



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

**HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI OLUŞTURULMUŞ  
YENİDOĞAN SIÇANLARDA ABT-491' İN  
NÖRONAL APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİSİ**

**Dr. Gülçin BOZLU  
UZMANLIK TEZİ**

**Danışman  
Prof. Dr. Aytuğ ATICI**

**MERSİN - 2006**



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

**HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI OLUŞTURULMUŞ  
YENİDOĞAN SIÇANLARDA ABT-491' İN  
NÖRONAL APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİSİ**

**Dr. Gülçin BOZLU  
UZMANLIK TEZİ**

**Danışman  
Prof. Dr. Aytuğ ATICI**

**Bu tez, BAP-TF DTB (AA) 2004-3 kodlu proje olarak  
Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma  
Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir**

**MERSİN - 2006**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bana emek harcayan bütün hocalarıma en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın her aşamasında bana destek olan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Aytuğ Atıcı'ya, ayrıca katkılarını esirgemeyen Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Ayşe Polat ve çalışma arkadaşlarına, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Ali Naycı, araştırma görevlisi Dr. Hakan Taşkınlar ve çalışma arkadaşlarına, Neonatoloji Bilim Dalı araştırma görevlisi Uz. Dr. Ali Haydar Turhan' a ve çalışma arkadaşlarına, ayrıca Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı çalışanlarına, mesai arkadaşlarıma ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına teşekkürü bir borç biliyorum.

Yaşamım boyunca sevgi ve desteklerini hissettiğim sevgili aileme ve katkıları için sevgili eşime yürekten teşekkür ederim.

Dr. Gülçin Bozlu

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET.....	5
İNGİLİZCE ÖZET.....	6
GİRİŞ VE AMAÇ.....	7
GENEL BİLGİLER.....	9
Hipoksik İskemik Beyin Hasarı.....	9
Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Patofizyoloji.....	10
Hipoksi ve İskemiye Takiben Gelişen Nörotoksik Olaylar.....	13
Hipoksik İskemik Beyin Hasarı ve Eksitotoksisite.....	14
Nörotrofik Faktörler ve Hücrede Hasar/Ölüme Karşı Nöroprotektif Etki..	19
İkincil Haberci Sinyal Yolakları ve Nöronal Yaşam.....	20
Hipoksik İskemik Hücre Ölümünde Temel Bir Mekanizma: Apoptozis....	21
Apoptozisin Tanımı.....	22
Apoptozisin Organizmada Görüldüğü Durumlar.....	24
Apoptozisin Aşamaları.....	29
Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler.....	30
Nöronal Apoptozis Üzerine Trombosit Aktive Edici Faktör (Platelet Activating Factor-PAF)' in Etkisi.....	34
PAF Reseptör Antagonisti: ABT-491.....	37
Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Histolojik Bulgular.....	38
Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Klinik Bulgular.....	40
Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Evreleme.....	40
Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Tanı.....	42
Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Tedavi.....	44
GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	47
BULGULAR .....	51
TARTIŞMA.....	60
SONUÇ VE ÖNERİLER .....	66
KAYNAKLAR.....	67
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	74
ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ.....	75
TABLolar DİZİNİ.....	76

## ÖZET

Hipoksi ve iskemi, fetüs ve yenidoğanın beyinde hasara yol açan nedenlerin başında gelmektedir. Bu hasar sıklıkla nekroz ve/veya apoptoz ile gerçekleşen nöron ölümüne bağlı olmaktadır. Son yıllarda, hipoksik isemik beyin hasarını (HİBH) önlemeye yönelik olarak apoptozis inhibisyonu yeni bir tedavi yaklaşımı olarak önerilmektedir. Bu çalışmada, HİBH oluşturulan yenidoğan sıçan modelinde trombosit aktive edici faktör reseptörünün çok güçlü bir antagonisti olan ABT-491' in nöronal apoptozis üzerine etkilerini araştırdık.

Çalışmaya 77 adet yedi günlük yavru sıçan alındı ve beş gruba ayrıldı. Birinci gruptakilere (n: 16) sadece orta hat kesisi yapılarak karotid arter bulundu fakat bağlanmadan kesi yeri dikildi, bu gruba hipoksi de uygulanmadı (kontrol grubu). İkinci (n: 14), üçüncü (n: 12) dördüncü (n: 16) ve beşinci (n: 19) gruptaki sıçanların sağ karotid arterleri bağlandıktan sonra; ikinci gruptakilere hipoksi öncesi ve üçüncü gruptakilere ise hipoksi sonrasında periton içine serum fizyolojik uygulandı. Dördüncü ve beşinci gruplara ise sırasıyla hipoksi öncesi ve sonrasında periton içine ABT-491 (0.4 mg/kg) verildi. Hipoksi, sıçanların %8 oksijen içeren hipoksi odacığında iki saat bekletilmesiyle oluşturuldu. Deneyin sonunda nöronal apoptozis TUNEL ve Kaspaz-3 immün boyalarıyla değerlendirildi.

Serum fizyolojik verilen grupların her iki beyin yarısındaki apoptotik hücre sayıları, kontrol grubuna göre anlamlı derecede fazla bulundu ( $p=0.0001$ ). Serum fizyolojik verilen gruplarla karşılaştırma yapıldığında, hipoksi öncesi ya da sonrasında ABT-491 verilmesi her iki beyin yarısındaki apoptotik hücre sayılarını anlamlı derecede azalttı ( $p=0.0001$ ). Kontrol grubu haricindeki gruplarda, beyinin sağ yarısındaki apoptotik hücre sayıları sol yarısındakinden anlamlı derecede fazla bulundu ( $p=0.0001$ ).

Bu bulgular, güçlü bir trombosit aktive edici reseptör antagonisti olan ABT-491' in yenidoğanın hipoksik iskemik beyin hasarında nöronal apoptozisi azaltarak koruyucu ve/veya tedavi edici etkileri olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** ABT-491, apoptozis, beyin hasarı, hipoksi-iskemi, yenidoğan

## ABSTRACT

### **The Effects of ABT-491 on Neuronal Apoptosis in Neonatal Rat Model of Hypoxic Ischemic Brain Injury**

Hypoxic ischemia is a common cause of brain damage to the fetal and neonatal brain. Hypoxic Ischemic Brain Injury (HIBI) at the prenatal/perinatal stage has a severe impact on brain maturation and is a leading cause of serious neurological disorders. More recently, inhibition of apoptosis has been proposed as a novel and promising therapeutic approach for neuronal rescue following neonatal HIBI. In the present study, we investigated the effect of ABT-491, a highly potent platelet-activating factor receptor antagonist, on neuronal apoptosis in neonatal rat model of HIBI.

The study included seven-day-old rat pups (n: 77) and they divided into five groups. Animals of the first group (n: 16), neither underwent carotid artery ligation nor exposed to hypoxia (sham). Cerebral hypoxia-ischemia was induced by right carotid artery ligation followed by a 2 h of hypoxia with 8% oxygen in the rest of the groups. Animals of the second (n: 14) and third (n: 12) groups were treated with saline before and after hypoxia, respectively. The fourth (n: 16) and fifth (n: 16) groups received ABT-491 (0.4 mg/kg, i.p.) before and after hypoxia, respectively. At end of the study, neuronal apoptosis was evaluated by the terminal-transferase mediated dUTP biotin nick-end-labeling (TUNEL) and caspase-3 staining methods. Apoptotic cells in the right and left hemispheres were calculated and expressed as average number per high visual field.

The numbers of apoptotic cells in both hemispheres were significantly higher in saline treatment groups than that of control group ( $p=0.0001$ ). Administration of ABT-491 either before or after hypoxia resulted in significant reduction of the numbers of apoptotic cells in both hemispheres, when compared to saline treatment groups ( $p=0.0001$ ). Except the control group, the numbers of apoptotic cells in right hemispheres were significantly higher than that in the left hemispheres in all of the groups ( $p=0.0001$ ).

These results indicate that ABT-491, a highly potent platelet-activating factor receptor antagonist, may provide beneficial effects on neonatal HIBI by reducing neuronal apoptosis.

**Key Words:** ABT-491, apoptozis, brain injury, hypoxia-ischemia, newborn

## GİRİŞ VE AMAÇ

Hipoksik iskemik beyin hasarı (HİBH) fetal ve yenidoğan dönemde beyinde en sık hasar yapan, mortalite ve kronik nörolojik hasarın en önemli nedenlerindedir<sup>1,2</sup>. HİBH gelişiminde doğum öncesi nedenler kadar perinatal asfiksi de büyük önem taşımaktadır. Henüz olgunlaşmamış beyinin hipoksi ve iskemiye yanıtı olgunlaşmış beyindekinden farklıdır<sup>3,4</sup>. Hipoksi ve iskeminin başlangıçta oluşturduğu hasarın yanı sıra reperfüzyonun, glutamat ve nitrik oksit nörotoksitesinin, serbest radikal oluşumunun, hücre içinde kalsiyum birikmesinin ve sonuçta gelişen apoptozisin beyinde geri dönüşümsüz hasara yol açtığı bilinmektedir<sup>5,6</sup>.

Hücre ölümü, hücre fonksiyonlarının geri dönüşümsüz kaybı olup programlanmış (apoptozis) veya nekrotik şekilde olabilir. Olgunlaşmamış beyinde hipoksi ve iskemi sonrası gelişen nörodejenerasyonda apoptozis ve nekrozis belirgindir<sup>7</sup>. Apoptozisin ve apoptotik-nekrotik geçiş formunun dengelenmesi hasar sonrası ortaya çıkan değişik apoptotik ve antiapoptotik proteinlerin dengesine bağlıdır. Bu sürecin detaylı olarak araştırılması HİBH' den korunma ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için önemlidir.

Literatürde yenidoğan' ın HİBH modellerinde nöronal hasarı önlemek için çeşitli farmakolojik ajanlar ve yöntemler kullanılmıştır<sup>8-12</sup>. Son yıllarda yapılan çalışmalar, değişik stimülasyonlar sonucunda beyinde trombosit aktive edici faktör (platelet activating factor-PAF) ve doymamış yağ asitlerinin sentezlendiğini göstermektedir<sup>13</sup>. Özellikle merkezi sinir sisteminde PAF ikincil haberci olup presinaptik bölgede etkili olmaktadır. PAF' ın gerek sistemik ve gerekse bölgesel uygulamalarıyla beyindeki kan dolaşımını olumsuz etkilediği bildirilmektedir<sup>14,15</sup>. Bunun yanı sıra değişik hayvanlarda yapılan iskemi modellerinde, PAF' ın merkezi sinir sisteminde önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir. Örneğin maternal-fetal kan akımının durdurulmasını takiben 20 dakika içerisinde PAF üretiminde artış olmaktadır<sup>16</sup>. Bir başka deneysel modelde, inme oluşturulan hayvanlarda iskemi ve reperfüzyonu takiben omurilikte PAF artışı olmaktadır<sup>17</sup>.

Yenidoğanlarda PAF iskemik beyin dokusunda yoğunlaşarak proinflamatuvar etki gösterir<sup>18</sup>. 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 bildirilmiştir<sup>19</sup>. BN 5202' in ise gerek hipoksi öncesi gerekse sonrası verildiğinde etkili olmadığı gözlenmiştir<sup>19</sup>. Diğer bir çalışmada hipoksiden hemen önce ve sonra BN 50730 kullanılmış ve bunun hem doku kaybını azalttığını hem de öğrenme ve hafıza yetisini koruduğu izlenmiştir<sup>20</sup>. Diğer taraftan hipokampal nöronlarda yapılan bir çalışmada; PAF' ı inaktive eden PAF asetil hidrolazın, N-metil D-aspartat (NMDA) ile uyarılmış apoptozisi azalttığı ve nöroprotektif etki sağladığı gözlenmiştir<sup>21</sup>. Böylece PAF asetil hidrolazın eksitotoksisite, epileptik beyin hasarı, kafa travması, inme, glokom ve nörodejeneratif hastalıklar gibi olaylarda PAF antagonistlerine karşı alternatif olabileceği ileri sürülmüştür<sup>22</sup>.

ABT-491 çok güçlü bir PAF reseptör antagonistidir. Literatürde, deneysel hayvan modellerinde ABT-491' in kullanımıyla ilgili sınırlı sayıda çalışma olmasına rağmen<sup>23,24</sup>; bilgilerimize göre, HİBH oluşturulan hayvan modellerinde ABT-491' in etkilerini gösteren yayımlanmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, HİBH oluşturulan yenidoğan sıçan modelinde güçlü bir PAF reseptör antagonisti olan ABT-491' in nöronal apoptozis üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır.



## GENEL BİLGİLER

### Hipoksik İskemik Beyin Hasarı

HİBH tıptaki ilerlemelere rağmen önemli bir mortalite ve morbidite nedeni olmaya devam etmektedir. Serebral palsinin en önemli nedenlerindendir<sup>1,2</sup>. Hipoksi kandaki oksijenin normalden az olduğunu, iskemi ise bir organ veya dokudaki kan akımının azalmasını ifade eder. İskemi durumunda dokuya sadece oksijen değil glukoz gibi hayati önemi olan diğer maddeler de gidemez. Bu durumda dokuda biriken artık maddelerin de yeterince temizlenmesi mümkün olamamaktadır. Deneysel ve klinik veriler HİBH' da iskeminin daha önemli rol oynadığını göstermiştir. Asfiksi terimi, plasental veya pulmoner gaz değişiminin kesilmesine bağlı oluşan hipoksiye hiperkapninin de eklendiğini ifade etmektedir.

Hipoksi ve iskemi, fetüs ve yenidoğanın beyinde hasara yol açan nedenlerin başında gelmektedir. Gelişmiş toplumlarda HİBH görülme insidansı 1000 canlı doğumda 0.4-3.7 olup, ciddi vakalarda buna bağlı ölüm ve nörolojik hasar gelişme insidansı 1000 canlı doğumda 0.2-1.3 olarak bildirilmektedir<sup>25</sup>. Gelişmekte olan toplumlarda sağlıklı veriler olmamakla beraber bu oranların daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir.

Fetüs ve yenidoğanda asfiksiye neden olan durumlar şunlardır:

### Anneye Ait Nedenler

Anne yaşınının 16' dan küçük 40' tan büyük olması,  
Düşük sosyoekonomik durum,  
Diyabet,  
Kronik hastalıklar (böbrek, akciğer, karaciğer vb),  
Hipertansif hastalıklar,  
Annede tiroid hastalıkları,  
Tüberküloz,  
Sistemik Lupus Eritematozis,  
Psikoz, epilepsi, zeka geriliği,  
Ağır anemi,  
İskelet anomalileri,  
Gebelik toksemisi,  
Perinatal enfeksiyonlar,  
Alkol ve narkotik ilaç alışkanlığı,  
Annenin Magnezyum veya antikonvülzan ilaç kullanması.

### **Plasentayla İlgili Nedenler**

Kalsifikasyon  
Anormal yerleşim  
Gelişim bozuklukları,  
İnflamatuvar değişiklikler,  
Ödem veya infarkt olması.

### **Göbek Kordonuyla İlgili Nedenler**

Kısa kordon,  
Kordon sarkması,  
Kordon dolanması.

### **Fetüsle İlgili Nedenler**

Çoğul gebelikler,  
Zamanından önce doğum, zamanından sonra doğum,  
Fetal anomaliler (hidrosefali gibi),  
Anemi (hidrops, eritroblastozis fetalis vb.),  
Fetal enfeksiyonlar,  
İri fetus,  
İntrauterin gelişme geriliği.

### **Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Patofizyoloji**

Fetal hipoksi ağır ise dakikalar içinde bradikardi, hipotansiyon, kalp fonksiyonlarında bozulma, metabolik ve solunumsal asidoz ortaya çıkabilir. Henüz olgunlaşmamış beyin yavaş gelişen hipoksiye olgunlaşmış beyinden daha dirençlidir<sup>4,5</sup>. Hücresel ölüme neden olan olaylar zinciri, hipoksi ve iskemi sona erdikten sonraki reperfüzyon döneminde başlamaktadır. Hipoksinin başladığı andan itibaren birkaç saat sonra gelişen ve ağır hasarlara neden olan reperfüzyon dönemi henüz başlamadan yapılacak olan müdahaleler ve tedavi ile hipoksik-iskemik hasarın önlenebileceği veya azaltılabileceği ileri sürülmektedir<sup>5,7</sup>.

HİBH' de hücre ölümü nekroz, apoptozis veya her iki mekanizmayla olabilmektedir<sup>7</sup>. Nekrotik hücre ölümü hücrede şişme, zar bütünlüğünün bozulması, hücrenin parçalanması, hücre içeriğinin salınması ve bunun sonucu olarak inflamasyon ve fagositoz ile karakterizedir. Apoptotik hücre ölümü ise kromatinin yoğunlaşması, hücrenin büzülmesi ve inflamasyon olmadan oluşan ölümdür.

HİBH olup da hayatlarını devam ettirenlerde paralizi, öğrenme bozuklukları, serebral palsi ve epilepsi gibi ömür boyu yaşamı etkileyecek bilişsel, duyuşsal veya motor bozukluklar gelişebilir. Otopsi çalışmalarına ek olarak değişik yaşı gruplarında manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ile yapılan çalışmalar, gelişmekte olan beyinde seçilmiş bölgelerde hasar geliştiğini göstermektedir<sup>26</sup>. Hücre ve dokuların farklılaştığı dönemlerde hipoksik iskemik durumun oluşması beyinin olgunlaşmasını ciddi olarak etkilemektedir.

HİBH gelişmesinde rol oynayan gerçek mekanizmalar tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. Gebeliğin erken döneminde meydana gelen hipoksi ve iskemi beyaz cevher üzerinde zararlı etkilere sahiptir. Bunun aksine; olgunlaşmamış bazal ganglionlar ve motor korteks geç dönemde hasar görmektedir<sup>1,5</sup>. Örneğin gebeliğin erken döneminde gelişmekte olan beyaz cevherin hasar görmesi, spastik tip felçle sonuçlanabilmektedir<sup>5</sup>. Ayrıca yenidoğan döneminde gelişen hipoksi ve iskemilerin çoğunda, beyinin tamamından çok, belirli bölgeleri hasar görmektedir. Değişik düzeylerde hasar oluşmasının nedeni, gelişmekte olan nöronlar arası bağlantılar ve eksitator glutamat reseptörleri olabilir. İnsanlardaki kompleks parsiyel nöbetlerle olan temporal lob epilepsisinin temel özelliklerinden biri hilar, CA1 ve CA3 bölgelerindeki nöronların ölümü sonucunda gelişen hipokampal lezyonlardır. Benzer şekilde sıçanlardaki hipoksik iskemik modelde nöronal ölüm sıklıkla CA3 bölgesi olmak üzere, granül hücre tabakası, CA1 ve hilus bölgesinde gözlenmektedir. Bu bulgular gelişmenin hangi evresinde hipoksik iskemik hasar olursa; nöronal kaybın da buna bağlı olarak değişıceğini göstermektedir<sup>27</sup>.

Son yıllarda yapılan MRG çalışmaları, ciddi ya da tama yakın asfiksi sonrasında putamen, talamus ve serebral kortekste simetrik hasar geliştiğini göstermiştir<sup>26</sup>. Beyinin bu bölgeleri eksitator glutamaterjik giriş için hedef bölgelerdir. Hem deneysel hem de klinik çalışmalar beyinin belirli bölgelerindeki eksitator nöron disfonksiyonlarının seçici nöronal ölüme neden olduğunu göstermektedir. Perinatal dönemde beyinde hipoksik iskemiyeye bağlı olarak belirli nöronal yapıların hasar görmesi, gelişmekte olan nöronal ağdaki eksitator sinapsların özellikleriyle ilişkilidir. Hipoksik iskemik hasarların başlangıç fazında sistemik ve serebrovasküler faktörler de önemli bir rol oynamasına rağmen; son zamanlarda yapılan çalışmalar beyin hasarının hücreşel ve moleküler yönünü de ortaya koymaktadır<sup>5</sup>.

## **Perinatal İskemi ve Hipoksemi**

Fetal yaşamda normalde arteriyel kısmi oksijen basıncı düşük olduğu için hipoksik iskemik olayların birincil nedeni perfüzyon azlığıdır. Ancak yine de ciddi hipoksemi varlığında miyokardiyal fonksiyon bozukluğu meydana gelebilir ve hipoperfüzyona neden olarak, serebrovasküler otonöregülasyonu bozulabilir. Hipoperfüzyonun sonucunda da nöronal iskemi oluşur.

**Prenatal Hipoksemi:** İntrauterin hipoksemi genellikle plasental yetersizliğe bağlıdır. Bu bebeklerde doğum sonrasında ciddi solunum ve kalp yetmezliği gelişebilir. Diğer taraftan doğumdan sonra gelişen hipoksemimin nedeni solunum ya da kalp yetmezliği veya her ikisinin de beraber olmasıdır. Perinatal hipoksemi, yenidoğanda zaten çok hassas olan serebrovasküler otonöregülasyonu bozabilir. Bu durum ciddi sürfaktan yetmezliği sendromlarının nedeni periventriküler lökomalazi gibi nöronal hasarlarla birlikte geliştiğini açıklar.

**Perinatal İskemi:** Hücre seviyesinde anaerobik metabolizma ve zar geçirgenliği değişiklikleri sonucunda dokularda ve kanda laktik asit konsantrasyonları hızla artar. Potasyum hücreden kana geçer ve hiperpotasemi oluşur. Doku ve kanda laktik asit birikimi sonucu metabolik asidoz gelişir, solunum desteği sağlanmaz ise hiperkarbi ve hipoksi belirginleşir. Asfiksinin başlangıcında kan pH'sı 7.3 iken 10. dakikada 6.8' e kadar düşer.  $PCO_2$  45 mmHg' dan 150 mmHg' ya kadar yükselir.  $PO_2$  25 mmHg' dan 0' a kadar düşer. Organizma özellikle beyin hasarını önlemek için kalp debisini artırır. Eğer asfiksi devam ederse beyin damarlarındaki otonöregülasyonun bozulması ile serebral perfüzyon basıncı sabit tutulamaz. Serebral arteriyoller sistemde vazodilatasyon oluşamaz ve beyin kan akımında önemli bir azalma görülür. Asfiksi devam ettiği takdirde, kalp atımları giderek azalır ve hipotansiyon gelişir, bu durum böbrek ve miyokard beslenmesini negatif yönde etkiler. Sonuçta bir yanda renal kortikal nekroz gelişirken diğer yandan da kardiyojenik şok gelişir. Ayrıca diğer organ ve sistemlerde de hasarlar oluşarak çoklu organ yetmezliği gelişir. Geri dönüşümsüz olarak kabul edilen bu dönemde hastalar genelde kaybedilir.

**Pasif Basıncılı Beyin Dolaşımı:** Yenidoğan döneminde beyin dolaşımının otonöregülasyonu zayıftır. Hipoksemi ve hiperkarbi, zaten zayıf olan bu sisteme daha çok zarar verir ve beyin dolaşımı pasif basınçlı duruma geçer. Olgunlaşmamış beyin arterlerinin hipotansif ataklara karşı sınırlı bir uyum yeteneği vardır. Yenidoğan

döneminde sulkusların derin kısımları daha az perfüze olmakta ve bu bölgeler hipotansif durumlardan fazla etkilenmektedir.

### **Hipoksi ve İskemiye Takiben Gelişen Nörotoksik Olaylar**

Beyin kan akımı ve perfüzyonunu inceleyen laboratuvar çalışmalarının çoğu, fetüs ve yenidoğanlardaki hipoksik hasarların hemen hepsinde hipoksi ve iskeminin birlikte olduğunu göstermektedir<sup>28</sup>. Genel olarak hipoksik iskemik ensefalopati sendromu; saatler ve günler içerisinde oluşan biyokimyasal ve moleküler olaylar zincirini ifade etmektedir. HİBH' nin tedavi edilebilmesi için; gelişmekte olan beyinde meydana gelen hipoksik iskeminin sebep olduğu nöronal hücre ölümünün yani nörotoksik mekanizmalarının bilinmesi gerekmektedir. Bu mekanizmaları araştırmak için hayvanlarda perinatal dönemde HİBH modeli oluşturularak, çeşitli çalışmalar yapılmaktadır.

