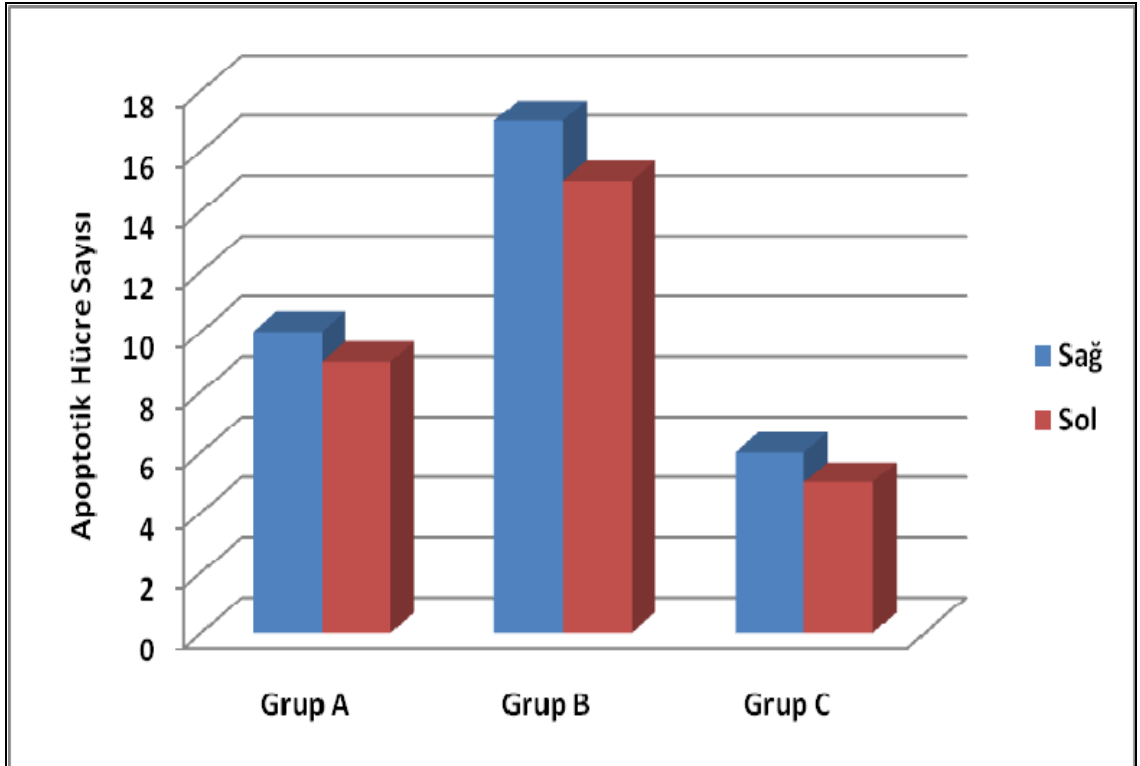
Grup	A	B	C
Beynin Sağ Yarısı	10 ± 2	17 ± 4	6 ± 1
Beynin Sol Yarısı	9 ± 2	15 ± 3	5 ± 1
P	0.121	0.053	0,078



Şekil 16: Beynin Sağ Yarısındaki Apoptotik Hücrelerin Gruplara Göre Dağılımı (TUNEL yöntemi).



Şekil 17: Beynin Sol Yarisındaki Apoptotik Hücrelerin Gruplara Göre Dağılımı (TUNEL yöntemi).



Şekil 18: Beynin Sağ ve Sol Yarisındaki Apoptotik Hücre Sayıları (TUNEL Yöntemi).

Kaspaz-3 İmmünohistokimya Yöntemiyle Beyindeki Apoptotik Hücrelerin Değerlendirilmesi

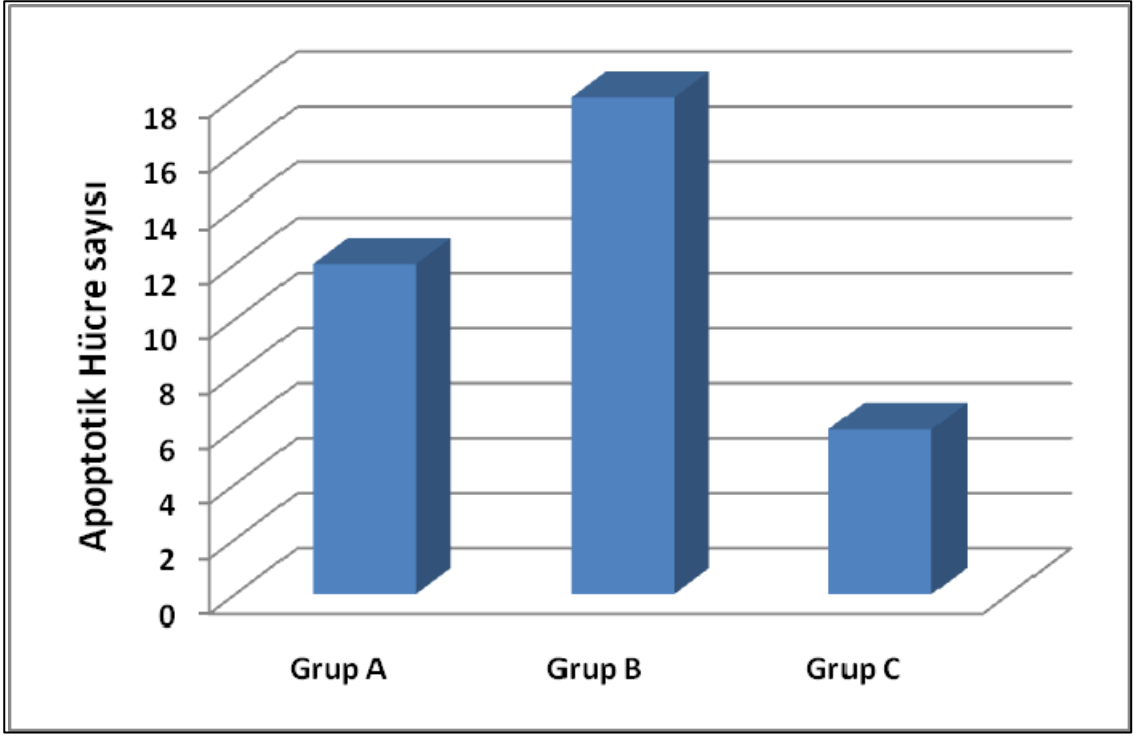
Beynin sağ yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle yapılan apoptotik hücre sayılarının değerlendirilmesinde; uygulanan hipoksi ve iskemi modeliyle beyindeki apoptotik hücre sayısında artış gözlemlendi. Grup A ve grup B' deki ortalama apoptotik hücre sayıları sırasıyla 12 ± 2 ve 18 ± 3 iken; grup C (sham)' nin ortalama apoptotik hücre sayısı 6 ± 2 olarak bulundu (Tablo 4, şekil 19). Grup A ve B' nin beynin sağ yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle belirlenen ortalama apoptotik hücre sayıları grup C ile karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,001$ ve $p<0,001$). Grup A ile grup B' de beynin sağ yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle saptanan apoptotik hücre sayıları karşılaştırıldığında ise grup A' daki apoptotik hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu saptandı ($p=0,003$) (Tablo 4, şekil 19).

Beynin sol yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle yapılan apoptotik hücre sayılarının değerlendirilmesinde; grup A ve grup B' teki ortalama apoptotik hücre sayısı sırasıyla 9 ± 2 ve 14 ± 4 olup grup C' den (5 ± 1) istatistiksel olarak anlamlı derecede fazlaydı (sırasıyla $p=0,003$ ve $p<0,001$) (Tablo 4). Grup A ile grup B' de beynin sol yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle saptanan apoptotik hücre sayıları karşılaştırıldığında ise grup A' daki apoptotik hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu saptandı ($p=0,007$) (Tablo 4, şekil 20).

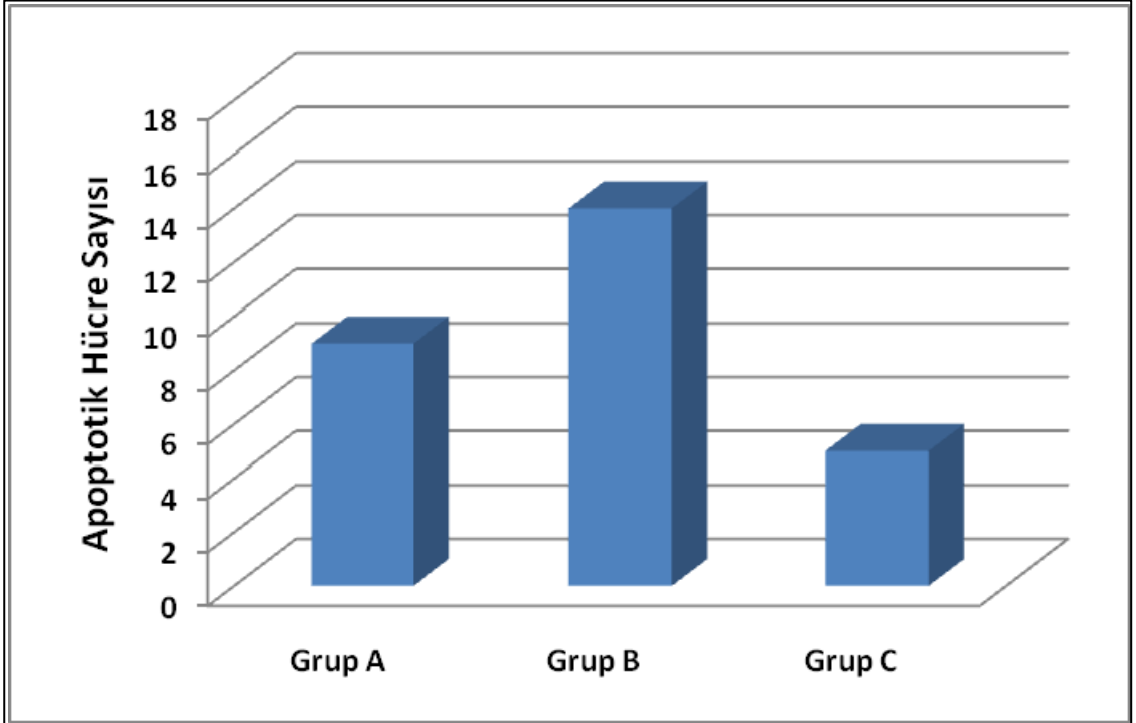
Beynin her iki yarısında kaspaz-3 yöntemiyle yapılan apoptotik hücre sayılarının her grup için karşılaştırılmasında; sham grubu hariç, grup A ve B' de sağ yarıdaki apoptotik hücre sayısı sola göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla olarak bulundu (sırasıyla $p=0,014$ ve $p=0,010$) (Tablo 4, Şekil 21).

Tablo 4: Gruplara Göre Kaspaz-3 Yöntemiyle Beynin Sağ ve Sol Yarısındaki Apoptotik Hücre Sayılarının Karşılaştırılması.

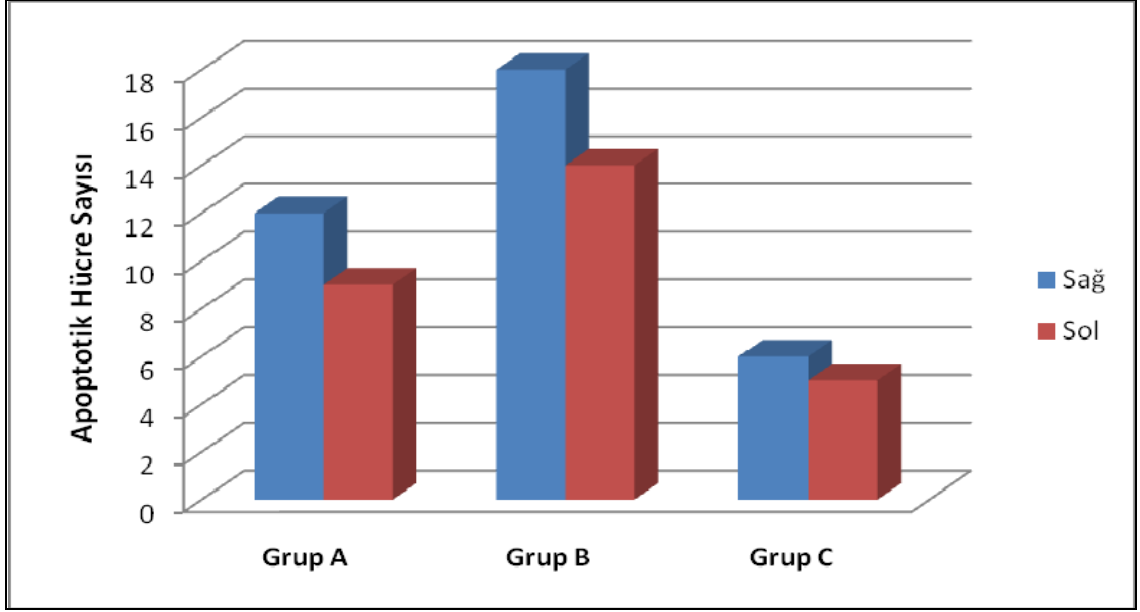
Grup	A	B	C
Beynin Sağ Yarısı	12 ± 2	18 ± 3	6 ± 2
Beynin Sol Yarısı	9 ± 2	14 ± 4	5 ± 1
P	0,014	0,010	0,052



Şekil 19: Beynin Sağ Yarisındaki Apoptotik Hücrelerin Gruplara Göre Dağılımı (Kaspaz- 3 yöntemi).



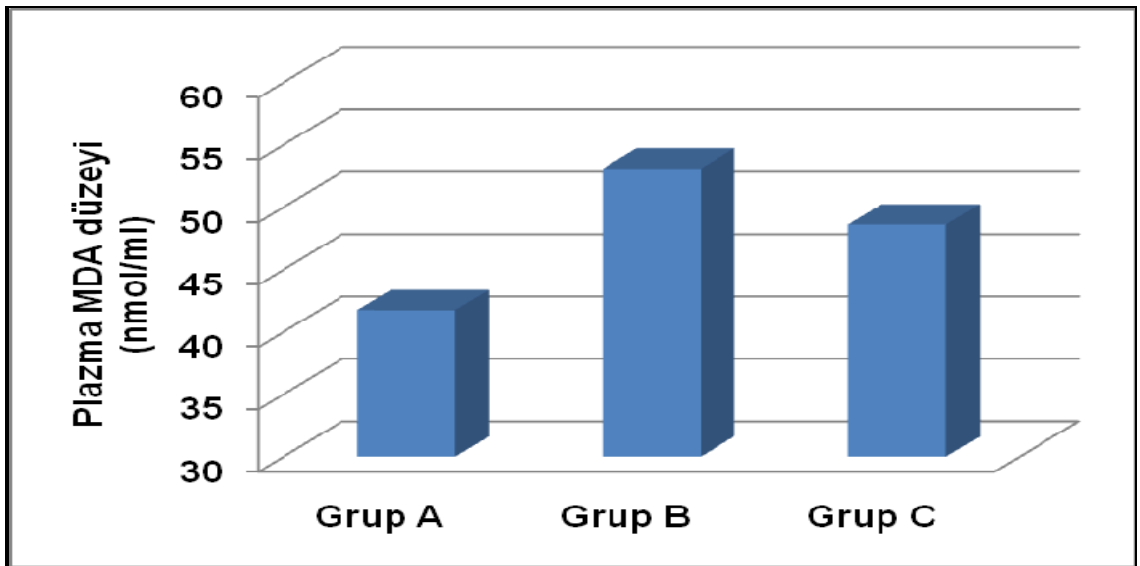
Şekil 20: Beynin Sol Yarisındaki Apoptotik Hücrelerin Gruplara Göre Dağılımı (Kaspaz- 3 yöntemi).



Şekil 21: Beynin Sağ ve Sol Yarısındaki Apoptotik Hücre Sayıları (Kaspaz-3 Yöntemi).

Malondialdehid Düzeyi

Doğumu takiben yedinci gün yapılan HİBH' den sonra kalp içi girişimle alınan kan örneklerinde en yüksek ortalama MDA düzeyi grup B' deki sıçanların plazmalarında saptandı. Serum MDA düzeyleri grup A' da 41.7 ± 27.7 , grup B' de 53.1 ± 26.3 ve grup C' de 48.6 ± 17.1 nmol/ml olarak ölçüldü. Plazma MDA düzeylerinin gruplar arası karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p = 0,690$) (Şekil 22).



