

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

FARKLI KORTİKOSTEROİDLERİN YENİDOĞAN
RATLARDA HİPOKAMPUSTA NÖRON KAYBINA VE
BEYİN AĞIRLIĞINA ETKİSİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. FATMA DUKSAL

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ:
PROF. DR. İLKNUR KILIÇ

DENİZLİ 2008

Prof.Dr.İlknur KILIÇ'ın danışmanlığında Dr. Fatma AYATA DUKSAL tarafından yapılan "Farklı Kortikosteroidlerin Yenidoğan Ratlarda Hipokampusta Nöron Kaybına ve Beyin Ağırlığına Etkisi" başlıklı çalışma jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr.Serap SEMİZ

Üye :Prof.Dr. İlknur KILIÇ

Üye : Doç.Dr.Dolunay GÜRSES

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

01/12/2008

Prof. Dr. Cüneyt Orhan KARA
Pamukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Dekan V.

TEŞEKKÜRLER

Asistanlığım boyunca bilgisinden ve tecrübelerinden her zaman faydalandığım, yardımlarını hiçbir zaman benden esirgemeyen saygıdeğer büyüğüm ve değerli hocam, Prof.Dr.İlknur Kılıç'a,

Bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, değerli hocalarım; Prof. Dr. Hacer Ergin, Prof. Dr. Aziz Polat, Doç. Dr. Serap Semiz, Yrd. Doç. Dr. Mine Cinbiş, Doç. Dr. Dolunay Gürses, Doç.Dr. Ahmet Akçay'a,

Her konuda desteğini ve yardımını benden esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım saygıdeğer hocam, Doç. Dr. Ahmet Çevik Tufan'a,

Tez aşamasında bana yardımcı olan Doç Dr. Ilgaz Akdoğan'a ,

Teze başladığım dönemde yardımlarını esirgemeyen sevgili çalışma arkadaşım Uzm.Dr. Erol Dağdeviren'e

Değerli çalışma arkadaşlarım ve dostlarım, Dr.Tülay İnce, Dr.Burçin Kaya, Hemşire Cemile Durur, Hemşire Ayşenur Teke'ye

Birlikte çalıştığım tüm asistan ve hemşire arkadaşlarıma,

Birlikte çalıştığım tüm personele,

Gerek asistanlığım döneminde, gerekse tez aşamasında, yardımlarını ve desteğini esirgemeyen, her zaman yanımda olan eşim Faysal Duksal'a ve yetişmemde büyük emekleri olan aileme teşekkür eder ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TABLolar ÇİZELGESİ	IV
ŞEKİLLER ÇİZELGESİ	V
KISALTMALAR ÇİZELGESİ.....	VI
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER.....	3
KRONİK AKCİĞER HASTALIĞI.....	3
DEKSAMETAZON TEDAVİSİ.....	4
PROGRAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜMÜNÜN TANIMLANMASI....	5
APOPİTOZİSİN MORFOLOJİSİ VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ.....	6
FAGOSİTOZ	7
APOPİTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜNÜN AŞAMALARI.....	7
APOPİTOZİSİN MEKANİZMALARI.....	7
HÜCRE İÇİNDEN KAYNAKLANAN SİNYALLER.....	8
KASPAZLAR.....	8
APOPTOZOM OLUŞUMU.....	8
BCL-2 PROTEİN AİLESİ.....	9
APOPİTOZİSDE MİTOKONDRİNİN ROLÜ.....	10
HÜCRE DIŞINDAN KAYNAKLANAN UYARILAR.....	10
APOPİTOZİSE ÖZEL OLAYLARIN SAPTANMASI.....	12
ADRENOKORTİKAL STEROİDLER.....	15
DEKSAMETAZON.....	17
BETAMETAZON.....	17
METİLPREDNİZOLON.....	17
HİPOKAMPUS VE GÖREVLERİ.....	17
GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
DENEY GRUPLARI.....	18
GLUKOKORTİKÖİD TEDAVİSİ VE ÇALIŞMANIN TASARIMI.....	18
ÖLÇÜMLER.....	19
ANESTEZİ.....	19

HİSTOPATOLOJİK İNCELEME.....	19
KESİT ALMA.....	19
TUNEL BOYAMA PREPARATLARININ HAZIRLANMASI.....	20
TUNEL POZİTİF HÜCRE SAYIMI.....	21
İSTATİKSEL ANALİZ.....	21
BULGULAR.....	22
TARTIŞMA.....	27
SONUÇLAR.....	38
ÖZET.....	40
YABANCI DİL ÖZETİ.....	42
KAYNAKLAR.....	44
EK TABLOLAR.....	53

TABLolar ÇİZELGESİ

	Sayfa No
Tablo-1 Apoptozis ve nekroz arasındaki farklar.....	6
Tablo -2 Apoptozisde morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler.....	6
Tablo -3 Grupların hipokampus bölgesinde ortalama apoptotik indeks sonuçları.....	24
Tablo -4 Grupların CA1 ve CA3 alt alanlarında apoptotik indeks sonuçları.....	25
Tablo -5 Grupların beyin ağırlığının vücut ağırlığına oranı	26

ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

	Sayfa No
Şekil-1 Apoptozom oluşumu.....	9
Şekil-2 Mitokondriyi içeren ana apoptotik sinyalin resmi.....	10
Şekil-3 A: Kontrol grubunda TUNEL pozitif hücre görüntüsü B: Betametazon grubunda TUNEL pozitif hücre görüntüsü.....	22
Şekil-4 A: Metilprednizolon grubunda TUNEL pozitif hücre görüntüsü B: Düşük doz deksametazon grubunda TUNEL pozitif hücre görüntüsü..	23
Şekil-5 Yüksek doz deksametazon grubunda TUNEL pozitif hücre görüntüsü....	23

KISALTMALAR ÇİZELGESİ

RDS	: Respiratuar Distres Sendromu
BPD	: Bronkopulmoner Displazi
KAH	: Kronik akciğer hastalığı
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör- α
APAF-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
AIF	: Apoptozis indükleyici faktör
STL	: Sitotoksik T lenfositler
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyltransferase mediated dUTP-biotin nick end labeling
TDT	: Terminal deoxynucleotidyl transferase
CA	: Cornu ammonis
Aİ	: Apoptotik indeks
SS	: Standart sapma

GİRİŞ

Deksametazon ventilatöre bağımlı kronik akciğer hastalığı olan prematüre infantlarda akciğer fonksiyonlarını düzeltmek için uzun süreden beri kullanılmaktadır (1,2).

Uygulanan doz genelde 0.1-0.5 mg/kg arasında olup oldukça yüksektir (3). Son zamanlarda bir çok makale, deksametazonun nörogelişimsel gecikme ve serebral palsy gibi birçok istenmeyen yan etkiye yol açtığını rapor etmiştir (2-6).

Deksametazon ile tedavi edilen ratların daha az kilo aldığı (7) ve infantların baş çevrelerinin daha küçük olduğu (8) gösterilmiştir. Deksamatazonun prematüre infantlarda klinik kullanımını, nörogelişimsel bozukluğa yol açtığı için azalmıştır. Bu nedenle, deksametazonun kullanımının azaltılmasıyla, kronik akciğer hastalığı insidansı arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bir çalışmada postnatal deksametazon tedavisi düşük ve yüksek doz olarak, ikinci ya da üçüncü haftada başlanacak şekilde kullanılmıştır (2). Sonuçta postnatal dönemde deksametazon kullanımının azaltılmasına rağmen, kronik akciğer hastalığı riskinin artmadığı saptanmıştır.

Andre ve ark. (9), kronik akciğer hastalığı riski olan çok küçük prematüre bebeklerde, metilprednizolon tedavisinin yararlarını ve orta dönemde yan etkilerini araştırmışlardır. Metilprednizolon tedavisinin kronik akciğer hastalığında deksametazon kadar etkili olduğu ve daha az yan etkiye yol açtığı görülmüştür. Ayrıca metilprednizolon grubundaki bebeklerin deksametazon grubundakilere oranla daha fazla kilo aldığı izlenmiştir.

Kılıç ve ark. (10), postnatal dönemde verilen metilprednizolon tedavisinin deksametazon tedavisine göre yenidoğan ratlarda kilo ve boyu daha az azalttığını ve metilprednizolon tedavisi alan yenidoğan ratlarda nörolojik skorun deksametazon tedavisi alanlara göre daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Çalışmanın sonucunda postnatal metilprednizolon tedavisinin deksametazona göre daha güvenli olabileceği belirtilmiştir.

Literatürde düşük doz deksametazon, metilprednizolon ve betametazonun beyin gelişimi üzerine etkilerini karşılaştıran bir çalışmaya rastlamadık. Bu çalışmada, aynı antiinflamatuvar etki gücü sağlayan dozda deksametazon, betametazon ve metilprednizolon tedavisinin neonatal dönemde verilmesinin hipokampusta apoptozise etkisi değerlendirilmiş ve beyin ağırlığının vücut ağırlığına oranı karşılaştırılmıştır. Ayrıca, aynı karşılaştırma yüksek ve düşük doz deksametazon tedavisi arasında da yapılmıştır.

GENEL BİLGİLER

KRONİK AKCİĞER HASTALIĞI

Ağır Respiratuar Distres Sendromu (RDS) olan prematüre infantların tedavisinde, 1960'lı yıllardan itibaren mekanik ventilasyon kullanılması sonucunda hastalığın seyri değişmiştir. Mekanik ventilasyon, küçük ve hasta bebeklerin yaşam şansını arttırmakla birlikte, bu bebeklerin çoğunda kronik akciğer hasarı gelişmektedir. İlk kez Northway ve ark. tarafından 1967 yılında bu durum, Bronkopulmoner Displazi (BPD) olarak tanımlanmıştır (11). RDS, çok düşük doğum ağırlıklı yenidoğanlarda gelişir, ventilatör ve oksijen bağımlılığı yaparak sonuçta kronik akciğer hastalığına (KAH) yol açar (12). KAH ve BPD terimleri birbirinin yerine kullanılabilir (11).

BPD gelişimi akciğer gelişiminde duraklamaya yol açan antenatal ve postnatal faktörlere bağlıdır (13-15). Antenatal dönemde maternal koriyoamniyonit BPD gelişimine neden olabilir (16). Postnatal dönemde oksijen toksisitesi, sepsis, mekanik ventilasyona bağlı barotravma ve volutravma, BPD'ye yol açar (17).

Yenidoğan yoğun bakımdaki gelişmelere rağmen BPD halen yaşayan düşük doğum ağırlıklı infantlarda (<1500 gram) ana problemlerdendir (18,19). BPD düşük doğum ağırlıklı bebeklerin ortak hastalığıdır ve 1000 gramın altındaki yenidoğanların yaklaşık %30-75'inde gelişmektedir (8,17,20). BPD'nin tanısı önemlidir, çünkü; primer patoloji akciğerlere ait olmasına rağmen multisistem bir hastalık olup, morbidite ve mortalitenin ana sebebidir. Oksijen tedavisinin uzaması, reaktif hava yolu hastalığı ve solunum yolu hastalıklarına yol açar (2,20). BPD'li çocuklarda gelişim geriliği, pulmoner fonksiyonlarda azalma, okul başarısında düşüklük vardır (19,21-24).

KAH'ın tanısı, spesifik olmasa da, klinik ve radyolojik bulgulara dayanmaktadır (11). KAH, önceden en az 28 gün boyunca oksijen ihtiyacının olması ve radyolojik olarak akciğer bulgularının olması olarak tanımlanmaktaydı. Son zamanlarda bu tanımlamaların yetersiz olduğu çünkü BPD'nin ağırlık

derecesinin gidişatı göstermede etkisiz kaldığı düşünülmektedir (25). Bu nedenle 2001 yılında “National Institute of Child Health and Human Development NICHD)/National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Workshop” kriterlerine göre BPD’nin ağırlığını gösteren yeni bir sınıflama getirilmiştir (26). Hastalık ağırlığına göre, 32 haftalıktan küçük preterm bebeklerde hafif, orta ve ağır BPD olarak 3 gruba ayrılmıştır.

Postnatal dönemde KAH riski olan prematüre bebeklerde deksametazon kullanımı uzun zamandan beri bilinmektedir. 1980’lerin başından beri deksametazon ventilatöre bağımlı kronik akciğer hastalığı olan bebeklere verilmektedir. Fakat bu ilacın bir çok yan etkisi vardır (2,24)

DEKSAMETAZON TEDAVİSİ

Deksametazon KAH’lı bebeklerde oksijen bağımlılığını azaltmakta ve erken ekstübasyon sağlamaktadır (2,27). Deksametazon tedavisi postmenstrual 24-40. haftalar arasında verilmekte olup, bu dönemde insan beyni belirgin yapısal ve fonksiyonel değişikliklere uğramaktadır. Bu da dış etmenlere hassasiyeti artırmaktadır (13,28,29).

Ratlarda beyin gelişimi postnatal 7. günde term bebeklerin beyin gelişimine eşit sayılmaktadır (30). Ratlarda postnatal 1.gün 22-24 haftalık, postnatal 2. gün 26-27 haftalık, postnatal 3.gün 28-29 haftalık, postnatal 6.gün 35-36 haftalık bebeğin beyin fonksiyonlarıyla aynıdır (31,32).

Prematüre infantlarda, deksametazonun akut dönemde sistemik bir çok yan etkisi vardır. Deksametazon, glukoz intoleransı, hipertansiyon, kardiyak hipertrofi, artmış nasokomial enfeksiyonlar, gastrointestinal sistem kanaması, sepsis, barsak perforasyonu, kilo alımında azlık gibi yan etkilere yol açabilir (2,8,9,20,33-36).

Prematüre bebeklerde deksametazonun fizyolojisi ve santral sinir sistemi fonksiyonları üzerine akut etkileri konusunda yapılan çalışmalar kısıtlıdır. Klinik çalışmalarda, uzun dönemli deksametazon tedavisinin büyüme geriliği, kilo

alımında azlık, daha küçük baş çevresi şeklinde problemlere yol açtığı gösterilmiştir (37-39). Akut dönemde nöromotor fonksiyonlarda değişiklikler gösterilmiştir (4,40). Yapılan çalışmalarda (41,42), deksametazonun uzun dönemli nörolojik etkileri araştırılmıştır. Bir yaşında serebral palsi insidansının arttığı ve görüntüleme yöntemleriyle beyin volümünün azaldığı tespit edilmiştir. Glukokortikoidlerin bu etkiyi tam olarak nasıl yaptıkları bilinmese de büyüme faktörlerini inhibe ederek ve apoptozisi kolaylaştırarak yaptıkları tahmin edilmektedir (37).

PROGRAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜMÜNÜN TANIMLANMASI

Programlanmış hücre ölümü, gelişim sürecinde tahmin edilen yer ve zamanda hücrelerin ölüme programlandığını tanımlamaktadır.

Yaşamakta olan hücreler nekroz ve apoptozis denilen iki farklı mekanizma ile ölürlür. Nekroz; hipoksi, aşırı ısı değişiklikleri, toksinler gibi hücre dışından gelen çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenler sonucunda gelişen travmatik hücre ölümü olup patolojik ve pasif bir süreçtir. Apoptozis ise yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin, organizma için güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Apoptozis fizyolojik veya patolojik uyaranlarla oluşabilir (43,44). Apoptozis, organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin, zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür (45,46). Apoptozis ve nekroz arasındaki farklar tablo 1’de gösterilmiştir.

Fizyolojik olarak oluşan hücre ölümü uzun yıllardır bilinmesine rağmen “apoptosis” terimi ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie adındaki patologlar tarafından kullanılmıştır. Yunancada ‘apo’ =ayrı, ‘ptosis’ =düşen anlamındadır. 1983 yılında Duke ve arkadaşları, jel lektroforezi ile apoptozisde endonükleazların aktive olarak DNA kırıklarına neden olduğunu göstermiştir (47,48).

Tablo-1: Apoptozis ve nekroz arasındaki farklar

Özellik	Nekroz	Apoptozis
Dağılım	Komşu hücre grupları	Dokuda tek tek hücreler
Nedenler	Her zaman patolojik	Fizyolojik/patolojik
Eksudatif yangı	Genellikle var	Yok
Işık mikroskopi	Bazofili, piknoz, karyoreksis, karyolizis	Kresentrik görünüm, eozinofilik partikül
Elektron mikroskopi	Hücrede şişme, membranda yırtılma, kromatinde erime	Hacim kaybı, apoptotik cisimcikler
Fagositoz	Mononükleer hücreler	Fagositik hücreler
Mekanizma	Kimyasal ya da yapısal parçalanma	Aktif hücresel yıkım

APOPTOZİSİN MORFOLOJİSİ VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Apoptozisde, birçok morfolojik ve metabolik değişiklikler olmaktadır (49). Bu değişiklikler, kısaca tablo-2’de özetlenmiştir.