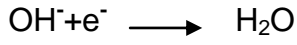
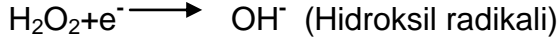
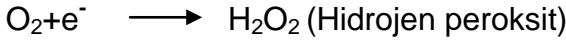
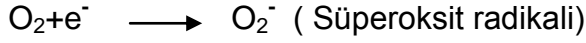
Çalışmalar hipoksi ve iskeminin; enerji yetmezliği, membran depolarizasyonu, beyin ödemi, nörotransmitter salınımının artışı ve geri alınımının inhibisyonu, hücre içi kalsiyum artışı, serbest oksijen radikallerinin artışı ve lipid peroksidasyonunun artışı gibi moleküler ve biyokimyasal olaylar zincirini başlattığını göstermektedir<sup>1,2,5,6</sup>. Bütün bu moleküler ve biyokimyasal olaylar nöronal hasar ve hücre ölümüne neden olmaktadır. Yenidoğan döneminde oluşan ve karmaşık moleküler olayların neden olduğu bu hasarın arkasında yatan gerçek mekanizmaları anlamak, HİBH sonucunda uzun dönemde ortaya çıkabilecek epilepsi ve serebral palsy gibi nörolojik bozuklukların önlenmesi veya tedavi edilebilmesi için gereklidir.

### **Enerji yetersizliği**

Nöronların enerji ihtiyacı birincil olarak ATP yoluyla sağlanır. ATP üretimi büyük çoğunlukla mitokondiriler içinde ve oksidatif fosforilasyonla oluşur. Dokudaki oksijen belirli bir düzeyin altına indiğinde oksidatif fosforilasyonla oluşan ATP üretimi durur. Bu da hücre içindeki enerji tüketen olayların ve iyon pompasının durmasına neden olarak hücre ölümüne neden olur. Anaerobik glikolizin artmasıyla laktat düzeyinin artması ve pH'ın düşmesi nöronal hasarın oluşumuna katkıda bulunur.

### **Serbest Radikal Hasarı**

Hasara uğramış sinir sisteminde, hasardan sonraki birkaç dakikadan saatlere kadar olan dönemde birçok sebepten dolayı superoksit radikali oluşur<sup>6</sup>. Normalde serbest oksijen, elektron transport zinciri içinde direkt olarak suya dönüştürülür. Ancak bazen bu dönüşüm kademe kademe olmaktadır. İşte bu kademeler sırasında oksijen radikalleri ortaya çıkmaktadır.



En zararlı radikal  $\text{OH}^-$  radikalidir.

Vücutta aşırı miktarda serbest radikallerin oluşumunu engelleyen ya da oluşmuş olan serbest radikalleri yok etme işlevine sahip birçok antioksidan mekanizma mevcuttur. Bunlar arasında süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz gibi reaktif oksijen radikallerini daha az toksik ürünlere dönüştüren antioksidan enzim sistemleri,  $\alpha$ -tokoferol, askorbat, ürik asit, glutatyon, betakaroten gibi serbest radikal nötralizatörleri ve Haber-Weiss reaksiyonunu katalize eden demir ve bakır bağlayan ferritin, transferin, serüloplazmin gibi reaktif oksijen radikallerinin oluşumunu ve yayılmasını engelleyen bileşikler, ayrıca mitokondride oluşan radikalleri suya indirgeyen sitokrom oksidaz gibi antioksidan sistemler sayılabilir<sup>6</sup>.

Hücresinin maruz kaldığı iskemi ve bunu takip eden reperfüzyon döneminde oluşan serbest oksijen radikali artışı karşısında, endojen antioksidanlar, serbest oksijen radikal temizleyicileri ve peroksidazlar yetersiz kalmaktadır. Beyin çoklu doymamış fosfolipidler açısından zengin olduğundan serbest radikallere karşı oldukça duyarlıdır<sup>1,2,6</sup>. Yüksek oranda çoklu doymamış yağ asitleri içeren hücre zarının yıkılması, serbest radikallere bağlı nöronal hasar oluşmasının en önemli aşamasıdır. Serbest yağ asitlerinin serbest radikal ile oksidasyonu "lipid peroksidasyonu" olarak adlandırılır. Hücre zarında meydana gelen lipid peroksidasyonu membran lipoproteinlerinin oksidasyonu ve yapısal bütünlüğün bozulmasına yol açarak, anormal iyon girişiyle birlikte hücre ölümüne neden olur. Ayrıca oluşan lipid peroksidasyonu ile birlikte mikrovasküler endotel hasarı oluşarak kan beyin bariyerinin bozulduğu deneysel çalışmalarda gösterilmiştir<sup>5,6</sup>. Yenidoğan beyinde antioksidanların eksik olması hasarın daha da ağır olmasına neden olur.

### **Hipoksik İskemik Beyin Hasarı ve Eksitotoksisite**

Nöronların hipoksik iskemik hasarından sorumlu olaylara genel olarak eksitotoksisite denmiştir<sup>29</sup>. Bu terim ekstrasellüler eksitator amino asit reseptörlerinin aşırı uyarılması sonucunda hücrelerin ölmesini ifade etmektedir.

Hipoksi ve iskemi sırasında sinaptik aralığa yoğun bir biçimde eksitator nörotransmitterler (özellikle glutamat gibi aminoasitler) salınmaktadır<sup>1,5,29</sup>. Düşük enerjili durumdaki nöronal hasarda bu eksitotoksinler çok önemli rollere sahiptir.

Sinaptik aktivitenin hücre ölümü için gerekli olması, spesifik glutamat antagonistlerinin hipoksik hücre ölümünü engellemesi, glutamatın ortaya çıkışının hipoksik hücre ölümünü taklit etmesi, hipoksidede ekstrasellüler bölgede glutamatın yoğunlaşması (artmış salınım ve azalmış geri alım nedeniyle) ve hipoksiden ölen hücrelerin topografik dağılımının glutamat sinapslarıyla uyumlu olması, iskemik hücre ölümünün eksitotoksinlerle yakın ilişkili olduğunu göstermektedir<sup>29</sup>.

Beyinde eksitator sinaptik geçişin hemen hemen çoğu glutamat ile olmaktadır<sup>29,30</sup>. Yapılan çalışmalar glutamat reseptörlerinin aracı olduğu eksitotoksitenin nöronal hücre ölümünde anahtar rol oynadığını ve bunun gelişmekte olan beyinde erişkin beynine nazaran daha kritik bir önem taşıdığını göstermektedir<sup>29</sup>.

Glutamat merkezi sinir sisteminin en önemli eksitator nörotransmitteridir. Spesifik membran reseptörleri ile etkileşerek duysal bilgilerin iletilmesi, motor aktivite, spinal reflekslerin düzenlenmesi, hafıza ve öğrenme gibi birçok fonksiyonda önemli rol oynar<sup>30</sup>.

Eksitotoksinler tarafından tetiklenen hücre ölümü; akut nöronal şişmeye öncülük eden sodyum ve klorun ve daha sonra gecikmiş hasara neden olan kalsiyumun hücre içine girmesini sağlayan spesifik reseptörler tarafından yönetilir. Glutamat reseptör aktivasyonu erken evrede intrasellüler sodyumun artışına, bu ise sitotoksik ödem, hücre içi asidoz ve parçalanma yol açar. Sodyum-potasyum ATP'az mekanizmasındaki yetmezlik ise sodyum ve suyun hücre içi birikimini artırır. Bir sonraki aşamada kalsiyumun hücre içine akımı artar, bu ise kalsiyum bağımlı proteaz ve lipazların aktivasyonuna yol açarak hücre zarının ve nöroflamanların hasarına neden olur.

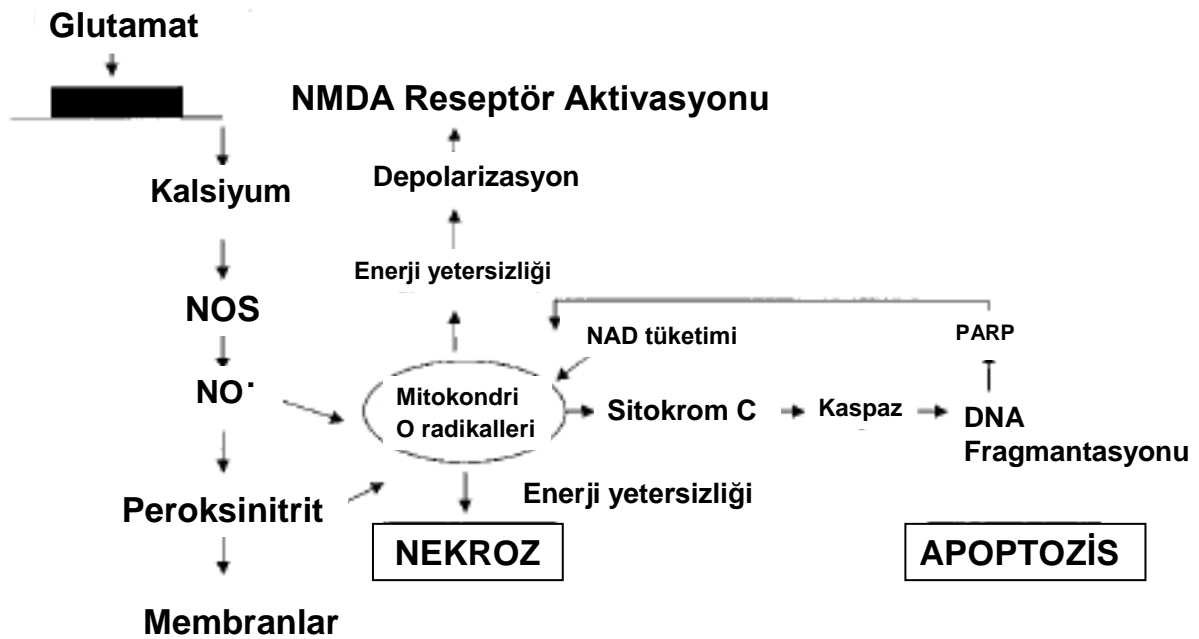
Glutamat farklı farmakolojik ve elektrofizyolojik özelliklere sahip bir grup reseptörler aracılığı ile aktivasyon gösterir<sup>1,5</sup>. NMDA,  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propiyonat (AMPA) ve kainat reseptörleri ligand kapılı iyon kanalları içerdiğinden "iyonotropik" olarak adlandırılırlar. Diğer bir grup ise transmembran proteinlere bağlı ikincil haberci sistemi üzerinden etkili "metabotropik" reseptörlerdir.

**Metabotropik Reseptörler:** Aktive edildiklerinde fosfolipaz C' yi aktif hale getirerek hücre içinde bağlı bulunan kalsiyumun serbest hale geçmesini sağlarlar. G proteini ile ikincil haberci sistemi üzerinden de etkilidirler. Hem glutaminerjik, hem de glutaminerjik olmayan sinapslarda iletiyi yönlendirirler.

**İyonotropik Reseptörler:** Ligand kapılı iyon kanallarıdır. NMDA reseptörleri, AMPA reseptörleri ve kainat reseptörleri bu grup içerisinde yer alır. AMPA ve kainat reseptörleri arasında ayırım bazı durumlarda net olmadığı için bu iki reseptör tipine AMPA/KA veya non-NMDA adı verilmektedir. NMDA reseptörleri fizyolojik koşullarda ağırlıklı olarak öğrenme ve bellek fonksiyonunda rol alırken, non-NMDA reseptörleri yaygın olarak hızlı eksitator sinapslarda bulunurlar. AMPA/KA reseptörleri ve NMDA reseptörlerinin genetik özellikleri de birbirinden farklıdır.

### N-Metil D –Aspartat (NMDA) Reseptörleri

Glutamat bağlanması sonrasında sodyum ve kalsiyumun hücre içine girişine, potasyumun ise hücre dışına çıkışına neden olurlar. Bu grup reseptörler magnezyum ile bloke edilirler. NMDA reseptörünün özelliği, hem voltaj hem de ligand kapılı olmasıdır. NMDA reseptörleri tarafından oluşturulan eksitotoksistide, nöronal ölümü şiddetlendiren reaktif moleküllerin oluşması sonucu meydana gelen birtakım olaylar kaskadının başlaması söz konusudur (Şekil 1).



**Şekil 1. Hipoksik İskemik Beyin Hasarında NMDA Reseptör Aktivasyonu.**

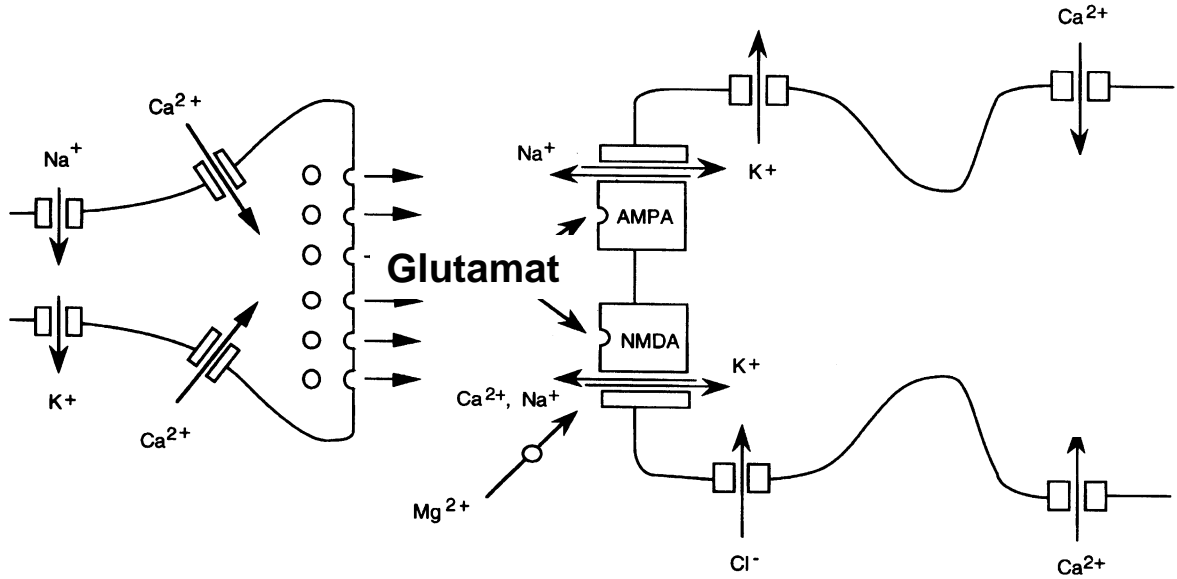
NMDA reseptör aracılığı ile kalsiyum düzeyinin yükselmesi sonucu, serbest radikal oluşumu, mitokondriyal hasar, kalsiyuma bağımlı enzim düzeyindeki patolojik yükselmeler ve gen ekspresyon değişiklikleri gibi mekanizmalarla hücresel hasar şiddetlenmektedir<sup>1,5</sup>. Sitolitik kalsiyum konsantrasyonundaki artış birçok doku tipinde hücre ölümünün son ortak yolu olarak görünmektedir.



2-Amino-fosfonohepnoik asit, 2-amino fosfovalerik asit ve kinürek asit gibi seçici ve seçici olmayan NMDA reseptör antagonisti moleküller geliştirilmiştir. Ancak bunların kan-beyin bariyerini geçememeleri ve koruyucu etkilerinin sıklıkla direkt santral sinir sistemine uygulanma gerekliliği nedeniyle kullanımları geniş yer bulamamıştır. Glutamat ile yarışan NMDA antagonistleri, reseptörün glutamatı tanıyan bölgesine bağlanarak inhibisyonuna neden olurlar. Glutamat ile yarışmayan antagonistler ise NMDA ile ilişkili iyon kanallarına bağlanarak reseptörü inhibe ederler. MK 801 (Dizocilpine), glutamat ile yarışa girmeyen seçici NMDA blokörüdür<sup>31</sup>. Sistemik olarak uygulanabilir olması ve omurilik hasarı sonrası eksitotoksik hasarı engellemesi nedeniyle önem kazanmıştır.

### **$\alpha$ -Amino-3-Hidroksi-5-Metil İzoksazol Propiyonat (AMPA) Reseptörleri**

Voltaj bağımsız olarak çalışırlar ve aktivasyonu sonucunda sodyum hücre içersine girer, potasyum ise hücre dışına çıkar (Şekil 2). Quisqualat reseptörleri olarak da bilinirler. AMPA reseptör aktivasyonu ile erken dönemde, hücre içi sodyum birikerek sitotoksik ödem ve hücre içi asidoz oluşur.



**Şekil 2. AMPA Reseptör Aktivasyonu.**

### **Kainat Reseptörleri**

AMPA reseptörleri ile iyi ayırt edilemediğinden AMPA/KA veya non-NMDA olarak adlandırılırlar. NMDA reseptörlerinin spinal kordda eksitator nörotransmisyonunda yönetici özelliği olduğu düşünülmektedir. Normalde yüksek hücre dışı kalsiyuma karşı hücre içi kalsiyumu düşük tutan mekanizmalar hücre zarında

mevcuttur. Hipoksi-iskemi sırasında bu mekanizmalar işlemez hale gelir, hücre içine kalsiyum geçişi artarken hücre dışına çıkışı azalır. Hücre içinde aşırı kalsiyum birikimi sonucunda; serbest yağ asitlerinin salınımı, fosfolipaz A<sub>2</sub> aktivasyonu, kalsiyum bağımlı adenozin 5' trifosfataz aktivasyonuna bağlı enerji depolarının tükenmesi, toksik eikozonoid sentezi, serbest radikal oluşumu, hücre iskeletinin mikrotübüler ve nöroflaman bölümlerinde değişiklikler, mitokondriyel oksidatif fosforilasyonun bozulması, aksonal dejenerasyon, proteaz, fosfotaz, endonüklaz gibi litik enzimlerin aktivasyonu meydana gelir<sup>5</sup>. Özellikle kalsiyum iyonunun nükleazı uyarması ile DNA (deoksiribonükleik asit) yapısı bozularak apoptozis meydana gelir.

Yine 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. Magnezyum iyonu ayrıca NMDA reseptör blokajı ile nörotoksisitede koruyucu rol oynadığından, seviyesindeki azalma nöronal hasarın şiddetlenmesine yol açmaktadır. Bunlara ek olarak, magnezyumun düşüşü hücre içi kalsiyum aktivasyonunun şiddetlenmesine neden olarak, ikincil hasarın büyümesine yol açar.

Akut enerji yoksunluğu hücre dışı glutamatın aşırı salınımına ve iyonotropik glutamat reseptörleri olan NMDA, AMPA ve kainat reseptörlerinin kontrolsüz aktivasyonuna neden olmaktadır<sup>29,30</sup>. Bu durumda enerji bağımlı glutamat geri alımı engellenmekte ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artmaktadır.

Hipoksik iskemik hasara neden olan glutamat sinaptik disfonksiyonunun diğer önemli bileşeni, voltaja duyarlı kanalların açılmasına ikincil olarak postsinaptik nöronal membran depolarizasyonudur. Sinaptik glutamat konsantrasyonunun artışıyla gelişen membran depolarizasyonu, kanalların en fazla düzeyde açılmasına ve nöron içerisine kalsiyum ve sodyum girişine neden olmaktadır.

Deneysel çalışmalar hipoksi ve iskemi sonucunda mitokondrinin fonksiyonunu kaybederek beyin hücrelerinin ölümüne neden olduğunu göstermektedir<sup>32</sup>. Kemirgenlerde NMDA reseptör blokajı yapılarak hipoksi ve iskemiye bağlı mitokondriyal disfonksiyon önlenabilmektedir. Ayrıca NMDA reseptör kanallarından kalsiyum geçişi mitokondrilerin kontrolü altında olup, hipoksi ve iskemide bu geçiş tersine dönmektedir. NMDA kanallarının aşırı aktivasyonu, nöronlara kalsiyum girişi, nitrik oksit (NO) artışı ve mitokondriyal disfonksiyon ölüm ile bağlantılı olaylardır<sup>6</sup>.

## **Nitrik Oksit Toksisitesi**

Yeniden oksijenlenme ve yeniden perfüzyon ile oluşan serbest radikallerin etkisi ile nöronlardan serbestleşen glutamat (hızlı uyarıcı nörotransmitter-eksitator nörotransmitter)'in etkisi ile kalsiyumun hücre içerisine girişi uyarılır. Glutamat postsinaptik iyon kanallarındaki NMDA reseptörleri üzerinden etki eder. NMDA reseptörlerinin aktivasyonu nöronal NO sentetaz (NOS) ile NO yapımına yol açar<sup>6</sup>. NO siklik GMP oluşumunu bozarak hasara neden olur. NO membranlardan geçerek glutamat salınımının uyarılmasına da yol açar. NO ayrıca moleküler oksijen ile reaksiyona girerek DNA hasarı ve membran lipid oksidasyonuna yol açan süperoksit, peroksit ve peroksinitrit serbest radikallerini oluşturur<sup>6</sup>. Bunlar apoptozisin potansiyel indükleyicisidirler. NO' nun deneysel çalışmalarda fokal serebral iskemiye yol açtığı ve bu hasarın NOS inhibitörleri verilerek önlenebileceği gösterilmiştir<sup>33</sup>. Vasküler endotelial NOS tarafından üretilen NO' nun ise nöronal etkilerinin aksine vasküler yapı üzerinde faydalı etkileri vardır. Bunlar vazodilatasyon, nötrofil ve trombosit agregasyonunun inhibisyonudur.

## **Nörotrofik Faktörler ve Hücrede Hasar/Ölüme Karşı Nöroprotektif Etki**

Nörotrofik faktörlerin yaşamı devam ettirici olası etkilerinin keşfiyle birlikte, bu faktörlerin merkezi sinir sistemi hastalıklarında kullanılabileceği fikri gündeme gelmiştir. Hücreleri ve özellikle de nöronları eksitotoksite ve hipoksik iskemik hasardan korumak için hücre dışı ligand-reseptör etkileşimiyle hücre içi sinyallerin aktivasyonları gerekmektedir. Merkezi sinir sisteminde bu sinyallerin bir kısmı NGF (neurotrophic growth factor; nörotrofik büyüme faktörü), FGF (fibroblast growth factor; fibroblast büyüme faktörü), NT-3 (neurotrophin-3; nörotrofin-3), IGF (insulin like growth factor; insülin benzeri büyüme faktörü), CNTF (ciliary neurotrophic factor; siliyer nörotrofik faktör) ve BDNF (brain derived neurotrophic factor; beyin kaynaklı nörotrofik faktör) ile sağlanmaktadır<sup>34</sup>. Bu büyüme faktörleri büyüme, farklılaşma, olgunlaşma, onarım ve nöronal yaşamı destekleme fonksiyonlarını yerine getirirken; hasar sonrasında nöroprotektif aktivite gösterirler. Büyüme faktörlerinin tedavi edici etkileri araştırılırken, hangi hastalıkta ve hangi nöronların disfonksiyon ve ölümden korunduğu incelenmektedir. Örneğin BDNF ve onun protein reseptörü tirozin kinaz B birçok nörondan salınmaktadır ve neonatal hipoksi ve iskemide doku hasarını önleyebileceği gösterilmiştir<sup>35</sup>. Ayrıca NGF' nin yedi günlük sıçanlardaki hipoksi ve iskemide nöroprotektif etkisi olduğu ve bunu apoptozisi inhibe ederek yaptığı bildirilmiştir<sup>36</sup>. Fetüs kuzularında da IGF' nin hipoksi ve iskemide nöron hasarını

inhibe ettiği gösterilmiştir<sup>37</sup>. Bununla beraber FGF ailesinin neonatal beyinde nöroprotektif etkisi olduğu bilinmekte fakat hasar sonrası nasıl etki ettiği bilinmemektedir<sup>38</sup>.

### **İkincil Haberci Sinyal Yolakları ve Nöronal Yaşam**

Merkezi sinir sistemi nöronlarının yaşamı, özellikle hücre içi sinyal yolaklarının büyüme faktörleri tarafından uyarılmasıyla etkilenmektedir. Büyüme ve nörotropik faktörlerin oluşturduğu nöron koruyucu etki, hücre içindeki değişik ikincil haberci sinyal yolaklarıyla oluşmaktadır<sup>39</sup>. Bunların araştırılması, yenidoğan beyninin hipoksik iskemik hasardan korunması için yapılan tedavi arayışları açısından önem taşımaktadır. Gelişmekte olan beyindeki hipoksik iskemik hasarın tedavisi ve bunun sonucunda çocuklarda HİBH sonucu gelişebilecek nörolojik bozuklukların önlenmesiyle ilgili çalışmaların sonuçları, gelecekte bu hasarın önlenebileceği yönünde umut vericidir.

Neonatal dönemde orta düzeyde ensefalopati gelişenlerin %30' undan fazlasında normal gelişim olduğu için, bunların hangisinin daha fazla hasara maruz kalacağını önceden belirlemek oldukça güçtür. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar olgunlaşmamış beyinin tedaviye yanıtının olgunlaşmış beyinden farklı olduğunu göstermektedir<sup>1,5,6</sup>. Erişkin beyinlerinde başarıyla sonuçlanan tedavi biçimleri, yenidoğanlarda daha kötü sonuçlar verebilir. Bunun olası nedeni, yenidoğanlardaki hücre ölümünün apoptotik yolla olmasıdır. Olgunlaşmamış hayvan modellerinde eksitotoksisite ve HİBH' ye karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilen maddelerin çoğu apoptozisi inhibe etmektedir. Günümüzde klinik olarak nöroprotektif amaçlı uygulanan hipoterminin, eksitotoksisiteyi azaltma ya da yavaşlatmasının temel mekanizmasının apoptozis üzerinden olduğu düşünülmektedir<sup>12</sup>.

