

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

MİAD YENİDOĞAN SIÇANLARDA OLUŞTURULAN
HİPOKSİK İSKEMİK ENSEFALOPATİ MODELİNDE
İNTRAPERİTONEAL OLARAK UYGULANAN
FENİTOİNİN
BEYİN HASARINA ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
DR. GÜLİZ BAYRAM

TEZ DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. MİNE CİNBİŞ

DENİZLİ - 2008

İş bu çalışma, Jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda
Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç.Dr.Serap SEMİZ

Üye : Prof.Dr.Hacer ERGİN

Üye : Prof.Dr.İlknur KILIÇ

Üye : Yrd.Doç.Dr.Mine CİNBİŞ

Üye : Doç.Dr.Esat ADIGÜZEL

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

22/01/2008


Prof. Dr.Zafer AYBEK
Pamukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Dekan

TEŞEKKÜR

Tez araştırmamı birlikte yürüttüğüm, desteğini, güvenini hep hissettiğim, yoğun çalışma temposunun içinde zamanını esirgemeyen değerli hocam Sayın Yrd.Doç.Dr.Mine Cinbiş'e, tezimin tüm aşamalarında desteğini ve yardımını esirgemeyen, engin bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, değerli hocam Anatomi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç.Dr.Esat Adıgüzel'e, her zaman saygıyla anacağım hocalarım Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç.Dr.Serap Semiz'e, Sayın Prof.Dr.Hacer Ergin'e, Sayın Prof.Dr.İlknur Kılıç'a, Sayın Doç.Dr.Dolunay Gürses'e, Sayın Doç.Dr.Ahmet Akçay'a, , Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü'nün tüm çalışanlarına, Deney Hayvanları Laboratuvarı çalışanlarına, gerek asistanlığım dönemimde, gerekse tez aşamasında sabır ve destekleriyle yanımda olan aileme ve eşime teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
HİPOKSİ VE İSKEMİ	2
HİPOKSİK-İSKEMİK BEYİN HASARI VE NÖROPATOLOJİK ÖZELLİKLER	2
HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI GELİŞİMİNDE HÜCRESEL MEKANİZMALAR	3
ENERJİ YETMEZLİĞİ VE HÜCRE İÇİ ASİDOZ GELİŞİMİ	5
SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ	6
EKSİTATÖR NÖROTRANSMİTTER VE NÖROTOKSİSİTE	8
HÜCRE İÇİ KALSİYUM BİRİKİMİ	10
İNFLAMATUAR HÜCRELER VE MEDIATÖRLER	11
İSKEMİ VE HİPOKSİK İSKEMİK HÜCRE ÖLÜMÜ	11
FENİTOİN	12
HİPOKAMPAL FORMASYON	13
HİPOKAMPUS	13
SIÇANLARDA HİPOKAMPUS	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
HİPOKSİ-İSKEMİ MODELİ	18
İLAÇ VE SERUM FİZYOLOJİK VERİLMESİ	18
DOKUNUN HAZIRLANMASI	18
KESİTLERİN BOYANMASI	19

STEREOLOJİK YÖNTEMLER	19
OPTİK DİSEKTÖR VE OPTİK PARÇALAMA	20
KESİT ÖRNEKLEME ORANI	21
ALAN ÖRNEKLEME ORANI	22
KESİT KALINLIĞININ ÖLÇÜMÜ	22
KALINLIK ÖRNEKLEME ORANI	23
NÖRON SAYIMI	23
TOPLAM NÖRON SAYISI	24
İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER	25
4. BULGULAR	26
SIÇANLARIN HÜCRE SAYIM SONUÇLARI VE KULLANILAN PARAMETRELER	26
GRUPLARIN HİPOKAMPAL ALANLARDAKİ TOPLAM NÖRON SAYILARI ORTALAMALARI	32
5.TARTIŞMA	35
6.SONUÇLAR	42
7.ÖZET (Türkçe-İngilizce)	39-40
8.KAYNAKLAR	45

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1: Birinci grup 4 nolu sıçanın disektör partikül sayıları ve hata katsayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler	24
Tablo-2: Birinci grup sıçanların vücut ağırlıkları, sol hipokampal CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanlarındaki, toplam nöron sayıları ve kullanılan parametreler	27
Tablo-3: İkinci grup sıçanların vücut ağırlıkları, sol hipokampal CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanlarındaki, toplam nöron sayıları ve kullanılan parametreler	28
Tablo-4: TG-F1 grubu sıçanların vücut ağırlıkları, sol hipokampal CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanlarındaki, toplam nöron sayıları ve kullanılan parametreler	30
Tablo-5 : TG-F2 grubu sıçanların vücut ağırlıkları, sol hipokampal CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanlarındaki, toplam nöron sayıları ve kullanılan parametreler	31
Tablo-6: ‘Mann-Whitney U’ testi kullanılarak, ikili karşılaştırılan grupların istatistiksel p değerleri	33

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil-1: HİE’de beyin hasarı mekanizmaları	4
Şekil-2: Aerobik(krebs siklusu) ve anaerobik yoldan(glikoliz), enerji üretimi	6
Şekil-3: Serbest oksijen radikallerinin oluşum mekanizmaları	8
Şekil-4: Glutamat reseptörleri	10
Şekil-5: Hipokampal formasyonun bağlantıları	15
Şekil-6: Birinci gruptaki sıçanların nöron sayıları	26
Şekil-7: İkinci gruptaki sıçanların nöron sayıları	28
Şekil-8: TG-F1 grubundaki sıçanların nöron sayıları	29
Şekil-9: TG-F2 grubundaki sıçanların nöron sayıları	31
Şekil-10: Grupların toplam nöron sayısı ortalamaları	33
Şekil-11: Deney gruplarından birer sıçana ait, farklı mikroskop büyütmelerinde hipokampus görüntüleri	34