Tablo-2: Apoptozisde morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler (49)

Morfolojik değişiklikler	Biyokimyasal ve fonksiyonel değişiklikler
Hücre boyutunda azalma	Serbest iyonize kalsiyum artışı
Sitoplazmanın kondensasyonu	Bcl2/bax birlikteliği
Endoplazmik retikülumun kalınlaşması	Hücre dehidratasyonu
Nükleer membranda değişiklikler	Mitokondriyal transmembran potansiyelinin kaybı
Nükleer parçalanma	Proteolizis
Hücre yüzeyinin yapısının kaybı	Fosfotidil-serinin membranın dışına çıkması
Apoptotik cisimler oluşumu	Laminin B’nin proteolizi
İzole hücreler	DNA’nın bozulması
Hücrenin hızla fagositozu	DNA’nın 50-300 kb’lik parçalara ayrılması
İnflamatuar reaksiyonun olmaması	İnternükleozomal bölünme

Apoptozis yoluyla hücre ölümü 2 faza ayrılır. Birinci fazda hücre içi genler ve biyokimyasal maddeler hücreyi onarmaya çalışır. Bu mekanizma başarılı olamazsa hücre ölümüne yol açan değişikliklerin olduğu ikinci ya da yürütme fazına girer (49). Apoptotik hücrede kromatin ve nükleer membranda değişiklikler olur. Nükleer proteinin kondensasyonu sonucunda, nükleus zarı altında kresentik görünüm oluşur (50). Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılırken, apoptozisde yaklaşık 300 000 kırılma meydana gelir ve bu nedenle yıkım onarımdan fazla olduğu için hücre bu onarımı yapamaz. Hücre zarı yapısı bozulur ve zarın üzerinde tomurcuklanmalar oluşur. Hücre, sitoplazma ile çevrilmiş

kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimlere parçalanır (51). Normalde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidil serin, apoptozis olayının başlamasıyla hücre zarının dış yüzeyine yerleşir. Fagositik hücrelerin reseptörleri, hücre zarındaki fosfatidil serin ile bağlanarak fagositozu uyarır (51). Apoptotik hücreler, komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınır ve fagosit edilir.

Apoptozisin başlaması için 2 temel yol vardır. Birincisi ekstrinsik yol denilen ve ölüm reseptörleriyle yönlendirilen yoldur. Bu grupta Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α) reseptör ailesi vardır. İkincisi intrinsik yol ya da daha doğru bir terimle bcl-2 kontrollü yol denilen yoldur. Bu yol bcl-2 ailesi tarafından yürütülür (52). Başlangıçları farklı olmasına rağmen, proteolitik enzim kaskadı ve kaspaz-aile üyelerinin aktive olması ile iki yol da aynı şekilde sonlanır.

FAGOSİTOZ

Hücreler öldükten sonra fagositoza uğrarlar. Apoptozis sırasındaki hücre zarı değişimleri, komşu hücrelerin ölü hücreyi fagosit etmesi için gerekli tüm uyarıları verecek şekilde düzenlenir (45,53).

APOPTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜNÜN AŞAMALARI

Apoptozis hücre içinden veya dışından gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini takip eden bir olaylar zinciri olarak seyreder ve hücrenin fagositozu ile sona erer. Hücre içinden veya dışından gelen sinyaller, kaspazları aktive eder. Bu kaspazlar hedef proteinlerini yıkarak, hücre içi değişikliklere neden olur. Parçalanan hücre apoptotik cisimlere ayrılarak fagositoz yoluyla yok edilirler.

APOPTOZİSİN MEKANİZMALARI

Programlı hücre ölümünde basamakların neler olduğu tam olarak bilinmemektedir. 1986 yılında Wyllie (50), glukokortikoid verilen kemirgenlerde timus timositlerinin apoptozisle öldüğünü göstermiştir. Apoptozis önceden hazır olan hücrelerde (primer) başlatılabilir ya da bir uyarı sonucu sekonder olarak gelişir. Hücre dışı uyarılar tümör nekroz faktörü (TNF), koloni uyarıcı faktörler (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF),

interlökin-2 (IL-2) gibi maddelerin ortamda azalması, glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler gibi pozitif uyaranlar olabilir. Otoimmün hastalık gelişiminde rolü olduğu belirtilen Fas/FasL, sFas proteinleri ve virüsler (HIV, gp120 proteini; influenza virüsü, TNF reseptörü üzerinden; adenovirus, hücre genetik yapısını bozarak) hücreyi apoptozise götürmektedir (51).

HÜCRE İÇİNDEN KAYNAKLANAN SİNYALLER

DNA hasarı, hücre içi Ca^{++} seviyesinde artış, hücre içi pH'da düşme, metabolik bozukluklar hücreyi apoptozise götüren merkezi hücre ölüm sinyallerini başlatabilmektedir (54).

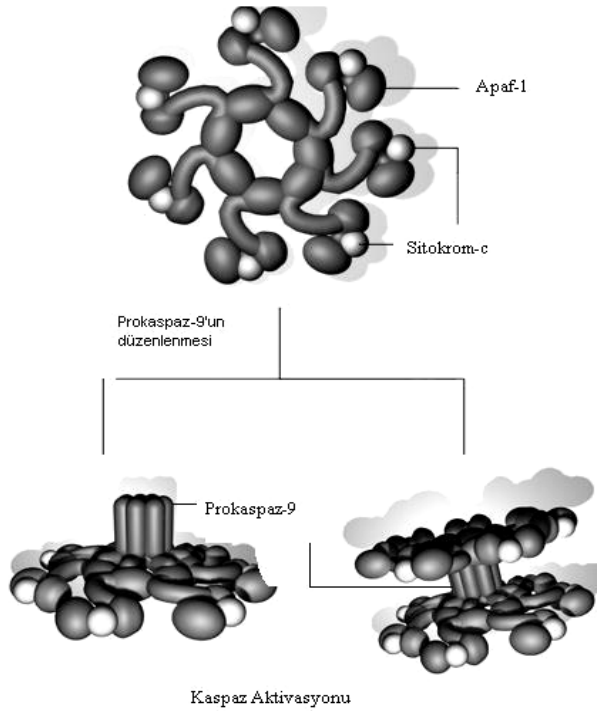
KASPAZLAR

Tüm kaspazlar zimojen (prokaspazlar) olarak sentezlenirler. 2 büyük kaspaz grubu vardır. Birincisi başlatıcı kaspaz denilen grup olup kaspaz 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12'yi içerir. Diğer sonlandırıcı kaspaz olup, kaspaz 3, 6 ve 7'yi içermektedir. Kaspaz 1, 4, 5, 11 ve 12 apoptozisi sağlamaktan çok yürütücü olarak görev yaparlar. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir kaskada neden olurlar. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm uyarılarını yürütücü kaspazlara iletirler. Yürütücü kaspazlar ise ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik yapıyı oluştururlar. Zimojen formdaki kaspazlar kırılarak aktifleşirler (46,55,56).

APOPTOZOM OLUŞUMU

Omurgalılarda apoptozom oluşumu mitokondriyal sitokrom c'nin salınımıyla başlamaktadır. Sitokrom c bağlayıcı protein olan apaf-1, sitozolde aktif olmayan monomer formunda bulunur. Sitokrom-c, apaf-1'in C-terminal alanına bağlandığında apaf-1 aktive olur (57). Sitokrom-c-apf-1 kompleksi apoptozom adlı bileşimi oluşturur. Bu bileşim prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise yürütücü kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktive ederek sitoplazmada yapısal proteinlerin sindirimi, kromozomal DNA'nın degradasyonu ve hücrenin fagositozu sağlar (58-60).

Apoptozom Oluşununun İlk Basamağı



Şekil-1: Apoptozom oluşumu (61).

BCL-2 PROTEİN AİLESİ

Bcl-2 ailesi apoptozisin düzenlenmesinde önemli rol üstlenir. Bu proteinler BH alanları denilen ve sayısı 1 ve 4 arasında olan ayrı homolog gruplar içerirler (62). Bcl-2 ailesi işlevlerine göre 2 gruba ayrılabilir: Prosurvival grup ve pro-apoptotik grup

Pro-Survival grup (anti-apoptotik proteinler): Bu grup temel olarak bcl-2, bcl-x1 ve mcl-1 proteinlerini içerir ve hücrelerin bir çok uyarın sonucu ölümünü engeller (62). Bcl-2, güçlü bir ölüm inhibitörüdür ve en fazla yerleştiği yerler mitokondri, düz endoplazmik retikulum ve çekirdek çevresindeki zarıdır. Antiapoptotik etkisini, mitokondriden sitokrom c salınımını engelleyerek gösterir. Bcl-x1, mitokondri zarında bulunur ve bcl-2 ile birlikte mitokondri zar geçirgenliğini korur. Proapoptotik bcl-2 üyelerini inhibe ederek apoptozisi engeller. Bcl-x1, kaspaz aktivasyonunu apaf-1 üzerinden engeller (63,64).

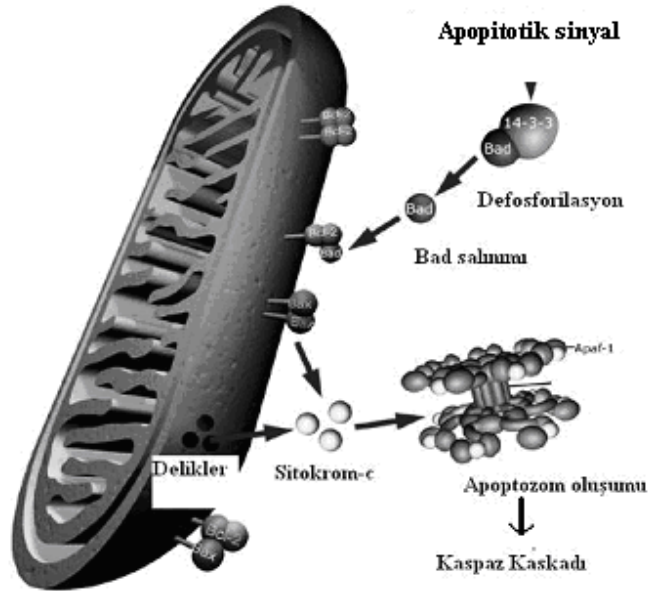
Pro-apoptotik bax/bax benzeri proteinler: Pro apoptotik bax/bax benzeri proteinler (bax, bak, bcl-xs) en az 2 BH alanı içermekte olup, çoğu 3 alan içerir. Bir

çok çalışma çeşitli uyarılarla tetiklenen birçok hücrede apoptozisin gerçekleşmesi için bax ve bak proteinlerinin gerekli olduğunu göstermiştir (65,66).

Pro-apoptotik “BH3-only” proteinler: Bu proteinler bcl-2 ailesinde pro-apoptotik alt gruptur. Tüm “BH3-only” proteinler prosurvival bcl-2 benzeri proteinlere bağlanırlar ve fazla salındıklarında apoptozisi tetiklerler. (67).

APOPTOZİSDE MİTOKONDRİNİN ROLÜ

Mitokondri hücre ölümünün düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Apoptozis indükleyici faktör (AIF), Smack/DIABLO ve sitokrom-c gibi bir çok pro-apoptotik proteinleri içermektedir. Bu faktörler, mitokondride küçük delikler oluşmasıyla salınırlar.



Şekil-2: Mitokondriyi içeren ana apoptotik sinyalin resmi (67).

HÜCRE DIŞINDAN KAYNAKLANAN UYARILAR

Hücrelerin Maruz Kaldığı Dış Etkenler: Radyasyon, gamma ve ultraviyole ışınlar, hipoksi, ısı, antikanser ilaçlar gibi etkenler apoptozise neden olabilirler (54).

Çevresel Yaşam Uyarılarının ve Büyüme Faktörlerinin Yetersizliği: Hücrelerin yaşaması için, çevre hücrelerden ve ekstrasellüler matriksden gelen yaşam uyarıları ve büyüme faktörleri gereklidir. Bu uyarılar düzenli ve yeterli olmalıdır. Çevreden gelen uyarıların kesilmesi ile hücre ölümünün nasıl başladığı

tam olarak bilinmemektedir. Büyüme faktörüne bağımlı hücre kültürlerinden büyüme faktörleri çıkarıldığı zaman, hücrelerin metabolizmalarında ani bozulmalar ve hücre siklusunda duraklama olduğu gözlenmiştir (54).

Ölüm Reseptörlerinin Aktivasyonu: Bazı sitokinler hücre zarında bulunan reseptörlere bağlanarak ölüm programını harekete geçiren uyarılar oluşturabilirler (54,68). Apoptozisde rol alan zar reseptörleri içinde en önemli grup tümör nekrozis faktör reseptör ailesidir. Bu reseptör grubunun en az 19 üyesi vardır. Bu reseptörlerin biyolojik etkileri çeşitlidir ve apoptozis ile sınırlı değildir. Bir bölümü apoptozis oluştururken, bir bölümü proliferasyona neden olur. Bir bölümü ise her ikisini de oluşturur. Bu reseptörler uyarıldıklarında, hücrenin sitoplazmasında bulunan adaptör proteinlere bağlanır. Adaptör proteinlerin ölüm efektör parçaları vardır. Bunlar da apoptozis için başlatıcı enzimler olan kaspazlara (örn: prokaspaz 8) bağlanırlar (54,69).

Sitotoksik T Lenfosit Aracılı Apoptozis : Sitotoksik T lenfositler (STL) infekte olmuş olan konakçı hücrelerin yüzeyinde bulunan yabancı antijenleri tanırlar. STL'lerin ana görevi malign ve/veya virüs ile infekte olmuş olan hücrelerin öldürülmesidir (54,70). Yabancı antijenleri tanıdıklarında yüzeylerinde Fas oluşur. Hedef hücrelerin Fas reseptörlerine tutunurlar. STL'ler sitoplazmalarında granzyme B (serin proteaz) ve perforin adı verilen ve apoptozis oluşmasını sağlayan proteinler içeren sitoplazmik granüllere sahiptirler (70). Perforin, transmembran delikçik oluşturucu bir proteindir. STL'ler hedef hücrelerin zarlarında perforin ile delikçikler oluşturarak, sitoplazmalarına granzyme B salgırlar. Granzyme B hedef hücrelere girerek kaspazları aktive eder (54).

Fas-Fas Ligand Aracılı Apoptozis: Bu tip apoptozis Fas hücre yüzey reseptörü aracılığı ile oluşur. Fas'ın Fas reseptörüne bağlanması ile Fas reseptörünün hücre içinde bulunan parçası, Fas adaptör proteinle birleşerek ölüm başlatan uyarı kompleksini oluşturur. Bu da prokaspaz 8'in aktifleşmesini sağlar (71). Fas zara bağlı veya çözünmüş olabilir. Çözünmüş Fas immun sistem hücreleri tarafından oluşturulur. Çözünmüş Fas'ın T hücre zarında bulunan Fas

reseptörüne bağlanmasıyla, immün reaksiyonla aktive olmuş ve görevlerini tamamlamış olan lenfositlerin apopitozis ile yok edilmeleri sağlanmış olur (54,72).

APOPİTOZİSE ÖZEL OLAYLARIN SAPTANMASI

Apopitozis morfolojisine yönelik yapılan çalışmalarda, başlangıçta daha çok kromatin kondensasyonu ve nükleer dağılım gibi nükleusta gerçekleşen olaylar üzerinde durulmuştur. Bununla birlikte 1990'ların ortalarında sistein proteazlar (kaspazlar) bulunmuştur ve apopitozisin morfolojisinden sorumlu olduğu görülmüştür. Bilim adamları bu nedenle, apopitozis süresince nükleer değişiklikler olmadan önceki dönemde gelişen sitoplazmik olaylara yoğunlaşmışlardır. Böylece, kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metodlarla saptanabilen apopitozis, 1990'ların sonuna doğru fosfatidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlandı.