Olgunlaşmamış beyinde hipoksik iskemik hasarın başlaması ve devam etmesiyle ilgili temel mekanizmaların anlaşılabilmesi için ileri çalışmalara gereksinim olacaktır. Bu mekanizmaların anlaşılması, hedefe yönelik tedavi biçimlerinin geliştirilmesine olanak verecektir.

Özetle, aktiviteye bağımlı gelişim nedeniyle yenidoğan beyni erişkin beynine nazaran elektriksel uyarılara ve eksitotoksisiteye daha fazla duyarlıdır. Hipoksi ve iskemi sonucunda glutamat ve diğer eksitatör aminoasitlerin etkisiyle nöronal membranlarda depolarizasyon oluşmakta ve eksitatör uyarılar hızlı bir şekilde oluşmaktadır<sup>29,30</sup>. Özellikle bu dönemde nöronlar eksitatör travmadan daha fazla zarar görmektedir. Olgunlaşmamış hayvan modellerinde hipoksi ve iskemi

sonucunda nöronlardaki eksitator glutamat reseptörleri aşırı uyarılarak; kalsiyum girişi, NO üretimi, mitokondriyal bozulma ve nekroz ya da apoptozisle hücre ölümüne neden olmaktadır. Yenidoğanın beynindeki hipoksi ve iskeminin erken döneminde glutamatla ilişkili olaylar NMDA ve AMPA reseptörleriyle başlatılırken; daha sonra eksitator uyarılar kendiliğinden ilerlemekte ve nöronal hasara yol açmaktadır.

Yenidoğanın beyninde hipoksi ve iskemiye bağlı gelişen hasarın temel mekanizması apoptozisin aktivasyonudur<sup>7</sup>. Başarılı bir nöron koruyucu yöntem bulmak için bu mekanizmaların aydınlatılması gerekmektedir. Son zamanlarda büyüme faktörleri ve kaspaz inhibitörleriyle yapılan çalışmalar nöron korumada etkili sonuçlar vermiştir<sup>5,6</sup>. Yenidoğanın beynindeki hasarın temel moleküler mekanizmalarının bilinmesi ve gelişimsel biyolojideki yeniliklerle birleştirilmesi; bireyi ömür boyu etkileyecek serebral palsy, epilepsi ve davranış/öğrenme bozuklukları gibi olayların önlenmesinde yardımcı olacaktır.

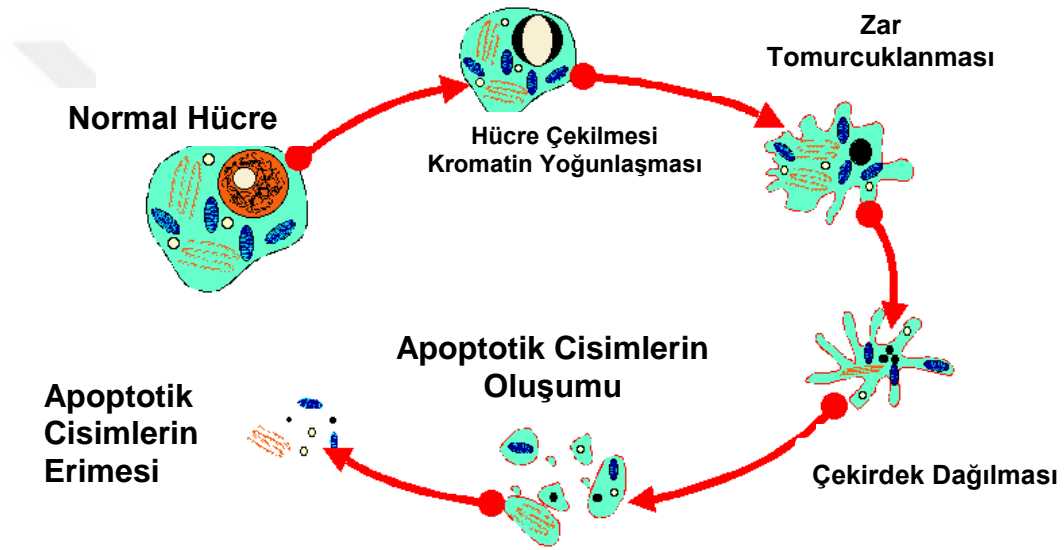
### **Hipoksik İskemik Hücre Ölümünde Temel Bir Mekanizma: Apoptozis**

Bütün nöronlar yaşamları boyunca aksonal yollar ve sinaptik bağlantılar düzeyinde fizyolojik fonksiyonlarını yerine getirebilmek için; başlangıç, farklılaşma, çoğalma, göç ve olgunlaşma evrelerinden geçerler<sup>1</sup>. Sinir sisteminin gelişimi sırasında uyum amacıyla değişik nöron tiplerinde (motor, sensoryal, otonom gibi) kayıp gözlenir. Özellikle oligodendrositlerde büyük oranda hücre ölümü gözlenir. Bu olay, canlılığını sürdüren nöronları uyaran hedef hücrelerden salınan özel nörotrofik faktörlerle (NGF, BDNF, NT-3/4/5 gibi) açıklanmaktadır. Ayrıca nöronların gelişebilmesi için kendilerini innerve eden nöronların sinyallerine, spesifik hormonlara ya da sinyal verecek komşu glial hücrelere gereksinim vardır. Bütün bu karmaşık yapılar, nöronların gelişmesinde rol oynamakta ve bunlardaki düzensizlikler hücre ölümüyle sonuçlanmaktadır.

Erken dönemde hipoksi ve iskemiye bağlı hücre ölümü nekrozla oluşur (birincil hasar). Geç dönemde ise nöronal ölüm; saatler ve günler içerisinde apoptozisle sonuçlanan bir dizi karmaşık biyokimyasal ve moleküler olaylar sonunda meydana gelir (ikincil hasar). Yapılan çalışmalar yenidoğan döneminde gelişen hipoksik iskemik beyin hasarında apoptozisin nekrozdan daha önemli olduğunu göstermektedir<sup>7,40</sup>. Apoptozis, erişkin dönemde gerekli olmayacak birçok nöronun hücre bağlantı ve yollarını gelişme dönemindeyken tekrar düzenleyen bir mekanizmadır.

### Apoptozisin Tanımı

Yaşamakta olan hücreler iki farklı mekanizma ile ölürlür. Bu mekanizmalar nekroz ve apoptozistir (Şekil 3). Nekroz; hipoksi, aşırı ısı değişiklikleri, toksinler gibi hücre dışından gelen çeşitli fiziksel veya kimyasal etkenler sonucunda gelişen travmatik hücre ölümüdür. Apoptozis ise yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin, organizma için güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür.

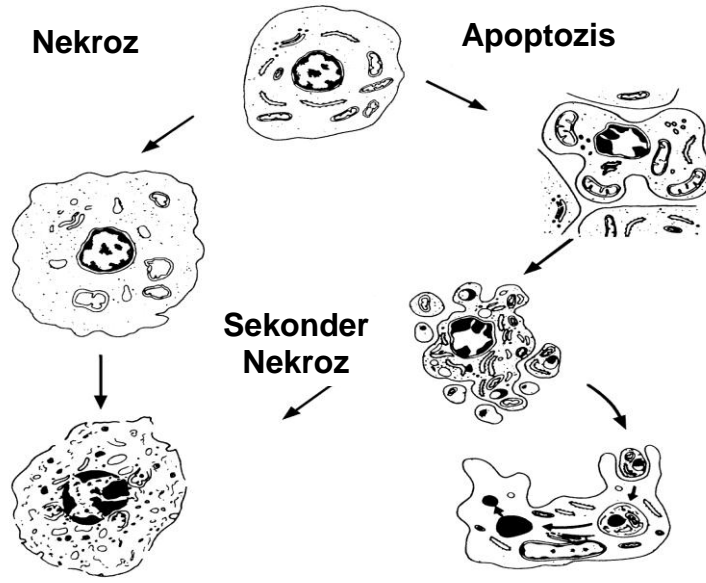


Şekil 3. Apoptozisle Hücre Ölümü.

İlk olarak Kerr ve arkadaşları, apoptozisi, hücrede büzülme, hücre zarında kabarcıklar oluşması, kromatin yoğunlaşması ve DNA parçalanmasıyla kendini gösteren hücre ölümü olarak tanımlamıştır<sup>41</sup>. Bu ölüm; toksisite, travma ve iskemide gözlenen organel şişmesi ve hücre zarının yırtılmasıyla seyreden nekrozdan farklıdır.

Nekroz patolojik bir olaydır. Apoptozis ise fizyolojik veya patolojik uyarılarla oluşabilir. Apoptozis klasik hücre ölüm şekli olarak bilinen nekrozisden birçok özelliğiyle farklı olan bir hücre ölüm mekanizmasıdır (Şekil 4).

Apoptozis ve nekrozda gözlenen morfolojik değişiklikler Tablo 1' de özetlenmiştir.



**Şekil 4. Nekroz ve Apoptozisteki Morfolojik Değişiklikler.**

**Tablo 1. Apoptozis ve Nekrozdaki Özelliklerin Karşılaştırılması.**

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

Agar jel elektroforeziyle yapılan çalışmalar, apoptozda endonükleazların aktive olarak DNA kırıklarına neden olduğunu göstermiştir<sup>40</sup>. Böylece apoptotik hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtı elde edilmiştir. Bu tarihten sonra apoptoz ile ilgili çalışmalar hızlı bir şekilde artmıştır.

### **Apoptozisin Organizmada Görüldüğü Durumlar**

- Embriyogenez ve fetogenez döneminde,
- Sinir sisteminin ve immün sistemin gelişiminde,
- İntrauterin gelişim sırasında el ve ayak parmaklarının aralarının açılmasında,
- Embriyonal böbrek taslaklarının dejenerasyonunda,
- Embriyonun maternal desidua tarafından reddinin engellenmesinde,
- Erişkinlerde hormon yetmezliğine bağlı olarak gelişen organ gerilemelerinde,
  - Mensturasyonda endometrial hücre yıkımı,
  - Menapozda ovaryum folliküllerinin atrezisi,
  - Laktasyon sonrasında meme bezi gerilemesi,
- Proliferasiyona uğrayan hücre topluluklarında (örneğin: barsak kript epiteli),
- Tümörlerde, özellikle regresyona gittikleri dönemlerde,
- Pankreas, parotis ve böbrek gibi organlarda kanal obstrüksiyonlarına bağlı olarak gelişen atrofilerde ,
- Timusun gerilemesinde,
- Hücrel immun red ve graft versus host reaksiyonlarında
- Çeşitli viral hastalıklarda; Örneğin: Viral hepatitte,
- Hücrelerde hasar oluşturan ısı, radyasyon, kanser ilaçlarıyla tedavi, hipoksi sonrası apoptozis görülür.

### **Apoptoziste Artma veya Azalmanın Sonuçları**

Her saniye yaklaşık bir milyon hücremiz apoptozis ile vücuttan uzaklaştırılmaktadır. Yapım (mitozis) ile yıkım (apoptozis) arasında kontrollü bir denge vardır. İşte bu dengenin apoptozis lehine veya aleyhine bozulması bir çok önemli hastalığın patogenezinde rol oynar (Tablo 2 ).

### **Apoptozisin Mediatörleri**

Apoptozis çok sayıda ve çeşitte mediatör tarafından düzenlenir. Bunlar arasında, bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (*c-myc*), proteinler (p53) ve hatta organeller (mitokondri) bulunmaktadır<sup>40</sup>. Bazı mediatörler hücre tipine özgüdür, bazıları da apoptotik stimulusun çeşidine göre farklılık gösterebilirler.



**Tablo 2. Apoptozisin İnhibisyonu ve Artışı ile Seyreden Hastalıklar.**

<b>Apoptozisin İnhibisyonu İle Seyreden Hastalıklar</b>	<b>Apoptozisin Artması İle Seyreden Hastalıklar</b>
<b>Kanser</b> Foliküler Lenfomalar p53 mutasyonu olan karsinomalar Hormon bağımlı tümörler Meme kanseri Prostat kanseri Over kanseri	<b>AIDS</b> <b>Nörodejeneratif Bozukluklar</b> Alzheimer Hastalığı Parkinson Hastalığı Amiyotrofik lateral sklerozis Retinitis pigmentosa Serebeller dejenerasyon
<b>Otoimmün Bozukluklar</b> Sistemik Lupus Eritematozus İmmün Aracılıklı Glomerülonefrit	<b>Miyelodisplastik Sendromlar ve Aplastik Anemi</b> <b>İskemik Hasar</b> Miyokard İnfarktüsü İnme
<b>Viral Enfeksiyonlar</b>	<b>Toksik Karaciğer Hasarı</b> Alkolik siroz

**Kalsiyum:** Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum girişi olur. Kalsiyum iyonları endonükleaz, proteazlar ve doku transglutaminazının aktivasyonunda, gen regulasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol alırlar. Kalsiyum, mitokondriyal zarın depolarizasyonu ile birlikte reaktif oksijen türlerinin artışına neden olur<sup>42</sup>. Kalsiyum ile uyarılan apoptoziste, sitozolde Bad defosforilasyonu ve mitokondriyal translokasyonla Bcl ailesi proteinlerinin dimerizasyonu gerçekleşir.

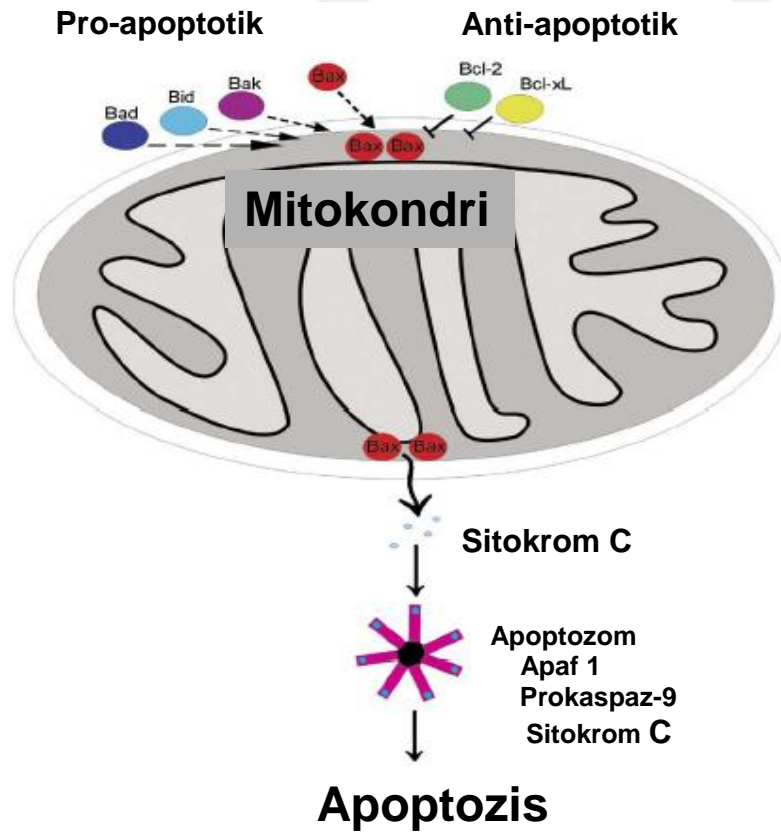
**Siklik AMP:** Hücre sel cevapları düzenleyen ikincil habercilerden biridir. Siklik AMP' nin Bad' ı fosforile eden kinazlar aracılığıyla apoptoziste rol aldığı düşünülmektedir.

**Bcl-2 Ailesi:** İç sinyallerle oluşan apoptozda mitokondri önemli rol oynamaktadır. Sinyaller dış mitokondri zarında bazı proteinler aracılığı ile geçirgenlik artışına neden olurlar. Bunların en önemlisi bcl-2 grubu proteinlerdir. Bcl-2 ailesi, üyelerinin bir kısmı apoptozisi indüklemekte, bir kısmı ise inhibe etmektedir (Tablo 3).

**Tablo 3. Apoptozisi Etkileyen Bcl-2 Grubu Proteinler.**

<b>Anti-apoptotik</b>	<b>Pro-apoptotik</b>
Bcl-2	Bad
Bcl-xL	Bid
Bcl-w	Bak
Bfl-1	Bax
Mcl-1	Bcl-xS

Bu iki zıt etkili grubun işleyişi yapılarında bulunan iki bölgeye (hidrofobik cep ve amfipatik  $\alpha$ -heliks) bağlıdır. Anti-apoptotik üyeler, doğal olarak intrensek sitokrom c' nin saliverilmesini baskılama özelliğine sahiptir. Bu durumda, pro-apoptotik üyelerin anti-apoptotik üyelerle bağlanması halinde bu inhibitör etki ortadan kalkar ve sitokrom c saliverilmesi gerçekleşir (Şekil 5).



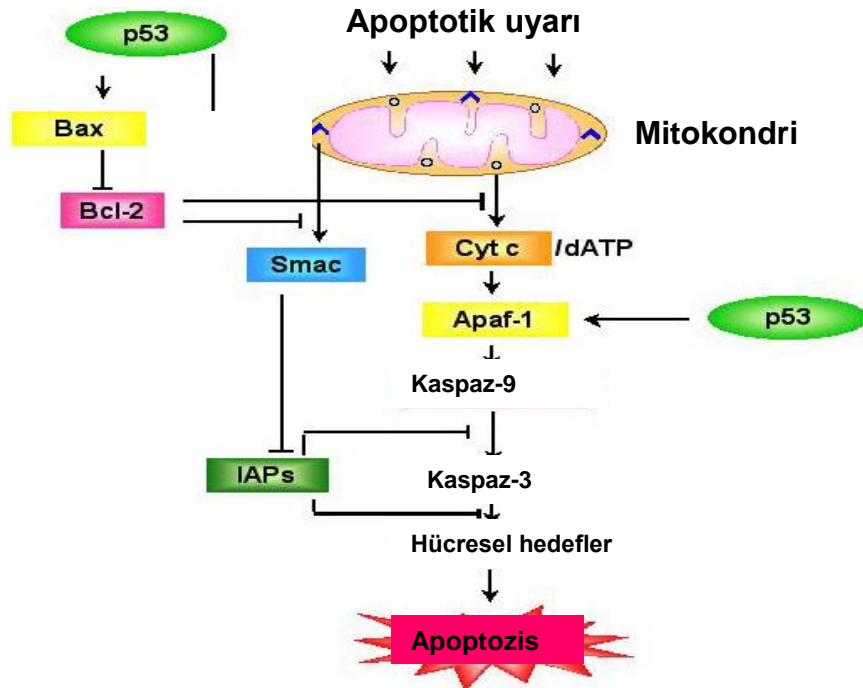
**Şekil 5. Bcl-2 Grubu Proteinlerin Apoptozisle İlişkisi<sup>7</sup>.**

Bu ailenin üyeleri kendi aralarında homo veya hetero-dimerler oluştururlar. Hücrenin yaşayabilirlik durumu bu ailenin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin rölaf oranına bağlıdır. Bcl-2, Apaf 1 (apoptotic protease activating factor 1; apoptotik proteaz aktive edici faktör-1)' e tutunmuş olarak mitokondri dış zarında bulunur. Hücrenin içinden kaynaklanan apoptotik sinyaller Apaf 1' in mitokondriden ayrılmasına neden olur. Bu ayrılma dış mitokondri zarının geçirgenliğini artırır.

Geçirgenliğin artması, mitokondrinin iki zarı arasında bulunan sitokrom c' nin sitozole çıkmasına neden olur. Sitokrom c' nin sitoplazmaya salınmasıyla, sırasıyla kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktive olur ve hücre apoptozise gider<sup>7</sup>. Bcl-2' nin ayrıca mitokondri ile olan ilişkisinden dolayı antioksidan bir etkiye sahip olduğu ve böylece oksidan stresin neden olduğu apoptozisi baskılayabildiği bulunmuştur. Bax sitozolde bulunur ve apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bağlanır, burada küçük delikçikler oluşumunu indükler, böylece selektif iyon permeabilitesi kaybolur, sonuçta sitokrom c ve AIF (apoptosis inducing factor; apoptozis indükleyici faktör)' in mitokondriden sitozole çıkmasını sağlar.

**Seramid:** Yapılan çalışmalar seramidlerin; ICE (interleukin 1- $\beta$  converting enzyme; interlökin 1- $\beta$  dönüştürücü enzim) benzeri proteazları ve endonükleazları aktive ederek DNA parçalanmasına neden olduğunu düşündürmektedir. Hücre yaşamı için gerekli olmasına rağmen; yüksek düzeylerde apoptotik etkiye sahiptir<sup>43</sup>.

**p53 Geni:** DNA tamiri yapan proteinlerin transkripsiyonunu sağlar (Şekil 6).



Şekil 6. P53 Geni ve Apoptozis.

Hücrede bir şekilde (radyasyon, kemoterapi etkisiyle) DNA hasarı oluştuğunda, eğer hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve DNA hasarlı hücrenin çoğalması engellenir. Bu proteinler DNA hasarını tamir edebilirse, hücre siklusundaki blok kalkar. Hücre hasarının tamiri başarılı olmazsa p53 geni *bax* proteinini aktive ederek Bcl-2/Bax oranını değiştirir ve mitokondri aracılığı ile hücrenin apoptoza giderek ölmesini sağlar<sup>44</sup>. Böylece DNA hasarlı hücre ortadan kaldırılmış olur.

**Sitokrom c:** Mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteindir. Son yıllarda anlaşılan önemiyle apoptozis sürecinde merkezi bir konuma oturmuştur. Bu yüzden de sitokrom c' nin mitokondriden sitoplazmaya salınması apoptozis yoluna girmiş bir hücrede irreversibl bir döneme girildiğini işaret eder<sup>45</sup>. Sitokrom c, mitokondriden AIF ile birlikte sitoplazmaya salınır. Sitokrom c sitoplazmik protein olan Apaf 1' e bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP'nin de katılımıyla "apoptozom" adı verilen bir kompleks oluşur<sup>7</sup>. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9' un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz-3' ü aktive eder. Aktif kaspaz-3, ICAD (inhibitor of caspase activated deoxyribonuclease; kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü)' ı inaktifleştirir ve ICAD' in bağladığı CAD (caspase activated deoxyribonuclease; kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz)' ı serbestleştirir. Bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin yoğunlaşmasına ve oligonükleozomal DNA parçalanmasına neden olur.

**Kaspaz ("caspase")'lar:** Bu enzimler "caspase" (cysteine-containing aspartate specific protease) olarak adlandırılmaktadır. Zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein içeren; sistein proteazlar da denilen bu ailenin en az 14 üyesi olduğu bilinmektedir. Bu enzimler, spesifik aspartik asit rezidülerinden sonra belirli proteinleri parçalar ve bu parçalanma sonucunda diğerleri de aktive olarak proteolitik bir süreci başlatır. Bazıları (Kaspaz-2, 8, 9, 10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken bazıları da (Kaspaz-3, 6, 7) efektör kaspazlar olarak bilinir<sup>7,46</sup>. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri (örneğin hücre iskeleti proteinleri; aktin veya fodrin, nükleer membran proteini; laminin A, DNA tamirinde rol alan PARP-poly(ADP-ribose) polymerase) parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar<sup>7</sup>. İlk tanımlanan enzim ICE' dir ve Prokaspaz-1 olarak bilinir. Kaspaz kaskadı, sitokrom c' nin

sitoplazmaya saliverilmesiyle Prokaspaz-9' un aktivasyonu yoluyla aktifleştirildiği gibi, kaspazlar da sitokrom c' nin saliverilmesine neden olabilirler.

**Nitrik Oksit:** Düşük düzeylerde vazodilatatör etki yaparak beyni nöronal ölümden korurken; ağır iskemilerde yüksek orandaki nitrik oksit serbest radikaller gibi nörotoksik etki yapar. Nitrik oksitin apoptotik etkisi tirozin nitrasyonu, NMDA kanallarından kalsiyum akışı, aktin flamanları ve mikrotübüllerin bozulması sonucunda olmaktadır<sup>6,7</sup>. Nitrik oksit ayrıca, Bcl-2 proteinlerinin düzeylerinde azalma, Bax proteinlerinin düzeylerinde artışa neden olarak sitokrom c' nin sitoplazmaya salınımına yol açar. Bu olaylar da kaspaz aktivasyonu ile seyreden apoptotik süreci başlatır.