KISALTMALAR DİZİNİ

ADP:	Adenozin difosfat
AMP:	Adenozin 5'-monofosfat
c-AMP:	Siklik adenozin 5'-monofosfat
AMPA:	Amino-3 -hidroksi-5-metil-4-izoksazol propiyonik asit
ATP:	Adenozin trifosfat
EAA:	Eksitatör aminoasitler
FADH:	Flavin-adenin-dinükleotid
GABA:	Gamma- amino butirik asit
HİE:	Hipoksik-iskemik ensefalopati
H₂O₂:	Hidrojen peroksit
HOCL⁻:	Hipoklorik asit
i.p.:	İntraperitoneal
i.v.:	İntravenöz
KA:	Kainat
LT:	Lökotrien
LOOH⁻:	Lipit peroksit
mGluR1:	Metabotropik glutamat 1 reseptör
mGluR2:	Metabotropik glutamat 2 reseptör
mGluR3:	Metabotropik glutamat 3 reseptör
mGluR4:	Metabotropik glutamat 4 reseptör
mGluR5:	Metabotropik glutamat 5 reseptör
mGluR6:	Metabotropik glutamat 6 reseptör
mGluR7:	Metabotropik glutamat 7 reseptör
NADH:	Nikotinamid-adenin-dinükleotid
NMDA:	N-metil-D-aspartat
NO:	Nitrik oksit
NOS:	Nitrik oksit sentetaz
PG:	Prostaglandin
RO⁻:	Alkoksil radikali
ROO⁻:	Peroksil radikali

- SR:** Serbest radikali
SOR: Serbest oksijen radikaller
O⁻² : Süperoksit radikali
OH⁻: Hidroksil radikali

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hipoksik iskemik ensefalopati (HİE), preterm ve term yenidoğanlarda görülen, birden fazla sistem tutulumu ile karakterize bir hastalıktır (1). Prenatal, natal ve posnatal faktörlerin etkisiyle sistemik hipoksi sonucu serebral kan akımının azalmasıyla oluşan beyin zedelenmesidir. Nörolojik morbidite ve mortalitenin en önemli nedenidir (2). İnsidansı term bebeklerde 2-4/1000'dir (3). HİE'li yenidoğanların %20-50'si ölmektedir (4).

Perinatal hipoksik-iskemik beyin hasarlanmasındaki hücresel ve moleküler olayların anlaşılmasında önemli aşamalar sağlanmıştır. Çalışmalar hücre homeostasisinden sorumlu biyokimyasal mekanizmaların yetersizliğinde beyin hasarlanmasının nasıl oluştuğuna odaklanmıştır ve bu çalışmalarda rat modelleri önem kazanmıştır. Sıçanların beyin gelişimi, 12-13 günlük oldukları zaman, term yenidoğanın beyin gelişimine benzer özellik göstermektedir (5).

Hipoksik iskemik beyin hasarı eksitatör amino asitlerden özellikle glutamat ve glutamatın NMDA reseptörü ile ilişkilidir. Hipoksi iskemi modellerinde serebral korteks ve hipokampustan glutamatın salınımı mikrodializ tekniğiyle gösterilmiştir. Antikonvülzan olarak kullanılan fenitoin, glutamat salınımını azaltmaktadır. Voltaj bağımlı Na kanallarını bloke ederek ve Na-K-ATPazı uyararak hücreiçi/dışı iyon dengesini korumaktadır. Sodyum bağımlı aksiyon potansiyelinin amplitüdünü azaltmakta ve enerji metabolizmasını baskılamaktadır. Bunların yanısıra fenitoin, iskemide, laktat ve serbest yağ asitlerinin birikimini önlemektedir (6).

Bu çalışma; hipoksi-iskemi uygulanmış sıçan modelinde, hipokampusun piramidal hücre tabakasında meydana gelen hücre azalması üzerine fenitoinin etkisini stereolojik yöntemlerle araştırmak ve değişik fenitoin dozlarının hücre azalmasını önleme konusundaki farkını ortaya koymak üzere planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

HİPOKSİ VE İSKEMİ

Kan dolaşımının olduğu bir veya birden fazla dokuda oksijenin parsiyel yokluğu hipoksemi, oksijenin tam yokluğu ise anoksemi olarak tanımlanır. Asfiksi, progressif hipoksemi ve asidoz ile sonuçlanan pulmoner veya plasental gaz değişiminin bozulmasıdır. İskemi sistemik hipotansiyon, kardiyak arrest veya oklüsiv vasküler hastalık nedeniyle dokulara giden kan akımının kesilmesi veya azalmasıdır. Hipoksik-iskemi, doku düzeyinde iskemi ile birlikte hipoksemi olmasıdır (7,8).