MORFOLOJİK GÖRÜNTÜLEME YÖNTEMLERİ

IŞIK MİKROSKOBU İLE GÖRÜNTÜLEME

Hematoksilen-Eosin Boyama: Hematoksilen boyama hem hücre kültürü çalışmalarında hem de doku boyamalarında kolaylıkla kullanılabilir. Apopitotik hücrelerin saptanmasında genellikle ilk metod olarak başlanması uygundur ve çeşitli açılardan (örn. ilk değerlendirme, maliyet) diğer metodlara karşı avantaj sağlar. Hematoksilen boyamada, hematoksilen boyası kromatini boyadığından apopitotik hücreler çekirdek morfolojisine göre değerlendirilir. Apopitozise özgü değişiklikler iyi bir boyama yapılmışsa kolayca gözlenebilir. Gözlenebilen değişiklikler şunlardır: hücre küçülmesi "cell shrinkage", veya sitoplazmik küçülme "cytoplasmic shrinkage", kromatinin kondanse olması "nuclear condensation" ve çekirdek zarının periferinde toplanması, çekirdeğin küçülmesi "pyknosis" veya parçalara bölünmesi "nuclear fragmentation".

Giemsa Boyama: Giemsa ile boyamada hematoksilenle boyamada olduğu gibi çekirdek morfolojisi esas alınarak apopitotik hücreler tanınır. Sitoplazma sınırları hematoksilen boyamaya göre daha iyi seçilebilmekle birlikte hematoksilen boyamaya belirgin bir üstünlüğü yoktur.

Floresan Mikroskopu: Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini, dolayısıyla çekirdeği görünür hale gelebilir. Eğer hücre

kültürü çalışmasında kullanılırlarsa, ölü hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına olanak tanır.

ELEKTRON MİKROSKOBU İLE GÖRÜNTÜLEME

Elektron mikroskobu ile değerlendirme apoptozisi saptamada temel yöntemdir. Işık mikroskopisine göre, hücre morfolojisi açısından daha ayrıntılı bilgiler vermektir. Ayrıca, hücre kültürlerinde ve dokularda apoptozis ve nekrozu en doğru şekilde gösteren yöntemdir, nükleus fragmentasyonu net olarak izlenebilir, apoptotik hücrede, normal hücreyle kıyaslandığında sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu izlenebilmektedir.

HİSTOKİMYASAL YÖNTEMLER

Anneksin V Yöntemi: Sağlıklı hücrelerde, bazı lipidler çoğunlukla plazma zarının dış tabakasında yer alırken, özellikle fosfatidil serin molekülü olmak üzere diğer lipidler, iç tabakada yer almaktadır. Hücre apoptozise uğradığında, lipidler iki tabaka arasına yayılırlar. Fosfatidil serin molekülü hücre zarının dış tabakasında belirerek, hücrenin apoptozise hazır olduğunu gösterir. Dış yüze yerleşen fosfatidilserin'ler, floresan bir madde ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilir. Böylece apoptotik hücreler saptanmış olur.

TUNEL Yöntemi: DNA kırıklarının gösterilmesine dayalı apoptotik hücrelerin tanınmasına dayalı diğer bir metod da "TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling (TUNEL)" metodudur. Çift zincirli DNA'nın ayrılması sırasında DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar. Burada apoptozis sırasında oluşan DNA kırıkları, DNA parçalarının 3'-hidroksil kısmına nükleotid ekleyen "terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)" tarafından kolaylıkla tanınır. Parafin bloklar, donmuş kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki veya "plate"lere ekilmiş, ya da lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerde apoptozisin varlığı bu metodla saptanabilir ve apoptozisi saptamada en yaygın kullanılan yöntemdir

Kaspaz-3 Yöntemi: Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 belirlenebilir. Bunun için, dokunun kaspaz-3 ekspresyonu ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptozise yol açan ajanın kaspaz-3'ü

kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir. Ancak, bu bilinirse apoptotik hücreler bu metodla tespit edilebilirler

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

BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER

Agaroz Jel Elektroforezi: DNA kırıklarının gösterilebildiği bir başka yöntemdir. Apoptozisde DNA, 180 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen noktalardan (internukleozomal bölgelerden) kırıldığı için merdiven görüntüsü "ladder pattern" oluşur. Bu bulgu apoptozisin karakteristik özelliğidir ve nekrozda görülmez. O yüzden apoptozisi nekrozdan ayırmada faydalı yöntemlerden biridir.

Western Blotting: Bu metod yardımıyla apoptozise özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn. Bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. kaspaz-3) saptanması mümkündür. Sitokrom c'nin mitokondriye çıkıp çıkmadığı da bu metodla belirlenebilir..

Flow Sitometri: Floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozisde eksprese olduğu bilinen herhangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Böylece apoptozis ilişkili olaylar saptanabilir. Hücrenin küçülmesi, membran geçirgenliğinde değişiklikler, membran yağ dağılımında değişiklikler, kromatin kondensasyonu, DNA kırıkları ve mitokondrinin membranları arasındaki potansiyel farkının kaybı durumlarını saptayabilir.

İMMÜNOLOJİK YÖNTEMLER

Elisa: Bu yöntem ile gerek kültürü yapılmış hücre populasyonlarında gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür.

Fluorimetrik Yöntem: Kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde ilgili kaspazın antikorunun

bulunduğu "plate"lere hücre izolatlarının konulması ile kaspaz molekülleri tutulur ve sonra ortama kaspazların parçalandığı 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.

ADRENOKORTİKAL STEROİDLER

Adrenal kortekste iki sınıf steroid sentezlenir. Yirmi bir karbonlu kortikosteroidler (glukokortikoid ve mineralokortikoid) ve 19 karbonlu androjenlerdir. Kortikosteroidlerin işlevleri glukokortikoid (karbohidrat metabolizması düzenleyicisi) ve mineralokortikoid (elektrolit dengesi düzenleyicisi) olarak sınıflandırılmıştır. İnsanlarda hidrokortizon (kortizon) ana glukokortikoid ve aldosteron ana mineralokortikoiddir.

Fizyolojik Aktivite: Kortikosteroidlerin etkileri çok fazla ve çeşitlidir. Bunlar; karbohidrat, protein ve yağ metabolizmasında değişiklikler, sıvı ve elektrolit dengesinin sağlanması, kardiyovasküler, immün, böbrek, iskelet kası, endokrin ve sinir sisteminin normal işlevinin sürdürülmesidir (73).

Kortikosteroidler, sodyum geri emilim gücü, karbohidrat metabolizmasındaki etki gücü ve antiinflamatuvar etkilerine göre gruplandırılmaktadır. Genelde, adrenalectomize hayvanlarda yaşamı idame ettirme etkileri sodyumu geri emme güçlerine bağlıdır. Glukoz metabolizması üzerindeki etkileri antiinflamatuvar etkilerine paraleldir. Sodyum geri emilimi ve karbohidrat/antiinflamatuvar görevleri pek bağlantılı değildir. Bu etkiler nedeniyle, kortikosteroidler, mineralokortikoid ve glukokortikoid olarak ayrılmıştır. Kortikosteroidler hedef dokuda özel reseptörler ile etkileşirler.

Glukokortikoidlerin Protein ve Karbohidrat Metabolizması Üzerine Etkileri: Karaciğerde aminoasit ve gliserolden glukoz yapımını ve glukozun karaciğerde glikojen şeklinde depolanmasını sağlar. Periferik dokularda, glukoz kullanımını azaltır, protein yıkımını artırır ve lipolizi aktive eder. Böylece net etki kan glukoz düzeyinin artırılmasıdır.

Glukokortikoidlerin Lipid Metabolizması Üzerine Etkileri: Kortikosteroidlerin iki etkisi tanımlanabilmiştir. Birincisi hiperkortizolizmde

gerçekleşen vücut yağ dağılımıdır. İkincisi, adipoz dokularda diğer hormonların etkisini artırarak lipolizin sağlanması ve serbest yağ asitlerinin artmasıdır.

Antiinflamatuvar ve İmmüsupresif etkileri: Glukokortikoidler, radyasyon, mekanik, kimyasal, enfeksiyöz ve immünolojik uyarana cevap sonucu oluşan inflamasyonu önler ya da baskılar.

Kortizol molekülünde kimyasal değişiklikler sonucu sentetik glukokortikoidler oluşturulmaktadır. Bu glukokortikoidlerin etki süresi daha uzun, etki gücü daha iyi olup, elektrolit etkileri en düşük düzeydedir. Deksametazon, betametazon ve metilprednizolon bu sentetik glukokortikoidlerden bazılarıdır (73). Kimyasal değişiklikler sonucu, etki gücünde değişiklikler olmakta ve bunun sonucunda kortikosteroid reseptörüne ilgi ve reseptörün aktivitesinde değişiklikler olmaktadır. Sentetik glukokortikoidlerin kortizole göre antiinflamatuvar etkileri (glukokortikoid etki) yüksek iken, tuz tutucu etkileri (mineralokortikoid etki) düşüktür. Glukokortikoid kullanımında sodyum ve su tutulumu, hipertansiyon ve potasyum kaybı gibi mineralokortikoid; diyabet mellitus, osteoporoz, femur boynunda avasküler nekroz, kas güçsüzlüğü, peptik ülser, büyüme geriliği gibi glukokortikoid yan etkiler görülebilir (74).

Glukokortikoidlerin Beyinde Apoptozise Etkileri: Glukokortikoid reseptörlerinin aktivasyonu hipokampüsteki granüler hücrelerde apoptozisi indükler. Rat hipokampüsünde glukokortikoid reseptör aktivasyonu, proapoptotik bax molekülünün, antiapoptotik bcl-2 ya da bcl-xl'ye oranını artırarak hücre ölümünü uyarır. Mineralokortikoid reseptörlerinin aktivasyonu sonrası zıt etki oluşur. Glukokortikoid reseptörü aracılı hücre ölümünde bax olmalıdır. Ayrıca, glukokortikoid reseptör aktivasyonu, bax ve bcl-2 gen ailesini doğrudan uyararak tümör supressör geni p53'ü azaltır (75).

Deksametazon ventilatöre bağımlı prematüre bebeklerde kronik akciğer hastalığı riskini azaltmak için uzun süreden beri kullanılmaktadır. Bunun yanında postnatal dönemde metilprednizolon tedavisi de verilmiştir. Metilprednizolon tedavisinin kronik akciğer hastalığında deksametazon kadar etkili olduğu ve daha az yan etkisi olduğu görülmüştür (9).

DEKSAMETAZON

Uzun etkili (yarı ömrü:36-72 saat) sentetik yapıda bir glukokortikoiddir. Kimyasal formülü; $C_{22}H_{29}FO_5$ şeklindedir. Mineralokortikoid aktivitesi yoktur. Otoimmün hastalıklarda, artritlerde, inflamatuvar durumlarda, adrenal yetmezlikte replasman tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Dokulara emilimi iyi olan deksametazon hızlıca böbreklere, karaciğere, kaslara, barsaklara ve akciğerlere yayılır. Karaciğerde metabolize edilerek böbreklerden atılır.

BETAMETAZON

Uzun etkili (yarı ömrü: 36-72 saat) sentetik bir glukokortikoiddir. Onaltıncı karbondaki metil grubunun yerleşimi dışında kimyasal yapısı deksametazon ile aynıdır. Deksametazonda 16. karbondaki metil grubu alfa pozisyonunda iken, betametazonda beta pozisyonundadır. Mineralokortikoid aktivitesi olmadığından klinikte yaygın kullanım olanağı sağlar. Dermatit, artrit, inflamatuvar barsak hastalığı, reaktif hava yolu hastalığı ve respiratuvar distres sendromunu önlemek için kullanılır. Karaciğerde metabolize edilerek böbreklerden atılır.

METİLPREDNİZOLON

Orta etkili (yarı ömrü: 12-36 saat) sentetik bir glukokortikoiddir. Mineralokortikoid aktivitesi düşük düzeydedir. Antiinflamatuvar aktivitesi betametazon ve deksametazona göre 5 kat daha düşüktür. Metilprednizolon alerjik hastalıklar, dermatolojik problemler, ülseratif kolit, artrit, lupus, psöriazis ya da solunum hastalıklarında tedavi amaçlı kullanılabilir.

HİPOKAMPUS VE GÖREVLERİ

Hipokampus bir gri cevher tabakası olup, lateral ventrikülün alt boynuz tabanı boyunca uzanır. Filogenetik olarak en eski beyin kısımlarındandır. Anatomik olarak koronal kesitlerde hipokampusun gövde kısmının ortası belirir. Bu seviyede, birbiri içine geçmiş iki gri tabaka vardır: “cornu ammonis;CA” ve dentat girus. CA, granüler hücrelere göre 4 mikroskobik tabakaya ayrılır (CA1, CA2, CA3, CA4) (76). Hipokampusun yokluğunda, verbal veya sembolik anıların saklanması sorunlar gelişir (77).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deneysel Hayvanlar Laboratuvarı'nda ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'undan çalışma için onay alındı.

DENEY GRUPLARI

Hayvanlar: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanlar Laboratuvarı'nda üretilmiş olan Sprague-Dawley ratlar (Denizli, Türkiye) çalışmaya alındı. Tüm hayvanlar standart laboratuvar şartlarında tutuldu (Isı 25±2 °C; gündüz/gece siklusu 14/10 saat). Hayvanların bakımı Amerikan İnsan ve Sağlık Birimi tarafından yayınlanan Laboratuvar hayvanlarının bakımı ve kullanımı klavuzuna göre yapıldı. Altı rat çiftleştirildi. 18. gebelik gününe kadar çift halinde olan ratlar 21. gebelik gününde ayrı olarak tutuldular. Daha sonra yenidoğan ratlar doğana kadar günde iki kez kontrol yapıldı. Doğdukları gün postnatal 1. gün olarak tanımlandı (P 1).

Gebe ratlar arasında ağırlık açısından istatistiksel anlamda fark yoktu. Postnatal 3. gün her dişi rattan 5'er erkek yenidoğan rat alındı. Toplam 30 erkek yenidoğan rat çalışmaya alındı. Yenidoğan ratlar rasgele olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Her grupta 6 yenidoğan rat vardı. Postnatal 1. ve 3. günde gruplar arasında ağırlık açısından istatistiksel olarak fark yoktu.

GLUKOKORTİKÖİD TEDAVİSİ VE ÇALIŞMANIN TASARIMI

İlaçlar serum fizyolojik (Drogsan İlaç sanayi), betametazon (Celestone chronodose[®], Eczacıbaşı İlaç sanayi), metilprednizolon (Prednol-L[®], Fako İlaç sanayi), düşük ve yüksek doz deksametazon (Decort[®], Deva İlaç Sanayi) şeklinde hazırlandı. Betametazon, metilprednizolon ve düşük doz deksametazon eşit etkin antiinflamatuvar dozda verildi (73).

Gruplar aşağıdaki şekilde sıralandırıldı;

1. Grup: kontrol grubu (6 yenidoğan rat)
2. Grup: betametazon grubu (6 yenidoğan rat)
3. Grup: metilprednizolon grubu (6 yenidoğan rat)

4. Grup: düşük doz deksametazon grubu (6 yenidoğan rat)

5. Grup: yüksek doz deksametazon grubu (6 yenidoğan rat)

Tüm yenidoğan ratlar annelerinden ayrılarak tedaviler saat 10-12 arasında verildi.

Betametazon grubundaki ratlara postnatal 3., 4. ve 5. günlerde betametazon tedavisi subkutan olarak postnatal 3. günde (0.2 mg/kg), postnatal 4. günde (0.1 mg/kg), postnatal 5. günde (0.05 mg/kg) verildi. Metilprednizolon grubundaki ratlara postnatal 3., 4. ve 5. günlerde metilprednizolon tedavisi subkutan olarak postnatal 3. günde (1 mg/kg), postnatal 4. günde (0.5 mg/kg), postnatal 5. günde (0.25 mg/kg) verildi. Düşük doz deksametazon grubundaki ratlara postnatal 3., 4. ve 5. günlerde düşük doz deksametazon tedavisi subkutan olarak postnatal 3. günde (0.2 mg/kg), postnatal 4. günde (0.1 mg/kg), postnatal 5. günde (0.05 mg/kg) verildi. Yüksek doz deksametazon grubundaki ratlara, postnatal 3., 4. ve 5. günlerde yüksek doz deksametazon tedavisi subkutan olarak postnatal 3. günde (0.5 mg/kg), postnatal 4. günde (0.25 mg/kg), postnatal 5. günde (0.125 mg/kg) verildi. Kontrol grubuna steril serum fizyolojik postnatal 3.-5. günlerde azaltılan dozlarda verildi.

ÖLÇÜMLER

Vücut ağırlıkları postnatal 1., 3-5.günlerde ve postnatal 7. günde dekapitasyon öncesinde ölçüldü. Postnatal 7. günde beyin kraniotomi ile çıkarılarak beyin ağırlıkları ölçüldü. Beyin dokusu simetrik olarak ikiye bölünerek bir yarısı TUNEL boyama için %10'luk formaldehid içine konuldu.