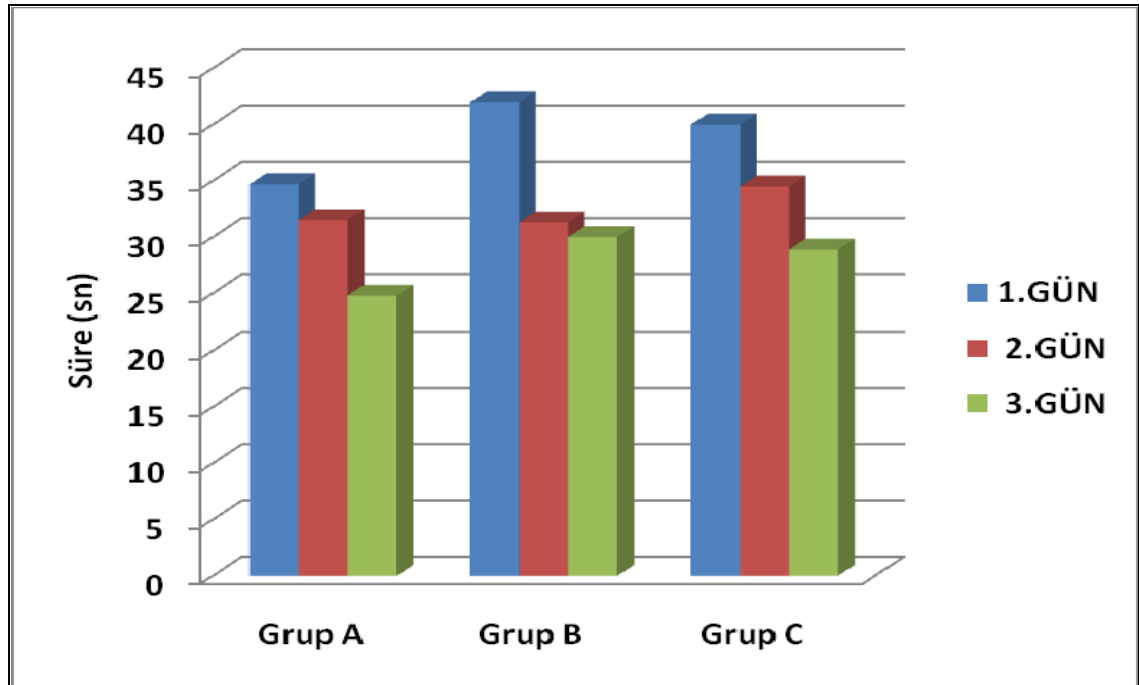
Şekil 22: Plazma MDA Düzeyinin Gruplara Göre Dağılımı.

Artı Labirent Deneyi Bulguları

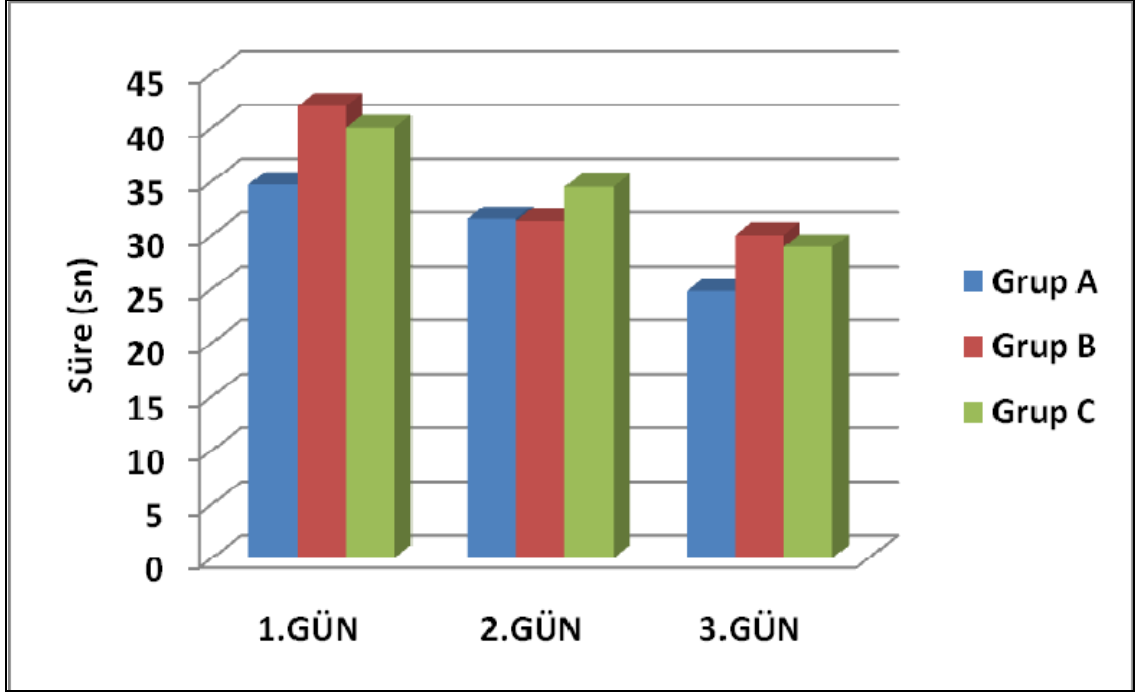
Bu deney doğumu takiben altıncı haftasını tamamlamış, ortalama ağırlıkları $103,6 \pm 23,6$ gr olan sıçanlara uygulandı. Her grupaki sıçanların 1, 2 ve 3. günlerde kapalı kola girme süreleri Tablo 5' te gösterilmiştir. Her grubun günlere göre kapalı kola girme süreleri kendi içinde karşılaştırıldığında gün ilerledikçe kapalı kola girme süresinin (KKGS) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde kısaldığı saptandı ($p=0,003$) (Şekil 23). Bir ve üçüncü günlerde KKGS en uzun saptanan grup B' nin günlere göre KKGS' nin, grup A ve C ile karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,530$) (Şekil 24).

Tablo 5: Sıçanların Günlere Göre Kapalı Kola Girme Süreleri (sn) (Artı Labirent Deneyi).

GRUP	1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN
A	34.7 ± 20.4	31.5 ± 18.5	24.8 ± 21
B	42 ± 17.8	31.3 ± 14.4	30 ± 21.8
C	40 ± 17.9	34.5 ± 16.8	28.9 ± 19



Şekil 23: Sıçanların Günlere Göre Kapalı Kola Girme Sürelerinin Gruplara Göre Dağılımı (Artı Labirent Deneyi).



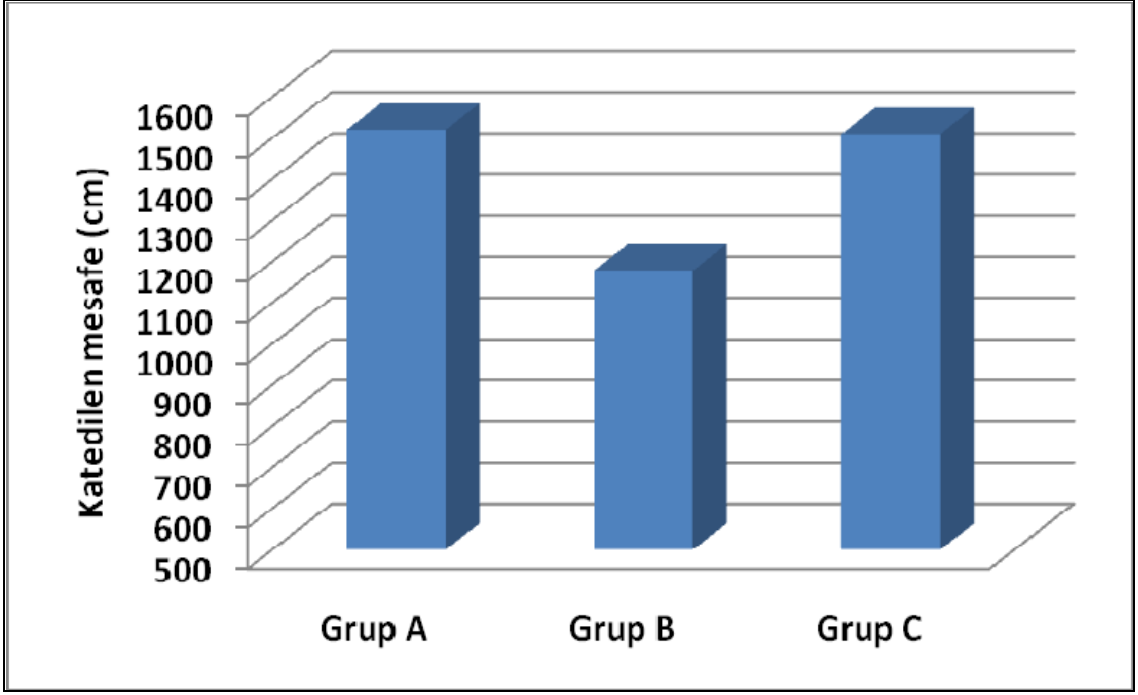
Şekil 24: Sıçanların Gruplara Göre Kapalı Kola Girme Sürelerinin Günlere Göre Dağılımı (Artı Labirent Deneyi).

Açık Alan Deneyi Bulguları

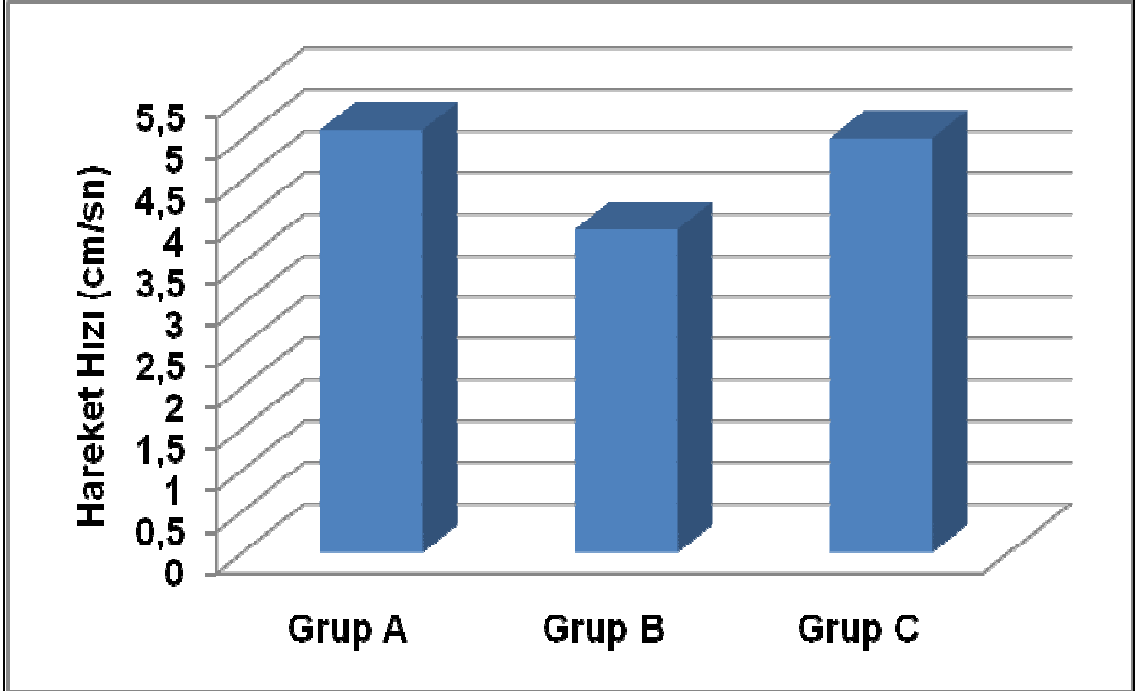
Doğumu takiben 10. haftasını tamamlamış, ortalama ağırlıkları $212,9 \pm 23,9$ gr olan sıçanlara uygulandı. Açık alan deneyinde her grubun birim zamanda ortalama katettiği mesafe ve hareket hızları Tablo 6' da gösterilmiştir. Ortalama katedilen mesafe ve hareket hızlarının gruplara göre karşılaştırmasında her iki değer için grup B en düşük ortalamaya sahip olmasına karşın, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. (Sırasıyla $p=0,228$ ve $p=0,214$) (Şekil 25 ve 26).

Tablo 6: Gruplara Göre Ortalama Katedilen Mesafe ve Hareket Hızı (Açık Alan Deneyi).

	Katedilen mesafe (cm)	Hareket Hızı (cm/sn)
Grup A	1519.8 ± 687.2	5.1 ± 2.3
Grup B	1178.1 ± 735.2	3.9 ± 2.5
Grup C	1510.1 ± 659.9	5.0 ± 2.2
p	0.228	0.214



Şekil 25: Sıçanların Katettikleri Mesafenin Gruplara Göre Dağılımı (Açık Alan Deneyi).



Şekil 26: Sıçanların Hareket Hızlarının Gruplara Göre Dağılımı (Açık Alan Deneyi).

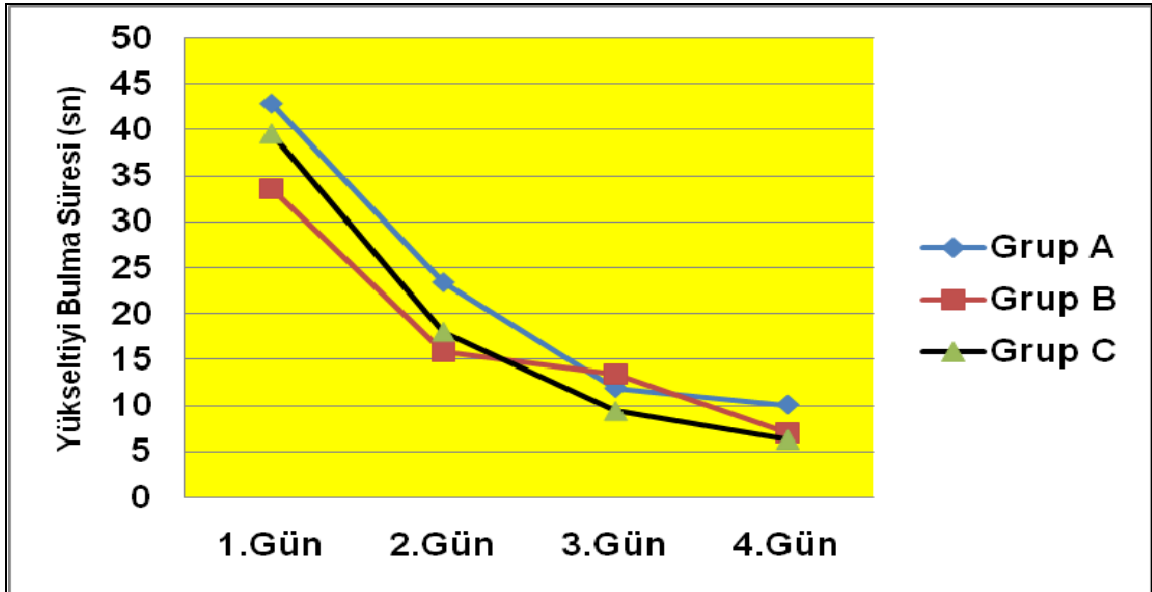
Morris Su Tankı Deneyi Bulguları

a. MST Uzak Hafıza Deneyi Bulguları

Doğumu takiben 12. haftasını tamamlamış, ortalama ağırlıkları 253.5 ± 22.2 gr olan sıçanlara uygulandı. MST uzak hafıza deneyinin ilk dört gününde elde edilen verilerden, her grubun günlere göre ortalama YBS ayrı ayrı hesaplandı. Her grubun kendi içinde günlere göre ortalama YBS' lerinin karşılaştırmasında, birinci günden 4. güne kadar, tüm gruplarda hergünün ortalama YBS' sinin bir önceki günden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde kısa olduğu saptandı ($p < 0,001$) (Tablo 7, grafik 1). Güne göre YBS' lerin gruplar arasında karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p = 0,058$) (Tablo 7).