HİPOKSİK-İSKEMİK BEYİN HASARI VE NÖROPATOLOJİK ÖZELLİKLER

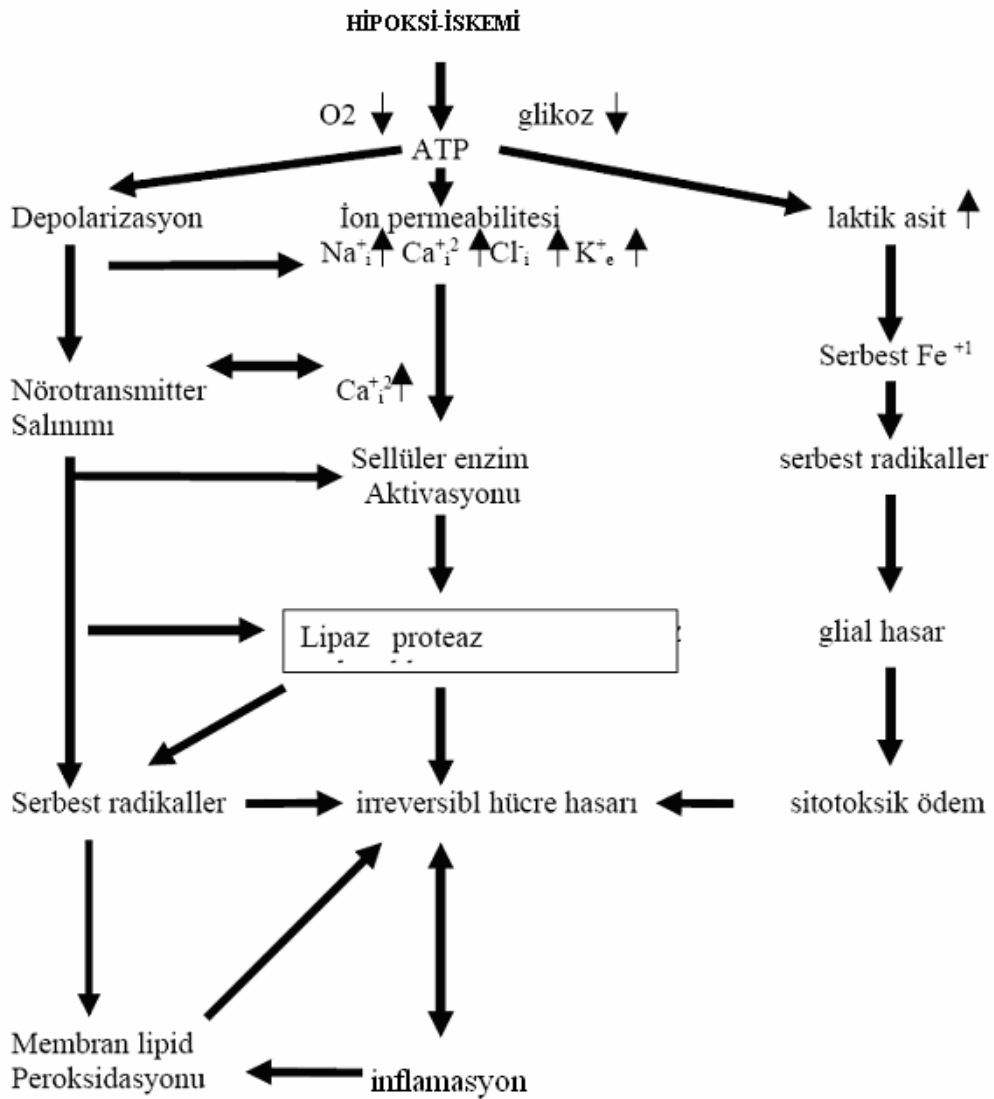
Perinatal asfiksinin temel özellikleri derin asidemi (kord kanında $pH < 7.00$), düşük apgar skoru, hipoksik iskemik ensefalopati ve multiorgan sistem disfonksiyonudur. Hipoksik iskemik ensefalopatili bebeklerde primer hasarlayıcı olayın gerçekleştiği dönemi belirlemek çok zordur; ancak %20'sinin antepartum, %35'inin intrapartum, %35'inin intrapartum ve antepartum, %10'unun postpartum dönemde geliştiği gösterilmiştir (9). Kronik fetal hipoksi ve akut hipoksik iskemik zedelenme gestasyonel yaşa göre değişen nöropatolojik bulgularla sonuçlanır (4). Hipoksik iskemik beyin hasarında başlıca 6 çeşit patolojik lezyon gelişmektedir. Bunlar selektif nöron hasarı, status marmaratus, parasagittal beyin hasarı, periventriküler lökomalazi, intraventriküler veya periventriküler kanama ve fokal veya multifokal iskemik beyin lezyonudur. Rat çalışmaları iskemiden sadece 10 dakika sonra selektif nöron hasarının geliştiğini göstermiştir (10,11). Nöropatolojik lezyonlar, prematür infantlarda daha çok serebral hemisferlerin beyaz cevherinde görülmekteyken, term yenidoğanlarda serebral korteks, serebellar hemisferler, bazal gangliyonlar, hipokampus gibi beyin bölgelerinin gri cevherinde görülmektedir. Bunların içinde hipokampus hipoksiye en duyarlı bölgedir. Beyaz cevherin akut lezyonunda, glial elementlerin proliferasyonu ile reaktif gliosis meydana gelmektedir. Reaktif gliosis, sentrum semiovale ve korpus kallosum'un da içinde bulunduğu serebral hemisferlerin periventriküler beyaz cevherinde oluşmaktadır. Postmortem çalışmalar, reaktif gliosis oluşumunun, hipoksi-iskemiyle beraber sepsis, intrauterin enfeksiyon gibi çok sayıda nedene bağlı olarak da ortaya çıktığını

göstermiştir. Akut hipoksik-iskemik beyin hasarında görülen diğer bir patoloji ise beyin ödemi. Özellikle ciddi beyin hasarında beyin ödemiyle beraber lateral ventriküllerde daralma, serebral giruslarda düzleşme ve hipokampal yapılarda herniasyon görülmektedir. Hipoksik-iskemik beyin hasarında kronik lezyonlar çok çeşitli olup term yenidoğanlarda akut dönemden en az üç hafta sonra gelişmektedir (12).