ANESTEZİ

İntraperitoneal olarak verilen 90 mg/kg ketamin (Ketalar[®], Parke-Davis, Eczacıbaşı, İstanbul) ile anestezi sağlandı.

HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

KESİT ALMA

Formaldehid solüsyonundan çıkarılan beyin dokuları parafine gömüldü. Parafin bloktan 50 mikronluk seri kesitler alınarak dokuya ulaşıldı. Doku bitene kadar 10 mikronluk kesitler alındı. Her lizimli lam üzerine iki kesit tespit edildi.

Hipokampal bölgenin görülebildiği örneklerden rastgele 5-10 tane lam alındı ve TUNEL tekniği ile boyama yapıldı.

TUNEL BOYAMA PREPARATLARININ HAZIRLANMASI

Apopitozisin belirlenmesi amacı ile TUNEL tekniğinden yararlanıldı; deneylerde Roche Diagnostics GbH, Penzerg, Germany firmasından satın alınan 11 684 809 910 katalog numaralı kitler kullanıldı.

Apopitotik sinyaller DNA üzerinde kırıklar oluşturmaktadır. Açığa çıkan DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına, terminal deoksinükleotidil transferaz aracılığı ile işaretlenmiş deoksinükleotidler eklendi. Daha sonra işaretlenmiş nükleotidler, alkalin fosfat konjugatı ile tespit edildi. Alkalin fosfat enziminin substratı ile dokular kaplandı.

Deparafinizasyon: Lamlar, gece boyunca (12 saatlik bir süre) 55 °C'lik etüvde bırakıldı. Sonra oda ısısında 60 dakika ksilende bekletildi.

Rehidrasyon: Birer kez 5 dakikalık sırası ile % 100, % 90, % 80 ve % 70'lik etanol inkübasyonları yapıldı. Lamlar alkolden geçirilerek, sonrasında distile suda 5 dakika bekletilerek rehidrasyon işlemi tamamlandı.

Dokuların Geçirgenliğinin Artırılması: Önce, kalın plastik bir kap içine 10 ml sitrat buffer ve 90 ml distile su konularak 1/10 sitrat buffer hazırlandı. 1/10 sitrat buffer içine konulan lamlar mikrodalga fırında konularak 5 dakika boyunca 400 watt'ta çevrildi. Mikrodalga fırından çıkarılan lamlar fosfat buffer solüsyonu (PBS) ile 5 dakika yıkandı. Yıkama sonrası dokunun etrafı peçete ile dokuya dokunmadan kurulandı.

İşaretleme Solüsyonunun Hazırlanması: 500 µl olan label solüsyonundan 100 µl atıldı kalan 400 µl label solüsyonu enzim solüsyonunun (50 µl) üzerine ekledi. 450 µl karışım elde edildi ve bu karışım pipetle homojenize edildi.

İşaretleme Protokolünün Uygulanması: Çevresi elmas kalemle çizilerek çember içine alınan dokuların üzerine işaretleme solüsyonundan 50 µl damlatıldı. Dokular 37 derecelik etüvde 60 dakika bekletildikten sonra PBS ile 5 dakika yıkandı ve etrafları kurulandı.

Tespit Aşaması: İşaretlenmiş dokuların üzerine 50 µl alkalin fosfat konjuge antikoru eklendi. Lamlar 30 dakika 37 °C etüvde bekletildikten sonra PBS ile 5 dakika yıkandı ve dokuların etrafı kurulandı.

Substrat Solüsyonunun Eklenmesi: Alkalen fosfataz enziminin substratından (BM Purple AP substrate, Roche Diagnostics GbH, Penzerg, Germany) 50 µl dokular üzerine eklendi. Lamlar kapalı nemli bir kutuda 12 saat beklemeye alındı. Bekleme sonrası lamlar PBS ile yıkandı ve kurulamadan 5 saniye eozinde bekletildi. Sonra tekrar PBS ile yıkandı. Son olarak dokular entelan ve lamel ile kapatıldı.

TUNEL POZİTİF HÜCRE SAYIMI

Her alandan sistematik random örnekleme sistemine göre 8-12 alan seçilerek TUNEL pozitif hücreler sayıldı. TUNEL pozitif hücreler hipokampusta ve hipokampusun CA1 ve CA3 alt bölgelerinde sayıldı. Her sayım bir apopitotik indekse (Aİ) çevrildi. Aİ, birim alandaki 100 hipokampus hücresindeki TUNEL pozitif hipokampus hücresi olarak tanımlandı. Arka arkaya giden diğer alan da bölgenin doğru yer olduğunu görmek amacıyla “hematoxylen-eosin” ile boyandı. Hipokampusun CA1 ve CA3 alt bölgeleri daha önceki bir çalışmaya göre belirlendi (78).

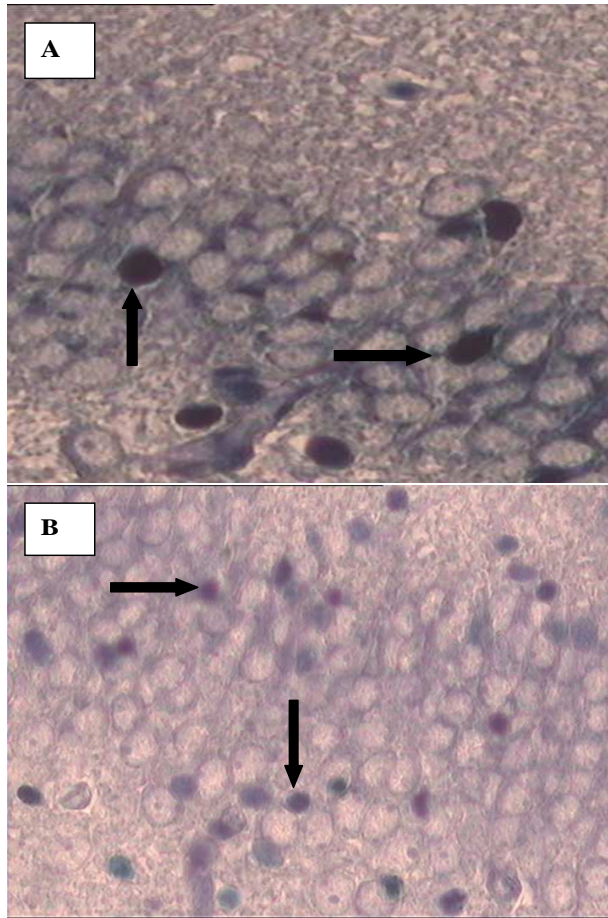
İSTATİKSEL ANALİZ

Tüm istatistikler Microsoft Office Excel programı ile analiz edildi. Veriler ortalama \pm standart sapma (SS) olarak ifade edildi Beyin ağırlığı, vücut ağırlığı ve Aİ sayısı ölçümleri non-parametrik Mann Whitney's U-testi kullanılarak yapıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi olarak $p < 0.05$ kabul edildi

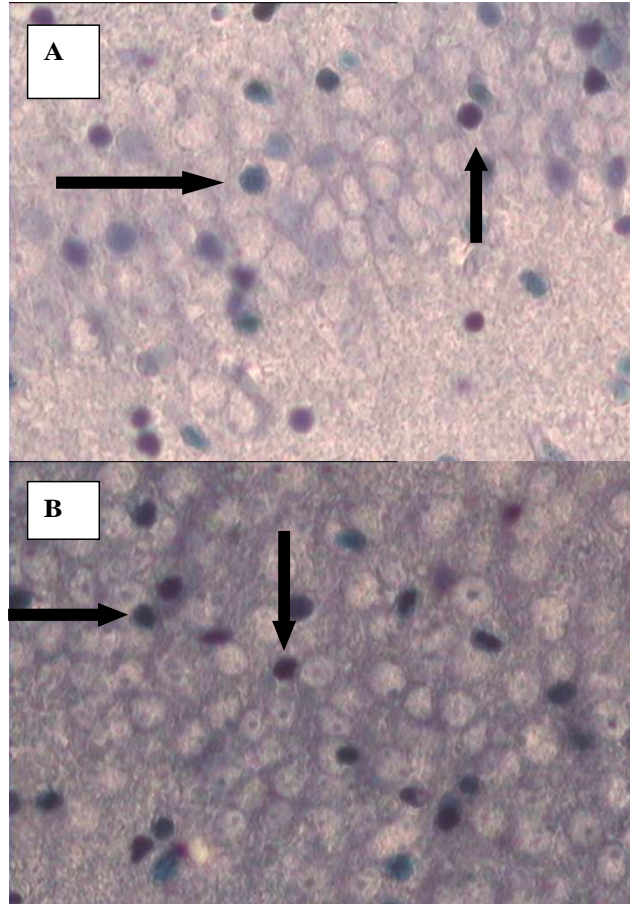
BULGULAR

HİPOKAMPÜSTE APOPİTOTİK HÜCRE SAYIMI SONUÇLARI

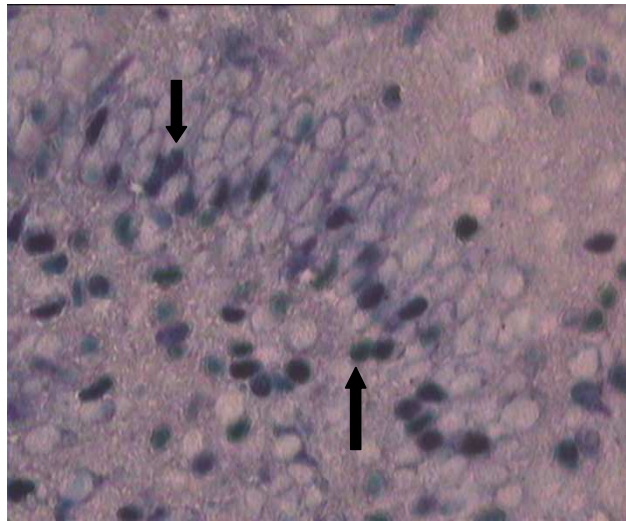
TUNEL yöntemi ile yapılan boyama preparatlarında Aİ sonuçları, kontrol grubunda, 16.31 ± 0.76 ; betametazon grubunda, 15.63 ± 0.54 ; metilprednizolon grubunda, 22.81 ± 0.74 ; düşük doz deksametazon grubunda, 16.76 ± 0.65 ; yüksek doz deksametazon grubunda, 41.16 ± 2.27 olarak bulundu (Şekil-3,4,5). Şekillerde TUNEL pozitif hücreler ok ile gösterilmiştir.



Şekil-3: **A:** Kontrol grubunda TUNEL pozitif hücre görüntüsü, **B:** Betametazon grubunda TUNEL pozitif hücre görüntüsü.



Şekil-4: A: Metilprednizolon grubunda TUNEL pozitif hücre görüntüsü B: Düşük doz doksametazon grubunda TUNEL pozitif hücre görüntüsü



Şekil-5: Yüksek doz doksametazon grubunda TUNEL pozitif hücre görüntüsü.

Yüksek doz deksametazon grubunda hipokampusta Aİ sonucu, diğer gruplardan anlamlı olarak yüksekti ($p<0.001$). Ayrıca, metilprednizolon grubunda Aİ sonucu kontrol, betametazon ve düşük doz deksametazon grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0.001$). Betametazon, düşük doz deksametazon ve kontrol grubu arasında Aİ sonucu açısından anlamlı fark yoktu ($p>0.05$). Sonuçlar tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo-3: Grupların hipokampus bölgesinde ortalama apoptotik indeks sonuçları

Gruplar	Hipokampusta Ortalama Apoptotik İndeks Sonuçları (\pm S.S.)
Kontrol	16.31 \pm 0.76
Betametazon	15.63 \pm 0.54
Metilprednizolon	22.81 \pm 0.74*
Düşük doz deksametazon	16.76 \pm 0.65
Yüksek doz deksametazon	41.16 \pm 2.27**

* $p<0.001$: metilprednizolon grubunun kontrol, betametazon ve düşük doz deksametazon grubuyla karşılaştırılması, ** $p<0.001$: yüksek doz deksametazon grubunun diğer gruplarla karşılaştırılması, S.S: Standart sapma

HİPOKAMPÜSÜN CA1 ve CA3 ALT BÖLGELERİNDE APOİTOTİK İNDEKS SONUÇLARI

Hipokampusun CA1 ve CA3 alt bölgelerinde TUNEL yöntemi ile yapılan boyama preparatlarında Aİ sonuçları kontrol grubunda, CA1, 6.81 \pm 0.52; CA3, 10.07 \pm 0.71, betametazon grubunda CA1, 6.48 \pm 0.37; CA3, 9.70 \pm 0.55, metilprednizolon grubunda, CA1, 8.64 \pm 0.51; CA3, 16.78 \pm 0.81, düşük doz deksametazon grubunda, CA1, 8.50 \pm 0.80; CA3, 10.19 \pm 0.67 ve yüksek doz deksametazon grubunda, CA1, 18.27 \pm 1.36; CA3, 26.66 \pm 1.93 olarak bulundu.

Yüksek doz deksametazon grubunda, hipokampusun hem CA1 hem de CA3 alt bölgelerinde Aİ sonucu diğer grupların CA1 ve CA3 alt bölgelerine göre anlamlı olarak yüksekti ($p < 0.001$).

Aİ sonucu, metilprednizolon grubunun CA1 alt bölgesinde, betametazon ($p<0.001$) ve kontrol ($p<0.02$) gruplarının CA1 alt bölgelerine göre anlamlı olarak

yüksekti. Metilprednizolon grubunun CA3 alt bölgesinde Aİ sayısı kontrol, betametazon ve düşük doz deksametazonun CA3 alt bölgelerine göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0.001$).

Ayrıca kontrol, betametazon, metilprednizolon ve yüksek doz deksametazon grubunun CA3 alt bölgelerinde Aİ sonucu, bu grupların CA1 alt bölgelerindekine göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0.001$). Düşük doz deksametazon grubunun CA3 alt bölgesinde Aİ sonucu CA1 alt bölgesine göre yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Sonuçlar tablo 4’te gösterilmiştir.

Tablo-4: Grupların CA1 ve CA3 alt alanlarında apopitotik indeks sonuçları

Gruplar	CA1 alt alanında apopitotik indeks sonucu (\pm S.S.)	CA3 alt alanında apopitotik indeks sonucu (\pm S.S.)
Kontrol	6.81 \pm 0.52	10.07 \pm 0.71
Betametazon	6.48 \pm 0.37	9.70 \pm 0.55
Metilprednizolon	8.64 \pm 0.51 [†]	16.78 \pm 0.81*
Düşük doz deksametazon	8.50 \pm 0.80 ^{††}	10.19 \pm 0.67
Yüksek doz deksametazon	18.27 \pm 1.36**	26.66 \pm 1.93**

[†] $p<0.05$: metilprednizolon grubunun kontrol ve betametazon grubuyla, ^{††} $p<0.05$: düşük doz deksametazon grubunun betametazon grubuyla, * $p<0.001$:metilprednizolon grubunun kontrol, betametazon ve düşük doz deksametazon grubuyla,** $p<0.001$: yüksek doz deksametazon grubunun diğer gruplarla karşılaştırılması. S.S: standart sapma

BEYİN AĞIRLIĞININ VÜCUT AĞIRLIĞINA ORANI

Beyin ağırlığının vücut ağırlığına oranı kontrol grubunda 0.038 \pm 0.0015, betametazon grubunda 0.038 \pm 0.0015, metilprednizolon grubunda 0.039 \pm 0.0005, düşük doz deksametazon grubunda 0.038 \pm 0.0011, yüksek doz deksametazon grubunda 0.031 \pm 0.0025 olarak saptandı. Yüksek doz deksametazon grubunda beyin ağırlığının vücut ağırlığına oranı diğer gruplara göre anlamlı olarak düşük saptanmıştır. Beyin ağırlığının vücut ağırlığına oranı arasında diğer gruplar arasında fark saptanmamıştır (Tablo-5).

Tablo-5: Grupların beyin ağırlığının vücut ağırlığına oranı

Gruplar	Beyin ağırlığının vücut ağırlığına oranı (\pm S.S.)
Kontrol	0.038 \pm 0.0015
Betametazon	0.038 \pm 0.0015
Metilprednizolon	0.039 \pm 0.0005
Düşük doz deksametazon	0.038 \pm 0.0011
Yüksek doz deksametazon	0.031 \pm 0.0025*

*p<0.02: yüksek doz deksametazon grubunun diğer gruplarla karşılaştırılması

S.S: standart sapma

TARTIŞMA

Kronik akciğer hastalığı çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerde halen mortalite ve morbiditenin ana sebebidir. Deksametazon ventilatöre bağımlı bebeklere KAH'ı önlemek ve tedavi etmek için uzun zamandan beri uygulanmaktadır (1,2).