### **Apoptozisin Aşamaları**

- Apoptozisin indüksiyonu
- Hücre yüzey ölüm reseptörlerinin uyarılması
- Sitokrom c' nin saliverilmesi
- Apoptozom oluşumu (sitokrom c + Apaf 1 + Kaspaz-9)
- Mitokondriyal transmembran potansiyelinin değişmesi
- Kaspazların aktivasyonu
- Fosfatidilserinin hücre membranının iç yüzünden dış yüze transloke olması
- DNaz' ın aktivasyonu sonucu DNA' nın parçalanması
- Yapısal proteinlerin yıkılmasına bağlı olarak apoptozise özgü morfolojik değişikliklerin meydana gelmesi.

-Fagositoz

### **Hücrede Oluşan Biyokimyasal ve Morfolojik Değişiklikler**

Hücreler özelleşmiş yüzeysel yapılarını ve diğer hücrelerle olan temas yüzeylerini kaybederler, su kaybederek küçülürler, büzüşürler. Zar bütünlüğü korunur. Organeller genel olarak sağlamdır. Bazen ribozomlarda çökme izlenebilir. Sitoplazmada yüzeye paralel yerleşmiş mikrofilaman kümeleşmeleri ve endoplazmik retikulumda geçici genişlemeler görülür. Mitokondriler genellikle normal yapılarını korurlar. En önemli değişiklikler çekirdekte izlenir. Kromatin çekirdek zarına yakın kısımlarda yoğunlaşarak, değişik şekil ve büyüklüklerde çöker. Elektron mikroskop ile bakıldığında kromatinin yoğun granüler yarım ay, hilal veya yüzük şeklinde çekirdek zarının iç yüzünde yerleştiği izlenir. Çekirdek büzüşür, bazen zarla sarılı birkaç parçaya ayrılabilir. Nükleer delikçikler kromatinin hücre zarına komşu olmadığı bölgelerde yoğunlaşırlar.

Apoptozis hematoksilen eozinle boyanmış kesitlerde ışık mikroskopik seviyede de izlenebilir. Hücreler koyu eozinofilik sitoplazmalı, bir veya birkaç parçalı piknotik çekirdekli olarak görülür. Çekirdek, kromatinin çekirdek zarının iç yüzüne yerleşmesi nedeniyle hilal veya yarım ay şeklinde izlenebilir. Apoptotik süreç ilerledikçe hücrelerde sitoplazmik çıkıntılar oluşur. Hücre daha sonra zarla çevrili küçük parçalara bölünür. Bunlara “apoptotik cisim” adı verilir. İçlerinde sitoplazma ve sıkıca paketlenmiş organeller bulunur. Bazılarında çekirdek parçaları da mevcuttur.

### **Apoptoziste Görülen Biyokimyasal Değişiklikler**

Sonlandırıcı kaspazlar aktive olduktan sonra sitoplazmada ve çekirdek içinde hedef proteinleri yıkarlar.

**DNA Kırıklarının Oluşması:** Hedef proteinlerden bir tanesi DNA endonükleaz ile bağ yapan bir proteindir. Kaspazlar bu proteini yıkarak endonükleazı serbestleştirirler. Çekirdek içine giren kalsiyum-magnezyum bağımlı endonükleaz, DNA kırıkları oluşturur<sup>7,40</sup>. Kırıklar nükleozomların arasında mono veya oligonükleozomal olarak meydana gelir. 180 baz çifti ve katları şeklinde kırılmalar oluşur.

**Hücre İskeletinin Yıkılması:** Kaspazların aktifleştirdiği bir başka protein ise hücre iskeletinin ana bileşenlerinden olan aktini yıkan bir proteindir. Aktin filamanlarının yıkılması ile hücre normal şeklini kaybeder.

**Hücre Membran Değişiklikleri:** Kaspazların etkisiyle hücre membranının asimetrisi bozular. Hücre zarının iç yüzünde bulunan fosfatidilserin yer değiştirerek zarın dış yüzüne yerleşir. Ayrıca bazı apoptotik hücreler hücre zarında thrombospondin denilen adeziv bir glikoprotein ve bazı hücre adezyon molekülleri (örneğin: ICAM 3) içerirler. Bütün bu membran değişiklikleri apoptotik hücrelerin çevre fagositler tarafından fark edilmelerini ve fagositozlarını sağlamaktadır. Transglutaminaz aktivasyonu ile membran proteinlerde oluşan çapraz bağlanmalar, membranların parçalanmasını ve apoptotik cisimlerin oluşmasını sağlar.

**Fagositoz:** Apoptotik cisimler çevredeki parankim hücreleri ve fagositler tarafından fagosite edilerek dokudan temizlenirler.

### **Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler**

Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler aşağıda sıralanmıştır:

- Morfolojik görüntüleme yöntemleri
- İmmunohistokimyasal yöntemler
- Biyokimyasal yöntemler

- İmmunolojik yöntemler
- Moleküler biyoloji yöntemleri

### **Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri**

- Işık Mikroskobu
  - Hematoksilen Boyama
  - Giemsa Boyama
- Floresan Mikroskobu
  - Lazerli Floresan Mikroskop
  - Propidium İyodür (PI)
  - Hoechst Boyası
- Elektron Mikroskobu
- Faz Kontrast Mikroskobu

### **Işık Mikroskobu Kullanımı**

**Hematoksilen Boyama:** Morfolojik görüntüleme yöntemleri içinde en ucuz ve kolay olanı hematoksilen ile boyamadır. Hematoksilen ile boyanan preparatlar ışık mikroskobu ile incelenir. Hematoksilen boyama hem hücre kültürü çalışmalarında hem de doku boyamalarında kolaylıkla kullanılabilir. Apoptotik hücrelerin saptanmasında genellikle ilk metod olarak başlanması uygundur ve çeşitli açılardan (örneğin maliyet) diğer metotlara karşı avantaj sağlar. Hematoksilen boyamada, hematoksilen boyası kromatini boyadığından apoptotik hücreler nukleus morfolojisine göre değerlendirilir. Gözlenebilen değişiklikler; hücre küçülmesi veya sitoplazmik küçülme, kromatinin yoğunlaşması, çekirdek zarının büzülmesi, nukleusun küçülmesi veya parçalara bölünmesidir.

**Giemsa Boyama:** Giemsa ile boyamada hematoksilenle boyamada da olduğu gibi nukleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır; hematoksilen boyamaya belirgin bir üstünlüğü yoktur.

### **Floresan mikroskobu**

Floresan maddelerin (örneğin; Hoechst boyası, propidium iyodür) kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir. Floresan boyalar DNA' ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nukleusu görünür hale gelebilir. Floresan sistemler ışık mikroskobuna göre çok daha pahalıdır. Fakat, eğer hücre kültürü çalışmasında kullanılırlarsa, canlı hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına olanak tanır. Apoptozise özgü nukleus morfolojisi bu hücrelerde tanı koydurucudur. Tipik nukleus parçalanması en önemli bulgudur.

### **Elektron Mikroskobu**

Elektron mikroskobu ile değerlendirmenin apoptozisde en değerli yöntem olduğu düşünülmektedir. Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözleendiği bir

yöntemdir. Üstelik hücre içi detaylar (örneğin; mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nükleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi) da incelenebilir.

### **Faz Kontrast Mikroskobu**

Bu tür mikroskop sadece hücrelerin kültür ortamında, büyütüldüğü çalışmalarda, hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır. Faz kontrast mikroskobu ile apoptotik hücreler üzerinde gelişen kabarcıklar izlenebilir. Faz kontrast mikroskopunda hücreleri gözlemek için normalde boya kullanmaya gerek yoktur

### **İmmünohistokimyasal Yöntemler**

- Anneksin V Yöntemi
- TUNEL Yöntemi
- M30 Yöntemi
- Kaspaz-3 Yöntemi

#### **Anneksin V Yöntemi**

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde fosfatidilserin bulunmaktadır. Eğer hücre apoptozise giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan fosfatidilserin molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Dış yüze transloke olan fosfatidilserinler, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilirler. Böylece apoptotik hücreler saptanmış olur.

#### **TUNEL Yöntemi**

DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar. Parafin bloklar, donmuş kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki veya "plate" lere ekilmiş, ya da lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerde apoptozisin varlığı bu methodla saptanabilir.

#### **M30 Yöntemi**

M30 yönteminde apoptotik hücreler sitokeratin 18' in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenir. Sadece sitokeratin 18' i eksprese eden dokularda kullanılması mümkündür. Bu dokular epitelyal kaynaklı dokulardır.

#### **Kaspaz-3 Yöntemi**

Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif Kaspaz-3 belirlenebilir. Bunun için, dokunun Kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptozise yol açan ajanın Kaspaz-3' ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir. Ancak, bu bilinirse apoptotik hücreler bu methodla tespit edilebilirler.



## **Biyokimyasal Yöntemler**

- Agaroz Jel Elektroforezi - DNA parçalanması
- Western Blotting
  - Substrat kırılmaları
  - Aktif kaspaz' ın belirlenmesi
  - Sitokrom c saliverilmesi
- Flow Sitometri
  - DNA azalması
  - Annexin V

## **İmmunolojik Yöntemler**

### **ELISA**

ELISA ile gerek kültürü yapılmış hücrelerde gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür. Aynı şekilde M30 düzeylerinin ölçümü de mümkündür.

### **Fluorimetrik Yöntem**

Kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde ilgili kaspazın antikorunun bulunduğu "plate" lere hücre lizatlarının konulması ile kaspaz molekülleri tutulur. Daha sonra ortama kaspazların parçaladığı ve kendisine floresan bir maddenin tutunduğu bir substrat ilave edilir. Ortamdaki kaspaz aktivitesiyle orantılı olarak ortaya çıkan floresanın şiddeti fluorimetre ile ölçülerek kaspaz aktivitesi saptanır.

### **Moleküler Biyoloji Yöntemleri**

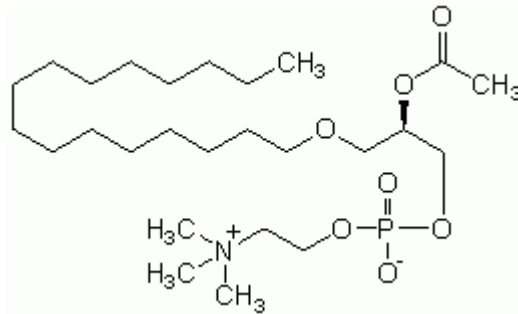
- DNA Microarrays
  - Gen ekspresyon dereceleri (mRNA; ribonükleik asit)
  - Hücre ölüm reseptörleri
  - Kaspazlar

DNA "microarray" teknolojisi henüz çok yeni ve çok pahalı bir yöntemdir. Fakat, yakın bir gelecekte tıp pratiğini radikal bir biçimde değiştirme iddiası taşıyan bu teknoloji ile aynı anda ve kısa bir süre içinde (önceden aylarca sürerken) yüzlerce hatta binlerce genin ekspresyon derecelerinin (mRNA' larının) tespiti mümkün olabilecektir. Böylece, apoptozise özgü hücre yüzey ölüm reseptörlerinin ekspresyon durumları hakkında geniş bilgi edinme olanağı doğacaktır.

## Nöronal Apoptozis Üzerine Trombosit Aktive Edici Faktör (Platelet Activating Factor-PAF)' in Etkisi

Sinir sistemi hücreleri, vücuttaki membran yüzey alanı en geniş olan hücrelerden biridir. Özellikle nöronlardaki dendritik uzantılar geniş hücre zarı yüzeyi içeren postsinaptik elementler oluşturmaktadır. Astrositler, oligodendrisitler ve mikroglial hücrelerde de hücre zarı yüzeyi geniştir. Nöronal membranlar lipid yapılı habercilerin kaynağı olan özel fosfolipidlerden zengindir. Nörotransmitterler, nörotrofik faktörler, sitokinler, membran depolarizasyonu ve iyon kanal aktivasyonu gibi olaylar fosfolipazları uyararak bu depolardan lipid habercilerin salınımına neden olur<sup>47</sup>. Lipid haberciler sinir sisteminin gelişmesi, farklılaşması, fonksiyonu, korunması ve onarımıyla ilgili olan diğer sinyal yollarını düzenler. Nöronlar, glialar ve serebrovasküler endotel hücreler yoğun miktarda lipid haberci deposu olan fosfolipid havuzlarına sahiptir.

PAF (platelet activating factor; trombosit aktive edici faktör) fosfolipid yapılı ve güçlü etkileri olan bir mediyatördür. Karbon atomlarının biri üzerine alkilenmiş ve diğeri üzerinde asetilenmiş gliserol 3 fosfokolin türevi olan lipid kaynaklı ikincil habercidir (Şekil 7). Kimyasal adı 1-O-alkil-2-asetil-sn-glisero-3-fosfokolindir.

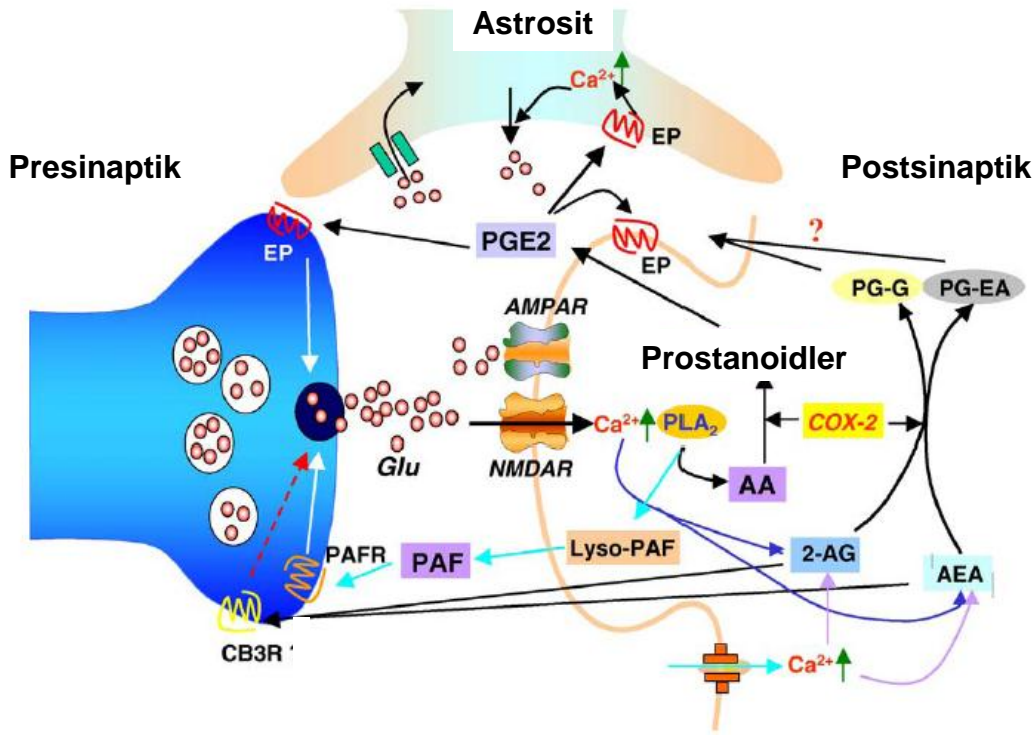


**Şekil 7. Trombosit Aktive Edici Faktör (Platelet Activating Factor-PAF).**

Trombositler, nötrofiller, eozinofil lökositler, monositler, damar endoteli, mast hücreleri ve böbrek mezengial ve interstisyel hücrelerinde iki basamaklı bir tepkime ile üretilir. Yapılan çalışmalar, PAF üretiminde fosfolipaz A2 ve asetil transferaz enzimlerinin önemli rolleri olduğunu göstermektedir<sup>13,47</sup>. PAF' in aktif bölümü Sn 2 pozisyonundaki gliserol kısmıdır. PAF reseptörleri hücre membranındaki bir G protein aracılığıyla aktive olarak birçok yolağın harekete geçmesine neden olmaktadır. PAF güçlü vazodilatatör ve hipotansif etkilere sahiptir. Böbreklerde belirgin vazokonstrüksiyon yaparak böbrek kan akımını ve itrah fonksiyonunu azaltmaktadır.

Yüksek dozlarda damar içinde trombosit kümeleri oluşumu ve vazokonstrüktör ikincil habercilerin salınımı nedeniyle bazı organların kan akımını azaltır. Pulmoner dolaşımında vazokonstrüksiyon yapar. Kapiller ve venüllerin geçirgenliğini artırır. Cilt içine PAF enjeksiyonu Lewis' in üçlü cevabına neden olur. Trombositleri uyararak kümeleşmeye ve tromboksan A<sub>2</sub> salınımına neden olur ve yıkımın artmasıyla trombositopeni gelişir.

Membran fosfolipidlerinin fonksiyonlarından biri de reseptörler, iyon kanalları ve enzimler için uygun bir çevre oluşturarak lipid yapısındaki haberciler için kaynak oluşturmaktır<sup>47</sup>. Ayrıca fosfolipid türevleri de sinaptik iletinin sağlanması ve düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Şekil 8).



**Şekil 8. Biyoaktif Lipidlerin Sinaptik Sinyallerdeki Rolü<sup>13</sup>** (AA: Araşidonik asit, AEA: Araşidonoil etanol amid, AG: Araşidonoil gliserol, CBR: Kannabinoid reseptörler, COX: Siklooksijenaz, EP: PG-E2 reseptörleri, Glu: Glutamat, PAF: Trombosit aktive edici faktör, PLA<sub>2</sub>: Fosfolipaz A<sub>2</sub>, PG: Prostaglandin, PG-GE: Prostaglandin gliserol ester, PG-EA: Prostaglandin etanolamid).

Merkezi sinir sisteminde PAF sentezi nöronlar ve mikroglialarda olmakta; reseptörleri de daha çok bu alanlar olmak üzere astrositler ve endotelyumda da

olabilmektedir. Yapılan çalışmalar, sinaptik habercilik ve transkripsiyonel aktivasyonun yanı sıra, normal beyin gelişiminin kritik belirleyicilerinden birinin de PAF olduğunu göstermektedir<sup>13</sup>. Ayrıca sistemik proinflamatuvar özelliği de mevcuttur. PAF proinflamatuvar aktivitesini trombositler, nötrofiller, eozinofiller, makrofajlar ve diğer inflamatuvar hücrelerin yüzeyinde bulunan özel reseptörleri aktive ederek gösterir.

PAF, hipokampusta glutamat salınımını uyaran biyoaktif bir fosfolipiddir. Membran bütünlüğünü sağlamaktan ziyade; özel uyarılarla o anda sentezlenerek sinaptik aktiviteyi düzenler. Nöronlarda postsinaptik bölgeden salınarak presinaptik bölgedeki eksitatör nörotransmitterlerin açığa çıkmasını sağlayan habercilere retrograd haberci denmektedir. Tıpkı araşidonik asit, nitrik oksit ve karbon monoksit gibi PAF da retrograd habercidir. Beyinde hücre düzeyinde PAF'ın bağlandığı 2 değişik bölge vardır; sinaptik membranlar ve hücre içi (mikrozomal) membranlar. PAF'ın sinaptik membrana bağlanan kısmı, presinaptik reseptörlerle etkileşime girerek glutamat salınımına neden olur ve hipokampal eksitatör sinapslar aktive olur<sup>13</sup>. Beyinde eksitatör presinaptik glutamat nörotransmisyonu postsinaptik GABA (gama amino bütirik asit) ile baskılanarak kontrol altında tutulmaktadır. PAF, GABA reseptör aktivitesini azalttığı için eksitatör presinaptik aktivite artış göstermektedir<sup>48</sup>.

PAF'ın hücre içi reseptörlerdeki kısmı nükleus içindeki gen ekspresyonuyla ilişkilidir. Erken uyarılan genleri aktive ederek nükleusla bağlantılı sinyallerin oluşumuna neden olur<sup>49</sup>. Son zamanlarda yapılan çalışmalar PAF'ın hücre içi reseptörlerini endozomlar ve nükleer membranlar olarak değişik formlarda tanımlamaktadır<sup>13,47</sup>. Her iki hücre içi reseptör tanımlamasının daha önce tarif edilen mikrozomal formun bir parçası olduğu düşünülmektedir. PAF'ın transkripsiyonel aktivitesi göz önüne alındığında; iki mekanizma göze çarpmaktadır: Hücre yüzeyindeki reseptörler sinyal zincirini tetiklemekte ve diğer tip olan hücre içi form spesifik kinazlar, fosfatazlar veya transkripsiyonel faktörlerle etkileşime girmektedir<sup>13</sup>. PAF'ın bütün bu fonksiyonları, tıpkı diğer retrograd haberciler gibi merkezi sinir sisteminde sinaptik iletileri düzenlemekte ve bunların devamlılığını sağlamaktadır.

Merkezi sinir sisteminde PAF depolarını uygun bir şekilde kontrol altında tutmak amacıyla değişik enzimler görev yapmaktadır. Bu enzimlerin başında PAF asetil hidrolazlar gelmektedir. Bu enzim PAF'ın Sn pozisyonundaki asetil esterini hidrolize ederek işlev yapar. PAF asetil hidrolaz ile bu kısmın deasetilasyonu aktivitenin kaybolmasına neden olur. Nörotoksik konsantrasyonlarda PAF açığa

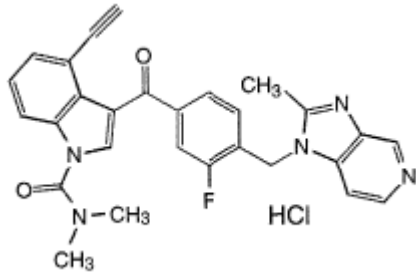
çıkıldığında; bu enzimlerle inaktive edilmekte ve sinyaller engellenmektedir<sup>22</sup>. PAF, deasetilasyonla lyso-PAF adı verilen biyolojik olarak inaktif lipide dönüşmektedir.

Zamanında veya zamanından önce doğan hayvanlarda merkezi sinir sistemi dokularında iskemi gibi oksidatif stres oluşturulduğunda, düzenli sentez ve yıkım sağlanamadığı için PAF birikir. Özellikle yenidoğan döneminde, beyinde hipoksi ve iskemi oluşturulduğunda membran fosfolipidlerinin yıkımı sonucunda akut olarak PAF konsantrasyonu artmaktadır<sup>13</sup>. Artan PAF konsantrasyonu nörotoksik mediyatörleri uyarır. Presinaptik hücre membranındaki PAF aktivasyonu, eksitator aminoasit ilişkili uyarıları aktive ederek hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artırır. Retrograd haberci özelliğiyle, postsinaptik nöronlardan PAF salınarak presinaptik nöronlardan eksitator nörotransmitterlerin açığa çıkmasına neden olur. Hücre içi (mikrozomal) PAF reseptörlerinin uyarılmasıyla da transkripsiyonel düzenlemelerde rol alan genler (fos, jun, zif/268 gibi) hızlı bir şekilde aktive olur. HİBH' da PAF' ın güçlü proinflatuar etkisiyle sitokin stimülasyonunun rolü olduğu düşünülmektedir. Merkezi sinir sistemindeki inflammatuar hücreler mikroglialar olup, beyin hasarı oluştuğunda nitrik oksit ve proinflatuar sitokinlerin salınımından sorumlu tutulmaktadır.

#### **PAF Reseptör Antagonisti: ABT-491**

Önemli bir mediyatör olan PAF' ın astım, alerjik rinit, sepsis, pankreatit, inflammatuar barsak hastalığı ve iskemi-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<sup>50,51</sup>.

ABT-491 (4-etinil-N,N-dimetil-3-[3-floro-4-[(2-metil-1H-imidazo-[4,5-c]piridin-1il)metil]benzoil]1H-indol-1-karboksamid hidroklorid) çok güçlü bir PAF reseptör antagonistidir (Şekil 9).



**Şekil 9. ABT-491.**

Bu molekül imidazopiridin-indol içeren reseptör antagonistlerini içeren ABT-299' in indol kısmı ile BB-882' nin imidazopiridin kısmının birleşmesinden sentez edilmektedir<sup>23</sup>. Literatürde ABT-491' in kullanımıyla ilgili sınırlı sayıda çalışma olmakla beraber<sup>23,24</sup>; hipoksik iskemik beyin hasarında kullanımıyla ilgili bir çalışma görülmemektedir.

### **Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Histolojik Bulgular**

Volpe, hipoksi ve iskemik beyin hasarında beş önemli nöropatolojik durum tanımlamıştır<sup>52</sup>. Hasarın nedenine bağlı olarak, bir kişide birden fazla lezyon gözlenebilir. Bu lezyonların gelişimi, hipoksi ve iskemiye maruz kalındığı dönemdeki beyinin olgunluk düzeyiyle yakından ilişkilidir. Zamanından önce doğan bebeklerde germinal matriks alanında gelişen hasar subependimal germinal matriks veya ventrikül içinde kanamaya neden olabilir. Zamanında doğanlarda patoloji daha çok serebral korteks ve bazal ganglionlardadır.