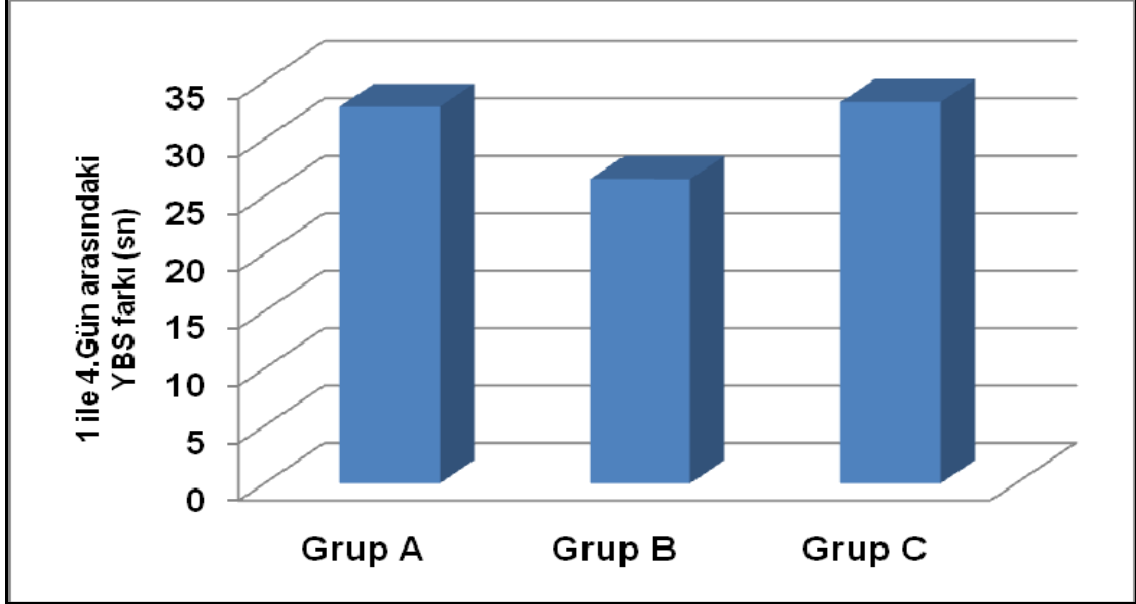
Tablo 7: Grupların Günlere Göre Ortalama Yükseltiyi Bulma Süreleri ve Bir ile Dördüncü Gün Arasındaki YBS Farkları (MST Uzak Hafıza Deneyi).

YBS (sn)	1.Gün	2.Gün	3.Gün	4.Gün	1.Gün-4.Gün Farkı
Grup A	42.9 ± 12.9	23.4 ± 12.9	11.9 ± 7.8	10.1 ± 5.4	32.8 ± 11.7
Grup B	33.6 ± 10.1	15.9 ± 8.5	13.5 ± 8.5	7.1 ± 3.6	26.5 ± 10.5
Grup C	39.6 ± 9.9	18.1 ± 12.2	9.5 ± 4.8	6.4 ± 3.3	33.2 ± 10



Grafik 1: Grupların Günlere Göre Yükseltiyi Bulma Sürelerinin ve Günler Arasındaki Değişimin Karşılaştırması (MST Uzak Hafıza Deneyi).

Birinci ve dördüncü günler arasındaki YBS farkının karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamakla birlikte ($p=0,054$) en az değişim Grup B' de saptandı (Tablo7, şekil 27).

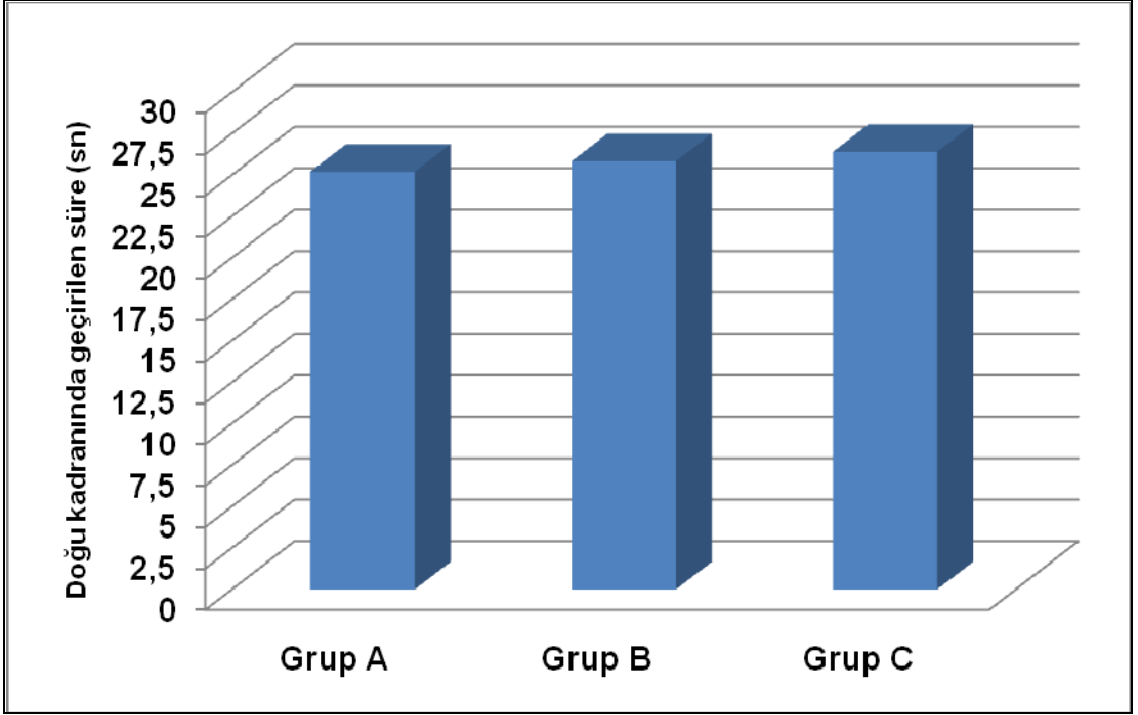


Şekil 27: Bir ile Dördüncü Gün Arasındaki Yükseltiyi Bulma Süresi Farkının Gruplara Göre Dağılımı (MST Uzak Hafıza Deneyi).

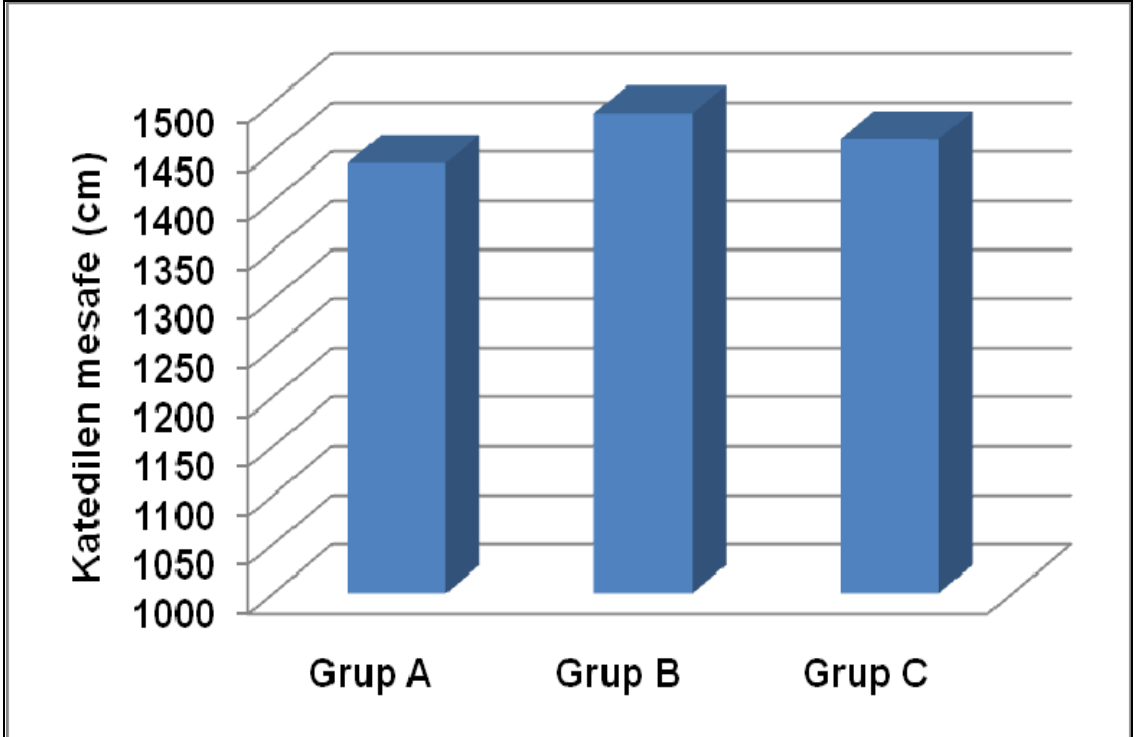
Uzak hafıza deneyi beşinci gününde sıçanların eskiden yükseltinin olduğu (doğu) kadranda geçirdikleri ortalama süre, katettikleri mesafe ve yüzme hızları Tablo 8' de gösterilmiştir. Doğu kadranda geçirilen ortalama süre, katetilen mesafe ve hızların gruplar arası karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,854$) (Şekil 28, 29 ve 30).

Tablo 8: Sıçanların Doğu Kadranda Geçirdikleri Süre, Katettikleri Mesafe ve Yüzme Hızları (MST Uzak Hafıza Deneyi).

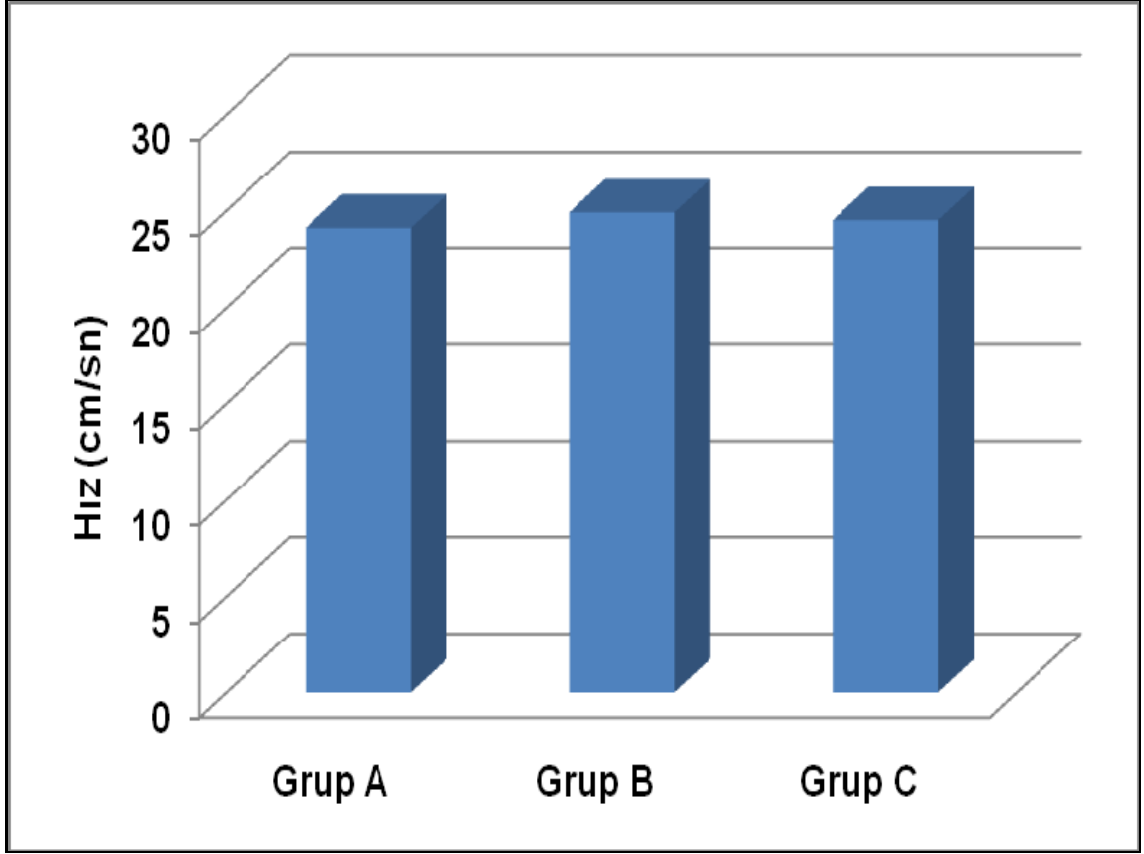
	Doğu kadranda geçirilen süre (sn)	Katedilen mesafe (cm)	Hız (cm/sn)
Grup A	25.2 ± 6.8	1438 ± 234,1	24,1 ± 3,9
Grup B	25.83 ± 5.5	1488,8 ± 205	24,9 ± 3,4
Grup C	26.40 ± 6.5	1462,3 ± 189,8	24,5 ± 3,2
P	0,854	0,758	0,764



Şekil 28: Beşinci Günde Doğu Kadranında Geçirilen Sürenin Gruplara Göre Dağılımı (MST Uzak Hafıza Deneyi).



Şekil 29: Beşinci Günde Katedilen Mesafenin Gruplara Göre Dağılımı (MST Uzak Hafıza Deneyi).



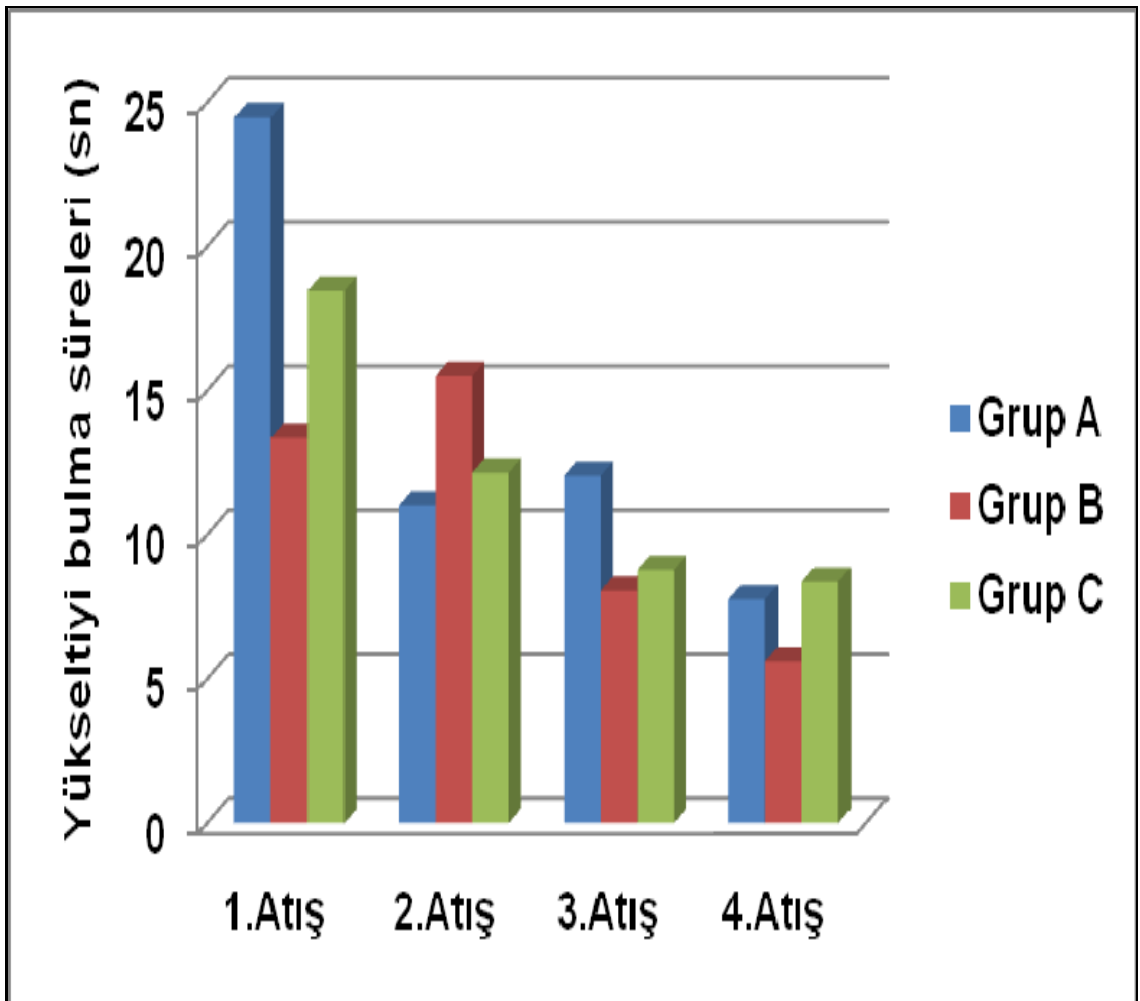
Şekil 30.: Beşinci Günde Yüzme Hızlarının Gruplara Göre Dağılımı (MST Uzak Hafıza Deneyi).