HİPOKSİK-İSKEMİK BEYİN HASARI GELİŞİMİNDE HÜCRESEL MEKANİZMALAR

Hipoksik iskemik beyin hasarında kan beyin akımının ve oksijen dağılımının azalması ile oksidatif yol kesintiye uğramakta ve anaerobik metabolizma hakimiyeti başlamaktadır. Bu durum; adenozin trifosfat (ATP) üretiminin azalmasına, laktik asit birikimine ve hücre fonksiyonların sürdürülmesinde yetersizliğe neden olmaktadır (13). Enerji yetmezliği transsellüler iyon pompalarının bozulmasına yol açmaktadır ve bunun sonucunda hücre içinde sodyum (Na^+), kalsiyum (Ca^{++}), klor (Cl^-) ve su birikmektedir. Aynı zamanda enerji yetmezliği akson terminallerinden glutamat gibi nörotoksik eksitator aminoasitlerin salınımına neden olmaktadır. Glutamat; akut dönemde sitotoksik ödeme katkıda bulunmaktadır. Geç dönemde ise hücre içine Ca^{++} girişini arttırmakta ve hücrede irreversible hasara neden olmaktadır. Hipoksi-iskeminin hücre membranında yaptığı hasarın sonucunda hücre sitoplazmasında serbest yağ asitleri birikmektedir, bunlar mitokondride indirgenme olayları sonucu açığa çıkan serbest oksijen radikalleri ile peroksidasyona uğramaktadır. Bu olayı takiben prostaglandin, ksantin, ürik asit sentezi başlamakta ve bu kaskatın etkisiyle serbest radikallerin oluşumu artmaktadır. Enerji yetmezliği nedeniyle plazma membranından çıkışı azalan Ca^{++} 'un hücre içinde aşırı birikimi, nörotoksitesiteyle sonuçlanan birçok membran, sitoplazma ve nükleer olayların gelişmesine katkıda bulunmaktadır. Serbest radikaller içinde bulunan nitrik oksit sentezi; Ca^{++} ve nörotransmitterlerin etkisiyle uyarılmaktadır. Hücredeki enerji yetmezliği, asidoz gelişimi, glutamat ve nitrik oksit nörotoksitesitesi, serbest radikal oluşumu, Ca^{++} birikimi ve lipid peroksidasyonu hücre içi organellerde disfonksiyona, hücrenin yapısal bütünlüğünün bozulmasına ve sonuçta hücre ölümüne neden olmaktadır (14,15). Resusitasyon sonrası; serebral perfüzyonun ve oksijenizasyonun düzeldiği dönemde sekonder beyin hasarı gelişmektedir. Bu dönemde fosfor metabolitlerinin

konsantrasyonu ve intrasellüler pH bazal seviyelerine dönmektedir. Fosfokreatin/inorganik fosfat oranı azalmaktadır. Takip eden süreçte kalsiyumun hücre içine alınması, eksitator nörotoksitesi, serbest oksijen radikalleri ve nitrik oksit üretimi mitokondriyal fonksiyonların bozulmasına sebep olmaktadır. Sonuçta sekonder enerji yetmezliği olarak adlandırılan dönem başlamaktadır. Ayrıca bu dönemde endojen inflamatuvar mediatörler beyin hasarının artmasına katkıda bulunmaktadır (13,16). Hipoksik iskemik hücre hasarı mekanizmaları Şekil-1'de gösterilmiştir.



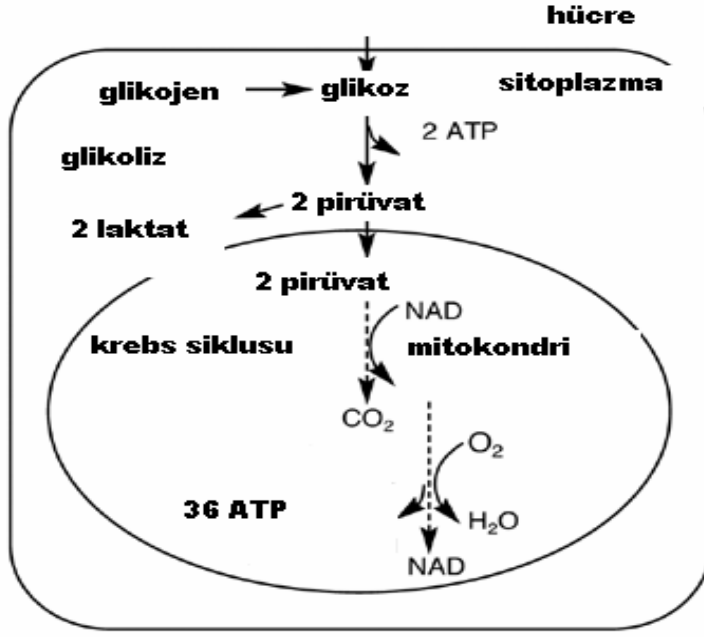
Şekil 1: Hipoksik iskemik hücre hasarı mekanizmaları

ENERJİ YETMEZLİĞİ VE HÜCRE İÇİ ASİDOZ GELİŞİMİ

Beynin normal fonksiyonunu devam ettirebilmesi için yeterli oksijen ve glukozun bulunması gereklidir. Nöronlarda glukozun yıkımı ile sağlanan enerji elektriksel uyarıların iletimi ve biyosentetik reaksiyonlar için kullanılmaktadır. Fizyolojik şartlarda glukozun pirüvata dönüşümü ile başlayan aerobik glikoliz yolu en önemli metabolik yoldur. Oluşan pirüvik asit, mitokondri içinde Krebs siklusuna girmekte, elektron transferi ve NADH oksidatif fosforilasyonu ile ATP üretilmektedir (17). Dokuda hipoksi olduğunda mitokondri içinde oksijen parsiyel basıncı düşmekte mitokondrinin sitokrom sisteminde indirgenmiş NADH ve FADH birikmektedir. ATP üretimi kesildiği için hücre içinde ADP ve AMP düzeyleri artarak anaerobik glikoliz uyarılmaktadır. ATP nöronlar da dahil olmak üzere tüm hücreler için en önemli enerji kaynağıdır. Aerobik yoldan net 36 molekül(M) ATP üretimine karşılık anaerobik yoldan sadece 2 M ATP üretimi olur (Şekil-2). Enerji üretim yetersizliği ATP bağımlı iyon pompalarını etkilemekte ve sitotoksik ödem olarak adlandırılan hücre içi Na ve Cl birikimine neden olmaktadır (18,19).