**Seçici Nöronal Nekroz:** En sık görülen nöropatolojik durumdur. Hipoksi ve iskeminin daha çok doğumdan sonraki dönemde olması sonucu gelişir. Nöronal hasar serebral korteksin bazı özel bölgelerinde, hipokampusta ve ciddi olgularda santral kortekste görülür. Etkilenen diğer alanlar diensefalon, beyin sapı, serebellumun Purkinje hücreleri, bazal ganglionlar ve omuriliklidir. Yenidoğan döneminde stupor, koma, nöbetler, hipotoni, okülomotor, emme ve yutma bozuklukları gibi klinik bulgular izlenir. Uzun dönemdeki önemli bulgular bilişsel bozukluklar, spastik kuadriparezi, konvülsiyonlar, ataksi, bulber ve psödobulber paralizi, hiperaktivite ve dikkatsizliktir.

**Parasagittal Serebral Nekroz:** Zamanında doğan bebeklerde, sıklıkla perinatal hipoksi ve iskemi sonucunda görülen önemli bir iskemik lezyondur. Genellikle bilateral ve simetriktrir. Adından da anlaşıldığı gibi serebral konveksitelerin parasagittal veya üst-iç bölgelerindedir. Serebral korteks ve özellikle parietookspital subkortikal beyaz cevherde gözlenir. Bu bölge büyük serebral arterlerin (anteriyor, mediyal ve posteriyor) sonlandığı ve perfüzyon için sınır bölgelerdir. Beyinin arka kısmı önünden daha çok etkilenir. Klinik olarak proksimal üst ekstremiteleri, distal alt ekstremitelerden daha fazla etkileyen spastik kuadripareziyle seyreder. Temporal-posteriyor pariyetal-okspital tutulum nedeniyle konuşma bozukluğu ve göz hareketlerinde yetersizlikler gözlenir.

**Periventriküler Lökomalazi:** Zamanından önce doğup en az birkaç gün yaşayan bebeklerde en sık görülen iskemik lezyondur. Düşük doğum ağırlığı, kalp ve

solunum sistemindeki problemler nedeniyle ventilatör ihtiyacı olanlarda yüksek oranda izlenir. İskemik durum doğum öncesi ya da sonrası olabilir. Periventriküler beyaz cevherle lateral ventriküllerin arka-dış-yan köşelerinde nekroz ve kanamayla kendini gösterir. Sıklıkla yan ventriküllerin ön boynuzları (foramen Monro etrafındaki beyaz cevher) ve parietookspital bileşke veya optik trakt düzeyindeki trigon etrafını tutar. Kortikal ve talamik yapılarla bağlantıyı sağlayan nöronların etkilenmesi bu lezyonun olumsuz yönüdür. Daha çok alt ekstremiteleri kapsayan spastik diplejiyle seyreder. Bunun nedeni kortikospinal yolda bacaklara giden liflerin periventriküler alandan geçmeleri ve nekrozdaki direkt etkilenmeleridir. Ayrıca optik traktus ve görsel liflerin etkilenmesi nedeniyle göz hareketleri ve görsel alan bozuklukları ortaya çıkabilir.

**Status Marmoratus:** En az görülen nöropatolojik lezyon olup genellikle zamanında doğan bebeklerde gözlenir. Status marmoratus ya da *etat marbre* terimi derin nükleer yapıların bilye-mermer beyazı renginde görünmesi nedeniyle kullanılmaktadır. Bu görünümün nedeni nöronal kayıp, gliosis ve astrosit liflerinin hipermyelinizasyonudur. Özellikle bazal gangliyonlarda ve sıklıkla da putamende gözlenir. Yenidoğan döneminde nörolojik defisit gözlenmeyebilirken; yaşamın ileri dönemlerinde hareket bozuklukları veya bilişsel bozukluklar izlenebilir. Özellikle distoni gelişenler olmak üzere, olguların yaklaşık %30' unda spastik kuadriparezi gelişir. Bilişsel bozukluklar gözlenebilir fakat zekanın normal olması mümkündür.

**Bölgesel ve Çoklu Bölgesel İskemik Beyin Nekrozu:** Genellikle zamanında doğan bebeklerde doğumdan sonraki iskemik olaylar sonucunda gözlenir. Bu lezyonlar beyin parankimi, korteks ve subkortikal beyaz cevherde nispeten geniş bölgesel nekroz alanlarıdır. En sık etkilenen bölge orta serebral arterin beslediği alanlar olup genelde tek taraflıdır. Temel bulgusu tek bir damar ya da birkaç damarın beslediği alanların çevresindeki bütün hücre elemanlarında nekroz olmasıdır. Beyin parankiminde infarktlara bağlı oyuklar oluştuğunda porencefali (eğer tekse), mültikistik ensefalomalazi (eğer oyuk sayısı çok ise) ve hatta hidrencefali (eğer oyuk sayısı çok ve genişse) gelişebilir. Bu oyuklar ventriküler sistemle birleşebilir. Fetüs ve yenidoğan beyninin iskemi sonucunda oyuk gelişmesine meyilli olmasının nedeni su içeriğinin yüksek, miyelinli liflerin az ve astroglia cevabının zayıf olmasından kaynaklanmaktadır. Arteriyel tıkanma insidansı gebelik yaşıyla değişmekle beraber 28. haftadan önce görülmesi nadirdir. Bölgesel ve tek taraflı beyin infarktı olan bebeklerin en az %80' inde belirgin semptom nöbettir. Bölgesel veya çoklu bölgesel

beyin nekrozunun uzun dönem sekelleri spastik hemiparezi, kuadriparezi, bilişsel bozukluklar ve nöbetlerdir.

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

HİBH' de klinik bulgular hipoksi ve iskeminin ağırlığına, süresine ve bebeğin gebelik yaşına göre değişkenlik gösterir. Olguların büyük bir çoğunluğunda diğer organlar da etkilenir. En sık etkilenenler sırasıyla böbrekler, kalp, akciğerler, karaciğer ve barsaklardır.

İlk 12 saatte stupor, koma, periyodik solunum, solunum yetmezliği, hipotoni, spontan hareketlerde azalma ve konvülsiyon mevcuttur. 12-24 saat arasında ağır vakalarda koma devam ederken hafif vakalarda uyanıklık halinde iyileşme görülür. Ancak bu dönemde şiddetli konvülsiyonlar ve apneik ataklar mevcuttur. 24-72 saat içinde durumu ağır olan bebeklerde bilinç giderek kötüleşir, koma, solunum durması ve beyin sapı disfonksiyonları görülür. Bebeklerin çoğu bu dönemde kaybedilir. 72 saatin sonunda hayatta kalan bebeklerde emme-yutma ve dil hareketlerinde sorunlar ortaya çıkabilir.

### **Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Evreleme**

Hipoksi ve iskemik olaylara maruz kalan yenidoğanlarda, gelişebilecek beyin hasarının ciddiyetini ölçmek ve ensefalopati bulgularını takip edebilmek için çeşitli evreleme sistemleri geliştirilmiştir. Kullanışlı olmalarına rağmen; retrospektif verilerin toplanmasıyla elde edildikleri için eleştirilebilirler. Çoğunun önceden belirleyebilme kapasitesi yetersizdir.

En bilinen evreleme yöntemi Sarnat ve Sarnat tarafından 1976' da önerilen evreleme sistemidir<sup>53</sup>. Bu evreleme sistemi birçok modern evreleme yöntemine de temel olmuştur (Tablo 4). Bu yöntemde sonuçların önceden belirlenebilmesi için EEG bulguları da kullanılmıştır.

**Evre I:** Hasarın erken dönem bulgularıyla karakterizedir. Aşırı uyanıklık (uykuda azalma), sempatik aktivasyonda artış (gözleri geniş açma, gözleri az kırpma, midriyazis), uyarılara aşırı yanıt, normal tonus ve EEG' ye rağmen emmede zayıflık mevcuttur. Bu evre 24 saatten kısa sürer ve normal nörolojik bulgularla sonlanır.

**Evre II:** Bu evreye ilerleyenlerde hafif hipotoni, letarji, klinik nöbet, parasempatik aktivasyonla miyozis, kalp atım hızında düşme, peristaltizm ve sekresyonda artış gözlenir. EEG' de nispeten düşük voltaj amplitüdü görülür.



**Tablo 4. Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Sarnat ve Sarnat Evrelemesi<sup>53</sup>.**

	<b>Evre I</b>	<b>Evre II</b>	<b>Evre III</b>
<b>Bilinç Düzeyi</b>	Aşırı uyanık	Letarjik	Stupor
<b>Nöromusküler Kontrol</b>			
Kas Tonusu	Normal	Hafif hipotoni	Flask
Postür	Hafif distal fleksiyon	Güçlü distal fleksiyon	Aralıklı deserebrasyon
Gerilim Refleksleri	Aşırı aktif	Aşırı aktif	Azalmış veya yok
Segmental myoklonus	Var	Var	Yok
<b>İlkel Refleksler</b>			
Emme	Zayıf	Zayıf veya yok	Yok
Moro	Güçlü: Düşük eşikli	Zayıf, yüksek eşikli	Yok
Okülovestibüler	Normal	Aşırı aktif	Zayıf veya yok
Tonik Boyun	Zayıf	Güçlü	Yok
<b>Otonomik Fonksiyon</b>	Jeneralize sempatetik	Jeneralize parasempatetik	Her iki sistem baskılanmış
<b>Pupiller</b>	Midriyazis	Miyozis	Değişken; sıklıkla eşit değil, ışık refleksi zayıf
<b>Kalp Hızı</b>	Taşikardi	Bradikardi	Değişken
<b>Bronşiyal-Tükürük Sekresyonu</b>	Seyrek	Yoğun	Değişken
<b>Gastrointestinal Motilite</b>	Normal veya azalmış	Artmış; ishal	Değişken
<b>Nöbetler</b>	Yok	Sık rastlanır; fokal veya mültifokal	Nadir (deserebrasyon hariç)
<b>EEG Bulguları</b>	Normal (uyanık)	Erken: Düşük voltajlı sürekli delta ve teta Geç: Periyodik patern (uyanık) Nöbetler: Fokal 1-1 Hz diken ve dalga	Erken: İzopotansiyel fazlarla periyodik patern Geç: Tamamen izopotansiyel
<b>Süre</b>	< 24 saat	2-14 gün	Saatler-günler

İkinci günde EEG' de uyanıklık sırasında merkezi ya da temporal ağırlıklı nöbetler gözlenir. Evre II 2-14 gün sürer. Klinik ve EEG' de beş gün içerisinde düzelme iyi prognoz lehinedir. Yedi günden fazla sürerse prognoz kötüdür.

**Evre III:** Stupor, deserebre postür, ciddi hipotoni, derin tendon, ilkel (moro, tonik boyun ve emme) ve beyin sapı (korneal ve okülosefalik) reflekslerinde baskılanma görülür. Klinik nöbetler evre II' den azdır. Genel olarak anormal solunum ve küçük ya da orta büyüklükte pupilla ile birlikte sempatik veya parasempatik otonom disfonksiyon gözlenir. Tablo kötüleştikçe EEG'de çok düşük voltaj ve izoelektrik görünüm izlenir.

Genel olarak tümü değerlendirildiğinde; doğum sırasındaki sorunlar ve takibindeki yaşam desteğiyle ilgili problemler (10 dakikaya kadar düşük Apgar skoru, solunumun gecikmesi), bilincin kötü olması (stupor ya da koma), solunum problemleri (apne, solunum yetmezliği) ve nöbet geçirilmesi uzun dönem nörolojik morbiditeyle yakından ilişkilidir.

### **Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Tanı**

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.

### **Biyokimyasal Testler**

- Fetüs kan gazlarında asidoz olması kötü prognozu işaret etmektedir.
- Fetal monitörizasyonda deselerasyonların gözlenmesi intrauterin fetal distress olduğuna işaret eder.
- Artmış BOS protein, piruvat/laktat oranı ve CK-BB değerleri
- Laktat oranında artış
- N-asetil-aspartat (Naa) düzeyinde düşüş
- Naa/kreatinin veya Naa/kolin oranında düşüklük
- Artmış CK, CK-MB, ürik asit, amonyak düzeyleri HİBH destekleyen bulgulardır.

Yenidoğanda özellikle de prematüre bebekte hipoksik hasarın klinik ve nörolojik bulguları spesifik olmadığı için gelişmiş tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Nöro-fizyolojik monitorizasyon ve görüntüleme yöntemleri HİE'nin

tanısında önemli katkılar sağladığı gibi prognoz hakkında da önemli ipuçları vermektedir.

**Elektroensefalogram (EEG):** Burst supresyonu, elektro-serebral inaktivite, düşük voltaj paterni ve multifokal keskin dalgalar ağır serebral etkilenimi gösterir ve kötü prognoza işaret eder.

**Kraniyal Ultrasonografi (US):** Bu yöntem ile peri-intraventriküler kanama ve periventriküler lökomalazi tanıları kolayca konabilir. Kanama sonrası ventriküler 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 spektroskopi yöntemi ile HİBH' li bebeklerde serebral otopregülasyonun 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 inceltme 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 Spektroskopi (MRS):** Bu yöntemle hipoksi ve iskeminin erken ve geç bulgularını detaylı bir şekilde değerlendirmek ve bunları prognoz ile ilişkilendirmek mümkündür. MRS ile <sup>31</sup>P kullanılarak fosfokreatinin (PCr) ve inorganik fosfat (Pi) ölçümü yapılabilmektedir. 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 N-asetil-aspartat (Naa) düzeyinde düşüş olduğu bu yöntemle saptanmıştır. Naa/kreatinin veya Naa/kolin oranındaki düşüklüğün kötü prognozu yansıttığı gösterilmiştir.

**Elektrofizyolojik Çalışmalar:** Beyin sapının işitsel ve görsel uyarılmış potansiyellerinin ölçümü ile HİBH' nin ağırlık derecesi hakkında yorum yapılabilir. Somato-sensoriyel uyarılmış potansiyeller (SEP) de nörolojik prognoz hakkında önemli ipuçları sağlayabilir. HİBH geliştikten sonraki 24 saat içinde median sinir kullanılarak yapılan SEP' in normal bulunması hastanın prognozunun iyi olacağını göstermektedir (%94 sensitive).

**Biyokimyasal Testler:** HİBH tanısında birçok biyokimyasal test de kullanılmaktadır. Bunlar arasında plazma laktat, beyin-omurilik sıvısı (BOS) laktat dehidrogenaz, hidroksibütirat dehidrogenaz, plazma hipoksantin, vasopressin ve eritropoietin sayılabilir. Son zamanlarda kreatin kinazın beyine spesifik 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' da nöron-spesifik enolaz, glial fibriler asidik protein ve eksitator aminoasitlerin ölçümünün tanıdaki değeri halen araştırılmaktadır.

### **Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Tedavi**

HİBH' nin tedavisinde birçok yeni yöntem denenmekte ise de destek tedavisi ve sistemik dengelerin sağlanması halen ilk sırada yer almaktadır. Zamanında ve etkili yapılan yeniden canlandırma uygulamaları, yeterli solunum ve dolaşım desteği, uygun sıvı ve elektrolit tedavisi, dengeli ve yeterli beslenme, enfeksiyon ve yaygın damar içi pıhtılaşmadan korunma sistemik ve destek tedavisinin temel öğelerini oluşturur.

Beyine yönelik tedaviler farmakolojik ve farmakolojik olmayan olmak üzere iki grupta incelenebilir. Farmakolojik yeni tedavi yöntemlerinden serbest oksijen radikalleri oluşumunu önleyen veya oluşmuş olanları ortadan kaldıran ilaçlar, eksitator aminoasit antagonistleri ve nitrik oksit sentetaz inhibitörleri üzerindeki araştırmalar devam etmektedir<sup>5,6,7</sup>. Tüm tedavilerin amacı seçici nöronal nekrozu (apoptozisi) ve beyinde yaygın infarktları önlemektir. HİBH tedavisinde zamanlama oldukça önemlidir, yeniden canlandırma uygulamalarından sonraki 1-2 saat içinde uygulanan tedavilerin etkili olabileceği bildirilmektedir.

### **Merkezi Sinir Sistemine Yönelik Klasik Tedavi**

Doğum esnasında oluşan hipoksi ve iskemi sonrasında önerilen klasik tedavide amaç; etkili ve yeterli ventilasyonun sağlanması, normal kan basıncının sağlanması, sıvı elektrolit dengesinin sağlanması, nöbetlerin kontrol altında tutulması, enfeksiyon ve yaygın damar içi pıhtılaşmanın önlenmesi yeterli beslenmenin sağlanması, vucut ısısının korunmasıdır.

### **Yeni Nöron Koruyucu Tedavi Yaklaşımları**

HİBH tedavisinde birçok nöron koruyucu yaklaşım hayvan modelleri üzerinde denenmektedir ancak klinik uygulamalar için henüz yeterince veri elde edilememiştir. Bu uygulamalardan sadece bir tanesinin nöronları tam olarak koruyamayacağı anlaşılmaktadır. Gelecekte bu uygulamaların birkaçı birarada kullanılabilir.

**Serebro-vasküler Disfonksiyonun Önlenmesi:** Steroid yapısında olmayan antiinflamatuvar ilaçların iskemi sonrası iyileşmeyi artırdığı deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. Bu ilaçlar siklo-oksijenazı inhibe ederek iskemi sonrası beyin perfüzyonunu düzeltmektedir. PAF antagonistleri de hayvan modellerinde iskemik hasarın azaltılmasında başarılı bir şekilde kullanılmıştır<sup>19,20</sup>.

**Serbest Radikal Hasarının Önlenmesi:** Bir ksantin oksidaz inhibitörü olan allopürinolün hipoksik-iskemik hasarda verildiğinde sıçanlarda beyin hasarını önlediği gösterilmiştir. Allopürinolün etkisi basit bir enzim inhibisyonundan ziyade nötrofillerden lizozomal enzimlerin salınımının baskılanması ve hidroksil serbest radikallerin temizlenmesi şeklindedir. Zamanından önce doğan bebeklerde 20 mg/kg dozunda kullanıldığında etkili olmadığı bulunmuştur. Doz 40 mg/kg' a çıkıldığında serbest radikal oluşumunda azalma olduğu ve klinik düzelmenin daha iyi olduğu gösterilmiştir

Serbest radikal hasarın oluşumunda serbest demirin rol aldığı ve elektron transferi yaparak reaksiyonları hızlandırdığı gösterilmiştir. Bu düşünceden yola çıkarak sıçanlara desferrioksamin uygulanmış ve demir şelasyonu sağlanmaya çalışılmıştır. Bu uygulamanın lipid peroksidasyonunu ve nörolojik hasarı azalttığı görülmüştür. Nitrik oksit sentetaz inhibitörü olan nitro-L-arginin, yine sıçan modelinde kullanılarak arteriyel oklüzyon ve buna bağlı hasar azaltılabilmektedir.

Serbest radikal oluşumu tüm bunlara rağmen önlenememişse C ve E vitaminleri, mannitol, barbiturat, superoksit dismutaz (SOD) ve katalaz kullanılarak oluşmuş olan radikaller temizlenmeye çalışılabilir. SOD ve katalazın koruyucu veya tedavi amaçlı olarak kullanıldığı hayvan deneylerinde iskemiye bağlı hasarın azaldığı gösterilmiştir. SOD, zamanından önce doğan respiratuvar distresli bebeklerde bronkopulmoner displaziye önlemek amacıyla kullanılmış ve beyin hasarını da azalttığı görülmüştür. Kalsiyumun hücre içine girişini engelleyen kalsiyum kanal blokerleri hayvan deneylerinde nöronal hasarı önlemiştir, ancak bu ilaçların negatif inotropik etkilerinden dolayı asfiktik bebeklerde kullanımı pek önerilmemektedir. Son zamanlarda NMDA reseptör antogonistleri üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. Çünkü hipoksi ve iskemi sonrasında fazla miktarda glutamat salınmakta bu da NMDA reseptörleri yoluyla hücre içine kalsiyum girmesine neden olmaktadır. NMDA antagonisti olan MK-801 maddesi sıçanlarda denenmiş ve hipoksik hasardan hemen sonra verildiğinde %90 oranında koruma sağlanmıştır<sup>31</sup>. Hasardan iki saat sonra

uygulanması durumunda ise koruma oranı %75' e düşmüştür. MK-801 son derece toksik olması nedeniyle şimdilik klinik kullanımı mümkün değildir.

Magnezyumun' da NMDA iyon kanallarını bloke ettiği ve deneysel hipoksik iskemik hasar oluşturulduktan hemen sonra sistemik olarak uygulandığında nöronal hasarı azalttığı gösterilmiştir<sup>9</sup>. Aslında Mg obstetride uzun zamandan beri kullanılmaktadır. Mg verilen annelerin bebeklerinde ventrikül çevresine veya içine kanama ve serebral palsinin daha az görüldüğü bulunmuştur.

**Hipotermi:** Hipotermi beyinin metabolizma hızını azaltmakta, serbest radikal hasarını sınırlandırmakta, eksitatör aminoasit salınımını azaltmakta ve lipid peroksidasyonunu azaltmaktadır. Hipoksi ve iskemi sonrası hipotermi oluşturulmasının nöronal hasarı önlediği gösterilmiştir<sup>12</sup>. Fakat hipoterminin diğer sistemik kötü etkileri nedeniyle sadece başın soğutulması önerilmektedir. Yapılan yeni çalışmalar başın tek başına soğutulmasının HİBH' de yeterli olmadığını göstermektedir. Son çalışmalarda sistemik hipotermi uygulamasının tedavide daha etkili olduğu söylenmektedir.

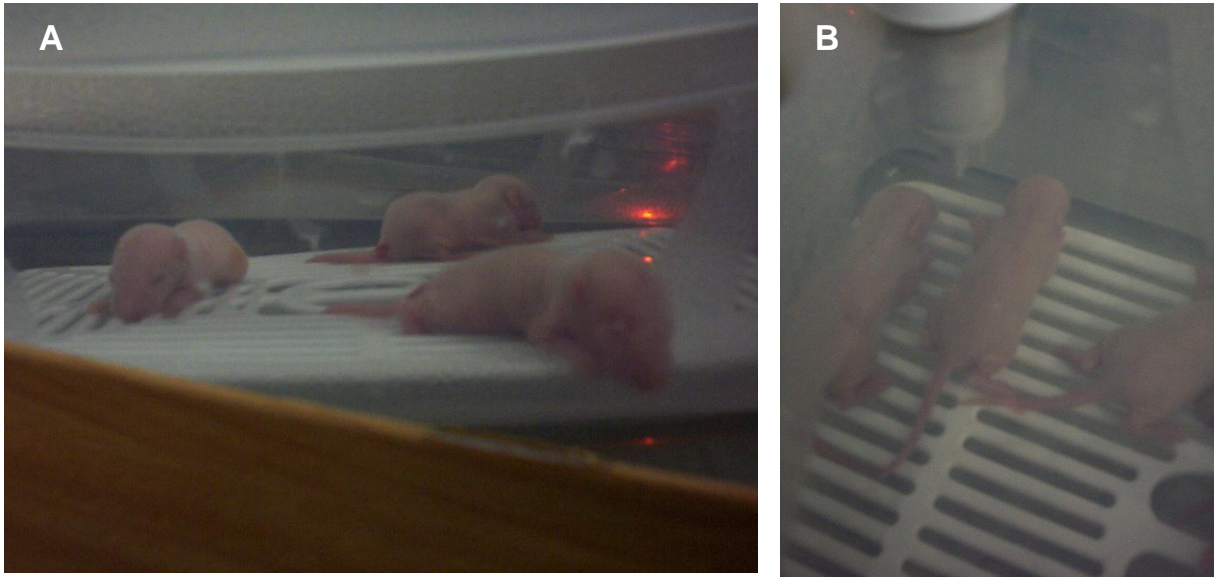
## GEREÇ VE YÖNTEMLER

**Çalışma Ekibi:** Bu çalışma Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Çocuk Cerrahisi ve Patoloji Anabilim Dalları tarafından yürütüldü.

**Etik Komite Onayı:** Çalışma için Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığından 01.12.2004 tarih, 24/3, B.30.2.MEÜ.0.01.00.00/3160 numaralı etik komite onayı alındı. Çalışma Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.

**Gereçler:** Deney sırasında; halotan inhalasyonu için pamuk ve huni, sıçanların pozisyonunu sabitlemek için flaster, diseksiyon için mikroskop ve çeşitli ebatlarda pens, bistüri, cildin kapatılması için 6-0 ipek ve portegü, ilaç ve serum fizyolojik (SF) uygulaması için insulin iğneleri, hipoksi odacığı, azot tankı, oksijen tankı, oksimetre, hava iletimi için ara bağlantı hortumları ve T tüp, sıçanların ısıtılması için ısıtıcı tabla (benmary), ısının kontrolü için termometre, dekapitasyon için pens ve bistüri, çıkarılan beyinleri korumak için saklama kapları kullanıldı.