BPD halen yaşayan düşük doğum ağırlıklı infantlarda (<1500 gram) ana problemlerendir (18,19). BPD düşük doğum ağırlıklı bebeklerin ortak hastalığı olup, 1000 gramın altındaki yenidoğanların yaklaşık %30-75'inde gelişmektedir (8,17,20). BPD'de primer patoloji akciğerlere ait olmasına rağmen multisistem bir hastalık olup, morbidite ve mortalitenin ana sebebi olduğundan BPD'nin tanısı önemlidir. BPD oksijen tedavisinin uzaması, reaktif hava yolu hastalığı ve solunum yolu hastalıklarına yol açar (2,20). BPD'li çocuklarda gelişim geriliği, pulmoner fonksiyonlarda azalma, okul başarısında düşüklük vardır (19,21-24).

KAH'ın tanısı, spesifik olmasa da, klinik ve radyolojik bulgulara dayanmaktadır (11). Hastalık ağırlığına göre, 32 haftalıktan küçük preterm bebeklerde hafif, orta ve ağır BPD olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır; 1. Hafif BPD: en az 28 gün oksijen ihtiyacının olması ve oksijen ihtiyacının 36. postmenstrual haftada kesilebilmesi, 2. Orta BPD: 36. postmenstrual haftadayken, en az 28 gün boyunca oksijen alması ve bu ihtiyacının %30 dan az olması ve 3. Ağır BPD: en az 28 gün boyunca %30 ve daha fazla oksijen desteği alması ve bu desteğin 36. postmenstrual haftada devam etmesi şeklinde tanımlanmıştır.

Yapılan çalışmalar sonucu deksametazonun bu bebeklerde erken ekstubasyonu sağladığı, oksijen tedavisinin süresini azalttığı ve akciğer fonksiyonlarını düzelttiği gösterilmiştir (1,2,79,80). Deksametazon tedavisi yenidoğanlarda beynin en hassas olduğu postmenstrual 24-40. haftalar arasında verilmektedir. Bu da dış etmenlere hassasiyeti artırmaktadır (13,28,29).

Bununla birlikte, prematüre infantlarda, deksametazonun akut dönemde sistemik bir çok yan etkisi vardır. Deksametazon, glukoz intoleransı, hipertansiyon, kardiyak hipertrofi, artmış nasokomial enfeksiyonlar, gastrointestinal sistem

kanaması, sepsis, barsak perforasyonu, kilo alımında azlık gibi yan etkilere yol açabilir (2,8,9,14,33-36). Akut dönemde nöromotor fonksiyonda değişiklikler gösterilmiştir (4,40). Glukokortikoidlerin bu etkiyi tam olarak nasıl yaptıkları bilinmese de büyüme faktörlerini inhibe ederek ve apopitozisi kolaylaştırarak yaptıkları tahmin edilmektedir (37). Glukokortikoidlerin beyinde apopitozise etkileri, glukokortikoid reseptörlerinin aktivasyonu sonucu hipokampüsteki granüler hücrelerde apopitozisi indüklemesiyle olmaktadır (75).

Prematüre bebeklerde deksametazonun fizyolojisi ve santral sinir sistemi fonksiyonları üzerine akut etkileri konusunda yapılan çalışmalar kısıtlıdır. Klinik çalışmalarda, uzun dönemli deksametazon tedavisinin büyüme geriliği, kilo alımında azlık, daha küçük baş çevresi şeklinde problemlere yol açtığı gösterilmiştir (37-39). Gross ve ark. (81) yaptığı bir çalışmada, kronik akciğer hastalığını önlemek için 2 haftalıkken deksametazon tedavisi alan 42 hasta 15 yaşına geldikleri zaman, büyümeleri, nörolojik gelişimleri ve akciğer gelişimleri değerlendirilmiştir. Hastaların doğum haftası 30 haftanın ve doğum ağırlığı 1250 gramın altında olup mekanik ventilasyona bağlanan hastalardı. Hastaların bir kısmı 42, bir kısmı 18 gün deksametazon tedavisi almıştır. Gruplar arasında nörolojik gelişim ve büyüme açısından fark saptanmamıştır. 42 günlük tedavi alan grubun hepsi normal sınıflarda eğitim alırken diğer grupta sadece %50 hasta ve kontrol grubunda % 40 hasta normal sınıflara devam etmiştir. Genel gidişata bakılacak olursa 42 günlük tedavi alan grubun gelişimi ve solunum fonksiyonları daha iyi saptanmıştır.

Prematüre bebeklerde serebral palsy için risk faktörleri arasında mekanik ventilasyon ve postnatal deksametazon kullanımı olduğu bilinmektedir. Deksametazon mekanik ventilasyona bağlanma süresini azalttığından sınırlı deksametazon kullanımı yararlı olabilir (82). Powell ve ark. (82) yaptıkları bir çalışmada doğum ağırlığı 1500 gramın altında olup, postnatal dönemde deksametazon tedavisi alan ve yaşayan bebekler arasında serebral palsy oranı araştırılmıştır. Bu çalışmada deksametazon tedavisi sadece oksijen ve/veya mekanik ventilasyon ihtiyacına göre verilmiştir. Serebral palsy postnatal 10. aydan sonra saptanmıştır. Takip edilen bebeklerin %27.3'ünde serebral palsy saptanmıştır. Sonuçta ventilatör süresi, periventriküler lökomalazi, *grade* 3/4 intraventriküler

kanama ve deksametazon kullanımının serebral palsy gelişiminde istatistiksel olarak anlamlı risk faktörleri oldukları saptanmıştır. Ayrıca serebral palsy riskinin deksametazonun toplam dozuyla da ilişkili olduğu saptanmıştır.

Yeh ve ark. (83) ciddi RDS olup mekanik ventilasyona gereksinim duyan 262 hasta incelemiştir. Deksametazon grubuna 1 hafta boyunca 12 saatte bir 0.25 mg/kg/gün deksametazon tedavisi verildikten sonra doz azaltılarak kesilmiştir. Çocukların büyümesi nörolojik ve motor gelişimi, okul başarısı değerlendirilmiştir. Deksametazon grubundaki çocuklar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında boyları daha kısa, motor gelişim daha geri, baş çevresi daha küçük, zeka gelişimi daha az saptanmıştır. Genel olarak bakıldığında yetersizlik deksametazon grubunda kontrol grubuna göre daha fazla saptanmıştır. Çalışmanın sonucunda erken postnatal deksametazon tedavisinin verilmesi önerilmemektedir.

Kamphuis ve ark.nın (84) ratlar üzerine yaptıkları bir çalışma sonucunda yenidoğan döneminde deksametazon alan ratların yaşam süresinin belirgin şekilde azaldığı saptanmıştır. Ayrıca, erken ölümlerin sebebinin son dönem kalp ve böbrek yetmezliği olduğu saptanmıştır. Erken dönemde hipertansiyon saptanmış olup, tansiyon düzeyi yaş arttıkça kötüleşmiştir.

Sistemik postnatal deksametazon kullanımı pretermelerde kronik akciğer hastalığı gelişme riskini azaltsa da nörogelişimsel bozuklukta artış yapma riski de vardır (85). Deksametazonun toplam dozunun bu etkiye yol açtığı bilindiğinden, Onland ve ark. (85) tarafından yapılan bir çalışmada düşük ya da yüksek toplam kortikosteroid dozunun preterm bebeklerde ölüm, akciğer gelişimi ve nörolojik gelişim açısından etkileri karşılaştırılmıştır. Çalışmaya 209 hasta katılmıştır. Hastalar 2 gruba ayrılarak yüksek deksametazon toplam 2.7 mg/kg'dan fazla ve düşük deksametazon toplam 2.7 mg/kg ya da daha az olacak şekilde verilmiştir. Nörolojik bozukluk açısından iki grup arasında fark saptanmamıştır. Kronik akciğer gelişmesini engellemede yüksek doz deksametazon tedavisinin düşük doz deksametazon tedavisine göre daha etkili olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre, kronik akciğer hastalığı riski olan prematüre bebeklerde ideal deksametazon dozunun halen bilinmediği sonucuna varılmıştır.

Bunlarla birlikte, Jones ve ark. (86) postnatal 2 ile 12 haftalık dönemde kronik oksijen bağımlısı olan 287 bebeğin gelişimini, sağlık durumunu ve akciğer gelişimini 13-17 yaş arasında incelemişlerdir. Sonuç olarak çocukların akciğer gelişiminin deksametazon alan gruba kontrol grubu arasında farklı olmadığı, büyümede gerilik ve kötü sağlık durumunun deksametazondan bağımsız olarak kronik akciğer hastalığına bağlı olduğunu saptamışlardır.

Murphy ve ark. (87) KAH olan, fakat ciddi intraventriküler kanama ya da beyaz cevher hasar bulgusu olmayan prematüre infantlarda, postnatal dönemde verilen deksametazon tedavisinin term dönemde beyin gelişimine etkisini araştırmışlardır. Doğum haftası 23-31 hafta arasında olan 18 prematüre bebek çalışmaya alınmıştır. Bunlardan yedisine deksametazon tedavisi verilirken diğerleri tedavi almamıştır. Term döneme (38-41 hafta) geldiklerinde gelişmiş manyetik rezonans görüntüleme (MRG) yöntemiyle serebral doku hacimleri ölçülmüştür. Çalışmaya ayrıca 14 sağlıklı term bebek de dahil edilmiştir. MRG ile serebral korteks gri cevher, bazal ganglion/talamus, miyelinsiz beyaz cevher, miyelinli beyaz cevher ve beyin omurilik sıvısı milimetre olarak ölçülmüştür. Sonuç olarak, deksametazon ile tedavi edilen grupta diğer gruplara göre özellikle serebral korteks gri cevherde belirgin azalma saptanmıştır. Deksametazon tedavisi alan prematüre infantlarda, ciddi solunum hastalıkları da olmasına rağmen, bu bulgu deksametazonun beyin gelişimini olumsuz etkilediğini gösterdiğinden dikkate alınması gereken önemli bir sorun olarak rapor edilmiştir.

Parikh ve ark. (88) oldukça düşük doğum ağırlıklı (<1500 gr) infantlarda postnatal deksametazon tedavisinin total ve yerel beyin hacmi arasındaki ilişkisini incelemişlerdir. Term dönemde bakılan beyin hacimleri volümetrik- MRG ile değerlendirilmiştir. Çalışmaya alınan 53 infantın 41'ine MRG çekilmiştir. Bunlardan 11 hasta postnatal steroid tedavisi almış olup, 30 hastaya tedavi verilmemiştir. Ortalama 6.8 günlükken verilen tedavinin toplam dozu 2 mg/kg olarak hesaplanmıştır. Deksametazon ile tedavi edilen grupta kontrol grubuna göre serebral doku hacimlerinde %10.2, korteks doku hacminde %8.7 serebellum doku hacminde %20.6 ve subkortikal gri cevherde % 19.9 oranında azalma olduğu

görülmüştür. Glukokortikoidlerin bu etkiyi apopitozisi kolaylaştırarak yaptıkları tahmin edilmektedir (37).

Apoptozis 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. Apoptozis fizyolojik veya patolojik uyaranlarla oluşabilir (43,44). Programlanmış bir hücre ölümü şekli olan apoptozis, genellikle bir hücrede veya hücre grubunda, plazma zarı bütünlüğü bozulmadan, yapısal ve nükleer proteinlerin parçalanması şeklinde izlenir. Apoptozis, embriyogenezden başlayarak yaşam boyunca her hücrede gerçekleşir ve birçok farklı biyolojik sistemi ilgilendiren önemli bir süreçtir (45,46).

Yenidoğan döneminde yaygın olarak kullanılan kortikosteroidlerin etkileri çok fazladır. Bunlar; karbohidrat, protein ve yağ metabolizmasında değişiklikler, sıvı ve elektrolit dengesinin sağlanması, kardiyovasküler, immün, böbrek, iskelet kası, endokrin ve sinir sisteminin normal işlevinin sürdürülmesidir. Ayrıca mekanizması tam olarak anlaşılmamış olmasına rağmen organizmanın stresli ortamlara uyum sağlamasına yardımcı olmaktadır. Adrenal korteks yokluğunda, yeterli ve düzenli beslenme, fazla miktarda sodyum klorid alımı ve uygun çevre ısısını sağlamak koşuluyla, vücut en uygun çevre ortamını sağlayarak yaşayabilir. Şimdiye kadar, kortikosteroidlerin etkileri fizyolojik (normal günlük üretim dozu) ve farmakolojik (günlük dozdan daha fazla) olarak sınıflandırılmıştır. Son zamanlarda antiinflamatuvar ve immüsupresif etki için farmakolojik dozda kullanılan kortikosteroidlerin fizyolojik durumda da koruyucu etkide rol aldığı öne sürülmüştür. Bu hipotez kortikosteroidlerin stres durumunda en az 10 kat arttığına gösterilmesiyle desteklenmiştir. Ayrıca, kortikosteroidlerin farmakolojik ve fizyolojik aktivitesi için aynı reseptörler kullanılmaktadır (73). Kortikosteroidlerin santral sinir sistemi üzerine etkileri ise kan basıncı, elektrolit ve glukoz konsantrasyonunu düzenleyerek dolaylı yoldan olmaktadır. Ruh hali, davranış ve beyin uyarılabilirliği üzerine doğrudan etki ederler. Kortikosteroidlerin nöronal aktiviteyi hangi mekanizmayla etkilediği bilinmemektedir. Son çalışmalar beyinde

yerel olarak üretilen steroidlerin nöronal uyarılabilirliği düzenlediğini düşündürmektedir.

Deksametazon, uzun etkili (yarı ömrü:36-72 saat) sentetik yapıda, betametazon, uzun etkili (yarı ömrü: 36-72 saat) sentetik yapıda ve metilprednizolon, orta etkili (yarı ömrü: 12-36 saat) sentetik yapıda glukokortikoidlerdir.

Çalışmamızda, yenidoğan döneminde, eşit antiinflamatuvar dozda betametazon, metilprednizolon ve düşük doz deksametazon tedavisinin beyin dokusunun hipokampus bölgesinde apoptozise etkisini ve beyin ağırlığın vücut ağırlığına oranını araştırdık. Ayrıca aynı etkiyi düşük ve yüksek doz deksametazon vererek de karşılaştırdık. Sonuçlarımız sadece betametazon tedavisinin hipokampusta nöronal ölüm üzerine anlamlı etkisi olmadığını gösterdi. Diğer taraftan, yüksek doz deksametazon ve metilprednizolon tedavisi hipokampusta anlamlı şekilde nöronal hücre ölümünde artışa neden oldu. Beyin ağırlığının vücut ağırlığına oranına bakacak olursak sadece yüksek doz deksametazon tedavisi, bu oranın istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmasına neden olmuştur. Bu sonuçlara göre, bu çalışmada çalışılan ilaçlar arasında sadece betametazon tedavisi kronik akciğer hastalığında en iyi tedavi seçeneği olabilir.

Hipokampus bir gri cevher tabakası olup, lateral ventrikülün alt boynuz tabanı boyunca uzanır (76). Hipokampusa tüm duyularla alakalı, doğrudan veya dolaylı çok sayıda afferent lif gelir. Bu duyuların hipokampusu terki forniks yoluyla olur. Miyelinli liflerden meydana gelen forniks; talamus, hipotalamus ve septal sahada sonlanır. Bu da hipokampus ile subkortikal alanlar arasındaki çeşitli devrelerin varlığını gösterir. Yine subkortikal alanlar aracılığı ile hipokampus, beyinde birçok bölge ile iletişim halindedir. Hareketlerin davranış biçimine dönüşmesinde önemli role sahip bulunan limbik sistem, çok sayıda sinyali hipokampustan alır. Ayrıca hipokampusun, özellikle de kısa süreli hafıza olmak üzere hafıza üzerinde rolü vardır. Hipokampusun yokluğunda, verbal veya sembolik anıların saklanması sorunlar gelişir (77).