b. MST Yakın Hafıza Deneyi Bulguları

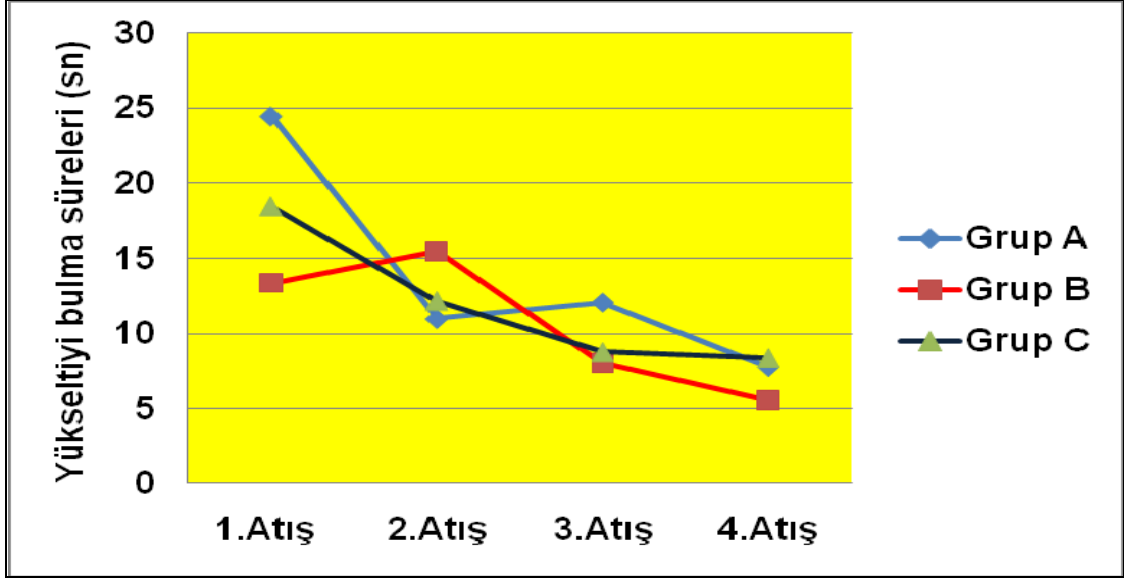
Doğumu takiben 14. haftasını tamamlamış, ortalama ağırlıkları 271.1 ± 20.2 gr olan sıçanlara uygulandı. Her bir grup için, o gruptaki tüm sıçanların dört güne ait 1. atış, 2. atış, 3. atış ve 4. atıştaki YBS, yüzme hızı ve katedilen mesafe verilerinin alt alta toplanmasıyla, her grubun her parametre için birer tane 1. atış, 2. atış, 3. atış ve 4. atış ortalama değerleri saptandı. Yükseltinin olduğu kadrandan yapılan öğrenme atışları istatistiksel hesaplamalara katılmadı. Atışlara göre sıçanların ortalama YBS'leri Tablo 9 gösterilmiştir. Sıçanların her atıştaki ortalama YBS'leri kendi aralarında karşılaştırıldığında, ikinci atıştan dördüncü atışa kadar, tüm gruplarda her atıştaki YBS'nin bir önceki atıştakinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde kısa olduğu saptandı ($p < 0,001$) (Grafik 2). Sıçanların her atıştaki YBS'nin gruplar arası karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p = 0,903$) (Şekil 31).

Tablo 9: Atışlara Göre Sıçanların Ortalama Yükseltiyi Bulma Süreleri (sn) (MST Yakın Hafıza Deneyi).

	Grup A	Grup B	Grup C
1.Atış	24.5 ± 13.1	13.4 ± 10.3	18.5 ± 13.3
2.Atış	11 ± 5.3	15.5 ± 9.3	12.2 ± 7.6
3.Atış	12.1 ± 7.1	8.1 ± 4.9	8.8 ± 4.1
4.Atış	7.8 ± 5.4	5.6 ± 3.1	8.4 ± 4.7



Şekil 31: Gruplara Göre Yükseltiyi Bulma sürelerinin Atışlara Dağılımı (MST Yakın Hafıza Deneyi).



Grafik 2: Grupların Atışlara Göre Yükseltiyi Bulma Sürelerinin ve Atışlar Arasındaki Değişimin Karşılaştırması (MST Yakın Hafıza Deneyi).

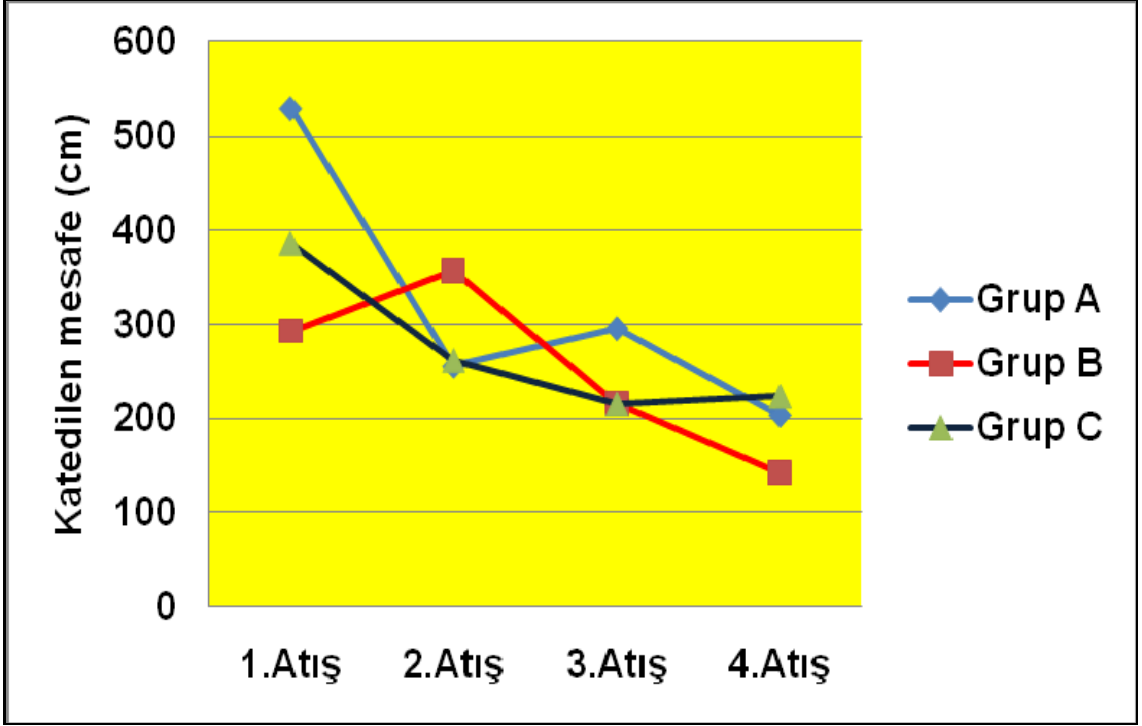
MST yakın hafıza deneyinde grupların her bir atışta yükseltiyi bulmak için katettikleri mesafeler Tablo 10' da ve yüzme hızları Tablo 11' de gösterilmiştir. Sıçanların her bir atışta katettikleri mesafe ve yüzme hızlarının karşılaştırmasında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,827$) (Grafik 3 ve 4).

Tablo 10: Sıçanların Her Bir Atışta Katettikleri Ortalama Mesafeler (cm) (MST Yakın Hafıza Deneyi).

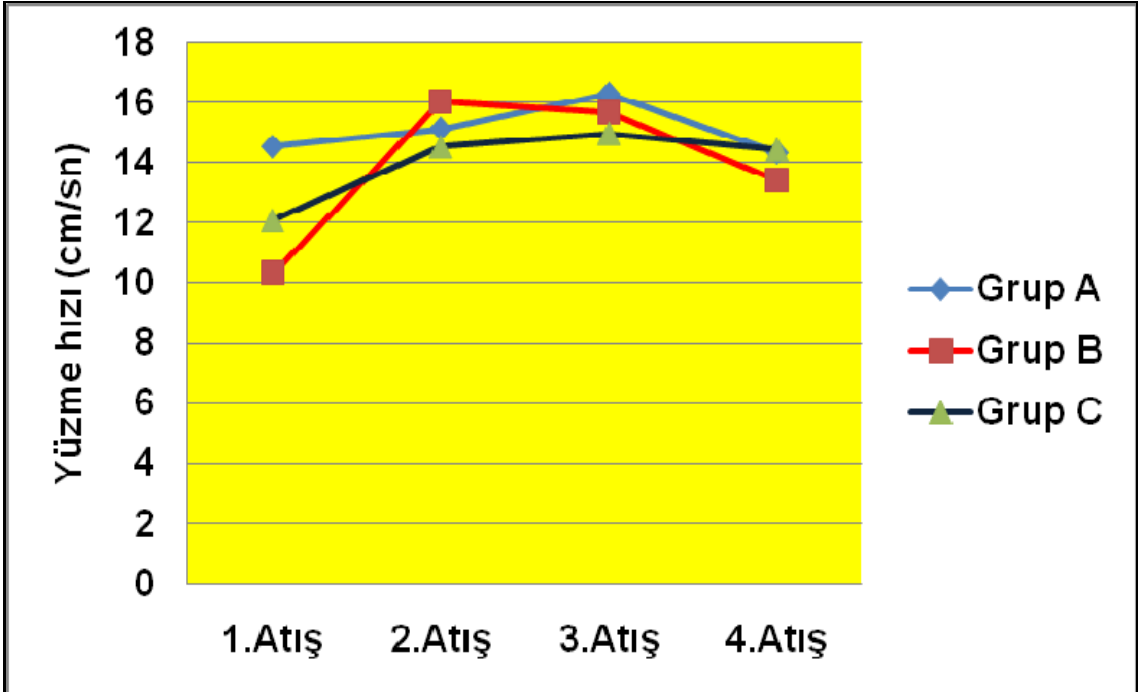
	1.Atış	2.Atış	3.Atış	4.ATIŞ
Grup A	530.9 ± 308.7	255.9 ± 102.1	296.1 ± 182.4	203.5 ± 122.8
Grup B	293.3 ± 246.1	357.4 ± 187.4	216.6 ± 110.5	143.2 ± 56.6
Grup C	387.2 ± 311.2	262.4 ± 129.5	215.9 ± 84	224 ± 144.5

Tablo 11: Sıçanların Her Bir Atıştaki Ortalama Hızları (cm/sn) (MST Yakın Hafıza Deneyi).

	1.Atış	2.Atış	3.Atış	4.Atış
Grup A	14.5 ± 6.1	15.1 ± 1.8	16.3 ± 3.0	14.4 ± 2.4
Grup B	10.3 ± 5.1	16.1 ± 2.7	15.7 ± 2.1	13.4 ± 2.1
Grup C	12.1 ± 2.1	14.5 ± 2.1	15.0 ± 2.2	14.5 ± 4.0



Grafik 3: Sıçanların Atışlara Göre Yükseltiyi Bulmak İçin Katettikleri Mesafeler (MST Yakın Hafıza Deneyi).



Grafik 4: Sıçanların Her Bir Atıştaki Ortalama Yüzme Hızları (MST Yakın Hafıza Deneyi).

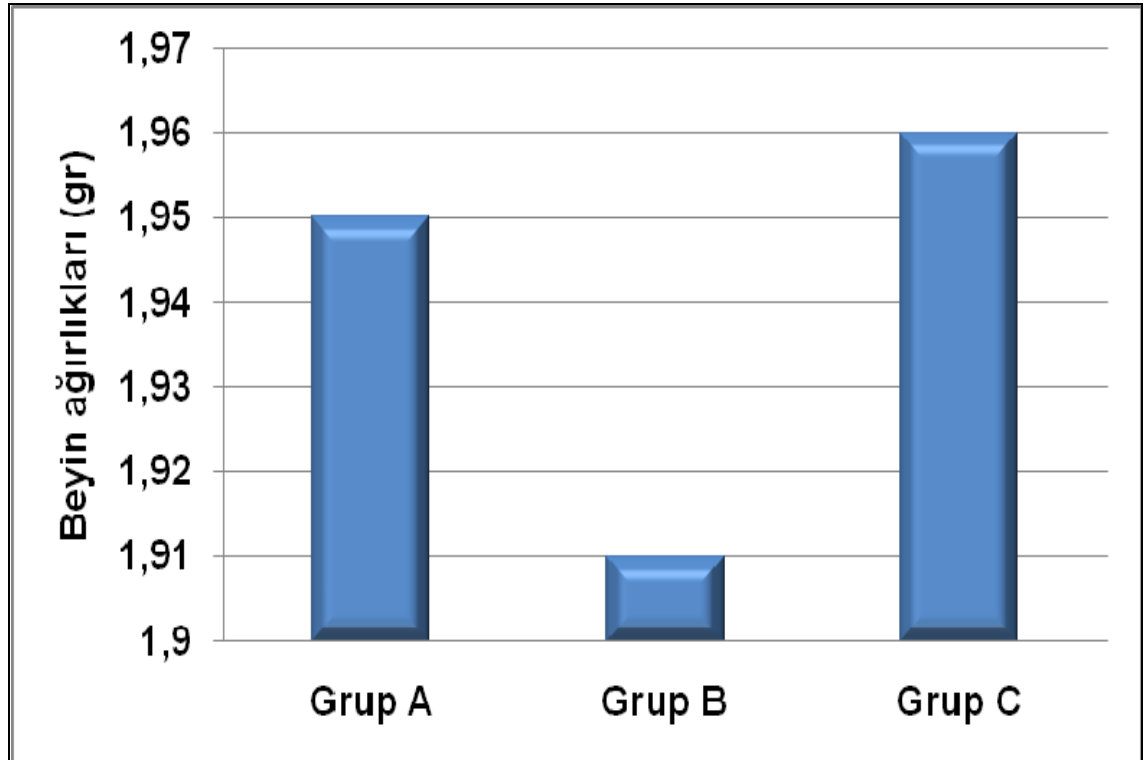
Beyin Ağırlıkları ve Makroskopik İnceleme

Doğumu takiben 16. haftasını tamamlamış, ortalama ağırlıkları $282,6 \pm 23,1$ gr olan erişkin sıçanlar dekapite edilerek, beyinleri bütünlükleri bozulmadan çıkarıldı. En düşük ortalama beyin ağırlığı Grup B' de saptanmasına karşın ($1,91 \pm 0,07$ gr), ortalama beyin ağırlıklarının karşılaştırılmasında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p = 0,193$) (Tablo 12, şekil 32).

Çıkarılan beyinlerin yapılan makroskopik incelemesinde de atrofi ya da HİBH düşündürecek başka bir patoloji saptanmadı.

Tablo 12: Gruplara Göre Ortalama Beyin Ağırlıkları.

Grup	Beyin ağırlıkları (gr)
A	$1,95 \pm 0,09$
B	$1,91 \pm 0,07$
C	$1,96 \pm 0,10$



Şekil 32: Ortalama Beyin Ağırlıklarının Gruplara Göre Dağılımı.

TARTIŞMA

HİBH ve buna bağılı komplikasyonlar gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde önemli bir sorundur¹⁵. HİBH geliştikten sonra geç dönemde uygulanan tedavilerin yeterince etkili olmaması, araştırmacıların HİBH' yi önlemeye yönelik ve erken dönemde hasarı azaltıcı tedavilere yöneltmiştir. HİBH' yi ve olumsuz etkilerini önlemeye yönelik tedavilerin sonuçlarını sıçanlarda biyokimyasal ve histopatolojik yöntemler ile; bilişsel ve lokomotor yetilerin değerlendirilmesiyle göstermek mümkündür.

Serebral palsy, işitme ve görme kayıpları, nöbetler, öğrenme güçlüğü gibi pek çok komplikasyona neden olan HİBH' yi⁴ hücresel düzeyde nekroz ve apoptozu azaltarak tedavi etmek mümkündür⁷. Erken dönemde hipoksi ve iskemiye bağılı hücre ölümü nekrozla oluşur (birincil hasar). Geç dönemde ise nöronal ölüm; saatler ve günler içerisinde apoptozla sonuçlanan bir dizi karmaşık biyokimyasal ve moleküler olaylar sonunda meydana gelir (ikincil hasar). Yapılan çalışmalar yenidoğan döneminde gelişen hipoksik iskemik beyin hasarında apoptozun en az nekroz kadar önemli olduğunu göstermektedir^{22,150}.