Boyutu 20x15x9 cm olan tek bir hava giriş borusu ile havanın çıkmasına izin verirken, içeriye hava girmesine izin vermeyen bir çıkış borusu olan hipoksi odacığı oluşturuldu (Resim 1).



**Resim 1. Hipoksi Odacığı (A: Yandan, B: Üstten Görünüm, 20x15x9 cm<sup>3</sup>).**

**Deney Hayvanları:** Bu çalışmaya, ağırlıkları 15-18 g arasında değişen, Wistar cinsi, 100 adet yedi günlük yavru sıçan dahil edildi.

## Yöntem

**İlaç:** ABT- 491 (Sigma) 0.4 mg/kg intraperitoneal (i.p.) yoldan 0.5 ml SF içinde verildi.

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

On adet anne sıçanın yavruları rasgele seçilerek, cinsiyet farkı gözetmeksizin beş ayrı gruba ayrıldı. Sıçanların kuyrukları, gruplar için belirlenen renkli kalemlerle boyanarak işaretlendi. Tüm sıçanlara halotan emdirilmiş pamuk ile bir iki dakika inhalasyon anestezi verildi. Sıçanlar uyandıktan sonra doz tekrarlandı. Halotan ile anesteziyi takiben sıçanlar işlem yapılacak masaya dört ayağından flasterle sabitlendi. Ardından boyunda orta hattan kesi yapılarak, mikroskop altında sağ karotid arter bulundu. Kontrol grubu hariç tüm sıçanların karotid arterleri bağlandı.

Sağ ana karotid arterleri bağlanan yavru sıçanlar derlenme ve beslenme süreci için anne sıçanların yanında üç saat bırakıldı. Bu sürecin sonunda ilaç veya SF uygulaması yapılan yavru sıçanlar, iki saat hipoksi odacığında bırakılarak HİBH deneysel olarak oluşturuldu. Hipoksi odacığının kapağına, içerideki havanın oksijen yüzdesini ölçmek için oksimetre algacı yerleştirildi. Sıçanlar hipoksi odacığına yerleştirildikten sonra hipoksi odacığının kapağı kapatıldı. Sıçanların ısılarının korunması için hipoksi odacıkları ısıtıcı tabla içerisine konuldu. Hipoksi odacığına bir T tüp aracılığı ile %8 yoğunlukta oksijen ve %92 yoğunlukta azot gazları içeren gaz verildi. Hipoksi odacığındaki oksijen yoğunluğu oksimetre ile sürekli takip edilerek %8' lik oran korundu.

**Birinci Grup (Kontrol):** Sıçanlara anesteziyi takiben sadece boyun diseksiyonu yapılarak karotid arter bulundu, ancak bağlanmadan diseksiyon alanı dikiş ile kapatıldı.

**İkinci Grup:** Hipoksi öncesinde 0.5 ml SF i.p. verildi.

**Üçüncü Grup:** Hipoksi sonrasında 0.5 ml SF i.p. verildi.

**Dördüncü Grup:** Hipoksi öncesinde ABT-491 verildi.

**Beşinci Grup:** Hipoksi sonrasında ABT-491 verildi.

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

Kontrol grubundaki sıçanlardan ikisi karotid arterin kopmasıyla kanama sonrası, biri halotan anestezisi sırasında, biri de hipoksi odacığında öldü. İkinci gruptaki sıçanlardan altısını anne sıçan yedi. Üçüncü grup sıçanların ikisi karotid



arterin kopması sonucunda kanama ile öldü, altısını anne sıçan yedi. Dördüncü gruptaki sıçanlardan ikisi karotid arterin bağlanması sırasında, diğer ikisi anestezi sırasında öldü. Beşinci gruptaki sıçanlardan biri karotid arterin kopması ve kanama sonucu öldü. Böylece birinci gruptan 16, ikinci gruptan 14, üçüncü gruptan 12, dördüncü gruptan 16 ve beşinci gruptan 19 adet sıçan olmak üzere toplam 77 sıçan ile deney tamamlandı.

### **Deneyin Bitiriliş Şekli**

Deney sonunda servikal dislokasyon ile ötenazi uygulandı. Beyin bütünlüklerini bozmadan dekapitasyon yapıldı ve kafatasından çıkarılan beyin örnekleri bekletilmeden %10' luk nötral formaldehid içeren kaplar içerisine konuldu.

### **Histopatolojik Değerlendirme**

Deney sonunda çıkarılan beyinlerde TUNEL ve Kaspaz-3 yöntemleri ile immünohistokimyasal olarak "apoptozis" 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 hemisferleri 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. Hipoksi ve 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 5 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. Fotoğraflama işlemi Nikon dijital kamera, DS-L1) ile yapıldı.

### **TUNEL Metodu**

Nöronlardaki DNA fragmentasyonunu 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 1 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 Metodu**

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

### **Apoptozisin Değerlendirilmesi**

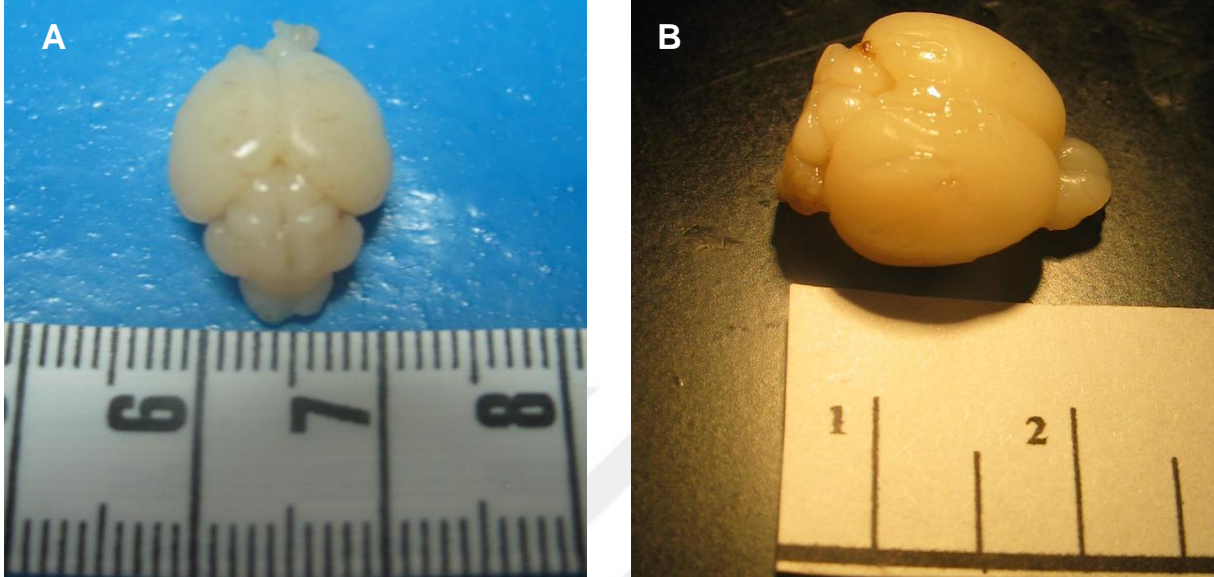
Sağ hemisferleri doku boyası ile işaretlenen koronal beyin kesitleri, TUNEL metodu ve Kaspaz immünohistokimyasal boyama işlemlerinden sonra ışık mikroskopunda değerlendirildi. Her iki taraf hemisfer ayrı olarak değerlendirildi ve her iki taraftaki subtalamik nükleuslar, hipokampus ve parietal korteksteki 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 hemisfer için sayım yapılacak alanlar seçildi. Sayım için uygun 5 alan X400 büyütme (her büyük büyütme =152  $\mu\text{m}^2$ , toplam alan 760  $\mu\text{m}^2$ ) tarandı. TUNEL ve Kaspaz-3 ile pozitif boyanan toplam nöron sayısı gözlenen alanlara göre hesaplandı.

### **İstatistiksel Yöntemler**

Apoptotik hücre sayıları ortalama  $\pm$  S.D. olarak hesaplandı. İstatistiksel farklılıkların karşılaştırılmasında ANOVA ve Tukey testleri yapıldı. P değerinin 0.05' in altında olması anlamlı olarak değerlendirildi.

## BULGULAR

Makroskopik olarak bütün gruplardan elde edilen beyinlerde; her iki hemisfer de normal görünümdeydi (Resim 2).



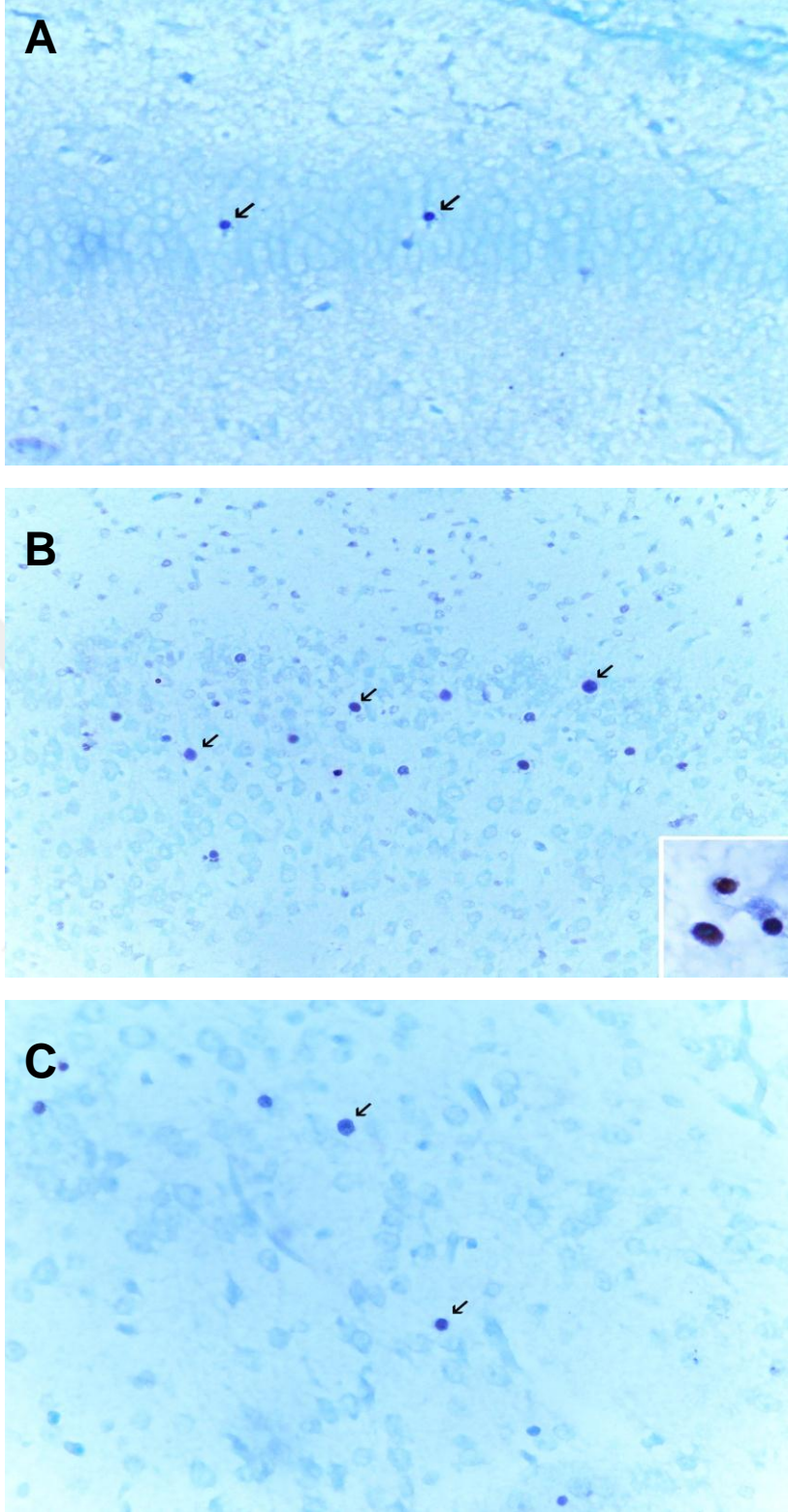
**Resim 2. Beyinlerin Makroskopik Görünümü (A: Üstten, B: Yandan).**

Ayrıca koronal kesitler yapıldığında da normal makroskopik bulgular mevcut olup; kanama, ödem ve infarkt alanı saptanmadı. Rutin hematoksilin eozin boyası ile apoptotik nöronlar normal morfoloji sergileyen nöronlara göre yuvarlak konturlu, 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 ve iskemi modeliyle beyindeki apoptotik hücre sayısında artış gözlemlendi (Resim 3). Hipoksi öncesi (grup 2) ve hipoksi sonrası (grup 3) serum fizyolojik verilen yavru sıçanlardaki ortalama apoptotik hücre sayıları sırasıyla  $38 \pm 11$  ve  $36 \pm 15$  iken; grup 1 (kontrol)'in ortalama apoptotik hücre sayısı  $3 \pm 1$  olarak bulundu.



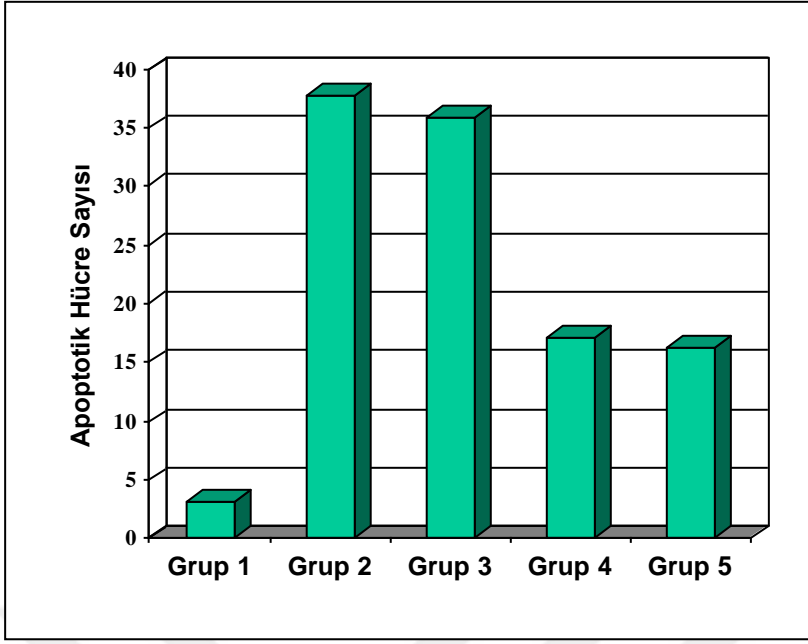
**Resim 3. Hipokampal Nöronlarda TUNEL Yöntemiyle Apoptotik Hücrelerin Gösterilmesi (A; Kontrol, B; Serum Fizyolojik ve C; ABT-491. Zemin boyası Metil Yeşil, X 400).**

Grup 2 ve 3' teki sıçanlarda beyinlerinin sağ yarısında TUNEL yöntemiyle saptanan ortalama apoptotik hücre sayıları grup 1' dekilerle karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p=0.0001$ ), (Şekil 10).

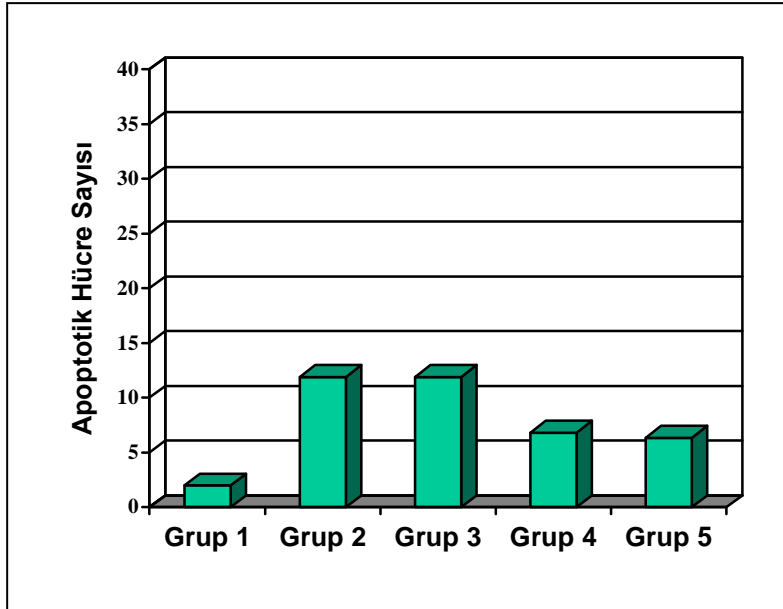
Beyinin sağ yarısında TUNEL yöntemiyle saptanan apoptotik hücre sayılarının değerlendirilmesinde; hipoksi öncesi veya sonrası ABT-491 uygulamasının beyindeki apoptotik hücre sayısını azalttığı izlendi (Resim 3) (Şekil 10). Hipoksi öncesi ABT-491 uygulanan sıçanlardaki (grup 4) apoptotik hücre sayısı  $17 \pm 4$  olarak bulundu. Bu sayı hem hipoksi öncesi (grup 2) hem de hipoksi sonrası (grup 3) serum fizyolojik verilen sıçanlarda saptanan apoptotik hücre sayılarından istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşüktü (sırasıyla  $p=0.0001$  ve  $p=0.001$ ). Hipoksi sonrası ABT-491 uygulanan sıçanlardaki (grup 5) apoptotik hücre sayısı  $16 \pm 3$  olarak bulunurken; hem hipoksi öncesi (grup 2) hem de hipoksi sonrası (grup 3) serum fizyolojik verilen sıçanlarda saptanan apoptotik hücre sayılarından istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmış bulundu (sırasıyla  $p=0.0001$  ve  $p=0.001$ ). Hipoksi öncesi ABT-491 verilen gruba hipoksi sonrası ABT-491 verilen grubun beyinlerinin sağ yarısında TUNEL yöntemiyle saptanan apoptotik hücre sayıları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi ( $p=0.496$ ).

Beyinin sol yarısında TUNEL yöntemiyle yapılan apoptotik hücre sayılarının değerlendirilmesinde; grup 2 ve grup 3' teki ortalama apoptotik hücre sayısı sırasıyla  $12 \pm 3$  ve  $12 \pm 3$  olup grup 1 (kontrol)' in ortalama apoptotik hücre sayısından ( $2 \pm 2$ ) istatistiksel olarak anlamlı derecede fazlaydı ( $p=0.0001$ ) (Şekil 11). Grup 4 ve grup 5' teki apoptotik hücre sayıları sırasıyla  $7 \pm 2$  ve  $6 \pm 2$  olarak bulunurken; hem hipoksi öncesi (grup 2) hem de hipoksi sonrası (grup 3) serum fizyolojik verilen sıçanlarda saptanan apoptotik hücre sayılarından istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmış bulundu (sırasıyla  $p=0.0001$  ve  $p=0.001$ ) (Şekil 11). Hipoksi öncesi ABT-491 verilen gruba hipoksi sonrası ABT-491 verilen grubun beyinlerinin sol yarısında TUNEL yöntemiyle saptanan apoptotik hücre sayıları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi ( $p=0.554$ ).

Beyinin her iki yarısında TUNEL yöntemiyle yapılan apoptotik hücre sayılarının her bir grup için karşılaştırılmasında; kontrol grubu hariç diğer grupların hepsinde sağ yarısındaki apoptotik hücre sayısı sola göre anlamlı derecede artmış olarak bulundu ( $p=0.0001$ ) (Tablo 5) (Şekil 12).



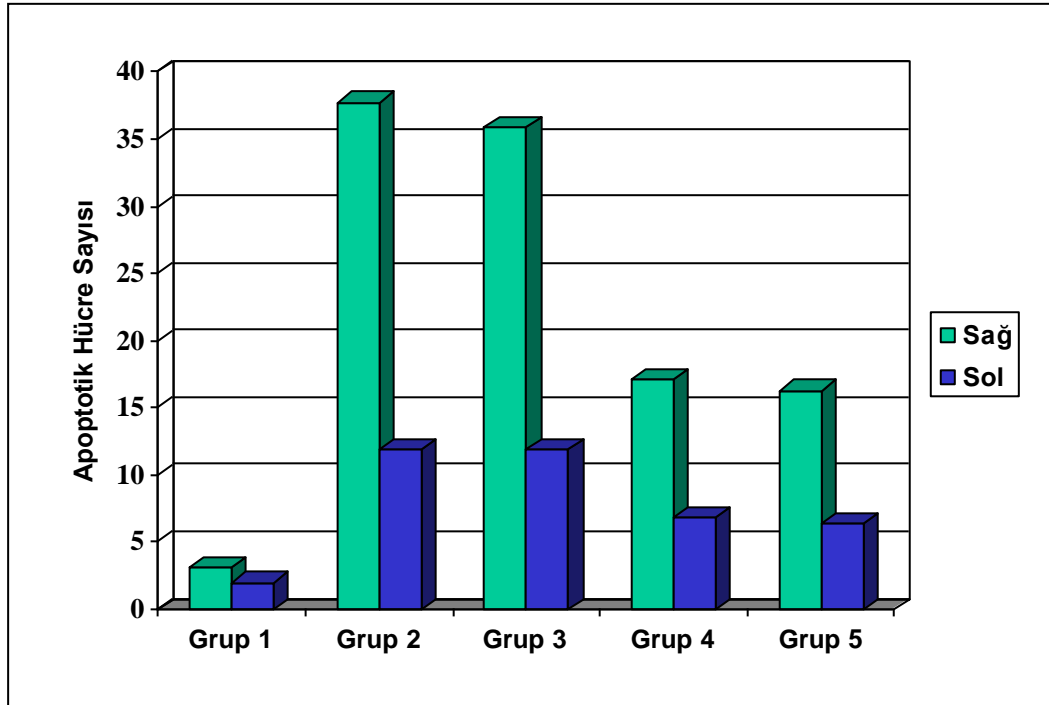
**Şekil 10. Beynin Sağ Yarısındaki Apoptotik Hücrelerin Gruplara Göre Dağılımı (TUNEL yöntemi).**



**Şekil 11. Beynin Sol Yarısındaki Apoptotik Hücrelerin Gruplara Göre Dağılımı (TUNEL Yöntemi).**

**Tablo 5. Gruplara Göre TUNEL Yöntemiyle Beynin Sağ ve Sol Yarısındaki Apoptotik Hücre Sayılarının Karşılaştırılması.**

Grup	1	2	3	4	5
Beynin Sağ Yarısı	3 ± 1	38 ± 11	36 ± 15	17 ± 4	16 ± 3
Beynin Sol Yarısı	2 ± 2	12 ± 3	12 ± 3	7 ± 2	6 ± 2
p	0.91	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001



**Şekil 12. Beynin Sağ ve Sol Yarısındaki Apoptotik Hücre Sayıları (TUNEL Yöntemi).**

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

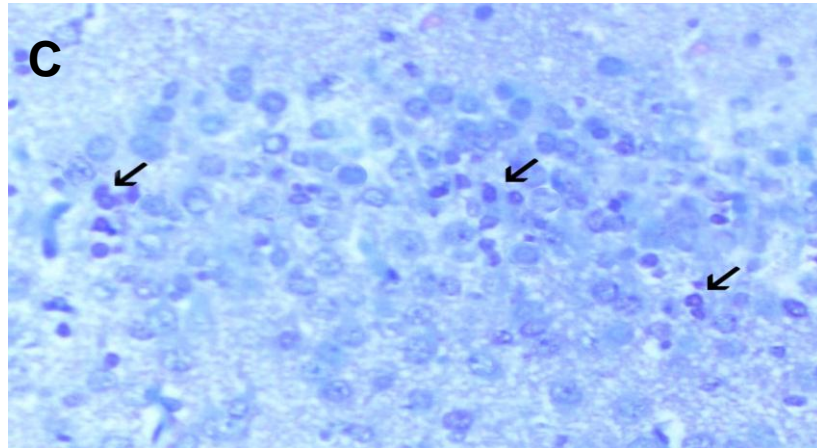
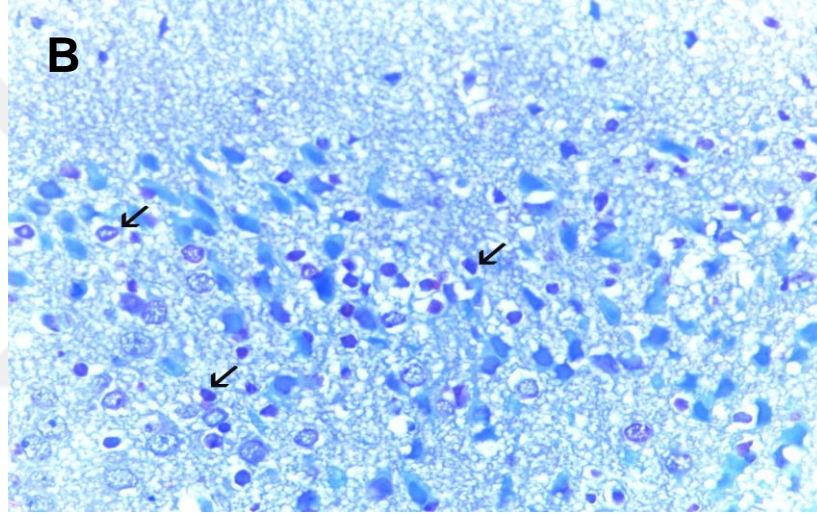
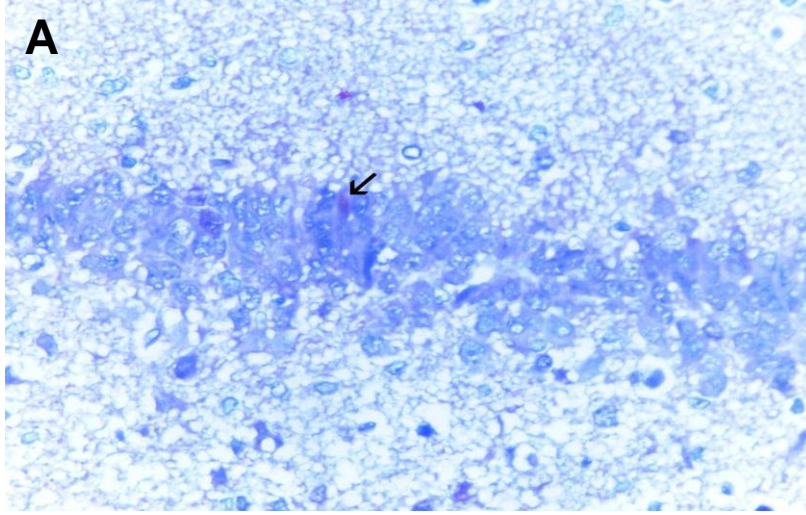
Beyinin sağ yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle yapılan apoptotik hücre sayılarının değerlendirilmesinde; uygulanan hipoksi ve iskemi modeliyle beyindeki apoptotik hücre sayısında artış gözlemlendi (Resim 4). Grup 2 ve grup 3' teki ortalama apoptotik hücre sayıları sırasıyla  $40 \pm 13$  ve  $41 \pm 7$  iken; grup 1 (kontrol)' in ortalama apoptotik hücre sayısı  $3 \pm 1$  olarak bulundu. Grup 2 ve 3' ün Kaspaz-3 yöntemiyle belirlenen ortalama apoptotik hücre sayıları grup 1 ile karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p=0.0001$ ) (Şekil 13).