Hayvan ve insan çalışmaları perinatal serebral hipoksik iskeminin iyileşme sürecinde sekonder enerji yetersizliğinin devam ettiğini göstermiştir. Gecikmiş serebral enerji yetmezliği olarak da tanımlanan bu durum immatür sıçanlarda, yenidoğan domuz yavrularında, koyun fetüslerinde çalışılmış olup, iyileşme döneminde 24-48 saat kadar devam ettiği ve kalıcı beyin hasarının gelişimine önemli katkıda bulunduğu gösterilmiştir (12).

Hipoksik iskemi sürecinde oksijenin yokluğu ile oksidatif fosforilasyon kesintiye uğramakta ve pirüvat oksidasyon aşamasında bloke olduğu için laktata dönüşmektedir (20). Enerji üretiminin öncelikle glikoliz yoluyla sağlanması ATP üretiminin azalmasının yanında hücrenin asidifiye olmasına neden olmaktadır. Bir molekül (M) glikozun anaerobik metabolizması ile 2 M laktat ve 2 M H⁺ oluşmaktadır (21). Hücre içinde asidoz gelişimi, glutamat reseptörleri aracılığıyla nörotoksitenin artmasına neden olmaktadır (22,23).



Şekil 2: Aerobik (Krebs siklusu) ve anaerobik yoldan (glikoliz) enerji üretimi

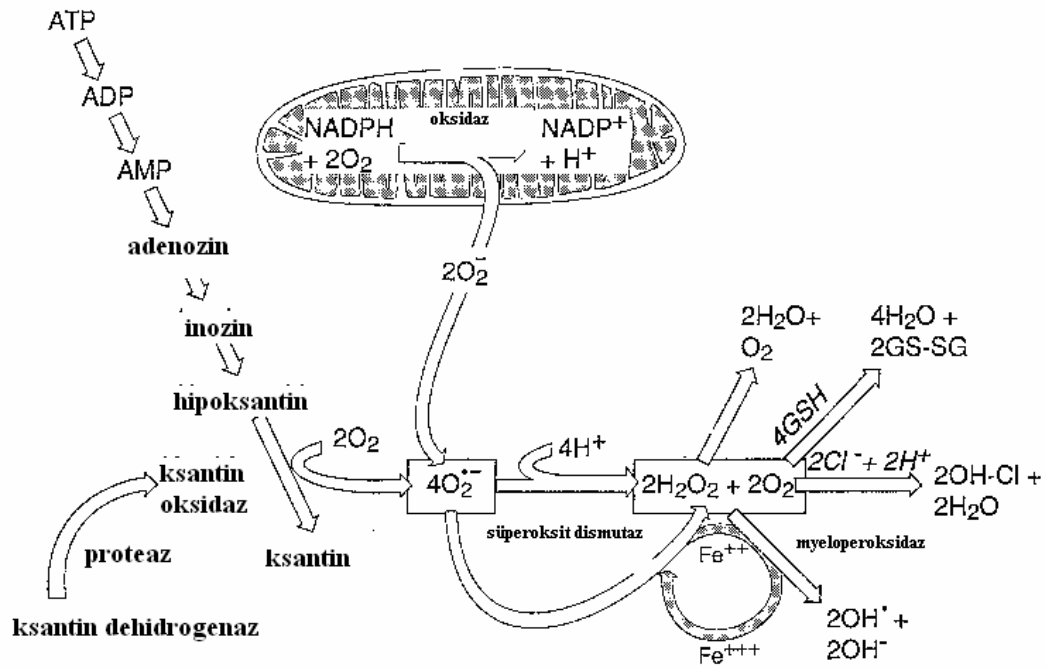
SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ

Serbest radikaller (SR), dış yörüngelerinde tek bir elektron içeren kimyasal türevlerdir. Bu durumda radikal ileri derecede reaktiftir, organik ve inorganik kimyasal maddelerle, nükleik asitlerle ve membranlarla tepkimeye girer. Serbest oksijen radikalleri (SOR) organizmada fizyolojik koşullarda ve yaşlanma sürecinde üretilmektedir. Bazı patolojik süreçlerde aşırı miktarda SOR üretimi veya biyolojik koruyucu mekanizmaların çalışmaması gibi durumlarda istenmeyen etkilerle karşılaşmaktadır. SOR, fizyolojik koşullarda süperoksit dismutaz, endoperoksidaz, katalaz gibi endojen antioksidanlarla ve kolesterol, alfa-tokoferol, askorbik asit gibi koruyucu moleküllerin yardımıyla hızlıca yıkılır. Fenton veya Haber-Weis reaksiyonu, ksantin oksidaz enzimi, eikosonoid metabolizması, katekolaminlerin katabolizması, veya aktive olmuş lökositlerde SOR oluşumu gerçekleşmektedir. Hipoksi-iskemi sırasında ve sonrasında oluşan SOR miktarı fizyolojik koruyucu kapasiteyi aşacak miktardadır ve bu süreçteki SOR üretiminde iki önemli yol vardır: Birincisi eikosonoid metabolizması ve ikincisi ATP'nin yıkımı sonucu oluşan ksantin yoludur. Beyinde miktarı fazla olan ve hücre membranında bulunan çoklu doymamış