Hipoksik-iskemi ve reperfüzyon dönemini takiben oluşan hücresel olaylar zinciri eksitator bir aminoasit olan glutamatın aşırı salınımına, NMDA ve diğer reseptörlerin uyarılmasına, kalsiyumun hücre içinde artışına, lipid peroksidasyonu ve araziidonik asit metabolitlerinin (LO ve SO) oluşumuna, SOR üretimine, proteazların (kaspazlar vb.) aktivasyonuna, sonuç olarak geriye dönüşsüz şekilde hücre ölümüne neden olmaktadır. Kaspazların HİBH' deki rolünün apoptozu başlatarak hasarlı hücrelerin ölümünü sağlamak olduğu daha önce gösterilmiş, başlatıcı (2,8,9,10) ve efektör (3,6,7) kaspazlar olarak iki tipi tanımlanmıştır^{22,80}. Apoptoz, prokaspaz 9' un uyarılması ile başlar²² ve ölüm sinyalleri efektör kaspazlara nakledilir. Efektör kaspazlarda ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücrelerin oluşumuna neden olurlar²². Apoptotik nöron sayısı ne kadar çoksa hasar da o kadar ağır olmaktadır. Bu nedenle apoptozu azaltmaya yönelik olarak pek çok ajan denenmektedir.

Apoptozun azaltılması ile nöron hücrelerinin yaşam süresinin uzadığı bugün bilinen bir gerçektir. Apoptozu azaltan pek çok tedavinin etkisi hücresel ve biyokimyasal düzeyde gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda PAF' ın HİBH patogenezinde önemli bir mediatör olarak rol oynadığı bildirilmektedir^{5,6,7}. Son yıllarda trombosit uyarıcı faktör baskılayıcı tedaviler ile ilgili araştırmalarda artış gözlenmiştir^{7,105,106}. Bozlu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada yedi günlük yenidoğan sıçanlara tek taraflı iskemi ve

iki saat %8 oksijen uygulaması ile HİBH oluşturulmuş, i.p. yolla güçlü bir PAF reseptör antagonisti olan ABT-491 tedavisi uygulanarak apoptoz üzerine olan etkisi incelenmiştir. Yapılan bu çalışmada ABT-491' in, hem HİBH öncesi hem de sonrası uygulandığında, SF uygulanan gruplara göre nöronlarda apoptozu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı gösterilmiş ve HİBH tedavisinde etkili olduğu iddia edilmiştir⁷.

ABT-491' in HİBH modelinde apoptozu azalttığı daha önce gösterilmiş olmasına karşın, bu ajanın uzun dönemde ortaya çıkan nörolojik bulguları nasıl etkilediği bilinmemektedir. Bizim çalışmamızda ABT-491' in uzun dönemde nörolojik bulgulara olan etkisini göstermek için, erken dönemde dekapite ettiklerimiz dışındaki sıçanlar 16 haftalık olana dek yaşatıldı, oluşturduğumuz bir takvime göre bu sıçanlara çeşitli hayvan davranış deneyleri uygulandı.

Perinatal dönemde oluşan HİBH' nin, insanlarda ortaya çıkardığı klinik ve histopatolojik bulguları taklit edebilecek, en uygun hayvan hipoksik-iskemi modelinin ne olduğu halen tartışmalıdır. Ancak gebelik süresince ve hemen doğum öncesi dönemde fetusta ortaya çıkan fizyolojik değişiklikleri anlamada büyük hayvanlar (koyunlar vb.); perinatal dönemde oluşan HİBH' nin histopatolojik ve biyokimyasal sonuçlarını, uzun dönem nörolojik etkilerini anlamada ise küçük hayvanlar (sıçan vb.) ile yapılan hipoksik iskemi modelleri daha uygun bulunmaktadır⁴.

1980' lerin başlarında Levene ve arkadaşları tarafından erişkin sıçanlara uygulanan, Rice ve arkadaşları tarafından yenidoğan sıçanlara uyarlanan hipoksik-iskemi modeline (tek taraflı karotid arter bağlama ve %8 oksijen maruziyeti) uygun olarak, biz de çalışmamızda yedi günlük sıçanların sağ karotid arterlerini bağlayıp derlenme sürecini takiben bir saat süreyle %8 oksijen ve %92 azot inhalasyonu uyguladık¹⁵¹.

Yenidoğan sıçanlarda, iskemi ve 1-3 saatlik hipoksiden sonra beyinde apoptotik nöron sayısının, karotid arter bağlaması yapılan tarafta daha fazla olmak üzere, her iki beyin yarısında arttığı pek çok çalışmada gösterilmiş, apoptozu azaltan çeşitli ajanlarla HİBH' nin akut etkilerinin tedavi edilebileceği ileri sürülmüştür^{7,105,106,152}.

Çalışmamızda, HİBH' nin ve ABT-491' in histopatolojik ve biyokimyasal etkilerini, erken dönemde beyin dokularında apoptotik nöronları sayarak ve kan örneklerinde MDA düzeylerine bakarak değerlendirdik.

TUNEL ve Kaspaz-3 yöntemleriyle istatistiksel olarak en fazla apoptotik hücre sayısı, sırasıyla hipoksi sonrası SF uygulanan grup, hipoksi sonrası ABT-491 uygulanan grup ve sham grubunda tespit edildi. Bu bulgular daha önce Bozlu ve arkadaşları

tarafından yapılan çalışmanın sonuçları ile benzerdi⁷. Çalışmamızın sonuçları da göstermektedir ki; HİBH oluşmuş sıçanlarda ABT-491 uygulaması apoptotik nöron sayısını azaltmaktadır. HİBH oluşturulan yenidoğan sıçanlarda diğer PAF reseptör antagonistlerinin etkilerini gösteren çalışmalardan birinde WEB 2170' in sadece hipoksi öncesi etkili olduğu bildirilmiştir¹⁰¹. BN 5202' in ise gerek hipoksi öncesi gerekse sonrası verildiğinde etkili olmadığı gözlenmiştir¹⁰¹. Bir diğer çalışmada ise hipoksiden önce ve sonra BN 50730 verilmesinin hem doku kaybını azalttığı hem de öğrenme ve hafıza yetilerini koruduğu izlenmiştir¹⁰². Diğer yandan başka bir çalışmada da PAF' ı inaktive eden PAF asetil hidrolazın apoptozu azalttığı ve nöroprotektif etki sağladığı gözlenmiş¹⁰³; PAF asetil hidrolazın eksitotoksisite, epileptik beyin hasarı, kafa travması, inme, glokom ve nörodejeneratif hastalıklar gibi olaylarda PAF antagonistlerine karşı alternatif olabileceği ileri sürülmüştür¹⁰⁴.

Plazma MDA düzeyi artışı ile HİBH' nin ağırlığı arasında paralel bir ilişki olduğu saptanmış, MDA düzeyi ne kadar yüksekse HİBH' nin de o kadar ağır olduğu gösterilmiştir²⁶. Çalışmamızda da en yüksek ortalama MDA düzeyi hipoksi sonrası SF uygulanan gruptaki sıçanların plazmalarında saptandı. Ancak plazma MDA düzeylerinin gruplar arası karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Kumar ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, perinatal asfiksi öyküsü olan ancak HİBH olmayan bebeklerin plazma MDA düzeyinin kontrol grubu ile benzer olduğu, HİBH kliniği hafifledikçe kontrol ile hipoksi grupları arasında yapılan plazma MDA düzeyleri karşılaştırmalarında istatistiksel anlamlılığın azaldığı saptanmıştır²⁶. Bizim çalışmamızda da plazma MDA düzeyleri arasında anlamlı bir fark çıkmaması oluşturduğumuz HİBH' nin hafif sayılabilecek düzeyde olmasıyla ilgili olabilir.

Sıçanların bilişsel ve lokomotor yetilerini değerlendirmede kullanılan davranış deneylerinin, sıçanların nöromotor gelişimin tamamlandığı 80-85. günlerden sonra¹¹⁰ ve/veya ortalama 180-400 gr ağırlığındaki erişkin erkek sıçanlara uygulanması önerilmektedir^{111,112,113}. Ancak artı labirent deneyi ile öğrenmenin değerlendirilmesi beşinci haftadan başlayarak 16. haftaya dek yapılabilmektedir^{120,121,122,132}. Sıçanların ilgili deneylerin koşullarını algılayacak zeka ve motor güce erişmelerinden sonra anormal sonuçlardan bahsedilebilmektedir. İnsan davranışından örnek verilecek olursa, normal olarak henüz yürümesi beklenmeyen yedi aylık bebekler arasında, yürüme yeteneğinin iyi ya da kötü olduğundan söz etmek mümkün değildir. Ancak iki yaşına gelmiş ama henüz yürüyemeyen bebeklerde nöromotor gelişimde gerilikten bahsedilebilir. Sıçanlarda da normal nöromotor gelişme süreçlerine uygun şekilde davranış deneyleri ile

değerlendirme yapılması önerilmektedir.

Bu deneylerde sıçanların cinsiyetlere göre de farklı davranışlar sergilediği¹¹⁴, bu durumun hormonal farklılık ve hipokampus gelişimdeki farktan kaynaklandığı¹¹⁵ ve özellikle uzaysal (spatial) öğrenmenin değerlendirilmesinde erkek cinsiyetin daha uygun olduğu saptanmıştır^{115,116,117}. Bu nedenle bizim çalışmamızda da olduğu gibi son yıllarda yapılan pek çok hayvan davranış deneyi çalışmasında erkek sıçanlar kullanılmıştır^{111,112,118,119}.

Bizim çalışmamızda yukarıda bahsedilen nedenler göz önünde bulundurularak, öğrenme yetisi için altıncı hafta tamamlandığında artı labirent, lokomotor aktivite için 10. hafta tamamlandığında açık alan, uzak hafıza ve yakın hafıza için sırasıyla 12 ve 14. haftalar tamamlandığında da Morris su tankı deneyleri yapıldı.

Hayvan davranış deneylerinde, sıçanların stres ve anksiyeteye girerek beklenenden farklı davranışlar sergiledikleri bilinen bir gerçektir. Daha önce yapılmış çalışmaların bulguları ışığında Ehman ve Moser, bu durumu en aza indirmek için düzeneklerin siyaha boyanmasını, deneyin yapıldığı odanın loş olacak şekilde aydınlatılmasını, aynı gün içinde tekrarların yapıldığı deneylerde sıçanların yorulmasını önleyecek şekilde atışlar arasında yeterince süre bırakılmasını, MST' de yükseltinin sıçanın büyüklüğüne uygun seviyede su altına gizlenmesini ve sıçanların vücut sıcaklıklarının korunması için önlem alınmasını önermiştir¹⁵³.

Artı labirent düzeneğinin genellikle pleksiglastan yapıldığı, son yıllarda siyah renkli olanların kullanıldığı dikkati çekmektedir^{147,148}. Artı labirent deneyi ardışık iki veya üç günde, günde bir kez, 1-5 dakika süre ile yapılabilmektedir^{120,121,122,132}. Bu deneyle ilgili çalışmalarda sıçanların öğrenme yetisini bozacak herhangi bir durumun varlığında, sıçanların kapalı kola girme sürelerinin uzadığı ve deney günleri ilerledikçe de kapalı kola girme sürelerini kontrol gruplarına kıyasla yeterince kısaltamadıkları bildirilmiştir^{120,122,134}. Biz bu çalışmada altıncı haftasını tamamlamış sıçanlara, siyah renkli pleksiglastan üretilmiş bir düzenekte, üç gün süreyle, günde bir kez ve 60 sn süreyle artı labirent deneyini uyguladık. Artı labirent deneyinde ardışık uygulamalarla tüm grupların, günden güne kapalı kola girme süreleri diğer yayınlarda belirtildiği gibi kısaldı. Günlere göre sıçanların kapalı kola girme süreleri gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamasına karşın, hem birinci gün hem de üçüncü günde ortalama kapalı kola girme süresi en uzun olan hipoksi sonrası SF uygulanan sıçanlardı. Bu nedenle hipoksi sonrası SF uygulanan sıçanların diğer iki

gruptaki sıçanlara göre daha az öğrendiği ve ABT-491' in de uzun dönemde öğrenme bozukluklarını düzeltebileceği düşünülebilir.

Açık alan düzeneği daire ya da kare şekilli olabilmekle birlikte, deneylerde en sık 1 m² lik kare zemin üzerine yerleştirilen 30 cm yükseklikteki duvarlardan oluşan, üstü açık kutu kullanılmaktadır¹²⁴. Açık alan deneyi genellikle her sıçana bir kez, 2-20 dakika süreyle yapılmaktadır^{123,124}. Lokomotor aktivite birim zamanda çizgi ya da kare geçme sayısı^{123,124,125} veya katedilen mesafe ve hareket hızının ölçümüyle değerlendirilmektedir¹²⁴. Çalışmamızda 10. haftasını tamamlamış sıçanlara, pleksiglastan üretilmiş, siyaha boyanmış, 100x100x40 cm boyutlu bir düzenekte, açık alan deneyi beş dakika süreyle yapılarak, sıçanların hareket hızları ve katettikleri mesafeler kaydedildi. Bu deneyde hipoksi sonrası ABT-491 uygulanan grup ve sham grubundaki sıçanlar birbirlerine eşit denecek kadar yakın düzeyde hareket hızı ile benzer mesafe katettiler. Hipoksi sonrası SF uygulanan gruptaki sıçanların hızları ve katettikleri mesafeler, hipoksi sonrası ABT-491 uygulanan gruptakilerden %23 ve sham grubundaki sıçanlardan da %22 daha az bulundu. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Yapılmış çalışmalarda, lokomotor etkilenmesi olan sıçanların açık alan deneyinde kontrol grubuna göre daha yavaş hareket ettikleri ve daha az mesafe katettikleri gösterilmiştir. Adı "Açık alan" olan bu düzeneğin kenarlarında duvarları olması nedeniyle aslında bir kapalı alan olduğu, sıçanlarda anksiyete yarattığı, strese giren sıçanların köşelerde donup kalabileceği gibi aşırı hareketli olabileceğinin de iddia edildiği farklı bir yaklaşım vardır^{124,125}. Ancak çalışmamızın bu aşamasında da diğer aşamalarda olduğu gibi, tüm sıçanlar için standart koşulların oluşturulduğu bir odada, uygulamalar aynı kişi tarafından yapıldığından, anksiyete-stres gibi sorunların tüm sıçanları eşit düzeyde etkilediği ve hipoksi sonrası SF uygulanan gruptaki sıçanların lokomotor yetilerinin HİBH' ye bağlı olarak bozulduğu; istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamasının hafif HİBH oluşturmamızla ilgili olabileceği düşünüldü.

Sıçanlar 12 ve 14 haftalık olduğunda uyguladığımız MST deneyleri hakkında yapılmış pek çok yayın bulunmaktadır. Bu deneylerde kullanılan havuzların ve yükseltelerin çapları ve yükseklikleri değişkenlik göstermektedir. Son yıllarda 150-153 cm çap ve 45-60 cm yükseklikteki havuzlar daha sık kullanılmaktadır. Bu havuzlar galvanizli sacdan, fiberglastan ve poliüretandan üretilmektedir. Bazı araştırmacılar MST içindeki suyu çeşitli toksik olmayan boyalarla bulanıklaştırırken¹⁴⁶, bazı araştırmacılar da MST zemin ve duvarlarını siyaha boyamaktadır¹⁵⁴. Kullanılan yükseltinin şekli ile ilgili de farklı uygulamalar vardır. Bazı araştırmacılar kare¹²⁹ bazı araştırmacılar daire¹⁴⁴ şekilli yükselti

kullanmayı tercih etmektedir. Çalışmamızda bu bilgiler ışığında galvanizli saçtan üretilen, 150 cm çap ve 60 cm yükseklikte, içi siyaha boyanmış bir su tankında MST deneylerini uyguladık. 15 cm çaplı ve daire şekilli bir yükselti kullanmayı tercih ettik. Daire veya kare yükselti kullanılmasının bu deney sonuçları üzerine etkileri hakkında herhangi bir bilgiye rastlayamadık. Bu nedenle bu konu ile ilgili olarak yaptığımız bir başka çalışmada, uzak hafıza deneyinin beşinci gününde, daire şekilli yükselti kullanılan gruptaki sıçanların kare şekilli yükselti kullanılan gruptaki sıçanlara göre eskiden yükselti olan kadranda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla süre geçirdiğini tespit ettik¹⁵⁵.