Beyinin sağ yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle saptanan apoptotik hücre sayılarının değerlendirilmesinde; hipoksi öncesi veya sonrası ABT-491 uygulamasının beyindeki apoptotik hücre sayısını azalttığı izlendi (Resim 4) (Şekil 13). Grup 4' teki apoptotik hücre sayısı  $17 \pm 3$  olarak bulundu. Bu sayı grup 2 ve grup 3' teki apoptotik hücre sayılarından istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşüktü ( $p=0.0001$ ). Grup 5' teki apoptotik hücre sayısı  $18 \pm 3$  olarak bulundu. Bu sayı grup 2 ve grup 3' te saptanan apoptotik hücre sayılarından istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşüktü ( $p=0.0001$ ). Grup 4 ve 5' in beyinlerinin sağ yarısında kaspaz-3 yöntemiyle saptanan apoptotik hücre sayıları arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi ( $p=0.324$ ).

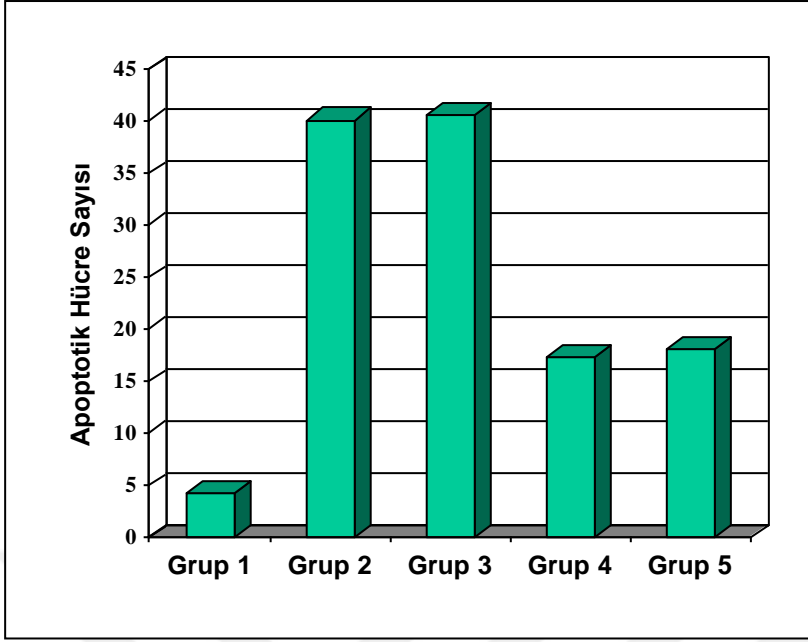
Beyinin sol yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle yapılan apoptotik hücre sayılarının değerlendirilmesinde; grup 2 ve grup 3' teki ortalama apoptotik hücre sayısı sırasıyla  $12 \pm 2$  ve  $12 \pm 2$  olup grup 1' den ( $3 \pm 1$ ) istatistiksel olarak anlamlı derecede fazlaydı ( $p=0.0001$ ) (Şekil 13) . Grup 4 ve grup 5' teki apoptotik hücre sayıları sırasıyla  $8 \pm 2$  ve  $8 \pm 3$  olarak bulunurken; grup 2 ve grup 3' ten istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmış bulundu ( $p=0.0001$ ) (Şekil 14). Grup 4 ve 5' in beyinlerinin sol yarısında Kaspaz-3 yöntemiyle saptanan apoptotik hücre sayıları arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi ( $p=0.851$ ).

Beyinin her iki yarısında kaspaz-3 yöntemiyle yapılan apoptotik hücre sayılarının her grup için karşılaştırılmasında; kontrol grubu hariç diğer grupların hepsinde sağ yarıdaki apoptotik hücre sayısı sola göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla olarak bulundu ( $p=0.0001$ ) (Tablo 6) (Şekil 15).

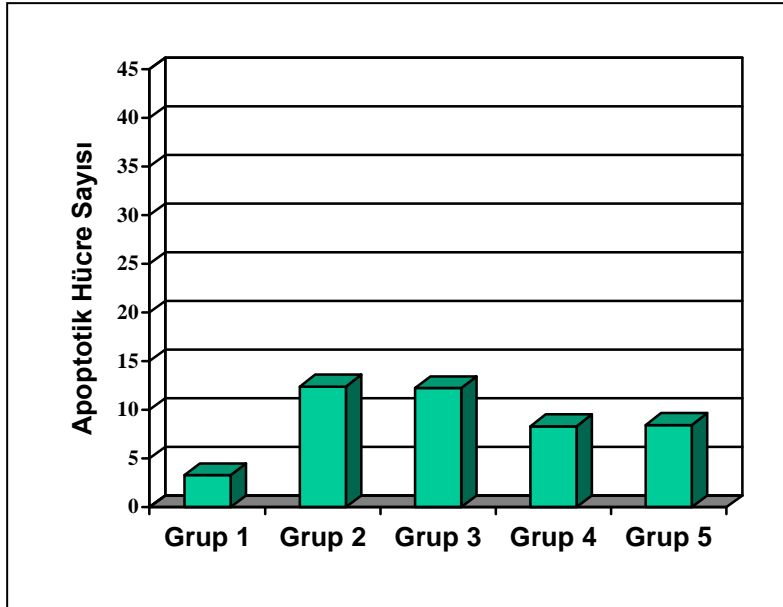




**Resim 4. Hipokampal Nöronlarda Kaspaz-3 Yöntemiyle Apoptotik Hücrelerin Gösterilmesi (A; Kontrol, B; Serum Fizyolojik ve C; ABT-491. Zemin Boyası Mayer Hematoksilen, X 400).**



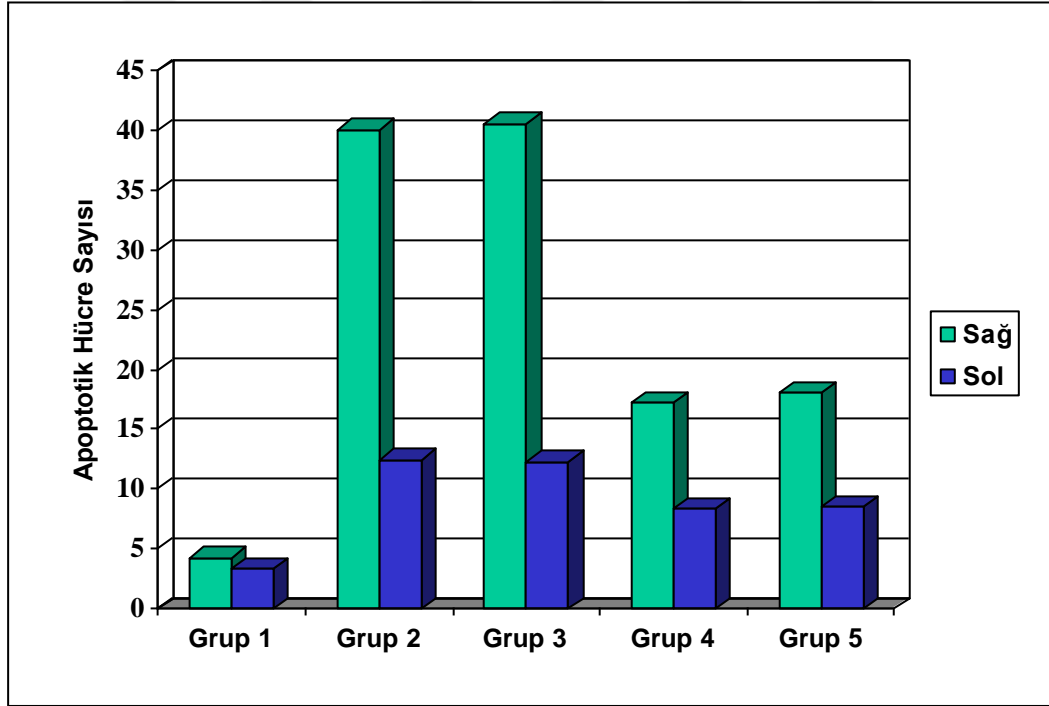
**Şekil 13. Beynin Sağ Yarısındaki Apoptotik Hücrelerin Gruplara Göre Dağılımı (Kaspaz-3 Yöntemi).**



**Şekil 14. Beynin Sol Yarısındaki Apoptotik Hücrelerin Gruplara Göre Dağılımı (Kaspaz-3 Yöntemi)**

**Tablo 6. Gruplara Göre Kaspaz-3 Yöntemiyle Beynin Sağ ve Sol Yarısındaki Apoptotik Hücre Sayılarının Karşılaştırılması**

Grup	1	2	3	4	5
Beynin Sağ Yarısı	4 ± 1	40 ± 13	41 ± 7	17 ± 3	18 ± 3
Beynin Sol Yarısı	3 ± 1	12 ± 2	12 ± 2	8 ± 2	8 ± 3
p	0.120	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001



**Şekil 15. Beynin Sağ ve Sol Yarısındaki Apoptotik Hücre Sayıları (Kaspaz-3 Yöntemi)**

## TARTIŞMA

Normal fetal gelişim için yeterli oksijen desteği gerekmektedir. Fetüste özellikle beyin, oksijen yetersizliğine karşı aşırı duyarlıdır<sup>1</sup>. Perinatal asfiksi ile ilişkili olan iskemik beyin hasarı hipoksik-iskemik ensefalopatinin en sık nedenidir. Perinatal dönemde serebral hipoksi ve iskemi sonucunda ensefalopati, nöbetler, zeka geriliği, epilepsi ve serebral palsi gibi akut ve kronik nörolojik morbiditeler ortaya çıkabilir<sup>1,2</sup>. Yenidoğan ve özellikle de zamanından önce doğanlar, oksidatif stres için yüksek risk altında olup, reaktif oksijen türlerinin hasarına karşı da oldukça duyarlıdır<sup>1-4</sup>.

İnsanlarda yenidoğan beyininde superoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz göreceli olarak yetersizdir. Ayrıca sinir hücresi zarı çoklu doymamış yağ asitlerinden zengindir. Bu nedenlerden dolayı yenidoğan beyinleri serbest radikal ilişkili hasar için özellikle risk altındadır<sup>5,6</sup>.

Her dokuda olduğu gibi beyinin oksijenizasyonu da, kan akımı miktarı ve arteriyel oksijen yoğunluğu olmak üzere iki önemli faktöre bağlıdır. Değişik sebepler nedeniyle beyin kan akımının kesilmesi ve beyindeki oksijenin azalması söz konusu olabilir. Oksijenin giderek azaldığı asfiksi, taşıyıcı protein olan hemoglobinin yetersiz olduğu anemi, hemoglobine karbon monoksitin geri dönüşümsüz olarak bağlanması ve ciddi hipotansiyon gibi durumlarda tama yakın serebral hipoksi gelişebilir<sup>6</sup>. Geçici ya da kalıcı iskemik hipoksik durumlarda, beslenmedeki bozulmanın yanı sıra dokuda biriken zararlı maddeler nedeniyle de nöronlar hasarlanır. Hipoksik durumun ortadan kalkması için kan akımının düzelmesi ve oksijenizasyonun normale gelmesi gerekmektedir.

Serebral iskemi, zamana bağlı olarak değişik moleküler olaylar zincirini tetikler ve hücre içi ATP depoları tükenir. Anaerobik glikolizin başlamasıyla birlikte laktik asidoz gelişerek membran depolarizasyonuna neden olur. Glutamat eksitotoksitesisi gelişir<sup>29,30</sup>. Hücre içine kalsiyum, sodyum ve su girerek hücreyi şişirir. Kalsiyum bağımlı enzimler aktive olarak mitokondriyal disfonksiyon gelişir ve serbest radikaller birikir<sup>6</sup>. İmmün sistem aktive olur. İnflamatuar reaksiyonla birlikte sitokinler, adezyon molekülleri ve diğer inflammatuar mediatörler salınır. Bazı genlerde aşırı ekspresyon olur. Bütün bu olaylar nöronal ölümle sonuçlanır<sup>54-56</sup>.

İnsanlardaki serebral hipoksik-iskemik hasarı anlayabilmek için değişik deneysel hayvan modelleri oluşturulmuştur. Bu modellerde serebral kan akımı ve oksijen konsantrasyonu azaltılarak serebellum<sup>57</sup>, korteks<sup>58</sup>, talamus<sup>59</sup>, limbik<sup>60</sup> ve vizüel sistemler<sup>61</sup> gibi beyin bölgelerinin nasıl etkilendiği incelenmiştir. Bu

çalışmalarda ortak karotid arter ve/veya orta serebral arterin değişik zamanlarda tıkanmasıyla beyindeki oksijen konsantrasyonu azaltılmaya çalışılmıştır<sup>62</sup>.

Bazı çalışmalarda ise aynı işlem için sıçanlara değişik konsantrasyonlarda gaz kombinasyonları uygulanmıştır. Bu modellerde normal atmosferik basınçta %5 oksijen ve %95 azot<sup>58,63,64</sup> ya da %7-10 oksijen kullanılmıştır<sup>65</sup>. Sonuçta hayvan modellerinde hipoksi oluşturabilmek için hipoksi odacıkları kullanılmıştır<sup>66-67</sup>.

Hayvan modellerinde beyne giden kan akımını azaltmak için genel olarak kullanılan yöntem sağ medial serebral arter ve dallarının ya da her iki karotid arterlerin bağlanmasıdır. Bu modellerde aynı taraflı kortekste kalıcı veya geçici iskemi taklit edilmektedir<sup>68</sup>. Arter bağlanması atravmatik damar klempleri<sup>69</sup>, medial serebral arter koterizasyonu<sup>70</sup>, karotid arterin naylon dikiş ile bağlanması<sup>54</sup> ya da internal karotid artere geçici olarak intraluminal flaman yerleştirilerek sağlanmıştır<sup>71</sup>.

Fetüs gelişiminin değişik dönemlerinde hipoksi ve iskemi oluşturulmuştur. Gebeliğin son döneminde veya doğum sırasında tam bir hipoksi ve iskemi oluşturulması uterin vasküler yapıların tamamen klempe edilmesi<sup>72</sup>, umbilikal plesental sirkülasyonun embolizasyonu<sup>73</sup>, doğum öncesinde dekapitasyon<sup>74</sup> ve yenidoğan hayvanların tek taraflı karotid arterlerinin tıkanmasıyla<sup>76</sup> oluşturulabilmektedir.

Bizim deneysel çalışmamızda 7 günlük sıçanlar kullanılmıştır. Özellikle insanların beyin gelişimi göz önüne alındığında, 7 günlük sıçan yavrularının beyinlerinin insanlardaki perinatal dönem için uygun olduğu düşünülmektedir<sup>7</sup>. Hayvan modellerinde beyinin gelişimsel anatomisinin karşılaştırılmasıyla ilgili sınırlı sayıda çalışma olmasına rağmen; Dobbing ve Sands türlerine göre beyinin büyüme oranlarını karşılaştırmıştır<sup>76</sup>. Bu oranlar beyin olgunlaşmasının düzeyini ölçmek için önem taşımaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, deneylerde sık kullanılan 8 memeli hayvanın beyin bölgelerinin ve sinir sistemlerinin insanlardaki yenidoğanlarla uyumlu olduğunu göstermektedir<sup>77</sup>. Clancy ve arkadaşlarının yaptığı bu karşılaştırmalarda neonatal hipoksi modeli oluşturulan 7 günlük yavru sıçanların beyinlerinin insanlardaki perinatal dönem için uygun olduğu düşünülmektedir<sup>77</sup>.

Günümüzde neonatal HİBH' nin değerlendirildiği deneysel çalışmalarda en çok kullanılan model Rice ve Vannucci tarafından tarif edilen yöntemdir<sup>78</sup>. Bu modelde tek taraflı karotid bağlanmasına ek olarak deney hayvanları hipoksi odacıklarına konulmaktadır. Çalışmamızda bu modele uygun olarak 7 günlük yavru sıçanların sağ

ana karotid arterleri bağlanmış ve daha sonra sıçanlar %8 oksijen ve %92 azot gazları içeren hipoksi çadırına bırakılarak hipoksik-iskemik model oluşturulmuştur.

Hücre ölümü biyokimyasal ve morfolojik kriterlere göre nekrotik veya apoptotik olarak sınıflandırılabilir<sup>7,40</sup>. Nekrotik hücre ölümü genellikle hücre zarı bütünlüğünün bozulması, sitoplazmik içeriğin hücre dışına çıkması ve inflamatuvar yanıtla karakterizedir. Apoptozisteki ölümden ise düzenli ve enerji gerektiren bir süreçtir. Apoptozisin erken döneminde nükleer yoğunlaşma ve kontraksiyon olurken; membranlar ve organeller son döneme kadar sağlam kalır. Deneysel hayvan modelimizde, sıçanlarda uygulanan hipoksi ve iskemiden 3 saat sonra beyindeki apoptotik hücre sayısında artış gözlenmiştir. Hipoksi ve iskemi uygulayarak serum fizyolojik verdiğimiz gruplardaki apoptotik hücre sayıları, hipoksi ve iskemi yapmayıp sadece boyun diseksiyonu yaptığımız gruptan daha yüksek bulunmuştur. Blomgren ve arkadaşlarının çalışmasında da yenidoğan sıçanlarda yapılan hipoksi ve iskemiden 3 saat sonra beyinde apoptotik hücrelerin arttığı gösterilmiştir<sup>79</sup>.

Olgunlaşmamış beyinde düşük enerji gereksinimi ve güçlü uyum mekanizmaları hipoksi ve iskemiye karşı korunmayı sağlarken; ciddi ve uzamış hipoksi ve iskemide nörotoksik olaylar zinciri aktive olur<sup>1,4</sup>. Zamanında doğan bebeklerde nöronal bağlantılar içerisindeki sinirler eksitotoksik hasardan kolay etkilenir. Erişkin sinir sistemi ile karşılaştırıldığında gelişmekte olan beyinde apoptozis ve apoptotik-nekrotik geçiş formu daha baskındır<sup>7,40</sup>. Tıpkı olgunlaşmamış hayvan modellerinde olduğu gibi, hipoksi ve iskemi sonrası ölen bebeklerin beyin dokularında yapılan çalışmalarda da apoptozis gösterilmiştir<sup>40</sup>.

Kemirgenlerde yapılan hipoksi ve iskemi sonrasında apoptotik ve nekrotik hücreler karşılaştırıldığında; serebral korteks ve bazal ganglionlarda çoğunlukla apoptotik hücrelerin olduğu gösterilmiştir<sup>80</sup>. Aynı çalışmanın elektron mikroskopik incelemelerinde yedi günlük sıçanların beyinlerinin değişik bölgelerinde %50'den fazla apoptozis gözlenmiştir. Bunun aksine erişkin sıçanlarda yapılan orta serebral iskemi modelinde apoptozisin nekroza oranı 1/6'dan daha az bulunmuştur<sup>7</sup>. Yenidoğan sıçanlardaki iskemi modellerinde, erişkin sıçanlardaki tipik yaygın eosinofilik iskemik nöronlar yerine irregüler kromatinli nekrotik hücreler görülür. Hipoksi ve iskemi oluşturulan yedi günlük sıçanların beyinlerinin çoğu bölgelerinde apoptozisten nekroza giden geçiş formunda morfolojik değişiklikler izlenir<sup>1,7,40</sup>.

Çalışmamızda beyindeki apoptozisin histopatolojik değerlendirilmesi için seçilen bölgeler subtalamik nükleuslar, hipokampus ve parietal korteksten

oluşmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda bu bölgelerdeki nöronların hipoksik-iskemik hasara daha çok duyarlı olduğu gösterildiği için<sup>1,2,4,6,25-28</sup>, bizim çalışmamızda da özellikle beyinin bu bölgeleri incelenmiştir. Olgunlaşmamış kemirgenlerin beyinlerine eksitotoksinlerin injeksiyonundan sonra benzer apoptotik-nekrotik geçiş formu özelliklerinin oluşması, bu olayın eksitotoksik kaskad ile tetiklendiğini göstermektedir<sup>29</sup>.

Olgunlaşmamış beyindeki hipoksi ve iskemi sonrası gelişen nörodejenerasyonda apoptozis ve apoptotik-nekrotik geçiş formu belirgindir. Apoptozis ve apoptotik-nekrotik geçiş formunun dengelenmesi hasar sonrası eksprese olan değişik apoptotik ve antiapoptotik proteinlerin dengesine bağlıdır<sup>7,40</sup>. Bu sürecin detaylı olarak araştırılması yeni nöroprotektif stratejilerin geliştirilmesi için önem taşımaktadır.

Sistein proteaz (Kaspaz) enzim olan Kaspaz-3 birçok hücrede apoptotik süreçte rol oynamaktadır. Cheng ve ark. Kaspaz-3 enzim aktivitesinin inhibisyonu ile yedi günlük sıçan beyinlerinde hipoksik-iskemik hasarın önlenebileceğini göstermişlerdir<sup>81</sup>. Bu ve benzeri çalışmaların sonuçları olgunlaşmamış beyindeki kaspaz bağımlı apoptozisin erişkin beyninden daha önemli rol oynadığını göstermektedir. Kaspaz inhibitörleri ile NMDA antagonistlerinin kombinasyonlarının tek başına verilmelerinden daha etkili olmaları; her iki mekanizmasında sorumlu olduğunu göstermektedir<sup>5-7</sup>.

HİBH' nin değerlendirilmesi için geliştirilen hayvan modellerinin çok çeşitli olmasının yanı sıra, tedavi için verilecek maddelerin; modelde kullanılan hayvan üzerindeki farmakokinetik ve metabolizma özelliklerinin de insanla uyumlu olması gerekmektedir. Günümüze kadar neonatal hipoksi-iskemik beyin hasarı oluşturulmuş hayvan modellerinde çok değişik tedavi yöntemleri kullanılmıştır Bunlardan bazıları PARP inhibitörleri<sup>8</sup>, magnezyum<sup>9</sup>, hiperbarik oksijen<sup>10</sup>, eritropoetin<sup>11</sup>, hipotermi<sup>12</sup>, NMDA reseptör blokajı<sup>82</sup>, büyüme hormonu<sup>83</sup> ve elektroakupunktur<sup>84</sup>. Anti-eksitotoksik ve antiapoptotik tedavilerin tek başına ya da birlikte kullanımları beyin dokunun hipoksik-iskemik hasara karşı korunmasında umut vaat etmektedir.