Flagel ve ark. (28), yaptığı bir çalışmada postnatal 3-6. günler arasında yenidoğan ratlara azaltılan dozlarda deksametazon tedavisi (P3:0.5 mg/kg, P4:0.25 mg/kg, P5: 0.125 mg/kg ve P6:0.05 mg/kg) verilerek kontrol grubuyla etkisi karşılaştırılmıştır. Deksametazon tedavisi alan yenidoğan ratların P7 ve P14. günlerde major nörolojik gelişim açısından geri oldukları, fakat bu geriliğin P20. günde olmadığı görülmüştür. Geç adolesan döneminde (P33) deksametazon alan ratların ışıklı ve karanlık ortamlarda daha az aktif oldukları görülmüştür. Bu çalışmadaki rat modeli, yenidoğan yoğun bakım ünitesindeki bebeklerin nörolojik gelişiminin en yüksek olduğu dönemde azaltılan dozlarda deksametazon tedavisi aldıkları zamana denk gelmektedir .

Slotkin ve ark. (89) yaptıkları bir çalışma sonucunda, gelişmekte olan fetus beyninin, yenidoğan beynine göre glukokortikoidlerin yarattığı zarardan daha çok etkilendikleri görülmüştür. Glukokortikoid reseptörlerinin *feedback* düzenlenmesi vücudun hemostatik mekanizması için gereklidir. Bu nedenle yaptıkları bir çalışmada gebe ratlara gebeliğin 17-19. günlerinde, yenidoğan ratlara postnatal 1-3. günlerde ya da postnatal 7-9. günlerde steroid tedavisi vermişlerdir. Bu tedaviyle glukokortikoid reseptörlerinin *downregulation*'ının gelişimi araştırılmıştır. Ratlara verilen deksametazon dozu, prematüre bebeklere önerilen dozdan daha düşük doz ile tedavi dozu (0.2-0.8 mg/kg) arasında değişmiştir. En son enjeksiyondan 24 saat sonra ön beyinde glukokortikoid reseptör proteinlerinin düzeyi değerlendirilmiştir. Postnatal deksametazon tedavisi tüm dozlarda glukokortikoid reseptörlerini *downregulation* yapmasına rağmen, fetal ön beyinde reseptörlerde azalma yerine artma saptanmıştır. Kontrol grubunda da, bu dönemde dolaşımdaki glukokortikoid miktarında artma olmasına rağmen gebeliğin sonundan postnatal ikinci haftaya kadar glukokortikoid reseptörlerinde fazla miktarda artma görülmüştür. Bu sonuçlara göre glukokortikoid hemostazının özellikle postnatal dönemde geliştiği ve fetusun dışardan verilen glukokortikoidlere oldukça hassas olmasının da glukokortikoid reseptörlerinde *downregulation* yapamamasından kaynaklandığı belirtilmiştir. Ayrıca bu en kritik dönemde glukokortikoid verilmesi sonucunda beyin gelişiminde yan etkiler ortaya çıkmasının kaçınılmaz olduğu rapor edilmiştir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda deksametazon tedavisinin uzun dönemde nörolojik yan etkilerinin çok olduğu gösterildiğinden, kullanımında azalmaya gidilmiştir. Ayrıca tedavi ne kadar erken başlarsa komplikasyonların o kadar fazla olduğu da görülmüştür (90,91). Fakat, postnatal dönemde deksametazonun kullanımı azaldıkça, KAH riskinin artacağı konusunda endişeler artmaktadır. Bu nedenle, Choi ve ark (2) tarafından yapılan bir çalışmada postnatal dönemde deksametazon dozu azaltılarak KAH insidansı araştırılmıştır. Bu çalışmada, postnatal deksametazon tedavisi yüksek ya da düşük doz şeklinde verilmiştir. Tedavi postnatal ikinci ya da üçüncü haftada başlanmıştır. Yüksek doz tedavi: 48 saat boyunca, 0.5 mg/kg/gün, 12 saatte bir verilecek şekilde doz ikiye bölünmüştür. Sonra doz 48 saatte bir yarıya düşürülerek 5 gün daha verilmiştir. Tedavi toplam 7 gün şeklinde ayarlanmıştır. Düşük doz tedavi rejiminde süre, yüksek doz tedavi rejimindeki gibi, fakat başlangıç dozu 0.2 mg/kg/g şeklinde planlanmıştır. Çalışmanın sonuçları, postnatal dönemde deksametazon dozu azaltılmasına rağmen KAH insidansının artmadığını göstermiştir.

Yakın zamanda, Kılıç ve ark. (10) tarafından yapılan bir çalışmada, yenidoğan döneminde eşit antiinflamatuvar dozda yüksek doz deksametazon tedavisinin (P3:0.5 mg/kg, P4:0.25 mg/kg, P5:0.125 mg/kg, P6:0.05 mg/kg subkutan) ve metilprednizolon tedavisinin (P3:2.6 mg/kg, P4: 1.3 mg/kg, P5:0.650 mg/kg, P6: 0.325 mg/kg) rat büyümesi ve nörolojik gelişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak postnatal dönemde verilen metilprednizolon ve deksametazon tedavisinin kontrole göre yenidoğan ratlarda kiloyu postnatal 4-6, 8, 14 ve 22 günlerde daha fazla azalttığı, fakat bu azalmanın deksametazon tedavisi alan grupta anlamlı olarak en az olduğu görülmüştür. Deksametazon tedavisi alan grupta postnatal 14 ve 21. günlerde bakılan boy metilprednizolon grubuna göre anlamlı olarak düşük saptanmıştır. Metilprednizolon tedavisi alan yenidoğan ratlarda nörolojik skorun deksametazon tedavisi alanlara göre postnatal 7, 14 ve 21. günlerde daha yüksek olduğu görülmüştür. Postnatal 7 ve 14. günlerde bakılan nörolojik skor, kontrol grubuna göre daha düşük bulunmasına rağmen postnatal 21. günde bakılan toplam nörolojik skor iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Çalışmanın sonucunda postnatal metilprednizolon tedavisinin deksametazona göre daha güvenli olabileceği belirtilmiştir. Çalışmamızda, yüksek

doz deksametazon tedavisinin metilprednizolon tedavisine göre daha fazla nöronal ölüme sebep olduğu görülmüştür. Fakat, metilprednizolon tedavisi alan ratlarda Aİ sayısı betametazon ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Sonuç olarak metilprednizolon tedavisi yüksek doz deksametazon tedavisinden daha güvenli olabilir. Fakat, çalışmamızda betametazon tedavisi hem yüksek doz deksametazon hem de metilprednizolon tedavisinden daha güvenli bulundu.

Andre ve ark. (9), kronik akciğer hastalığı riski olan çok küçük prematüre bebeklerde metilprednizolon tedavisinin yararlarını ve orta dönemde yan etkilerini araştırmışlardır. Metilprednizolon ve deksametazon grubuna doğum haftaları 24-29 olan 45'er prematüre bebek alınmıştır. Bu çalışmada metilprednizolon grubuna 6 saatte bir metilprednizolon tedavisi verilmiştir (0.6, 0.4, 0.2 mg/kg/doz her 3 günde bir). Dokuz gün sonra tedavi dozu 21 güne tamamlanacak şekilde 0.1 mg/kg betametazon tedavisi verilmiştir. Deksametazon grubuna 6 saatte bir deksametazon tedavisi verilmiştir (0.25, 0.125, 0.1 mg/kg/doz her 3 günde bir). Yine 9 gün sonunda tedavi aynı şekilde betametazonla devam ettirilmiştir. Sonuçta metilprednizolon tedavisinin kronik akciğer hastalığında deksametazon kadar etkili olduğu ve daha az yan etkisinin olduğu görülmüştür. Kistik periventriküler lökomalazi ve nörolojik yan etki insidansı metilprednizolon tedavisi alan grupta daha düşük bulunmuştur. Ayrıca metilprednizolon grubundaki bebekler deksametazon grubundakilere oranla daha fazla kilo almışlardır. Bu çalışmada kontrol grubu olmadığından metilprednizolon tedavisinin büyümeye olumsuz etkisi olup olmadığı saptanamamıştır. Benzer şekilde, bizim çalışmamızdaki sonuçlarda da yüksek doz deksametazon grubunda Aİ sayısının metilprednizolon grubundan daha fazla olduğu görüldü. Fakat betametazon tedavisinin, metilprednizolon tedavisine göre daha az nöronal hücre ölümüne yol açtığı görüldü. Bununla birlikte, beyin ağırlığının vücut ağırlığına oranı açısından betametazon, metilprednizolon, düşük doz deksametazon ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı.

Cambonie ve ark. (92) yaptığı bir çalışmada betametazonun ciddi kronik akciğer hastalığı olan yenidoğanlarda serebral hemodinamiğe etkisi araştırılmıştır. Postnatal 34. günden başlayarak 12 bebeğe 6 ardışık gün boyunca günde bir kez

betametazon tedavisi intravenöz uygulanmıştır. Bebeklerin ortalama doğum kiloları 698 gram, doğum haftaları 25.3 hafta olarak tespit edilmiştir. Serebral kan akımı, tedavi öncesi, tedavi sırasında ve tedaviden sonra *dopler flowmetry* ile ön serebral arter ve lentikülostriat arterden ölçülmüştür. Her iki arterde tedavi sırasında akımda anlamlı şekilde azalma ve dirençte anlamlı şekilde artma saptanmıştır. Tedavi kesildikten sonra bazal değerlere geri dönüş saptanmıştır. Sonuç olarak, betametazonun prematüre bebeklerde serebral kan akımını vazokonstriksiyon sonucu azalttığı ve bu nedenle ciddi KAH'lı prematüre bebeklerde kullanılırken dikkatli olunması gerektiği belirtilmiştir.

Limbik sistem beynin duygu ve hafıza oluşumunu sağlayan bölgesidir. Hipokampus ve amigdal önemli limbik yapılardır ve prematüre bebeklerin beyin gelişimi sırasında etkilenebilirler. Antenatal kortikosteroidler ve etkilerini gösteren çalışmalar çelişkili sonuçlar ortaya koymuştur (93,94). Kanagawa ve ark'nın (7) yaptığı bir çalışmada postnatal dönemde yenidoğan ratlara tekrarlayan dozlarda deksametazon tedavisi verilmiştir. 1. gruba postnatal 4. günde 0.5 mg/kg deksametazon tedavisi, 2. gruba postnatal 4. ve 5. günde 0.5 mg/kg/g deksametazon tedavisi ve 3. gruba 4., 5. ve 6. günlerde 0.5 mg/kg/gün deksametazon tedavisi verilerek karşılaştırma yapılmıştır. Tekrarlayan dozlarda deksametazon tedavisi alan yenidoğan ratların beyin ve vücut ağırlığının kontrol grubuna göre daha düşük olduğu görülmüştür. Bizim çalışmamızda da sadece yüksek doz deksametazonun beyin ağırlığının vücut ağırlığına oranını anlamlı bir şekilde azalttığı görüldü.

Sousa ve ark. (95) yaptığı bir çalışmada deksametazon tedavisinin (0.3 mg/kg) erişkin ratların dentat girus ve CA3 alt bölgesindeki piramidal hücrelerinde ve bu alt tabakanın bazı alanlarının hacminde istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma yaptığını fakat, CA1 bölgesindeki piramidal hücreleri etkilemediği görülmüştür. Sapolsky ve ark'nın (96) yaptığı bir çalışmada, erişkin maymunların hipokampuslarının etrafına kortizol implante edilmiştir. Bunun sonucunda CA3/CA2 bölgesindeki piramidal hücrelerin ve bu hücrelerin dendritik dallarının yapısının bozulduğu görülmüştür. Diğer taraftan yapılan başka bir çalışmada (97) deksametazon tedavisinin (20 mg/kg) striatum ve hipokampus hacmini azalttığı görülmüştür. Ayrıca en çok dentat girus, CA3 ve CA1 alt bölgeleri en hassas

bölgeler olarak saptanmıştır. Bizim çalışmamızda metilprednizolon ve yüksek doz deksametazon grubunda kontrol grubuna göre, düşük doz deksametazon grubunda betametazon grubuna göre CA1 bölgesinde Aİ sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı. CA3 alt bölgesine baktığımızda, hem yüksek doz deksametazon hem de metilprednizolon grubunda bu bölgede Aİ sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü.

Sonuç olarak glukokortikoidler, prematüre bebeklerde kronik akciğer hastalığını azaltmak için etkilidir, fakat yüksek doz deksametazon kabul edilmesi zor yan etkilere yol açmaktadır. Bu nedenle, yüksek doz deksametazon tedavisine acil olarak alternatif bir tedavi protokolü gerekmektedir. Bu sonuçlara göre, düşük doz deksametazon ve metilprednizolon tedavisi, yüksek doz deksametazon tedavisine göre daha güvenli olabilir. Fakat betametazon, bu çalışmada kullanılan glukokortikoidler arasında kronik akciğer hastalığında yüksek doz deksametazona en iyi alternatif tedavi olabilir.

SONUÇLAR

1. Hipokampal bölgede Aİ sonucu metilprednizolon grubunda kontrol, betametazon ve düşük doz deksametazon grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$).
2. Hipokampal bölgede Aİ sonucu yüksek doz deksametazon grubunda betametazon, metilprednizolon, düşük doz deksametazon ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$).
3. Hipokampal bölgede Aİ sonucu betametazon, düşük doz deksametazon ve kontrol grupları arasında farklı değildi ($p>0.05$).
4. Hipokampal bölgenin CA1 alt bölgesinde Aİ sonucu yüksek doz deksametazon grubunda betametazon, düşük doz deksametazon, metilprednizolon ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$).
5. Hipokampal bölgenin CA1 alt bölgesinde Aİ sonucu metilprednizolon grubunda betametazon ($p<0.001$) ve kontrol ($p<0.02$) gruplarının CA1 alt bölgelerine göre anlamlı olarak yüksekti.
6. Hipokampal bölgenin CA1 alt bölgesinde Aİ sonucu düşük doz deksametazon grubunda betametazon grubunun CA1 alt bölgesine göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0.03$).
7. Hipokampal bölgenin CA1 alt bölgesinde Aİ sonucu düşük doz deksametazon grubunda kontrol grubunun CA1 alt bölgesine göre yüksek olmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).
8. Hipokampal bölgenin CA3 alt bölgesinde Aİ sonucu yüksek doz deksametazon grubunda betametazon, düşük doz deksametazon, metilprednizolon ve kontrol grubunun CA3 alt bölgesine göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$).

9. Hipokampal bölgenin CA3 alt bölgesinde Aİ sonucu metilprednizolon grubunda kontrol, betametazon ve düşük doz deksametazonun CA3 alt bölgelerine göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$)
10. Hipokampal bölgenin CA3 alt bölgesinde Aİ sonucu betametazon ve düşük doz deksametazon gruplarında kontrol grubuna göre farklı bulunmadı ($p>0.05$)
11. Düşük doz deksametazon grubunun hipokampus bölgesinin CA3 ve CA1 alt bölgelerindeki Aİ sonucu farklı bulunmadı ($p>0.05$)
12. Kontrol, betametazon, metilprednizolon ve yüksek doz deksametazon grubunun CA3 alt bölgelerinde Aİ sonucu, bu grupların CA1 alt bölgelerine göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0.001$).
13. Beyin ağırlığının vücut ağırlığına oranı yüksek doz deksametazon grubunda anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.02$)
14. Beyin ağırlığının vücut ağırlığına oranı betametazon, metilprednizolon ve düşük doz deksametazon gruplarında kontrol grubuna göre farklı bulunmadı ($p>0.05$)

ÖZET

FARKLI KORTİKOSTEROİDLERİN RATLARDA HİPOKAMPUSTA NÖRON KAYBINA VE BEYİN AĞIRLIĞINA ETKİSİ

Dr.Fatma Duksal

Amaç: Kronik akciğer hastalığı riski olan mekanik ventilatöre bağlı düşük doğum ağırlıklı yenidoğanlara steroid tedavisi uygulanmaktadır. Çalışmamızda neonatal dönemde eşit etkin dozda deksametazon, betametazon ve metilprednizolon tedavisinin, ayrıca yüksek doz deksametazon tedavisinin hipokampusta nöron kaybına etkisi ve beyin ağırlığının vücut ağırlığına oranı karşılaştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda üretilmiş olan Sprague-Dawley ratlar (Denizli, Türkiye) çalışmaya alındı.