Yapılan çalışmalarda, MST deneylerinde iki atış arasındaki bekleme süresinin 1-15 dakika arasında değiştiği görülmektedir^{110,124,156}. Biz atışlar arası bekleme süresini uzak hafıza deneyinde 2-4 dk ve yakın hafıza deneyinde 5 dk olacak şekilde düzenledik. Bu deneylerde özellikle uzaysal öğrenmenin değerlendirildiği, bu yetinin de hipokampal fonksiyonlarla ilgili olduğu bildirilmiştir^{126,139}. HİBH olan sıçanlarda kontrol grubuna göre gizli yükseltiyi bulma süresinin daha uzun^{110,121,128,132} ve yükseltiyi bulana kadar katedilen mesafenin daha fazla olduğu tespit edilmiştir^{121,132,146}. Uzak hafıza deneylerinde atışlar ve günler ilerledikçe kontrol grubu bu değerleri azaltırken HİBH grubunun yeterince azaltmadığı gösterilmiştir^{121,128,132}. Uzak hafıza deneyi beşinci gününde ise kontrol gruplarının eskiden yükselti olan kadranda daha fazla süre geçirdikleri tespit edilmiştir¹²⁸. Yakın hafıza deneyinde atışlar ilerledikçe kontrol grubundaki sıçanlar yükseltiyi bulma sürelerini ve yükseltiyi bulmak için katettikleri mesafeleri kısaltırken, HİBH olan sıçanların ise daha az değişiklik yapabildiği gösterilmiştir^{110,131}. Daha önce yapılmış olan çalışmalarda, her iki MST deneyinde de yüzme hızlarının gruplara göre bir farklılık yaratmadığı bildirilmiştir^{110,132}.

Çalışmamızda MST uzak hafıza deneyinin ilk dört gününde tüm gruplar günler ilerledikçe, YBS' lerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde kısaltmasına karşın, birinci günden dördüncü güne dek yükseltiyi bulma süresini en az değiştirenler hipoksi sonrası SF uygulanan gruptaki sıçanlardı. Bu gruptaki sıçanlar birinci-dördüncü gün yükseltiyi bulma süreleri arasındaki fark bakımından en düşük değere sahiptiler. Sıçanlarda HİBH oluşturulup uzak hafıza deneyinin uygulandığı diğer çalışmaların sonuçlarına benzer olan bu sonuçlar; uzak hafıza yetisinde bozulmanın işareti olarak değerlendirilebilir. Ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmaması ve beşinci günde sıçanların eskiden yükseltinin bulunduğu kadranda geçirdikleri süre, katettikleri mesafeler ve yüzme hızlarının benzer olması HİBH' nin hafif oluşu ile açıklanabilir.

MST yakın hafıza deneyinde, 1. atıştan 4. atışa kadar ortalama yükseltiyi bulma

süreleri ve katedilen mesafeler her üç grupta da anlamlı düzeyde kısaldı. Ancak gruplar arasında yükseltiyi bulma süresi, katedilen mesafe ve yüzme hızları bakımından herhangi bir farklılık saptanmadı. MST yakın hafıza deneylerinin sonuçları da diğer deneylerde olduğu gibi hafif HİBH' nin bir sonucu olarak istatistiksel bir anlam kazanmamış olabilir.

HİBH' nin uzun dönemdeki etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada bir saatlik hipoksi uygulanması sonrası bilişsel ve lokomotor yetilerde, iki saatlik hipoksi uygulamasına göre daha az bozulma saptanmıştır¹²¹. Bizim çalışmamızda HİBH' nin histopatolojik bulguları net olarak gösterilmiştir, bununla birlikte istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber; sırasıyla artı labirent, açık alan, MST uzak ve yakın hafıza deneylerinde, hipoksi sonrası SF uygulanan gruptaki sıçanların diğer iki gruba göre daha kötü değerlere sahip olduğu, bu farkın deneyler uygulandıkça geçen süre içinde giderek azaldığı gözlenmiştir. Sıçanların ortama ve araştırmacıya alışması için, deneyler öncesi ve deneyler arasında yapılacak çeşitli uygulamaların [sıçanı ele alma (handling), deney düzeneği dışında farklı öğretici düzeneklerde çalıştırma vb.], sıçanların anksiyetelerinin azalmasına ve fiziksel olarak güçlenmelerine neden olduğu; davranış deneyleri uygulandığında ise özellikle hafif HİBH oluşmuş sıçanlardan kontrol grubununkilere yakın değerler elde edilebileceği de gösterilmiştir^{110,128,132}. Çalışmamızda hipoksi sonrası SF uygulanan gruptaki sıçanların sonuçlarının, sham grubundaki sıçanların sonuçları ile giderek daha çok benzemesi; özellikle de MST-yakın hafıza deneyinde bu durumun daha aşikar olması, uygulanan deneylerin aynı zamanda sıçanların anksiyetisinin azalmasına ve fiziksel olarak güçlenmelerine neden olmasıyla açıklanabilir. Ancak bir çalışmada MST deneyinde HİBH oluşturulmuş sıçanlarının beyindeki hasar oluşan alanın hacmi ile yükseltiyi bulma süresi arasında ters ilişki olduğu belirtilmiş; beyindeki hasarlı alanın hacmi birbirine yakın olan sıçanların yükseltiyi bulma sürelerinin, düzenli olarak ele alınıp alınmama durumundan etkilenmediği iddia edilmiştir¹²⁸.

Çalışmamızda uygulanan davranış deneylerinin tümü değerlendirildiğinde, genel olarak hipoksi sonrası SF uygulanan gruptaki sıçanların öğrenme, lokomotor ve uzak-yakın hafıza yetileri bakımından diğer gruplara göre daha yetersiz olma eğilimi dikkati çekmektedir. Ayrıca 16. hafta tamamlandığında ölçülen beyin ağırlıkları da, yine hipoksi sonrası SF uygulanan gruptaki sıçanlarda en düşük düzeyde bulunmuştur.

Tüm bu bulgu ve bilgiler ışığında bizim çalışmamız, ABT-491 kullanımının HİBH' nin akut dönem etkilerini azalttığını ve süregen komplikasyonlar (bilişsel ve lokomotor yetilerde bozulma) üzerine de olumlu etkileri olabileceğini göstermiştir. Ancak görece

kısa olan bu hipoksik sürecin uzun dönemde sıçanların öğrenme, lokomotor aktivite, uzak ve yakın hafıza yetilerini anlamlı bir şekilde bozmadığı anlaşılmıştır. Benzer deneylerin daha uzun süreli (örneğin 2 saat) hipoksi uygulamasından sonra tekrarlanmasıyla, ABT-491' in bilişsel ve motor yetiler üzerine olabilecek muhtemel etkilerinin değerlendirilmesinin gerekli olduğu kanısına varılmıştır.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda; hipoksi ve iskemi oluşturulan yenidoğan sıçanların beyinlerindeki apoptotik hücre sayıları, hipoksi ve iskemi yapılmayan yenidoğan sıçanlardan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.001$).

Hipoksi sonrası ABT-491 verilen yenidoğan sıçanların sağ beyin yarısındaki apoptotik hücre sayılarının, serum fizyolojik verilen yenidoğan sıçanlara göre TUNEL ve Kaspaz-3 yöntemiyle karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir (sırasıyla $p<0.001$ ve $p=0.003$).

Her bir grup için Beynin sağ ve sol yarısındaki apoptotik hücre sayılarının karşılaştırılmasında; Kaspaz-3 yönteminde sham grubu hariç diğer grupların sağ beyin yarısındaki apoptotik hücre sayısı sola göre anlamlı derecede artmış olarak bulunmuştur ($p<0.001$). Her bir grup için Beynin sağ ve sol yarısındaki apoptotik hücre sayılarının, TUNEL yöntemiyle yapılan karşılaştırılmasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Artı labirent deneyinde her grubun günlere göre kapalı kola girme süreleri kendi içinde karşılaştırıldığında, gün ilerledikçe kapalı kola girme süresinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde kısaldığı saptandı ($p=0,003$). Günlere göre kapalı kola girme süresinin gruplar arasındaki karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,895$).

Açık alan deneyinde katedilen mesafe ve hareket hızlarının gruplara göre karşılaştırılmasında her iki değer için, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla $p=0,228$ ve $p=0,214$).

MST uzak hafıza deneyinde, birinci günden dördüncü güne kadar, tüm gruplarda sıçanların her günlük yükseltiyi bulma sürelerinin bir önceki günün değerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde kısa olduğu saptandı ($p<0,001$). Sıçanların günlere göre yükseltiyi bulma süreleri karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,058$). Birinci ve dördüncü günler arasındaki yükseltiyi bulma süresi farkının karşılaştırılmasında da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0,054$). Beşinci günde sıçanların doğu kadranda geçirdikleri süre, katettikleri mesafe ve hızları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamadı ($p=0,854$).

MST yakın hafıza deneyinde sıçanların her atıştaki ortalama yükseltiyi bulma süreleri her grubun kendi içinde karşılaştırıldığında, ikinci atıştan dördüncü atışa kadar,

tüm gruplarda bir önceki atıştakinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde kısa olduğu saptandı ($p<0,001$). Gruplara göre sıçanların her atıştaki yükseltiyi bulma süreleri, karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0,903$). Her bir atışta sıçanların katettikleri mesafe ve yüzme hızlarının karşılaştırmasında da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,827$).

Sonuç olarak çalışmamızda oluşturduğumuz hipoksi-iskemi modelinde, bir saatlik hipoksinin sıçanların beyinde nöronal apoptozisi artırarak hasar oluşturduğu, akut dönemde oluşan bu hasarın bir PAF antagonisti olan ABT-491 uygulaması ile azaltılabildiği gösterilmiştir. Ancak görece kısa olan bu hipoksik sürecin uzun dönemde sıçanların öğrenme, lokomotor aktivite, uzak ve yakın hafıza yetilerini anlamlı bir şekilde bozmadığı anlaşılmıştır. Benzer deneylerin daha uzun süreli (örneğin 2 saat) hipoksi uygulamasından sonra tekrarlanmasıyla, ABT-491' in bilişsel ve motor yetiler üzerine olabilecek muhtemel etkilerinin değerlendirilmesinin gerekli olduğu kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1 . Jonston MV, Trescher WH, Ishida A, et. al. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the devolving brain. *Pediatr Res* 2001;49:735-41.
- 2 . Berger R, Garnier Y. Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Res Rev* 1999;30:107-34.
- 3 . Hossan MA. Molecular mediators of hypoxic-ischemic injury and implications for epilepsy in the developing brain. *Epilepsy Behav* 2005;7:204-13.
- 4 . Jerome Y.Yager. Animals Models of Hypoxic-Ischemic Brain Damage in the Newborn. *Seminars in Pediatric Neurology* 2004;11:31-46.
- 5 . Akisu M, Kultursay N, Huseynov A. PAF an important mediator in.Hypoxic ischemic brain injury in the newborn rat: flunarizine ginkgobloba ekstraktreduce PAF concentration in the brain. *Biol Neonate* 1998;4:439-44.
- 6 . Liu XH, Eun BL, Silversitein FS, Barks JDE PAF antagonist BN 52021 attenuates hypoxic ischemic brain injury in the immature rat. *Pediatr Res* 1996;40:797-803.
- 7 . 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 Research*. 2007;1143:193-8.
- 8 . Yue TL, Lysko PG. Production of PAF from rat cerebellar granule cell in culture. *J Neurochem* 1990;54:1809-11.
- 9 . Predescu D, Ihida K, Predescu S, Plade GE. The vascular distribution of the PAF receptor. *Eur J Cell Biol* 1996;69:86-98.
- 10 . Clark GD, McNeil RS, Bix GJ, Swann JW. PAF produces neuronal growth cone collapse. *Neuroreprt* 1995;6:2569-75.
- 11 . Banavida B, Mencia Huerta JM. PAF and cytokine network in inflammatory processes. *Clin Rev Allergy* 1994;12:381-95.
- 12 . Volpe JJ. Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatr Res* 2001;50:553-62.
- 13 . Johnston MV, Hoon Jr AH. Possible mechanisms in infants for selective basal ganglia damage from asphyxia, kernicterus, or mitochondrial encephalopathies. *J Child Neurol* 2000;15:588-91.
- 14 . Vannucci RC. Hypoxic-ischemic encephalopathy. *Am J Perinatol* 2000;17:113-20.

- 15 . Blair E, Watson L. Epidemiology of cerebral palsy. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006;11:117-25.
- 16 . Sciberras C, Spencer N. Cerebral palsy in Malta 1981 to 1990. *Dev Med Child Neurol* 1999;41:508-11.
- 17 . Dowding VM, Barry C. Cerebral palsy: social class differences in prevalence in relation to birthweight and severity of disability. *J Epidemiol Community Health* 1990;44:191-5.
- 18 . Daval JL, Vert P. Apoptosis and neurogenesis after transient hypoxia in the developing rat brain. *Semin Perinatol* 2004;28:257-63.
- 19 . William LS, Garg BP, Cohen M, et. al. Subtypes of ischemic stroke in children and young adult. *Neurology* 1997;49:1541-5.
- 20 . Koelfen W, Freund M, Varnholt V. Neonatal stroke involving the middle cerebral artery in term infants: clinical presentation, EEG and imaging studies, and outcome. *Dev Med Child Neurol* 1995;37:204-12.
- 21 . Delivoria-Papadopoulos M, Mishra P. Mechanisms of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategies for prevention. *J Pediatr* 1998;132:30-4.
- 22 . Northington JF, Graham EM, Martin LJ. Apoptosis in perinatal hypoxic–ischemic brain injury: how important is it and should it be inhibited? *Brain Res Rev* 2005;50:244-57.
- 23 . Johnston MV, Trescher WH, Ishida A and Nakajima W. Novel treatments after experimental brain injury. *Semin Neonatol* 2000;5:75-86.
- 24 . Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 2001;53:135-59.
- 25 . Sarnat H, Sarnat M. Neonatal encephalopathy following fetal distress: a clinical and electroencephalographic study. *Arch Neurol* 1976;33:696-705.
- 26 . Kumar A, Ramakrishna SV, Basu S, Rao GR. Oxidative stress in perinatal asphyxia. *Pediatr Neurol* 2008;38:181-5.
- 27 . Hellström-Westas L, Rosén I, Swenningsen NW. Silent seizures in sick infants in early life. Diagnosis by continuous cerebral function monitoring. *Acta Paediatr Scand* 1985;74:741-8.
- 28 . Toet MC, Groenendaal F, Osredkar D, Van Huffelen AC, De Vries LS. Postneonatal epilepsy following amplitude-integrated EEG-detected neonatal

- seizures. *Pediatr Neurol* 2005;32:241-7.
- 29 . Pryds O, Greisen G, Lou H, Friis-Hansen B. Vasoparalysis associated with brain damage in asphyxiated term infants. *J Pediatr* 1990;117:119-25.
 - 30 . Vannucci RC. Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia: relation to perinatal brain damage. *Pediatr Res* 1990;27:317-26.
 - 31 . Richard Berger, Yves Garnier, Arne Jensen. Perinatal brain damage: underlying mechanisms and neuroprotective strategies. *J Soc Gynecol Investig* 2002;9:319-28.
 - 32 . Volpe JJ. Hypoxic-ischemic encephalopathy. In: Volpe JJ eds. *Neuropathology and Pathogenesis*. 3rd ed. Philadelphia: Neurology of the Newborn, 1995:279-313
 - 33 . Perlman JM, Volpe JJ. Episodes of apnea and bradycardia in the preterm newborn: impact on cerebral circulation. *Pediatrics* 1985;76:333-8.
 - 34 . Vannucci RC, Vannucci SJ. A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Ann N Y Acad Sci* 1997;835:234-49.
 - 35 . Vannucci RC, Yager JY. Glucose, lactic acid, and perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Pediatr Neurol* 1992;8:3-12.
 - 36 . Vannucci RC, Mujsce DJ. Effect of glucose on perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Biol Neonate* 1992;62:215-24.
 - 37 . Robert C Vannucci, Robert M Brucklacher and Susan J Vannucci. The Effect of Hyperglycemia on Cerebral Metabolism During Hypoxia-Ischemia in the Immature Rat. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 1996;16:1026-33.
 - 38 . Lucas A, Morley R, Cole TJ. Adverse neurodevelopmental outcome of moderate neonatal hypoglycaemia. *BMJ* 1988 ;297:1304-8.
 - 39 . Bassan H, Bental Y, Shany E, et. al. Neonatal seizures: dilemmas in workup and management. *Pediatr Neurol* 2008;38:415-21.
 - 40 . Painter M. Neonatal seizure disorders. In: Levene MI; ed. *Fetal and neonatal neurology and neurosurgery*, 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995: 547-61.
 - 41 . Marchal C, Leveau P, André M, Garcia-Lang M, Costagliola P. The treatment of neonatal cerebral distress. Action of repeated refusions of mannitol. *Pediatric* 1972;27:709-19.
 - 42 . Levene MI, Evans DH. Medical management of raised intracranial pressure after severe birth asphyxia. *Arch Dis Child* 1985;60:12-6.