fosfolipidler SOR'lerin kaynağıdır. Araşidonik asitten prostoglandin (PG) oluşumu sırasında SOR üretilmektedir ve bunu takiben lipid peroksidasyonu gerçekleşmektedir. Burada üretilen SOR hücre membranının parçalanmasına ve hücre ölümüne neden olur. Adenin nükleotitlerinden ürik asitin sentezlendiği yol (ksantin yolu) diğer SOR üretim yoludur. Hipoksi sırasında ATP'ye fosforile olamayan AMP hücrede birikmektedir. Biriken AMP'den sırayla adenozin, inozin ve hipoksantin oluşmaktadır. Fizyolojik şartlarda hipoksantin, ksantin dehidrogenazla önce ksantine, sonra ürik aside çevrilmektedir; ancak hipoksi durumunda hücre içinde Ca^{++} konsantrasyonunun artışı ile ksantin dehidrogenaz enzimi proteaz aracılığıyla ksantin oksidaza dönüşür. Reoksijenizasyon durumunda ise hipoksantin ksantin oksidaz ile tepkimeye girerek SOR oluşturmaktadır (24,25). Serbest oksijen radikalleri dışında radikal olmayan reaktif oksijen türevleri de SR gibi davranmaktadır. Reaktif oksijen türevleri içinde süperoksit (O_2^-), hidroksil (OH^-), alkoksil (RO^-) ve peroksil (ROO^-) radikal olan gruptadır. Non- radikaller ise hidrojen peroksit (H_2O_2), lipid peroksit ($LOOH^-$), hipoklorik asit ($HOCL^-$) ve ozondur. Süperoksit, moleküler oksijene tek bir elektron eklenmesiyle oluşmaktadır. Normal koşullar altında O_2^- radikalleri spontan olarak süperoksit dismutaz enzimiyle H_2O_2 'e dönüşmektedir. Hidrojen peroksit ise bazı metallerle tepkimeye girerek OH^- radikalini oluşturur. Hidroksil radikalleri SOR'lerin en reaktif olanıdır ve hücre içindeki herhangi bir molekülle, örneğin karbonhidrat, lipid, protein veya nükleik asit bazlarından herhangi birisiyle reaksiyona girerek sitotoksositeye neden olmaktadır (26) (Şekil 3).

SOR bileşiklerinden biri olan nitrik oksit (NO); nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesi ile arjininden üretilmekte ve organizmada çift yönlü etki gösterdiği bilinmektedir. Fizyolojik fonksiyonların gerçekleşmesi için gereklidir ve antioksidan savunmaya katkıda bulunmaktadır. Aşırı üretim durumunda radikal etki göstermekte ve peroksinitrit gibi daha güçlü radikal bileşiklerin oluşmasına neden olmaktadır (27). Serebral iskemi sırasında massif intrasellüler Ca^{++} birikimi ile NOS aktive olmaktadır. Nitrik oksit, gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenazı aktive ederek glikolitik yolu kesintiye uğratmaktadır ve mitokondriyal elektron transport zinciri elemanlarını inhibe etmektedir. Bu etki sonucunda ATP üretimi bozulmaktadır. Ayrıca NO, OH^- gibi daha reaktif SR oluşumu için diğer SR'lerle reaksiyona girebilmekte ve oksidatif metabolizmayı etkileyerek nörotoksik etki göstermektedir (14).

Fizyolojik şartlarda demir (Fe) ferritin, transferrin gibi proteinlere bağlı ve non-toksik ferrik durumda bulunur. Hipoksi-iskemi sırasında proteinlerden serbest ferrik demir salınımı olmakta ve demir hidroksil radikaline dönüşmektedir. Ayrıca serbest ferrik demir, ferröz formun azalmasına neden olarak hasarın artışına katkıda bulunmaktadır (28).



Şekil 3: Serbest oksijen radikallerinin oluşum mekanizmaları

EKSİTATÖR NÖROTRANSMİTTER VE NÖROTOKSİSİTE

Serebral hipoksi iskemi sürecinde eksitatör aminoasitler (EAA) nörotoksik etki göstermektedirler. En önemli EAA olan glutamatın ekstrasellüler konsantrasyonu düşüktür ve bu denge nöronal ve glial hücrelerin geri alım mekanizmaları yardımıyla sağlanmaktadır. Fokal serebral iskemide ekstrasellüler glutamat konsantrasyonu 2,5 ile 40 kat arttığı gösterilmiştir. Artan glutamat hücre içine letal düzeyde Ca^{++} girişine neden olmaktadır. Bununla beraber enerji yetmezliği nedeniyle glutamatın presinaptik geri alınımı bozulmakta ve ekstrasellüler konsantrasyonu artmaktadır (29,30).

Glutamat 2 tip glutamat reseptörü ile etki göstermektedir (Şekil 4). Birincisi metabotropik glutamat reseptörleridir. Amino asit dizilimlerine göre bu reseptörler 3 sınıfa ayrılmaktadır.