1. Grup, kontrol; 2. grup betametazon; 3. grup, metilprednizolon; 4. grup, düşük doz deksametazon; 5. grup, yüksek doz deksametazon grubu

Postnatal 3., 4. ve 5. günlerde kontrol grubuna serum fizyolojik, ikinci gruba betametazon, üçüncü gruba metilprednizolon, dördüncü gruba düşük doz deksametazon, beşinci gruba yüksek doz deksametazon tedavisi azaltılan dozlarda subkutan verildi. Vücut ağırlıkları ilaçlar verilmeden önce postnatal 1., postnatal 3-5 günlerde ve postnatal 7. günde dekapitasyon öncesinde ölçüldü. Postnatal 7. günde beyin kraniotomi ile çıkarıldı. Beyin ağırlıkları ölçüldü. Beyin dokusu simetrik olarak ikiye bölünerek bir yarısı TUNEL boyama için hazırlandı.

Bulgular: Yüksek doz deksametazon grubunda hipokampusta Aİ sayısı diğer gruplardan anlamlı olarak fazlaydı ($p<0.001$). Ayrıca, metilprednizolon grubunda Aİ sayısı kontrol, betametazon ve düşük doz deksametazon grubuna göre anlamlı olarak fazlaydı ($p<0.001$).

Yüksek doz deksametazon grubunda, hipokampusun hem CA1 hem de CA3 alt bölgelerinde Aİ sayısı diğer grupların CA1 ve CA3 alt bölgelerine göre anlamlı olarak yüksekti ($p <0.001$).

Aİ sayısı metilprednizolon grubunun CA1 alt bölgesinde, betametazon ($p<0.001$) ve kontrol ($p<0.02$) gruplarının CA1 alt bölgelerine göre anlamlı olarak yüksekti. Düşük doz deksametazon grubunun CA1 alt bölgesinde Aİ sonucu betametazon grubunun CA1 alt bölgesine göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0.03$). Metilprednizolon grubunun CA3 alt bölgesinde Aİ sayısı kontrol, betametazon ve düşük doz deksametazonun CA3 alt bölgelerine göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0.001$).

Ayrıca, kontrol, betametazon, metilprednizolon ve yüksek doz deksametazonun CA3 alt bölgelerinde Aİ sonucu, bu grupların CA1 alt bölgelerindekine göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0.001$).

Beyin ağırlığının vücut ağırlığına oranı yüksek doz deksametazon grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak düşük bulunurken ($p<0.02$), betametazon, metilprednizolon, düşük doz deksametazon ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0.05$).

Sonuç: Sonuç olarak betametazonun hipokampusta nöron kaybına yol açmadığı ve beyin ağırlığını sadece yüksek doz deksametazonun etkilediği sonucuna varılmıştır.

SUMMARY

EFFECTS OF DIFFERENT CORTICOSTEROIDS ON THE BRAIN WEIGHT AND HIPPOCAMPAL NEURONAL LOSS IN RATS

Dr.Fatma Duksal

Purpose: Dexamethasone has been applied to ventilator-dependend premature infants with chronic lung disease to improve lung function. In this study, the effects of the equivalent doses for antiinflammatory potency of neonatal dexamethasone, betamethasone and methylprednisolone have been evaluated on in situ cell death in hippocampus and on ratio of brain weight to body weight in rats. Same comparision has also been performed with high and low dose dexamethasone treatment.

Material and Method:

Groups were prepared as follows:

Group 1, control; group 2;betamethasone; group 3, methylprednisolone; group 4, low dose dexamethasone; group 5, high dose dexamethasone group

At postnatal 3rd, 4th and 5th days pups at first, second, third, fourth and fifth groups were injected with saline, betamethasone, methylprednisolone, low and high dose dexamethasone respectively. The treatments were given subcutaneously with tapering doses.

Body weight was measured on PD1, PD 3-5 before the treatment was given and on PD 7 before the decapitation. On PD 7 brain weights were measured and divided into two hemispheres. One hemisphere was processed for TUNEL method.

Results: AI was significantly higher in high dose dexamethasone group than the other groups ($p<0.001$). It was also significantly higher in methylprednisolone group than betamethasone, low dose dexamethasone and control groups ($p<0.001$). AI in CA1 and CA3 subregions of high dose dexamethasone group were the highest among the five groups ($p<0.001$). AI in CA1 subregion of methylprednisolone group was significantly higher than that in control ($p<0.02$),

and betamethasone ($p < 0.001$) groups. AI in CA1 subregion of low dose dexamethasone group was significantly higher than that in betamethasone ($p < 0.03$) group. AI in CA3 subregion of methylprednisolone group was significantly higher than that in control, betamethasone, and low dose dexamethasone groups ($p < 0.001$). AI of CA3 subregion was significantly higher than that of CA1 subregion in control, betamethasone, methylprednisolone and high dose dexamethasone groups ($p < 0.001$).

High dose dexamethasone caused significant decrease in the ratio of brain weight to body weight ($p < 0.02$), there was no significant difference among other groups.

Conclusion: Betamethasone treatment has no effect on hippocampal neuronal loss. High dose dexamethasone treatment decreases the ratio of brain weight to body weight.

KAYNAKLAR

1. Romagnoli C, Zecca E, Luciano R, Torrioli G and Tortorolo G. A three year follow up of preterm infants after moderately early treatment with dexamethasone. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2002; 87:F55-58.
2. Choi CW, Hwang JH, Shim JW, Ko SY, Lee EK, Kim SS, Chang YS, Park WS, Shin SM. Decreasing incidence of chronic lung disease despite the gradual reduction of postnatal dexamethasone use in very low birth weight infants. *J Korean Med Sci* 2004; 19:514-518.
3. Neal CR Jr, Weidemann G, Kabbaj M, Vázquez DM. Effect of neonatal dexamethasone exposure on growth and neurological development in the adult rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004 ; 287:375-385.
4. Yeh TF, Lin YJ, Huang CC, Chen YJ, Lin CH, Lin HC, Hsieh WS, Lien YJ. Early dexamethasone therapy in preterm infants: A follow up study. *Pediatrics* 1998 DOI:10.1542/peds.101.5.e7.
5. Murphy BP, Inder TE, Huppi PS, Warfield S, Zientara GP, Kikinis R, Jolesz FA, Volpe JJ. Impaired cerebral cortical gray matter growth after treatment with dexamethasone for neonatal chronic lung disease. *Pediatrics* 2001; 107:217-221 .
6. Halliday HL. Early postnatal dexamethasone and cerebral palsy. *Pediatrics* 2002; 109:1168-1169.
7. Kanagawa T, Tomimatsu T, Hayashi S, Shioji M, Fukuda H, Shimoya K, Murata Y The effects of repeated corticosteroid administration on the neurogenesis in the neonatal rat. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194:231-238.
8. Stark AR, Carlo WA, Tyson JE, Papile LA, Wright LL, Shankaran S, Donovan EF, Oh W, Bauer CR, Saha S, Poole WK, Stoll BJ. Adverse effects of early dexamethasone treatment in extremely-low-birth-weight infants. National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *N Engl J Med* 2001; 344:95-101.
9. André P, Thébaud B, Odièvre MH, Razafimahefa H, Zupan V, Dehan M, Lacaze-Masmonteil T. Methylprednisolone, an alternative to dexamethasone in very premature infants at risk of chronic lung disease. *Intensive Care Med* 2000; 26:1496-1500.

10. Kilic I, Dagdeviren E, Kaya E. The effects of neonatal dexamethasone or methylprednisolone on rat growth and neurodevelopment. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 2006; 19: 139-140.
11. Bancalari EH. Bronchopulmonary dysplasia and neonatal chronic lung disease. In: Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh MC, eds. *Neonatal and Perinatal Medicine: Diseases of The Fetus and Infant*. Elsevier Science Company. 8th edition, Philadelphia, USA; 2006: 1155-1168.
12. Neal CR, Weidemann G, Kabbaj M, Vazquez DM. Effect of neonatal dexamethasone exposure on growth and neurological development in the adult rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;56: 375-385.
13. Jobe AH, Ikegami M. Antenatal infection/inflammation and postnatal lung maturation and injury. *Respir Res* 2001; 2: 27-32
14. Jobe AJ. The new BPD: An arrest of lung development. *Pediatr Res* 1999; 46: 641-643.
15. Bancalari E, Claure N, Sosenko IR. Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition. *Semin Neonatol* 2003; 8: 63-71
16. Watterberg KL, Demers LM, Scott SM, Murphy S. Chorioamnionitis and early lung inflammation in infants in whom bronchopulmonary dysplasia develops. *Pediatrics* 1996; 97: 210-215.
17. Farstad T, Bratlid D. Bronchopulmonary dysplasia. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2007; 127:2374-2377.
18. Lemons JA, Bauer CR, Oh W, Korones SB, Papile LA, Stoll BJ, Verter J, Temprosa M, Wright LL, Ehrenkranz RA, Fanaroff AA, Stark A, Carlo W, Tyson JE, Donovan EF, Shankaran S, Stevenson DK. Very low birth weight outcomes of the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, January 1995 through December 1996. NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 2001; DOI: 10.1542/peds.107.1.e1
19. Tin W, Wiswell TE. Adjunctive therapies in chronic lung disease: Examining the evidence. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2008; 13: 44-52
20. Ballard HO, Anstead MI, Shook LA. Azithromycin in the extremely low birth weight infant for the prevention of bronchopulmonary dysplasia: a pilot study. *Respir Res* 2007; 8:41.

21. Eber E, Zach MS. Long term sequelae of bronchopulmonary dysplasia (chronic lung disease of infancy). *Thorax* 2001; 56: 317–323.
22. Kaempf JW, Campbell B, Brown A, Bowers K, Gallegos R, Goldsmith JP. PCO₂ and room air saturation values in premature infants at risk for bronchopulmonary dysplasia. *J Perinatol* 2008; 28: 48-54.
23. Anderson PJ, Doyle LW. Neurodevelopmental outcome of bronchopulmonary dysplasia. *Sem Perinatol* 2006; 30: 227–232.
24. Needelman H, Evans M, Roberts H, Sweney M, Bodensteiner JB. Effects of Postnatal Dexamethasone Exposure on the Developmental Outcome of Premature Infants. *J Child Neurol* 2008; 23: 421-424.
25. Short EJ, Kirchner HL, Asaad GR, Fulton SE, Lewis BA, Klein N, Eisengart S, Baley J, Kercksmar C, Min MO, Singer LT. Developmental Sequelae in Preterm Infants Having a Diagnosis of Bronchopulmonary Dysplasia. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2007; 161:1082-1087.
26. Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:1723-1729.
27. Gross SJ, Anbar RD, Mettelman BB. Follow-up at 15 years of preterm infants from a controlled trial of moderately early dexamethasone for the prevention of chronic lung disease *Pediatrics.* 2005; 115:681-7.
28. Flagel SB, Vázquez DM, Watson SJ Jr, Neal CR Jr. Effects of tapering neonatal dexamethasone on rat growth, neurodevelopment, and stress response. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 282: R55-63.
29. Kamphuis PJ, Croiset G, Bakker JM, Van Bel F, Van Ree JM, Wiegant VM. Neonatal dexamethasone treatment affects social behaviour of rats in later life. *Neuropharmacology* 2004;47: 461-474.
30. Hagberg H, Bona E, Gilland E, Puka-Sundvall M. Hypoxia-ischemia model in the 7 day old rat: possibilities and shortcomings. *Acta Paediatr Suppl.* 1997; 422: 85–88.
31. Yossuck P, Kraszpulski M, Salm AK. Perinatal corticosteroid effect on amygdala and hippocampus volume during brain development in the rat model. *Early Hum Dev* 2006; 82: 267-272.
32. Whitelaw A, Thoresen M. Antenatal steroids and the developing brain. *Arch Dis Child. Fetal Neonatal Ed* 2000 ; 83: F154– 157.

33. Halliday HL, Ehrenkranz RA. Moderately early (7–14 days) postnatal corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;2:CD001144.
34. Halliday HL, Ehrenkranz RA. Early postnatal (<96 hours) corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;2:CD001146.
35. Romagnoli C, Zecca E, Vento G, Maggio L, Papacci P, Tortorolo G. Effect on growth of two different dexamethasone courses for preterm infants at risk of chronic lung disease. A randomized trial. *Pharmacology* 1999;59:266–274.
36. Zecca E, Pappacci P, Maggio L, Gallini F, Elia S, De Rosa G, Romagnoli C. Cardiac adverse effects of early dexamethasone treatment in preterm infants: a randomized clinical trial. *J Clin Pharmacol* 2001;41:1075–1081
37. Son GH, Geum D, Jung H, Kim K. Glucocorticoid inhibits growth factor-induced differentiation of hippocampal progenitor HiB5 cells. *J Neurochem* 2001; 79:1013-2138.
39. Shrivastava A, Lyon A, and McIntosh N. The effect of dexamethasone on growth, mineral balance and bone mineralisation in preterm infants with chronic lung disease. *Eur J Pediatr* 2000;159:380–384.
40. Bos AF, Martijn A, van Asperen RM, Hadders-Algra M, Okken A, and Prechtl HF. Qualitative assessment of general movements in high-risk preterm infants with chronic lung disease requiring dexamethasone therapy. *J Pediatr* 1998;132: 300–306.
41. Navarro HA, Lachowicz J, Bartolome J, Whitmore WL, Slotkin TA. Effects of prenatal dexamethasone on development of ornithine decarboxylase activity in brain and peripheral tissues of rats. *Pediatr Res* 1988; 24: 465–469.
42. O’Shea TM, Kothadia JM, Klinepeter KL, Goldstein DJ, Jackson BG, Weaver RG 3rd, and Dillard RG. Randomized placebo-controlled trial of a 42-day tapering course of dexamethasone to reduce the duration of ventilator dependency in very low birth weight infants: outcome of study participants at 1-year adjusted age. *Pediatrics* 1999;104: 15–21.
43. Ameisen JC. The origin of programmed cell death. *Science* 1996; 272:1278-1279

44. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462.
45. Kerr JF, Wyllie AH., Currie AR.. Apoptosis:a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26:239-257.
46. Cohen GM. Caspases:the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326: 1-16
47. Thompson CB. Apoptosis. In: Paul WE, ed. *Fundamental Immunology*. Lippincott-Raven Publishers, 4th edition, Philadelphia, USA. 1999.137-149.
48. Wyllie AH, Duvall E. Cell death. In: McGee JO'D, Isacson PG, Wright N, eds. *Oxford Textbook of Pathology*, vol 1, 1st edition, USA, Oxford University Press 1992: 142-147
49. Chamond RR, Anon JC, Aguilar CM, Pasadas FG. Apoptosis and disease *Alergol Immunol Clin*. 1999; 14:367-374
50. Narula J, Kharbanda S, Khaw BA. Apoptosis and the heart. *Chest*. 1997;112:1358-1362.
51. Oktem S, Ozhan MH, Ozol D: Apoptozisin önemi: Toraks. 2001; 2:91-95
52. Marsden VS.and Strasser A.. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21:71-105
53. Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie AH. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Semin Cancer Biol* 1995; 6: 3-16.
54. Bosman FT, Visser BC, Ooveren JV. Apoptosis: Pathophysiology of programmed cell death. *Path Res Pract* 1996; 192: 676-683.
55. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997; 91:443-446.
56. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases:enemies within. *Science* 1998; 281:1312-1316.
57. Chen M, Wang J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* 2002; 7: 313-319.
58. Katoh K, Ikata T, Katoh S, Hamada Y, Nakauchi K, Sano T, Niwa M. Induction and its spread of apoptosis in rat spinal cord after mechanical trauma. *Neurosci Lett*. 1996; 216:9-12.

59. Lu J, Ashwell K, Waite P. Advances in secondary spinal cord injury: Role of apoptosis . *Spine*. 2000; 25: 1859-1866.
60. Nakatsuka H, Ohta S, Tanaka J, Toku K, Kumon Y, Maeda N, Sakanaka M, Sakaki S. Release of cytochrome c from mitochondria to cytosol in gerbil hippocampal CA1 neurons after transient forebrain ischemia. *Brain Res*. 1999; 849: 216-219.
61. Dash P. Apoptosis. Basic Medical Sciences, St.George's, University of London www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash adresinden 30 Mayıs 2008 tarihinde ulaşılmıştır..
62. Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 1994; 369:321-323.
63. Nakamura K, Bossy-Wetzell E, Burns K, Fadel MP, Lozyk M, Goping IS, Opas M, Bleackley RC, Green DR, Michalak M. Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J Cell Biol* 2000; 150: 731-740.
64. Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* 2001; 276: 869-874.
65. Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Simon MC, Ma A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, MacGregor GR, Thompson CB. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 2000; 6:1389-1399
66. Rathmell JC, Lindsten T, Zong WX, Cinalli RM, Thompson CB. Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. *Nat Immunol*. 2002;3:932-939.
67. Strasser A. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:189-200.
68. Fox CK, Furtwaengler A, Nepomuceno RR, Martinez OM, Krams SM. Apoptotic pathways in primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *Liver* 2001; 21: 272-279.