- 43 . Mujsce DJ, Towfighi J, Stern D, Vannucci RC. Mannitol therapy in perinatal hypoxic-ischemic brain damage in rats. *Stroke* 1990;21:1210-4.
- 44 . Levene MI, Evans DH, Forde A, Archer LN. Value of intracranial pressure monitoring of asphyxiated newborn infants. *Dev Med Child Neurol* 1987;29:311-9
- 45 . Whitelaw A. Intervention after birth asphyxia. *Arch Dis Child* 1989;64:66-8.
- 46 . Busto R, Mordecai Y-T, Globus, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I and Ginsberg MD. Effect of Mild Hypothermia on ischemia-Induced Release of Neurotransmitters and Free Fatty Acids in Rat Brain. *Stroke* 1989;20:904-10.
- 47 . Abbot R, Laptook, Ron J.T. Corbett , Dennis Burns, Rick Steret. Neonatal ischemic neuroprotection by modest hypothermia is associated with attenuated brain acidosis. *Stroke* 1995;26:1240-6.
- 48 . Gunn AJ, Gluckman PD, Gunn TR. Selective head cooling in newborn infants after perinatal asphyxia: a safety study. *Pediatrics* 1998;102:885-92.
- 49 . Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Valdés I, Scheinberg P, Ginsberg MD. Small differences in intraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 1987;7:729-38.
- 50 . A D Edwards, D Azzopardi. Section of Paediatrics. Hypothermic neural rescue treatment: from laboratory to cotside? Imperial College School of Medicine, Hammersmith Hospital, Londo. 1998.
- 51 . 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.
- 52 . Schulzke SM, Rao S, Patole SK. A systematic review of cooling for neuroprotection in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy-are we there yet? *BMC Pediatr* 2007;7:30.
- 53 . Delivoria-Papadopoulos M, Mishra OP. Mechanism of perinatal cerebral injury in fetus and newborn. *Ann N Y Acad Sci* 2000;900:159-68.
- 54 . Akhlaq A Farrooqui, Wei Yi Ong, and Lloyd A Horrocks. Inhibitors of Brain Phospholipase A2 Activity: Their Neuropharmacological Effects and Therapeutic Importance for the Treatment Neurologic Disorders. *Pharmacol Rev* 2006;58:591-620.
- 55 . William M Armstead. Role of altered cyclooxygenase metabolism in impaired cerebrovasodilatation to nociceptin/orphanin FQ following brain Injury. *Brain*

Research Bulletin 2000;53;807-12.

- 56 . Qiu-F Ge, Er-Qing Wei, Wei-Ping Zhang, et. al. Activation of 5-lipoxygenase after oxygen-glucose deprivation is partly mediated via NMDA receptor in rat cortical neurons. *Journal of Neurochemistry* 2006;97:997-1004.
- 57 . Legido A, Valencia I, Katsetos CD, Delivoria-Papadopoulos M. Neuroprotection in perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. Effective treatment and future perspectives. *Medicina (B Aires)* 2007;67:543-55.
- 58 . Almedia A, Bolanos JP. A transient inhibition of mitochondrial ATP synthesis by nitric oxide synthase activation triggered apoptosis in primary cortical neurons. *J Neurochem* 2001;77:676-90.
- 59 . Dawson DA. Nitric oxide and focal cerebral ischemia: multiplicity of actions and diverse outcome. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1994;6:299-324.
- 60 . Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991;91:31-8.
- 61 . Yoshida E, Mokuno K, Aoki S, et. al. Cerebrospinal fluid levels of superoxide dismutases in neurological diseases detected by sensitive enzyme immunoassays. *J Neurol Sci* 1994;124:25-31.
- 62 . Saito Y, Yoshida Y, Akazawa T, Takahashi K, Niki E. Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants. *J Biol Chem* 2003;278:39428-34.
- 63 . Brigelius-Flohé R, Traber MG. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J* 1999;13:1145-55.
- 64 . Chan E, Obaid L, Johnson ST, Bigam DL, Cheung PY. N-acetylcysteine administration improves platelet aggregation in hypoxia-reoxygenation injury. *Proc West Pharmacol Soc* 2007;50:53-7.
- 65 . Stamford JA, Isaac D, Hicks CA., Ward MA, Osborne DJ, O' Neill MJ. Ascorbic acid is neuroprotective against global ischaemia in striatum but not hippocampus: histological and voltametric data. *Brain Res* 1999;835:229-40.
- 66 . Song JH, Shin SH, Ross GM. Oxidative stress induced by ascorbate causes neuronal damage in an in vitro system. *Brain Res* 2001;895:66-72.
- 67 . Furuta A, Rothstein JD, and Martin LJ. Glutamate Transporter Protein Supties are Expressed Differentially during Rat CNS Development. *Jour of Neuroscience* 1997;17:8363-75

- 68 . Carlsson M, Carlsson A. Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia-implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 1990;13:272-6.
- 69 . Olney JW. Excitotoxic amino acids and neuropsychiatric disorders. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990;30:47-71.
- 70 . Fukamachi S, Furuta A, Ikeda T, et. al. Altered expressions of glutamate transporter subtypes in rat model of neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Brain Res Dev Brain Res* 2001;132:131-9.
- 71 . Jonston MV. Excitotoxicity in neonatal hypoxia. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2001;7:229-34.
- 72 . Choi DW, Rothman SW. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 1990;13:171-82.
- 73 . Endres M, Namura S, Shimizu-Sasamata M, et. al. Attenuation of Delayed Neuronal Death After Mild Focal Ischemia in Mice by Inhibition of the Caspase Family. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 1998;18:238-47.
- 74 . Türkyılmaz C, Türkyılmaz Z, Atalay Y, Söylemezoğlu F, Celasun B. Magnesium pre-treatment reduces neuronal apoptosis in newborn rats in hypoxia–ischemia. *Brain Res* 2002;955:133-7.
- 75 . Follet PL, Deng W, Dai W, et. al. Glutamat Receptor-Mediated oligodendrocyte toxicity in periventricular leukomalacia: A protective role for topiramate. *The Journal of Neuroscience* 2004;24:4412-20.
- 76 . Follet PL, Rosenberg PA, Volpe JJ, and Jensen FE. NBQX attenuates excitotoxic injury in developing white matter. *J Neurosci* 2000;20:9235-41.
- 77 . Lin S, Fan LW, Pang Y, Rhodes PG, Mitchell HJ, Cai Z. IGF-I protects oligodendrocyte progenitor cells and improves neurological functions following cerebral hypoxia-ischemia in the neonatal rat. *Brain Research* 2005;1063:15-26.
- 78 . Chiaretti A, Genovese O, Riccardi R, et. al. Intraventricular nerve growth factor infusion: a possible treatment for neurological deficits following hypoxic-ischemic brain injury in infants. *Neurol Res* 2005;27:741-6.
- 79 . Shin DH, Lee E, Kim JW, et. al. Protective effect of growth hormone on neuronal apoptosis after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *Neurosci Lett* 2004;354:64-8.
- 80 . Hu BR, Liu CL, Ouyang C, Blomgren K, Siesjo BK. Involvement of caspase-3 in

cell death after hypoxia-ischemia declines during brain maturation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:1294-300.

- 81 . Chu K, Park KI, Lee ST, et. al. Combined treatment of vascular endothelial growth factor and human neural stem cells in experimental focal cerebral ischemia. *Neurosci Res* 2005;53:384-90.
- 82 . Manegold G, Meyer-Monard S, Tichelli A, Pauli D, Holzgreve W, Troeger C. Cesarean section due to fetal distress increases the number of stem cells in umbilical cord blood. *Transfusion* 2008;48:871-6.
- 83 . Yanqing Z, Yu-Min L, Jian Q, Bao-Guo X, Chuan-Zhen L. Fibronectin and neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor in focal cerebral ischemia. *Brain Res* 2006;1098:161-9.
- 84 . Ekert P, Maclusky N, Ping Luo X, et. al. Dexamethasone prevents apoptosis in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic encephalopathy(HIE) by a reactive oxygen species-independent mechanism. *Brain Research* 1997;747:9-17.
- 85 . Marta R, Isabelle H, Christine B, et. al. Fructose-1,6-biphosphate prevents excitotoxic neuronal cell death in the neonatal mouse brain. *Developmental Brain Research* 2003;140:287-97.
- 86 . Kumral A, Gönenc S, Ozer E, et. al. Erythropoietin Downregulates Bax and DP5 ProApoptotic Gene Expression in Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Biol Neonate* 2005;89:205-10.
- 87 . Kumral A, Gönenc S, Acikgoz O, et. al. Erythropoietin increases glutathione peroxidase enzyme activity and decreases lipid peroxidation levels in hypoxic-ischemic Brain Injury in neonatal rats. *Biol Neonate* 2005;87:15-8.
- 88 . Schurr A. Neuroprotection against ischemic/hypoxic brain damage: blockers of ionotropic glutamate receptor and voltage sensitive calcium channels. *Curr Drug Targets*. 2004;5:603-18.
- 89 . Yoneda S, Ibara S, Kobayashi K, et. al. Low adjusted serum ionized calcium concentration shortly after birth predicts poor outcome in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Obstet Gynaecol Res* 2005;31:57-64.
- 90 . Levene M, Blennow M, Whitelow A, Hanko E, Fellman V, Hartley R. Acute effects of two different doses of magnesium sulphate in infants with birth asphyxia. *Arch Dis Child* 1995;73:174-7.
- 91 . Gathwala G, Khera A, and Singh I. Magnesium in Birth Asphyxia. *Indian J Pediatr*

2006;73:209-12.

- 92 . He LN, Yang J, Jiang Y, Wang J, Liu C, He SB. Protective effect of tanshinone on injured cultured PC12 cells in vitro. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2001;26:413-6.
- 93 . Feng Y, Paul I, LeBlanc MH. Nicotinamide reduces hypoxic ischemic brain injury, in the newborn rat. *Brain Research Bulletin* 2006;69:117-22.
- 94 . Joseph L Nunez and Margaret M McCarthy. Estradiol exacerbates hippocampal damage in a model of preterm infant brain injury. *Endocrinology* 2003;144:2350-9.
- 95 . Lim YJ, Zheng S, Zuo Z. Morphine preconditions purkinje cells against cell death under in vitro simulated ischemia-reperfusion conditions. *Anesthesiology* 2004;100:562-8.
- 96 . Adam-Vizi. Neuroprotective effect of sodium channel blockers in ischemia: the pathomechanism of early ischemic dysfunction. *Orv Hetil* 2000;141:1279-86.
- 97 . Carter AJ, Grauert M, Pschorn U, et. al. Potent blockade of sodium channels and protection of brain tissue from ischemia by BIII 890 CL. *PNAS* 2000; 97:4944-9.
- 98 . Danielyan L, Gembizki O, Proksch B, et. al. The blockade of endothelin A receptor protects astrocytes against hypoxic injury: common effects of BQ-123 and erythropoietin on the rejuvenation of the astrocyte population. *Eur J Cell Biol* 2005;84:567-79.
- 99 . Bazan NG. Synaptic lipid signaling: significance of polyunsaturated fatty acids and platelet-activating factor. *J Lipid Res* 2003;44:2221-33.
- 100 . Park TS, Gonzalez ER, Gidday JM. Platelet-activating factor mediates ischemia-induced leukocyte-endothelial adherence in newborn pig brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:417-24.
- 101 . Viswanath M, Palmer C, Roberts R L. Reduction of hypoxic-ischemic brain swelling in the neonatal rat with PAF antagonist WEB 2170: lack of long-term protection. *Pediatr Res* 2000;48:109-13.
- 102 . Liu XH, Eun BL, Barks JD. Platelet-activating factor antagonist BN 50730 attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Pediatr Res* 2001;49:804-11.
- 103 . Ogden F, DeCoster MA, Bazan NG. Recombinant plasma-type platelet-activating factor acetylhydrolase attenuates NMDA-induced hippocampal neuronal apoptosis. *J Neurosci Res* 1998;53:677-84.
- 104 . Arai H. Platelet-activating factor acetylhydrolase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*

2002;68-69:3-58.

- 105 . Riera M, Torras J, Herrero I, et. al. Neutrophils accentuate renal cold ischemia-reperfusion injury. Dose dependent protective effect of platelet-activating factor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280:786-94.
- 106 . Stammberger U, Carboni GL, Hillinger S, Schneiter D, Weder W, Schmid R. Combined treatment of endothelin-and PAF antagonists reduces posttransplant lung ischemia/reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant* 1999;18:862-8.
- 107 . Albert DH, Magoc TJ, Tapang P, et. al. Pharmacology of ABT-491, a highly potent platelet-activating factor receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 1997;325:69-80.
- 108 . Albert DH, Malo PE, Tapang P, et. al. The role of platelet-activating factor(PAF) and the efficacy of ABT-491, a highly potent and selective PAF antagonist, in experimental allergic rhinitis. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;284:83-8.
- 109 . Robert M Kliegman, Richard E Behrman, Hal B. Jenson, Bonita F Standon. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 18th ed. Saunders Elsevier, 2007:2494-5.
- 110 . Pereria LO, Arteni NS, Peterson RC, Padilha da Rocha A, Achaval M, Netto CA. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory* 2007;87:101-8.
- 111 . Szyndler J, Piechal A, Blecharz-Klin K, et. al. Effect of kindled seizures on rat behavior in water Morris maze test amino acid concentrations in brain structures. *Pharmacological Reports* 2006;58:75-82.
- 112 . Nowakawska E, Kus K, Czubak A, et. al. Some Behavioural effects of carbamazepin-comparison with haloperidol. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2007;58:253-64.
- 113 . Nicholas A, Munhoz CD, Ferguson D, Campbell L, Sapolsky R. Enhancing Cognition after stress with Gen Therapy. *The Journal of Neuroscience* 2006;26:11637-43.
- 114 . Voyer D, Voyer S, Bryden MP. Magnitude of sex differences in spatial abilities: a meta-analysis and consideration of critical variables. *Psychol Bull* 1995;117:250-70.
- 115 . Bucci DJ, Chia AA, Gallegher M. Spatial learning in male and female long-evans rats. *Behav Neurosci* 1995;109:180-3.
- 116 . Gaulin SJC, Hoffman HA. Evolution and development of sex differences in spatial

- ability. In: Betzig L, Mulder M, Turke P, editors. Human reproductive behavior a darwinian perspective. Cambridge University Press; 1998:129-152.
- 117** . Jonasson Z. Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: a review of behavioral and biological data. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 2005;28:811-25.
- 118** . Pagenelli RA, Benetoli A, Miltus Lima KC, et. al. A Novel Version of The 8-Arm Radial Maze: Effects of Cerebral Ischemia on Learning and Memory. *Journal of Neuroscience Methods* 2004;132:9-18.
- 119** . EO Koylu, L Kanit, D Taşkıran, T Bağcı, B Balkan, S Pogun. Effects of nitric oxide syntase inhibition on spatial discrimination learning and central DA2 and mACh receptors. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2005;81:32-40.
- 120** . Itoh J, Nabeshima T, Kameyama T. Utility of an elevated plus-maze for dissociation of amnesic and behavioral effects of drugs in mice. *Eur J Pharmacol* 1991;194:71-6.
- 121** . Ikeda T, Mishima K, Yoshikawa T, et. al. Selective and long-term learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats. *Behav Brain Res* 2001;118:17-25.
- 122** . Pellow S, Chopin P, File SE, et. al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci Methods* 1985;14:149-67.
- 123** . Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm measure. *Eur J Pharmacology* 2003;463:3-33.
- 124** . Lieben CK.J, Oorsouw KV, Deutz NEP, Blokland A. Acute tryptophan depletion induced by a gelatin-based mixture impairs object memory but not affective behavior and spatial learning in the rat. *Behav Brain Res* 2004;151:53-64.
- 125** . A Ennaceur, S Michalikova, PL Chazot. Models of anxiety: Responses of rats to novelty in an open space and enclosed space. *Behav Brain Res* 2006;171:26-49.
- 126** . D' Hooger D, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev* 2001;36:60-90.
- 127** . Morris RGM, Garrud P. Place Navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 1982;297:681-3.
- 128** . Chou C, Trakht T, Signori C, et. al. Behavioral/Environmental Intervention Improves Learning After Cerebral Hypoxia-Ischemia In Rats. *Stroke* 2001;32:2192-7.