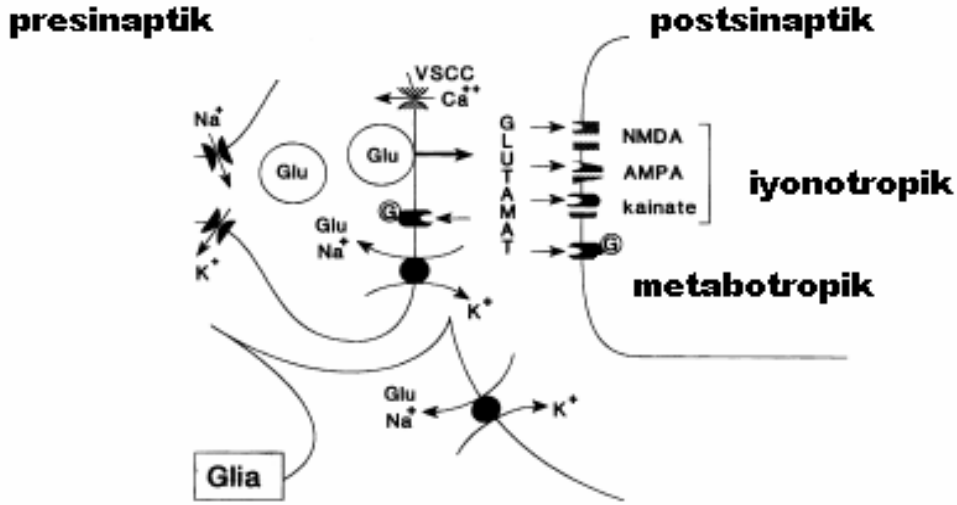
Birinci sınıfta: Metabotropik glutamat 1.reseptör (mGluR1), metabotropik glutamat 5.reseptör (mGluR5)

İkinci sınıfta: Metabotropik glutamat 2.reseptör (mGluR2), metabotropik glutamat 3.reseptör (mGluR3)

Üçüncü sınıfta: Metabotropik glutamat 4.reseptör (mGluR4), metabotropik glutamat 6.reseptör (mGluR6), metabotropik glutamat 7.reseptör (mGluR7) ve metabotropik glutamat 8.reseptör (mGluR8) bulunmaktadır.

Her sınıfın farklı sinyal iletim mekanizmaları vardır. Birinci sınıf metabotropik glutamat reseptörleri fosfolipaz C'yi aktive etmektedir, bunun sonucunda hücre içi diaçilgliserol ve inozitoltrifosfat düzeyi artmakta ve inozitoltrifosfat duyarlı depolardan Ca salınımı ve protein kinaz aktivasyonu gerçekleşmektedir. Buna karşılık 2. ve 3. sınıf metabotropik glutamat reseptörleri adenil siklaz enzimini inhibe ederek etki göstermektedirler. Presinaptik ve postsinaptik metabotropik glutamat reseptörlerinin fonksiyonları yerleşim yerlerine göre değişmektedir. Yapılan çalışmalarda bu reseptörlerin direkt aktivasyonlarıyla ilişkili olarak nöroprotektif kanıt bulunamamıştır (29).

Glutamatın reseptörlerinin ikincisi iyonotropik glutamat reseptörleridir. Bunlar N-metil-D-aspartat (NMDA), 5-metil-4-izoksazol propiyonik asit (AMPA) ve kainat (KA) reseptörleridir. NMDA reseptörleri hipokampusun CA1 bölgesinde, talamusta, striyatumda, serebellumun purkinje ve granül hücrelerinin bulunduğu tabakalarda ve serebral korteksin 3. 5. ve 6. tabakalarında bulunmaktadır. AMPA reseptörleri serebral korteksin derin tabakalarında, talamusta, striyatumda, serebellumun moleküler tabakasında, striyatum lüsidum tabakasında, hipokampusun piramidal hücreleri içinde, KA reseptörleri ise sadece hipokampusun striyatum lüsidum tabakasında bulunmaktadır. İlginçtir ki perinatal nöronal hasarlanmada hipokampus, serebellum ve bazal gangliyonlar sık tutulan bölgelerdir ve aynı zamanda bu bölgelerde çok sayıda glutamat nöronu bulunmaktadır. NMDA, AMPA ve KA reseptörlerinin aktive olması durumunda Ca^{++} kanalları açılarak hücre içi serbest Ca^{++} da artış olmakta bunun sonucunda da aktive olmuş proteaz, lipaz ve endonükleazlar hücre ölümüne sebep olmaktadır (26,31,32).



Şekil 4: Glutamat reseptörleri

HÜCRE İÇİ KALSİYUM BİRİKİMİ

Kalsiyum çeşitli hücresel reaksiyonlarda kofaktör olarak rol oynar. Nöronal fonksiyonlarda ve nöronal metabolizmada Ca^{++} homeostazının etkisi önemlidir. Hücre içinde %100'e yakın bir kısmı organellere bağlıdır ve serbest Ca^{++} konsantrasyonu oldukça düşüktür. Bu organellerden en önemlisi endoplazmik retikulum ve mitokondridir. Ayrıca Ca^{++} daha az miktarlarda nükleus ve plazma membranına bağlı halde bulunur. Hücre içi serbest Ca^{++} konsantrasyonu ise sitozole dağılmış olan spesifik Ca^{++} bağlayan proteinlerin yardımıyla, düşük düzeylerde tutulmaktadır (33). Fizyolojik şartlarda iyon veya reseptör bağımlı kanallarla hücre içine giren Ca^{++} , plazma membranı ve hücre içi organellerde birikmektedir. Plazma membranındaki Ca^{++} - Na^{+} değişim kanalı ve ATP'ye bağımlı Ca^{++} kanalı, mitokondrideki Ca^{++} kanalı ve endoplazmik retikulumdaki ATP'ye bağımlı Ca^{++} kanalı, hücre içindeki Ca^{++} düzeyini dengede tutmaktadır. Hipoksi-iskemi durumunda intrasellüler depolardan salınım ve plazma membranından geçişin artışı veya dışarıya salınımın azalması nedeniyle sitozolik serbest Ca^{++} konsantrasyonu artmaktadır (34). İnasellüler serbest Ca^{++} konsantrasyonunun patolojik olarak artması, hücreye toksin etkisi yapmakta; nöronal fonksiyonlarda yıkıcı bozukluklarla sonuçlanan bir dizi reaksiyona sebep olmaktadır. Bu reaksiyonlar lipaz, proteaz, endonükleaz, fosfolipaz C aktivasyonu, ksantin ve prostoglandinlerin üzerinden