Olgunlaşmamış hayvan modellerinde değişik büyüme faktörlerinin apoptozisi inhibe etmesi ile hipoksik-iskemik hasarın önlenildiği gösterilmiştir<sup>7</sup>. Kemirgenlerde hipoksi ve iskemi öncesi glikokortikoidlerin verilmesi muhtemelen nükleer reseptör mekanizması ile nöroprotektif etkilidir<sup>85</sup>. Son zamanlarda klinik olarak da nöroprotektif etkileri olan hipotermi üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Hipoterminin

nöroprotektif etkileri apoptozisi azaltarak ya da diğer bir mekanizma olan glutamat salınımı azaltarak olmaktadır<sup>12</sup>.

Eksitatör sinaptik nörotransmisyon, fosfolipazların aktivasyonuna neden olarak sinaptik membrandaki fosfolipid depolarından lipid habercilerin salınımına neden olmaktadır<sup>13,47</sup>. PAF endojen fosfolipid yapılı potent bir fizyolojik mediyatör olup; glutamat salınımı, nöronal kalsiyum iyonizasyonu ve NMDA reseptör aktivasyonunu düzenler<sup>13</sup>. Değişik stimülasyonlar sonucunda beyinde PAF ve doymamış yağ asitleri sentezlenmektedir. Santral sinir sisteminde PAF ikincil haberci olup presinaptik bölgede etkili olmaktadır. Uhl ve arkadaşları, PAF' in sistemik ve lokal uygulamalarının serebral mikrosirkülasyon üzerindeki etkileri üzerinde çalışmalar yapmıştır<sup>14,15</sup>. Değişik hayvan modellerinde, PAF' in santral sinir sisteminde gelişen iskemideki rolüyle ilgili çalışmalar yapılmıştır. Maternal-fetal kan akımının durdurulmasını takiben 20 dakika içerisinde PAF üretiminde artış olduğu gösterilmiştir<sup>16</sup>. Deneysel inme modelinde, 25 dakika iskemi ve 2 saat reperfüzyon yapıldığında; omurilikte PAF artışı olmaktadır<sup>17</sup>.

Hayvan modellerinde böbrek<sup>50</sup> ve akciğer<sup>51</sup> gibi değişik organlardaki iskemi/reperfüzyon hasarında PAF reseptör antagonistlerinin yararlı etkileri bildirilmektedir. HİBH oluşturulmuş hayvan modellerinde de değişik PAF antagonistlerinin etkileri gösterilmiştir. Panetta ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda da; iskemi-reperfüzyon oluşturulması sonucunda beyinde doymamış yağ asitlerinin arttığı gösterilmiştir<sup>86</sup>. PAF antagonisti olan BN 52021 verilmesiyle iskemiye bağlı artan bu yağ asitleri azalmış ve beyindeki kan akımı tekrar düzenlenerek nöroprotektif etkinin sağlandığı gösterilmiştir.

Literatürde HİBH oluşturulan yenidoğan sıçanlarda PAF reseptör antagonistlerinin etkilerini gösteren iki çalışma dikkati çekmektedir. Viswanath ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; hipoksi öncesi ve sonrası iki PAF reseptör antagonisti kullanılmıştır<sup>19</sup>. Sonuçta WEB 2170' in sadece hipoksi öncesi etkili olup, hipoksi sonrası verilmesinin hasarı engellemediği görülmüştür. BN 52021' in ise, gerek hipoksi öncesi gerekse sonrası verilmesinin etkili olmadığı gözlenmiştir. Diğer çalışmada hipoksiden hemen önce ve sonra BN 50730 kullanılmıştır<sup>20</sup>. Liu ve arkadaşları HİBH oluşturulan neonatal sıçanlarda BN 50730 verilmesinin hem doku kaybını azalttığını hem de öğrenme ve hafıza yetisini koruduğunu göstermişlerdir<sup>20</sup>. Diğer taraftan hipokampal nöronlarda yapılan bir çalışmada; rekombinant plazma tip PAF asetil hidrolazın, NMDA ile uyarılmış apoptozisi konsantrasyona bağlı olarak



azalttığı ve nöroprotektif etki sağladığı gözlenmiştir<sup>21</sup>. Böylece rekombinant plazma tip PAF asetil hidrolazın eksitotoksite, epileptik beyin hasarı, kafa travması, inme, glokom ve nörodejeneratif hastalıklar gibi olaylarda PAF antagonistlerine karşı alternatif olabileceği ileri sürülmüştür.

Bizim çalışmamızda oldukça güçlü bir PAF reseptör antagonisti olan ABT-491 kullanılmıştır<sup>23</sup>. Literatür taramamızın sonuçlarına göre, HİBH oluşturulan hayvan modellerinde ABT-491 kullanımı ve apoptozis üzerine etkileriyle ilgili yayımlanmış bir makale dikkati çekmemiştir. Bizim çalışmamızda hipoksi öncesi ve hipoksi sonrasında ABT-491 kullanılmıştır. Hem hipoksi öncesi ve hem de hipoksi sonrası ABT-491 uyguladığımız gruplar serum fizyolojik verileriyle karşılaştırıldığında; apoptotik hücre sayılarında anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Bilgilerimize göre çalışmamız; HİBH oluşturulan neonatal sıçanlarda PAF reseptör antagonisti ABT-491' in apoptozis üzerine olumlu etkilerini gösteren ilk çalışmadır. Bulgularımıza göre, gerek hipoksi öncesi gerekse sonrası ABT-491 verilmesi, HİBH oluşturulan neonatal sıçanlardaki apoptozisi azaltmaktadır.

## 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 ( $p=0.0001$ ).

Gerek hipoksi öncesi gerekse hipoksi sonrası ABT-491 verilen yenidoğan sıçanların beyinlerindeki apoptotik hücre sayılarının, serum fizyolojik verilen yenidoğan sıçanlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir ( $p=0.0001$ ).

Her bir grup için beyinin sağ ve sol yarısındaki apoptotik hücre sayılarının karşılaştırılmasında; kontrol grubu hariç diğer grupların hepsinin sağ yarısındaki apoptotik hücre sayısı sola göre anlamlı derecede artmış olarak bulunmuştur ( $p=0.0001$ ).

Bilgilerimize göre, HİBH oluşturulmuş hayvan modellerinde ABT-491 kullanımı ve bunun apoptozis üzerine etkileriyle ilgili yayımlanmış bir makale yoktur. Çalışmamız, bu içerikteki ilk çalışma olup; güçlü bir PAF reseptör antagonisti olan ABT-491' in yenidoğanın HİBH' sinde nöronal apoptozisi azaltarak koruyucu ve/veya tedavi edici etkileri olabileceğini göstermektedir.

## KAYNAKLAR

1. Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, Nakaji W. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing 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. Wiliam LS, Garg BP, Cohen M, et. Al. Subtypes of ischemic stroke in children and young adult. *Neurology* 1997; 49: 1541-45.
4. Vannucci SJ, Hagberg H. Hypoxia–ischemia in the immature brain. *J Exp Biol* 2004; 207: 3149-54.
5. Hossain MA. Molecular mediators of hypoxic–ischemic injury and implications for epilepsy in the developing brain. *Epilepsy Behav* 2005; 7: 204–13.
6. Rodrigo J, Fernandez AP, Serrano J, Peinado M A, Martinez A. The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 26-50.
7. 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.
8. Ducrocq S, Benjelloun N, Plotkine M, Ben-Ari Y, Charriaut-Marlangue C. Poly(ADP-Ribose) Synthase inhibition reduces ischemic injury and inflammation in neonatal rat brain. *J Neurochem* 2000; 74: 2504–11.
9. 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.
10. Calvert JW, Yin W, Patel M, Badr A et. al. Hyperbaric oxygenation prevented brain injury induced by hypoxia–ischemia in a neonatal rat model. *Brain Res* 2002; 951; 1–8.
11. Aydın A, Genç K, Akhisaroğlu M, Yörükoğlu K, Gökmen N, Gönüllü E. Erythropoietin exerts neuroprotective effect in neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Dev* 2003; 27: 494-8.
12. Zhu C, Wang X, Cheng X et. al. Post-ischemic hypothermia-induced tissue protection and diminished apoptosis after neonatal cerebral hypoxia–ischemia. *Brain Res* 2004; 996: 67–75.

13. Bazan NG. Synaptic lipid signaling: significance of polyunsaturated fatty acids and platelet-activating factor. *J Lipid Res* 2003; 44: 2221–33.
14. Uhl E, Pickelmann S, Baethmann A, Schurer L. Influence of platelet-activating factor on cerebral microcirculation in rats: part 1. Systemic application. *Stroke* 1999; 30: 873-9.
15. Uhl E, Pickelmann S, Rohric F, Baethmann A, Schurer L. Influence of platelet-activating factor on cerebral microcirculation in rats: part 2. Local application. *Stroke* 1999; 30: 880-6.
16. Kunievsky B, Yavin E. Production and metabolism of platelet activating factor in the normal and ischemic fetal rat brain. *J Neurochem* 1994; 63: 2144-51.
17. Lindsberg PJ, Jacobs TP, Paakkari IA, Hallenbeck JM, Feuerstein G. Effect of systemic platelet-activating factor (PAF) on the rabbit spinal cord microcirculation. *J Lipid Mediat* 1990; 2: 41-58.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. Arai H. Platelet-activating factor acetylhydrolase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; 68-69: 3-58.
23. 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.
24. 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.

25. Vannucci RC. Hypoxic-ischemic encephalopathy. *Am J Perinatol* 2000; 17: 113-20.
26. 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.
27. Towfighi J, Mauger D. Temporal evolution of neuronal changes in cerebral hypoxia-ischemia in developing rats: a quantitative light microscopic study. *Brain Res Dev Brain Res* 1998; 109: 169-77.
28. Vannucci RC. Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia: relation to perinatal brain damage. *Pediatr Res* 1990; 27: 317-26.
29. Johnston MV. Excitotoxicity in neonatal hypoxia. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2001; 7: 229-34.
30. Choi DW, Rothman SW. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 1990; 13: 171-82.
31. Meldrum B. Possible therapeutic applications of antagonists of excitatory amino acids neurotransmitters. *Clin Sci* 1985; 68: 113-22.
32. Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E et. al. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 1995; 15: 961-73.
33. Dawson DA. Nitric oxide and focal cerebral ischemia: multiplicity of actions and diverse outcome. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1994; 6: 299-324.
34. Mattson MP, Scheff SW. Endogenous neuroprotection factors and traumatic brain injury: mechanism of action and implications for therapy. *J Neurotrauma* 1994; 11: 3-33.
35. Han BH, D'Costa A, Back SA et al. BDNF blocks caspase-3 activation in neonatal hypoxia-ischemia. *Neurobiol Dis* 2000; 7: 38-53.
36. Holtzman DM, Sheldon RA, Jaffe W, Cheng Y, Ferriero DM. Nerve growth factor protects the neonatal brain hypoxic-ischemic injury. *Ann Neurol* 1996; 39: 114-22.
37. Johnston BM, Mallard EC, Williams CE, Gluckman PD. Insulin-like growth factor-1 is a potent neuronal rescue agent after hypoxic-ischemic injury in fetal lambs. *J Clin Invest* 1996; 97: 300-8.

38. Eckenstein FP, Shipley GD, Nishi R. Acidic and basic fibroblast growth factors in the nervous system: distribution and differential alteration of levels after injury of central versus peripheral nerve. *J Neurosci* 1991; 11: 412-9.
39. Segal RA, Greenberg ME. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Ann Rev Neurosci* 1996; 19: 463-89.
40. Sastry PS, Rao KS. Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* 2000; 74: 1–20.
41. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.
42. Kruman II, Mattson MP. Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. *J Neurochem* 1999; 72: 529-40.
43. Schwarz A, Futerman AH. Distinct role for ceramide and glucosylceramide at different stages of neuronal growth. *J Neurosci* 1997; 17: 2929-38.
44. Aloyz RS, Bamji SX, Pozniak CD et. al. P53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors. *J Cell Biol* 1998; 143: 1691-1703.
45. Deshmukh M, Johnson EM Jr. Evidence of novel event during neuronal death: development of competence-to-die in response to cytoplasmic cytochrome C. *Neuron* 1998; 21: 695-705.
46. 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.
47. Chen C, Bazan NG. Lipid signaling: sleep, synaptic plasticity and neuroprotection. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2005; 77: 65-76.
48. Chen C, Bazan NG. Platelet-activating factor inhibits ionotropic GABA receptor activity in cultured hippocampal neurons. *Neuroreport* 1999; 10: 3831-35.
49. Bazan NG, Squinto SP, Braquet P, Panetta T, Marcheselli VI. Platelet-activating factor and polyunsaturated fatty acids in cerebral ischemia or convulsions: intracellular PAF-binding sites and activation of a Fos/Jun/AP-1 transcriptional signaling system. *Lipids* 1999; 26: 1236-42.
50. 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.

51. 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.
52. Volpe JJ. Hypoxic-ischemic encephalopathy. In: Volpe JJ eds. *Neuropathology and Pathogenesis*. 3rd ed. Philadelphia: Neurology of the Newborn, 1995: 279-313.
53. Sarnat HB, Sarnat MS. Neonatal encephalopathy following fetal distress: a clinical and electroencephalographic study. *Arch Neurol* 1976; 33: 696-705.
54. Lerouet D, Beray-Berthart V, Palmier B, Plotkine M, Margail I. Changes in oxidative stress, iNOS activity and neutrophil infiltration in severe transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 2002; 958: 166-175.
55. Kato H, Kogure H. Biochemical and molecular characteristics of the brain with developing cerebral infarction. *Cell Mol Neurobiol* 1999; 19: 93-108.
56. Lee JM, Grabb MC, Zipfel GJ, Choi DW. Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest* 2000; 106: 723-731.
57. Llinas R, Muhlethaler M. Electrophysiology of guinea pig cerebellar nuclear cells in the in vitro, brain stem-cerebellar preparation. 1988; 186: 33-45.
58. Alonso D, Serrano J, Rodriguez J et. al. Effects of oxygen and glucose deprivation on the expression and distribution of neuronal and inducible nitric oxide synthase and on protein nitration in rat cerebral cortex. *J Comp Neurol* 2002; 454: 183-200.
59. Muhlethaler M, Serafin M. Talamie spindles in an isolated and perfused brain preparation in vitro. *Brain Res* 1990; 524: 17-21.
60. De Curtis M, Pare D, Llinas R. The electrophysiology of the olfactory hippocampal circuit in the isolated and perfused adult mammalian brain. *Hippocampus* 1991; 1: 341-54.
61. Muhlethaler M, De Curtis M, Walton K, Llinas R. The isolated and perfused brain the guinea-pig in vitro *Eur J Neurosci* 1993; 5: 915-26.
62. Gümüşlü S, Serteser M, Özben T, Balkan S, Balkan E. Inhibitory role of N-omega-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a potent nitric oxide synthase inhibitor, on brain malondialdehyde and conjugated diene levels during focal cerebral ischemia in rats. *Clin Chim Acta* 1997; 267: 213-23.

63. Matsuoka Y, Kitamura Y, Tooyama I, Kimura H, Taniguchi T. In vivo hypoxia-induced neuronal damage with an enhancement of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity in hippocampus. *Exp Neurol* 1997; 1465: 57-66.
64. Rodrigo J, Alonso D, Fernandez AP et. al. Neuronal and inducible nitric oxide synthase expression and protein nitration in rat cerebellum alter oxygen and glucose deprivation. *Brain Res* 2001; 909: 20-45.
65. Guo Y, Ward ME, Beasjourns S, Mori M, Hussain SNA. Regulation of cerebral nitric oxide production in response of prolonged in vivo hypoxia. *J Neurosci Res* 1997; 49: 89-97.
66. Serrano J, Encinas JM, Salas E et. al. Hypobaric hypoxia modifies constitutive nitric oxide synthase activity and protein nitration in the rat cerebellum. *Brain Res* 2003; 976: 109-19.
67. Castro-Blanco S, Encinas JM, Serrano J et. al. Expression of nitrergic system and protein nitration in adult rat brains submitted to acute hypobaric hypoxia. *Nitric Oxide* 2003; 8: 182-201.
68. Yanamoto H, Nagata I, Hashimoto N, Kikuchi H. Three-vessel occlusion using a micro-clip for proximal left middle cerebral artery produces a reliable neocortical infarct in rats. *Brain Res Brain Res Protoc* 1998; 3: 209-20.
69. West JB. Hypoxia of altitude. *Lancet* 1986; 2: 1097.
70. Fu D, Ng YK, Gan P, Ling EA. Permanent occlusion of the middle cerebral artery upregulates expression of cytokines and neuronal nitric oxide synthase in the spinal cord and urinary bladder in the adult rat. *Neuroscience* 2004; 125: 819-31.
71. Hara K, Suma H, Kozuma K et. al. Long-term outcome of percutaneous transluminal coronary angioplasty and coronary bypass surgery for multivessel coronary artery disease. *Jpn Circ J* 1996; 60: 940-46.
72. Gonzales-Barrrios JA, Escalante B, Valdes J, Leon-Chavez BA, Martinez-Fong D. Nitric oxide and nitric oxide synthases in the fetal cerebral cortex of rats following transient uteroplacental ischemia. *Brain Res* 2002; 945: 114-22.
73. Tolcos M, Harding R, Loeliger M et. al. The fetal brainstem is relatively spared from injury following intrauterine hypoxemia. *Dev Brain Res.* 2003; 143: 73-81.
74. Fernandez AP, Alonso D, Lizasoain I et al. Postnatal changes in the nitric oxide system of the rat cerebral cortex after hypoxia during delivery. *Dev Brain Res* 2003; 142: 177-92.



75. Ashwal S, Pearce WJ. Animal models of neonatal stroke. *Curr Opin Pediatr* 2001; 13: 506-16.
76. Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* 1979; 3: 79-83.
77. Clancy B, Darlington RB, Finlay BI. Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* 2001; 105: 7-17.
78. Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 1981; 9: 131-41.
79. 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: 10191-98.
80. Nakajima W, Ishida A, Lange MS et. al. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. *J Neurosci* 2000; 20: 7994-8004.
81. Cheng Y, Deshmukh M, D'Costa A et. al. Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *J Clin Invest* 1999; 101: 1992-99.
82. Hansen HH, Briem T, Dzierko M et. al. Mechanism leading to disseminated apoptosis following NMDA receptor blockade in the developing rat brain. *Neurobiol Dis* 2004; 16: 440-53.
83. 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.
84. Siu FKW, Lo SCL, Leung MCP. Electroacupuncture reduces the extent of lipid peroxidation by increasing superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in ischemic- reperfused rat brains. *Neurosci Lett* 2004; 354: 158-62.
85. Tuor UI. Glucocorticoids and prevention of hypoxic-ischemic brain damage. *Neurosci Biobehav Rev* 1997; 19: 326-38.
86. Panetta TV, Marcheselli L, Braquet P, Spinnewyn B, Bazan NG. Effects of a platelet-activating factor antagonist (BN 52021) on free fatty acids, diacylglycerols, polyphosphoinositides and blood flow in the gerbil brain: inhibition of ischemia reperfusion induced cerebral injury. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 149: 580-7.

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AIF</b>	Apoptosis Inducing Factor (Apoptozis İndükleyici Faktör)
<b>Apaf 1</b>	Apoptotic Protease Activating Factor 1 (Apoptoz Proteaz Aktive Edici Faktör 1)
<b>AMPA</b>	$\alpha$ -Amino-3-Hidroksi-5-Metil-4-İzoksazol Propiyonat
<b>BDNF</b>	Brain Derived Neurotrophic Factor (Beyin Kaynaklı Nörotropik Faktör)
<b>CAD</b>	Kaspazla Aktifleşen Deoksiribonükleaz
<b>CNTF</b>	Ciliary Neurotrophic Factor (Siliyer Nörotropik Faktör)
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>FGF</b>	Fibroblast Growth Factor (Fibroblast Büyüme Faktörü)
<b>GABA</b>	Gama Amino Bütirik Asit
<b>HİBH</b>	Hipoksik İsemik Beyin Hasarı
<b>ICAD</b>	Inhibitor of Caspase Activated Deoxyribonuclease (Kaspazla Aktifleşen Deoksiribonükleaz İnhibitörü)
<b>ICE</b>	Interleukin 1- $\beta$ Converting Enzyme (İntelökin 1- $\beta$ Dönüştürücü Enzim)
<b>IGF</b>	Insulin Like Growth Factor (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü)
<b>NGF</b>	Neurotrophic Growth Factor (Nörotropik Büyüme Faktörü)
<b>NMDA</b>	N-Metil D-Aspartat
<b>NO</b>	Nitrik Oksit
<b>NOS</b>	Nitrik Oksit Sentetaz
<b>NT</b>	Neurotrophin (Nörotropin)
<b>PAF</b>	Platelet Activating Factor (Trombosit Aktive Edici Faktör)
<b>PARP</b>	Poly(ADP-Riboz) Polimeraz
<b>RNA</b>	Ribonükleik Asit
<b>SF</b>	Serum Fizyolojik
<b>SOD</b>	Süperoksit Dismutaz
<b>TUNEL</b>	Terminal-transferase Mediated dUTP Biotin Nick-End-Labeling

## ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

Şekiller	Sayfa No
Şekil 1 (Hipoksik İskemik Beyin Hasarında NMDA Reseptör Aktivasyonu)...	16
Şekil 2 (AMPA Reseptör Aktivasyonu).....	17
Şekil 3 (Apoptozisle Hücre Ölümü).....	22
Şekil 4 (Nekroz ve Apoptozisteki Morfolojik Değişiklikler).....	23
Şekil 5 (Bcl-2 Grubu Proteinlerin Apoptozisle İlişkisi).....	26
Şekil 6 (P53 Geni ve Apoptozis).....	27
Şekil 7 (Trombosit Aktive Edici Faktör-PAF).....	34
Şekil 8 (Biyoaktif Lipidlerin Sinaptik Sinyallerdeki Rolü).....	35
Şekil 9 (ABT-491).....	37
Şekil 10 (Beyinin Sağ Yarisındaki Apoptotik Hücrelerin Gruplara Göre Dağılımı; TUNEL Yöntemi).....	54
Şekil 11 (Beyinin Sol Yarisındaki Apoptotik Hücrelerin Gruplara Göre Dağılımı; TUNEL Yöntemi).....	54
Şekil 12 (Beyinin Sağ ve Sol Yarisındaki Apoptotik Hücre Sayıları; TUNEL Yöntemi).....	55
Şekil 13 (Beyinin Sağ Yarisındaki Apoptotik Hücrelerin Gruplara Göre Dağılımı; Kaspaz-3 Yöntemi).....	58
Şekil 14 (Beyinin Sol Yarisındaki Apoptotik Hücrelerin Gruplara Göre Dağılımı; Kaspaz-3 Yöntemi).....	58
Şekil 15 (Beyinin Sağ ve Sol Yarisındaki Apoptotik Hücre Sayıları; Kaspaz-3 Yöntemi).....	59
<b>Resimler</b>	
Resim 1 (Hipoksi Odacığı).....	47
Resim 2 (Beyinlerin Makroskobik Görünümü).....	51
Resim 3 (Hipokampal Nöronlarda TUNEL Yöntemiyle Apoptotik Hücrelerin Gösterilmesi).....	52
Resim 4 (Hipokampal Nöronlarda Kaspaz-3 Yöntemiyle Apoptotik Hücrelerin Gösterilmesi).....	57

## TABLolar DİZİNİ

### Tablolar

	Sayfa No
Tablo 1 (Apoptozis ve Nekrozdaki Özelliklerin Karşılaştırılması).....	23
Tablo 2 (Apoptozisin İnhibisyonu ve Artışı ile Seyreden Hastalıklar).....	25
Tablo 3 (Apoptozisi Etkileyen Bcl-2 Grubu Proteinler).....	26
Tablo 4 (Hipoksik İskemik Beyin Hasarında Sarnat ve Sarnat Evrelemesi)...	41
Tablo 5 (Gruplara Göre TUNEL Yöntemiyle Beyinin Sağ ve Sol Yarısındaki Apoptotik Hücre Sayılarının Karşılaştırılması).....	55
Tablo 6 (Gruplara Göre Kaspaz-3 Yöntemiyle Beyinin Sağ ve Sol Yarısındaki Apoptotik Hücre Sayılarının Karşılaştırılması).....	59