- 129** . Widy-Tyszkiewicz E, Piechal A, Joniec I, Blecharz-Klin K. Long term administration of *Hypericum perforatum* improves spatial learning and memory in the water maze. *Biol Pharm Bull* 2002;25:1289-94.
- 130** . Komphuis PJGH, Gardoni F, Kamal A, et. al. Long-lasting effects of neonatal dexamethasone treatment on spatial learning and hippocampal synaptic plasticity: Involvement of the NMDA receptor complex. *FASEB Journal* 2003;17:911-13.
- 131** . Kheirandish L, Gozal D, Pequignot JM, Pequignot J, Row BW. Intermittant hypoxia during Development Induces Long-Term Alterations in Spatial Working Memory, Monoamines, and Dendritic Branching in Rat Frontal Cortex. *Ped Research* 2005;58:594-9.
- 132** . Ikeda T, Mishima K, Aoo N, et. al. Rehabilitative training tasks improve spatial learning impairment in the water maze following hypoxic-ischemic insult in neonatal rats. *Ped Research* 2006;59:61-5.
- 133** . Moragrega I, Carrasco MC, Vicens P, Redolat R. Spatial Learning in male mice with different levels of aggressiveness: effect of housing conditions and nicotine administration. *Behav Brain Res* 2003;147:1-8.
- 134** . Carvajal CC, Vercauteren F, Dumant Y, Michalkiewicz M, Quirion R. Aged neuropeptide y transgenic rats are resistant to acute stress but not maintain spatial and nonspatial learning. *Behav Brain Res* 2004;153:471-80.
- 135** . Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A. Animal models of anxiety, an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1997;30:289-304.
- 136** . Ferguson GD, Herschman HR, Sorm DR. Reduced anxiety and depression like behavior in synoptatagmin IV(-/-) mice. *Neuropharmacology* 2004;47:604-11.
- 137** . CS Hall. Emotional behavior in the rat. The relationship between emotionality and ambulatory activity. *J Comp Physiol Psychol* 1936;22:345-52.
- 138** . Soubrie P. Open field chez le rat: interrelations entre locomotion exploration et emotivite. *J. Pharmacol* 1971;2: 457.
- 139** . Morris RGM. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv* 1981;12:239-60.
- 140** . RJ Steele and RGM Morris. Delay-Dependent Impairment of a Matching-to-place Task with Chronic and Intrahippocampal Infusion of NMDA-Antagonist D-AP 5. *Hippocampus* 1999;9:118-36.

- 141 . L Kanit, EO Koylu, G Yararbaş, JJ Furedey, S Pogun. The effect of nitric oxide syntase inhibition on cognitive ability and strategies employed for place learning in the water maze: sex differences. *Brain Research Bulletin* 2003;62:151-9.
- 142 . Gustavsson M, Anderson MF, Mallard C, and Hagberg H. Hypoxic preconditioning confers long-term reduction of brain injury and improvement at neurological ability in immature rats. *Ped Research* 2005;57:305-9.
- 143 . Bolding K and Rudy JW. Place learning in the Morris water task: making the memory stick. *Learning and Memory* 2006;13:278-86.
- 144 . Yun YJ, Lee B, Hahm DH, et. al. Neuroprotective Effect of Palmul-Chongmyeong-Tang and Ischemia-Induced Learning and Memory Deficits in the Rat. *Biol Pharm Bull* 2007;30:337-42.
- 145 . Feng L, Xiao H, Xiao He, et. al. Long term effects of lanthanum intake on the neurobehavioral development the rat. *Neurotoxicology and teratology* 2006;28:119-24.
- 146 . M Kiray, HA Bagriyanik, C Pekcetin, et. al. Deprenyl and the Relationship Beetwen Its Effects on spatial Memory, Oxidant Stress and Hippocampal Neurons in Aged Male Rats. *Physiol Res* 2006;55:205-12.
- 147 . Balemans W, Moechars D, Kass S et al . Behavioural Characterization of myo-inositol monophosphatase(IMPA₂)-deficient mice. *Beh Pharmacology* 2003;14:71.
- 148 . Bull EJ, Hutson PH, KCF. Reduced social interaction following 3-4 MDM is not associated with 5-HT₂ receptor responsivity. *Neuropharmacology* 2003;44:439-48
- 149 . Uchiyama M, Mihara M. Determination of malondialdehyde precursors in tissues by thiobarbutiric acid test. *Anal Biochem* 1978;86:279-286.
- 150 . Sastry PS, Rao KS. Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* 2000;74:1-20.
- 151 . Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 1981;9:131-41.
- 152 . Blomgren K, Zhu C, Wang X, et. al. Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"? *J Biol Chem* 2001;276:10191-8.
- 153 . KD Ehman, VC Moser. Evaluation of cognitive function in weanling rats: A review of methods suitable for chemical screening. *Neurotoxicology and Teratology* 2006;28:144-161.

- 154** . Rossato JI, Zinn CG, Furini C, et. al. A link between the Hippocampal and the Striatum Memory Systems of the Brain. *An Acad Bras Cienc* 2006;78:515-23.
- 155** . Maraşlıgil B, Büyükdereli Z, Reşitoğlu B, Sungur MA, Ergenoğlu T, Beydağı H. Morris Su Tankı Referans Bellek alışmasında Yuvarlak veya Kare Platform Kullanmanın Sonuca Etkisi Var mı? VII. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 16-20 Nisan 2008, Adana. Kongre Özeti Kitabı, 35.
- 156** . Ikeda T, Mishima K, Aoo N. Combination treatment of neonatal rats with hypoxia-ischemia and endotoxin induces long-lasting memory and learning impairment that is associated with extended cerebral damage. *Am J of Obst and Gynecology* 2004;191; 2132-41.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APAF	Apoptotic Protease Activating Factor (Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör)
AA	Açık Alan
AL	Artı Labirent
AMPA	α -Amino-3-Hidroksi-5-Metil-4-İzoksazol Propiyonat
ASA	Askorbik Asit
ATP	Adenozin trifosfat
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
BT	Bilgisayarlı Tomografi
Ca⁺²	Kalsiyum
Caspase	Cysteine-containing Aspartate Specific Protease
CK	Kreatin Kinaz
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EAAT	Eksitatör Aspartik Asit Taşıyıcı Protein
EEG	Elektroensefalogram
EPO	Eritropoetin
FGF	Fibroblast Growth Factor (Fibroblast Büyüme Faktörü)
GP	Glutatyon Peroksidaz
HDD	Hayvan Davranış Deneyi
HİBH	Hipoksik İsemik Beyin Hasarı
IGF	Insulin-Like Growth Factor (İnsülin Benzeri Büyüme Hormonu)
İ.P.	İntraperitoneal (Periton içi)
İ.V.	İntravenöz (Damar içi)
K	Potasyum
KKGS	Kapalı Kola Girme Süresi
LO	Lipooksijenaz
LT	Lökotrien
MDA	Malondialdehid
Mg⁺²	Magnezyum

MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MST	Morris Su Tankı
Na	Sodyum
Naa	N-Asetil Aspartat
NAS	N-Asetil Sistein
NGF	Neuronal Growth Factor (Nöronal Büyüme Hormonu)
NMDA	N-Metil D-Aspartat
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentetaz
PAF	Platelet Activating Factor (Trombosit Aktive Edici Faktör)
PG	Prostoglandin
Se	Selenyum
SEP	Sensorial Uyarılmış Potansiyeller
SF	Serum Fizyolojik
Sn	Saniye
SO	Siklooksijenaz
SOD	Süperoksit Dismutaz
SOR	Serbest Oksijen Radikalleri
SP	Serebral Palsi
SS	Standart Deviation (Standart Sapma)
SSS	Merkezi sinir sistemi
TUNEL	Terminal-transferase Mediated dUTP Biotin Nick-End-Labeling
TxA₂	Tromboksan A ₂
US	Ultrasonografi
YBS	Yükseltiyi Bulma Süresi

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa No
Resim 1 (Artı labirent düzeneği.)	36
Resim 2 (Açık alan düzeneği.)	37
Resim 3 (Mikroskop.)	40
Resim 4 (Hipoksi Odacığı, 25x15x10cm ³ .)	40
Resim 5 (Artı Labirentin Yandan Görünüğu.)	41
Resim 6 (Artı Labirentin Üstten Görünüğu.)	42
Resim 7 (Açık Alanın Üst-yandan Görünüğu.)	42
Resim 8 (Morris Su Tankı Yandan Görünüğu.)	43
Resim 9 (Sabit Görsel İpuçları.)	44
Resim 10 (Kızaklar ve Yükselti Üst-yandan Görünüğu.)	44
Resim 11 (Gizli Yükseltinin Üstten Görünüğu.)	44
Resim 12 (Yedi Günlük Yavru Sıçanlar.)	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1 (HİBH' de Nekroz ve Apoptoz Oluşumu.)	13
Şekil 2 (HİBH'de Serbest Oksijen Radikalleri Oluşumu.)	14
Şekil 3 (Serbest Oksijen Radikalleri Oluşumu ve Zararsız Hale Getirme Yolakları.)	14
Şekil 4 (Apoptoz Oluşumu ve Genlerin Etkisi.)	15
Şekil 5 (Fosfolipid Yıkımı ile SOR Üretimi.)	23
Şekil 6 (ATP Yıkımı ile Hipoksantin, Ksantin ve SOR oluşumu.)	24
Şekil 7 (Arjinin Üre Döngüsünde NO Üretimi.)	25
Şekil 8 (Glutamat, Mg ⁺² , Ca ⁺² , NMDA ve AMPA Reseptör Etkileşimi.)	27
Şekil 9 (ABT-491.)	33
Şekil 10 (Morris Su Tankı.)	38
Şekil 11 (Deney Uygulama Takvimi.)	47
Şekil 12 (MST Uzak Hafıza Deneyinde 1. Gün Sıçanların Suya Atılış Şeması.)	51
Şekil 13 (MST Uzak Hafıza Deneyi Günlere Göre Uygulama Şeması.)	52
Şekil 14 (MST Yakın Hafıza Deneyinde 1. Gün Sıçanların Suya Atılış Şeması.)	52
Şekil 15 (MST Yakın Hafıza Deneyi Uygulama Şeması.)	53
Şekil 16 (Beynin Sağ Yarisındaki Apoptotik Hücrelerin Gruplara Göre Dağılımı, TUNEL yöntemi.)	56
Şekil 17 (Beynin Sol Yarisındaki Apoptotik Hücrelerin Gruplara Göre Dağılımı, TUNEL Yöntemi.)	57
Şekil 18 (Beynin Sağ ve Sol Yarisındaki Apoptotik Hücre Sayıları, TUNEL Yöntemi.)	57
Şekil 19 (Beynin Sağ Yarisındaki Apoptotik Hücrelerin Gruplara Göre Dağılımı, Kaspaz- 3 yöntemi.)	59
Şekil 20 (Beynin Sol Yarisındaki Apoptotik Hücrelerin Gruplara Göre Dağılımı, Kaspaz- 3 yöntemi.)	59

Şekil 21	(Beynin Sağ ve Sol Yarisındaki Apoptotik Hücre Sayıları, Kaspaz-3 Yöntemi.)	60
Şekil 22	(Plazma MDA Düzeyinin Gruplara Göre Dağılımı.)	60
Şekil 23	(Sıçanların Günlere Göre Kapalı Kola Girme Sürelerinin Gruplara Göre Dağılımı, Artı Labirent Deneyi.)	61
Şekil 24	(Sıçanların Gruplara Göre Kapalı Kola Girme Sürelerinin Günlere Göre Dağılımı, Artı Labirent Deneyi.)	62
Şekil 25	(Sıçanların Katettikleri Mesafenin Gruplara Göre Dağılımı, Açık Alan Deneyi.)	63
Şekil 26	(Sıçanların Hareket Hızlarının Gruplara Göre Dağılımı, Açık Alan Deneyi.)	63
Şekil 27	(Bir ile Dördüncü Gün Arasındaki Yükseltiyi Bulma Süresi Farkının Gruplara Göre Dağılımı, MST Uzak Hafıza Deneyi.)	65
Şekil 28	(Beşinci Günde Doğu Kadranında Geçirilen Sürenin Gruplara Göre Dağılımı, MST Uzak Hafıza Deneyi.)	66
Şekil 29	(Beşinci Günde Katedilen Mesafenin Gruplara Göre Dağılımı, MST Uzak Hafıza Deneyi.)	66
Şekil 30	(Beşinci Günde Yüzme Hızlarının Gruplara Göre Dağılımı, MST Uzak Hafıza Deneyi.)	67
Şekil 31	(Gruplara Göre Yükseltiyi Bulma sürelerinin Atışlara Dağılımı, MST Yakın Hafıza Deneyi.)	68
Şekil 32	(Ortalama Beyin Ağırlıklarının Gruplara Göre Dağılımı, 16. Hafta Deneyi.)	71

GRAFİKLER DİZİNİ

	Sayfa No
Grafik 1 (Grupların Günlere Göre Yükseltiyi Bulma Sürelerinin ve Günler Arasındaki Değişimin Karşılaştırması, MST Uzak Hafıza Deneyi.)	64
Grafik 2 (Grupların Atışlara Göre Yükseltiyi Bulma Sürelerinin ve Atışlar Arasındaki Değişimin Karşılaştırması, MST Yakın Hafıza Deneyi.)	69
Grafik 3 (Sıçanların Atışlara Göre Yükseltiyi Bulmak İçin Katettikleri Mesafeler, MST Yakın Hafıza Deneyi.)	70
Grafik 4 (Sıçanların Her Bir Atıştaki Ortalama Yüzme Hızları, MST Yakın Hafıza Deneyi.)	70

TABLolar DİZİNİ

		Sayfa No
Tablo 1	(Apoptoz-Nekroz Arasındaki Farklar.)	16
Tablo 2	(Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Sarnat ve Sarnat Evrelemesi.)	17
Tablo 3	(Gruplara Göre TUNEL Yöntemiyle Beynin Sağ ve Sol Yarisındaki Apoptotik Hücre Sayılarının Karşılaştırılması.)	56
Tablo 4	(Gruplara Göre Kaspaz-3 Yöntemiyle Beynin Sağ ve Sol Yarisındaki Apoptotik Hücre Sayılarının Karşılaştırılması.)	58
Tablo 5	(Sıçanların Günlere Göre Kapalı Kola Girme Süreleri (sn), Artı Labirent Deneyi.)	61
Tablo 6	(Gruplara Göre Ortalama Katedilen Mesafe ve Hareket Hızı, Açık Alan Deneyi.)	62
Tablo 7	(Grupların Günlere Göre Ortalama Yükseltiyi Bulma Süreleri ve Bir ile Dördüncü Gün Arasındaki YBS Farkları, MST Uzak Hafıza Deneyi.)	64
Tablo 8	(Sıçanların Doğu Kadranında Geçirdikleri Süre, Katettikleri Mesafe ve Yüzme Hızları, MST Uzak Hafıza Deneyi.)	65
Tablo 9	(Atışlara Göre Sıçanların Ortalama Yükseltiyi Bulma Süreleri (sn), MST Yakın Hafıza Deneyi.)	68
Tablo 10	(Sıçanların Her Bir Atışta Katettikleri Ortalama Mesafeler (cm), MST Yakın Hafıza Deneyi.)	69
Tablo 11	(Sıçanların Her Bir Atıştaki Ortalama Hızları (cm/sn), MST Yakın Hafıza Deneyi.)	69
Tablo 12	(Gruplara Göre Ortalama Beyin Ağırlıkları)	71

EKLER

EK- 1 (Hayvan Davranış Deneyleri Video Görüntü Örnekleri CD.)

EK- 2 (zekeriya_buyukdereli_tez.pdf CD.)