69. Jersak M, Bischof P. Apoptosis in the first trimester human placenta: the role in maintaining immun privilege at the maternal-foetal interface and in the trophoblast remodelling. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2002; 100: 138-142.
70. Budd RC. Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *J Clin Invest.* 2002; 109: 437-441.
71. Aral H. Apoptozis. *Sendrom.* 1996;1:33-37.
72. Jones BA, Gores GJ. Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas, and intestine. *Am J Physiol* 1997; 273: G1174-1188.
73. Schimmer BP, Parker KL Adrenocorticotropic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. In: Hardman JG, Limbird LE (eds) *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics.* 9th ed. The Mc-Graw-Hill Companies, New York, NY, USA, 1996;1459-1485.
74. Chrousos GP, Margioris AN. Adrenocorticosteroids and Adrenocortical Antagonists. In: Bertram G. Katzung, eds. *Basic and Clinical Pharmacology.* San Francisco: McGraw-Hill, 2001: 660-678.
75. Almeida OF, Condé GL, Crochemore C, Demeneix BA, Fischer D, Hassan AH, Meyer M, Holsboer F, Michaelidis TM. Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. *FASEB J* 2000;14:779-790.
76. Hayman LA, Fuller GN, Cavazos JE, Pflieger MJ, Meyers CA and Jackson EF. The Hippocampus: Normal Anatomy and Pathology. *Am J Roentgenol* 1998;171:1339-1146.
77. Songur A, Ozen OA, Sarsılmaz M. Hipokampus. *Turkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 2001; 21:427-431.
78. Unal N, Akdoğan I, Adıgüzel E, Ozdemir B, Tufan A.C. Effect of Penicilin-Induced Epilepsy Seizure On The Volume of Hippocampus Striatum Pyramidalis In Rats. *Neurosci Res Comm.* 2003; 33: 210-217.
79. Mammel MC Gren TP, Johnson DE, Thompson TR Controlled trial of dexamethasone therapy in infants with bronchopulmonary dysplasia. *Lancet.* 1983; 1: 1356-1358.

80. Baud O. Postnatal steroid treatment and brain development. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004; 89: F96-100.
81. Gross SJ, Anbar RD, Mettelman BB. Follow-up at 15 years of preterm infants from a controlled trial of moderately early dexamethasone for the prevention of chronic lung disease. *Pediatrics* 2005; 115: 681-687.
82. Powell K, Kerkering KW, Barker G, Rozycki HJ. Dexamethasone dosing, mechanical ventilation and the risk of cerebral palsy. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2006; 19: 43-48.
83. Yeh TF, Lin YJ, Lin HC, Huang CC, Hsieh WS, Lin CH, Tsai CH. Outcomes at school age after postnatal dexamethasone therapy for lung disease of prematurity. *N Engl J Med* 2004; 350: 1304-1313.
84. Kamphuis PJ, de Vries WB, Bakker JM, Kavelaars A, van Dijk JE, Schipper ME, van Oosterhout MF, Croiset G, Heijnen CJ, van Bel F, Wiegant VM. Reduced life expectancy in rats after neonatal dexamethasone treatment. *Pediatr Res* 2007; 61: 72-76.
85. Onland W, De Jaegere AP, Offringa M, van Kaam AH. Effects of higher versus lower dexamethasone doses on pulmonary and neurodevelopmental sequelae in preterm infants at risk for chronic lung disease: a meta-analysis. *Pediatrics* 2008; 122: 92-101.
86. Jones RA; Collaborative Dexamethasone Trial Follow-up Group. Randomized, controlled trial of dexamethasone in neonatal chronic lung disease: 13- to 17-year follow-up study: I. Neurologic, psychological, and educational outcomes. *Pediatrics* 2005;116: 370-378.
87. Murphy BP, Inder TE, Huppi PS, Warfield S, Zientara GP, Kikinis R, Jolesz FA, Volpe JJ. Impaired cerebral cortical gray matter growth after treatment with dexamethasone for neonatal chronic lung disease. *Pediatrics* 2001;107: 217-221
88. Parikh NA, Lasky RE, Kennedy KA, Moya FR, Hochhauser L, Romo S, Tyson JE. Postnatal dexamethasone therapy and cerebral tissue volumes in extremely low birth weight infants. *Pediatrics* 2007; 119: 265-272.
89. Slotkin TA, Seidler FJ, Wood CR, Lau C. Development of glucocorticoid receptor regulation in the rat forebrain: implications for adverse effects of glucocorticoids in preterm infants. *Brain Res Bull* 2008; 76: 531-535.

90. Papile LA, Tyson JE, Stoll BJ, Wright LL, Donovan EF, Bauer CR, Krause-Steinrauf H, Verter J, Korones SB, Lemons JA, Fanaroff AA, Stevenson DK. A multicenter trial of two dexamethasone regimens in ventilator-dependent premature infants. *N Engl J Med* 1998; 338: 1112-1118
91. Halliday HL. The effect of postnatal steroids on growth and development. *J Perinat Med* 2001; 29:281-285.
92. Cambonie G, Mesnage R, Milési C, Pidoux O, Veyrac C, Picaud JC. Betamethasone impairs cerebral blood flow velocities in very premature infants with severe chronic lung disease. *J Pediatr* 2008; 152: 270-275.
93. Lee BH, Stoll BJ, McDonald SA, Higgins RD; National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Adverse neonatal outcomes associated with antenatal dexamethasone versus antenatal betamethasone. *Pediatrics*. 2006; 117:1503-1510.
94. Baud O, Foix-L'Helias L, Kaminski M, Audibert F, Jarreau PH, Papiernik E, Huon C, Lepercq J, Dehan M, Lacaze-Masmonteil T. Antenatal glucocorticoid treatment and cystic periventricular leukomalacia in very premature infants. *N Engl J Med*. 1999; 341:1190-1196.
95. Sousa N, Paula-Barbosa MM, Almeida OF. Ligand and subfield specificity of corticoid-induced neuronal loss in the rat hippocampal formation. *Neuroscience* 1999; 89:1079-1087.
96. Sapolsky RM, Uno H, Rebert CS, Finch CE. Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *J Neurosci* 1990; 10: 2897-2902.
97. Haynes LE, Griffiths MR, Hyde RE, Barber DJ, Mitchell IJ. Dexamethasone induces limited apoptosis and extensive sublethal damage to specific subregions of the striatum and hippocampus: implications for mood disorders. *Neuroscience* 2001; 104:57-69.

EK TABLOLAR

Ek Tablo 1. Kontrol Grubunda Hipokampal Bölgede Apoptotik Hücre Sayıları

Rat	Alan 1	Alan 2	Alan 3	Alan 4	Alan 5	Alan 6	Alan 7	Alan 8	Alan 9	Alan 10
Rat1	23	30	6	1	3	5	6	11	24	21
Rat 2	6	2	5	8	21	20	23	13	9	5
Rat 3	10	18	15	0	2	0	5	13	10	10
Rat 4	7	7	4	4	6	12	5	7	8	4
Rat 5	2	3	0	7	8	9	20	1	18	33
Rat 6	22	7	10	14	6	8	5	12	0	3

Ek Tablo 2. Betametazon Grubunda Hipokampal Bölgede Apoptotik Hücre Sayıları

Rat	Alan 1	Alan 2	Alan 3	Alan 4	Alan 5	Alan 6	Alan 7	Alan 8	Alan 9	Alan 10
Rat1	9	4	39	8	9	14	6	11	8	13
Rat 2	11	11	6		4	23	18	20	14	11
Rat 3	17	13	2	2	3	2	7	9	12	16
Rat 4	8	17	9	5	2	17	18	19	21	11
Rat 5	18	16	13	7	15	13	9	5	2	9
Rat 6	14	11	16	15	17	8	7	2	16	9

Ek Tablo 3. Metilprednizolon Grubunda Hipokampal Bölgede Apoptotik Hücre Sayıları

Rat	Alan 1	Alan 2	Alan 3	Alan 4	Alan 5	Alan 6	Alan 7	Alan 8	Alan 9	Alan 10
Rat1	15	12	13	12	7	7	8	10	13	15
Rat 2	10	3	5	10	18	15	12	19	5	4
Rat 3	19	10	14	13	11	20	15	9	9	13
Rat 4	15	15	19	30	19	18	24	29	25	21
Rat 5	26	7	12	22	8	17	16	15	16	30
Rat 6	32	20	32	13	27	12	10	17	18	18

Ek Tablo 4. Düşük Doz Deksametazon Grubunda Hipokampal Bölgede Apoptotik Hücre Sayıları

Rat	Alan 1	Alan 2	Alan 3	Alan 4	Alan 5	Alan 6	Alan 7	Alan 8	Alan 9	Alan 10
Rat1	5	1	4	5	5	5	4	2	3	2
Rat 2	14	6	11	8	3	4	16	15	13	12
Rat 3	9	4	7	9	8	12	13	8	12	13
Rat 4	8	15	18	25	5	11	30	17	29	6
Rat 5	11	10	12	21	13	8	2	5	7	12
Rat 6	12	12	11	12	14	14	13	16	12	5

Ek Tablo 5. Yüksek Doz Deksametazon Grubunda Hipokampal Bölgede Apoptotik Hücre Sayıları

Rat	Alan 1	Alan 2	Alan 3	Alan 4	Alan 5	Alan 6	Alan 7	Alan 8	Alan 9	Alan 10
Rat1	50	41	34	40	30	18	22	25	29	26
Rat 2	23	16	14	12	21	49	45	26	77	80
Rat 3	86	64	56	64	52	55	63	33	61	21
Rat 4	18	28	24	21	19	12	16	65	53	69
Rat 5	69	60	80	67	74	72	62	12	12	7
Rat 6	13	13	11	31	84	48	72	33	9	16

Ek Tablo 6. Kontrol Grubunda Hipokampusun CA1 alt bölgesinde Apoptotik Hücre Sayıları

Rat	Alan 1	Alan 2	Alan 3	Alan 4	Alan 5	Alan 6	Alan 7	Alan 8	Alan 9	Alan 10
Rat1	23	30	1	3	5	6	6	2	5	6
Rat 2	3	7	8	22	17	2	11	12	19	21
Rat 3	15	0	2	0	5	6	4	4	7	7
Rat 4	5	3	2	11	7	11	5	3	2	12
Rat 5	25	9	9	8	10	18	21	18	6	6
Rat 6	2	5	6	6	12	20	22	13	19	12

Ek Tablo 7. Betametazon Grubunda Hipokampusun CA1 alt bölgesinde Apoptotik Hücre Sayıları

Rat	Alan 1	Alan 2	Alan 3	Alan 4	Alan 5	Alan 6	Alan 7	Alan 8	Alan 9	Alan 10
Rat1	4	3	9	8	23	18	2	1	11	8
Rat 2	9	12	14	8	2	4	11	8	8	9
Rat 3	15	17	25	5	15	19	20	27	14	9
Rat 4	10	8	8	14	4	8	9	12	8	24
Rat 5	11	14	8	18	12	12	13	7	13	16
Rat 6	12	8	12	9	16	7	11	29	34	17

Ek Tablo 8. Metilprednizolon Grubunda Hipokampusun CA1 alt bölgesinde Apoptotik Hücre Sayıları

Rat	Alan 1	Alan 2	Alan 3	Alan 4	Alan 5	Alan 6	Alan 7	Alan 8	Alan 9	Alan 10
Rat1	2	3	5	8	10	4	3	10	12	3
Rat 2	18	12	11	13	19	14	31	18	20	12
Rat 3	16	9	30	14	16	10	15	20	10	6
Rat 4	16	10	5	18	20	11	5	18	16	13
Rat 5	5	4	6	13	10	20	10	10	18	23
Rat 6	19	17	21	20	18	30	15	13	25	25

Ek Tablo 9. Düşük Doz Deksametazon Grubunda Hipokampusun CA1 alt bölgesinde Apoptotik Hücre Sayıları

Rat	Alan 1	Alan 2	Alan 3	Alan 4	Alan 5	Alan 6	Alan 7	Alan 8	Alan 9	Alan 10
Rat1	26	18	30	34	26	4	3	14	14	15
Rat 2	7	4	3	10	10	4	6	10	6	4
Rat 3	21	10	10	26	22	8	6	2	2	8
Rat 4	15	14	16	18	19	16	27	27	19	26
Rat 5	24	22	23	18	24	26	16	15	12	20
Rat 6	12	20	12	2	1	10	17	1	6	6

Ek Tablo 10. Yüksek Doz Deksametazon Grubunda Hipokampusun CA1 alt bölgesinde Apoptotik Hücre Sayıları

Rat	Alan 1	Alan 2	Alan 3	Alan 4	Alan 5	Alan 6	Alan 7	Alan 8	Alan 9	Alan 10
Rat1	50	40	33	42	30	76	84	80	62	58
Rat 2	60	22	20	24	20	54	68	68	63	62
Rat 3	14	14	10	16	15	19	14	32	25	24
Rat 4	18	22	12	22	10	18	8	28	32	18
Rat 5	30	20	13	21	22	34	36	43	38	33
Rat 6	34	30	12	10	324	29	39	48	40	60

Ek Tablo 11. Kontrol Grubunda Hipokampusun CA3 alt bölgesinde Apoptotik Hücre Sayıları

Rat	Alan 1	Alan 2	Alan 3	Alan 4	Alan 5	Alan 6	Alan 7	Alan 8	Alan 9	Alan 10
Rat1	21	24	11	6	5	7	20	21	20	7
Rat 2	12	19	10	12	8	5	6	4	13	7
Rat 3	10	18	21	18	18	5	13	10	10	7
Rat 4	22	15	14	5	10	22	10	15	14	5
Rat 5	3	21	4	4	3	15	0	2	0	2
Rat 6	2	7	20	21	9	8	7	3	0	7

Ek Tablo 12. Betametazon Grubunda Hipokampusun CA3 alt bölgesinde Apoptotik Hücre Sayıları

Rat	Alan 1	Alan 2	Alan 3	Alan 4	Alan 5	Alan 6	Alan 7	Alan 8	Alan 9	Alan 10
Rat1	4	8	6	11	11	17	12	9	7	2
Rat 2	11	11	3	3	8	7	9	4	7	5
Rat 3	22	22	25	12	22	0	9	8	5	13
Rat 4	24	14	8	7	3	13	11	9	6	5
Rat 5	5	7	4	9	7	8	15	10	23	11
Rat 6	3	7	14	20	18	22	21	23	21	24

Ek Tablo 13. Metilprednizolon Grubunda Hipokampusun CA3 alt bölgesinde Apoptotik Hücre Sayıları

Rat	Alan 1	Alan 2	Alan 3	Alan 4	Alan 5	Alan 6	Alan 7	Alan 8	Alan 9	Alan 10
Rat1	5	10	9	8	10	5	3	8	9	20
Rat 2	15	12	10	15	26	13	23	25	21	3
Rat 3	12	18	15	15	22	17	14	17	16	21
Rat 4	15	14	18	19	30	14	10	13	27	15
Rat 5	22	24	16	33	20	13	19	36	26	30
Rat 6	19	22	25	35	10	6	15	14	24	30

Ek Tablo 14. Düşük Doz Deksametazon Grubunda Hipokampusun CA3 alt bölgesinde Apoptotik Hücre Sayıları

Rat	Alan 1	Alan 2	Alan 3	Alan 4	Alan 5	Alan 6	Alan 7	Alan 8	Alan 9	Alan 10
Rat1	23	17	18	14	20	21	8	12	16	14
Rat 2	16	14	16	10	12	13	12	14	10	5
Rat 3	6	4	29	26	12	16	20	8	5	6
Rat 4	7	4	22	23	21	20	9	14	21	5
Rat 5	10	9	10	12	13	18	0	6	11	2
Rat 6	13	14	14	13	16	12	15	6	1	4

Ek Tablo 15. Yüksek Doz Deksametazon Grubunda Hipokampusun CA3 alt bölgesinde Apoptotik Hücre Sayıları

Rat	Alan 1	Alan 2	Alan 3	Alan 4	Alan 5	Alan 6	Alan 7	Alan 8	Alan 9	Alan 10
Rat1	64	72	0	68	80	40	65	18	12	18
Rat 2	38	60	57	54	66	30	31	27	23	19
Rat 3	48	20	34	37	72	60	79	41	33	34
Rat 4	40	22	30	14	44	45	40	63	35	12
Rat 5	18	28	62	78	8	15	10	25	24	48
Rat 6	40	72	88	80	40	42	74	70	18	13