serbest radikallerin oluşumudur. Sonuç olarak mitokondride oksidatif fosforilasyon ve buna bağlı olarak enerji yapımı gerçekleşemediği için mitokondriyal membranda iyon gradienti bozulmakta ve hücre depolarize konuma gelmektedir. Bu durum glutamatın sinaptik aralığa salınmasına sebep olmaktadır. AMPA, KA ve NMDA gibi glutamat reseptörlerinin uyarılmasıyla da hücre içine fazla miktarda Na^+ ve Ca^{++} girişi olmaktadır. Hücre içinde artan serbest Ca^{++} , plazma membranının bozulmasına ve hücre ölümüne neden olmaktadır (12,35).

İNFLAMATUAR HÜCRELER VE MEDIATÖRLER

İskemik beyin hasarında karaciğerden akut faz reaktanları salınımıyla sistemik akut faz yanıtı oluşmaktadır. Lökositlerin mobilize olması, serum glukokortikoid ve sitokin düzeylerinin artması, beyinde inflamatuvar yanıtı başlatmaktadır (36). Sistemik sirkülasyonda lökositlerin sayısının artmasını takiben nöral parankimde lokal olarak proinflamatuvar sitokinlerin ve kemotaktik moleküllerin üretimi gerçekleşmektedir (37). Erişkin beyinde hipoksik-iskemiden 4 ile 6 saat sonra nötrofil migrasyonu olmasına karşılık yenidoğan beyinde hipoksik-iskemiden 42 saat sonra nötrofil migrasyonu olmaktadır. İskemik dokuda nötrofillerden sonra lenfosit sayısının arttığı gösterilmiştir (38,39). Lökositler adezyon moleküllerinin yardımıyla vasküler endotelyuma yapışırlar. Ekstrasellüler matriks, glia, nöronlar ve mikrovasküler yapıdan oluşan nörovasküler üniteye inflamatuvar değişiklikler ve mediatörlerin salınımı başlamaktadır. Bu mediatörlerin içinde sitokinler, kemokinler, reaktif oksijen türevleri, araşidonik asit metabolitleri yer almaktadır (40). Hipoksik iskemide enerji yetmezliği ve kan akımının bozulması kalsiyumun hücre içinde birikimi ile sonuçlanır. Kalsiyum, gliserofosfolipidleri hidrolize eden fosfolipaz A2'nin aktive olmasına ve araşidonik asit metabolitlerinin salınımına neden olmaktadır. Siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzim kompleksleri ile araşidonik asit metabolize olmakta; prostaglandin (PG) ve lökotrien (LT) oluşmaktadır. PG'ler ve LT'ler, serbest radikallerin üretimini ve inflamasyonu artırarak beyin zedelenmesine katkıda bulunmaktadır (41).

İSKEMİ VE HIPOKSİK-İSKEMİK HÜCRE ÖLÜMÜ

İskemi, dokuyu perfüze eden kan akımındaki yetersizliğe bağlı olarak gelişmektedir ve geriye dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre hasarına neden

olmaktadır (42). Hipoksiden farklı olarak, glikoliz için gerekli maddeler de dokuya ulaşmamaktadır ve bu maddeler tükendiğinde anaerobik enerji üretimi durmaktadır. Bu nedenle iskemi, dokularda, hipoksiden daha hızlı hücre hasarına yol açmaktadır (43,44). İskemik dokularda kan akımı düzeldiğinde SR'ler oluşmaktadır ve iskemi-reperfüzyon hasarı meydana gelmektedir (42). Hayvan çalışmalarında 3 çeşit iskemi modeli kullanılmaktadır. Bunlar; global iskemi (beynin tüm bölgelerinde iskemi oluşturulması), fokal iskemi (beynin bir bölgesinde iskemi oluşturulması) ve hipoksi/iskemi (tek taraflı karotis arteri bağlanması ve beraberinde hipoksi uygulanması)'dir (45).

Beyin bölgelerinin iskemiye duyarlılık dereceleri aynı değildir. Bazı bölgeler (hipokampusun CA1 bölgesindeki piramidal hücreler, limbik sistem, serebellumun purkinje hücreleri, korteksin 3. 5. ve 6.tabakalarının ve striyatunun küçük ve orta büyüklükteki nöronları) iskemik hasara daha duyarlıdır. Nörotransmitterlerin ve reseptörlerin yapılarına, spesifik anatomik ve sinaptik bağlantılarına bağlı olarak nöronların iskemiden etkilenme dereceleri değişmektedir (46).

Hücre ölümünün iki çeşiti vardır. Bunlardan apoptozis genellikle bir hücrede veya hücre grubunda, plazma zarı bütünlüğü bozulmadan, yapısal ve nükleer proteinlerin parçalanması şeklindedir. Aktif bir süreçtir. Diğer bir hücre ölüm şekli olan nekroz ise iskemi ve mekanik travma gibi çevresel değişikliklerin neden olduğu fizyolojik olmayan, pasif bir süreçtir. Hipoksik iskemi sonrasında her iki sürecin birden ortaya çıktığı, insan ve hayvan çalışmalarında gösterilmiştir (47-50).

FENİTOİN

Non-sedatif antiepileptik bir ilaçtır. Fizyolojik sistem üzerinde çeşitli etkileri bulunmaktadır. Sodyum, potasyum ve kalsiyumun membran potansiyelleri üzerinde etkilidir. Norepinefrin, asetilkolin ve GABA gibi nörotransmitterlerin konsantrasyonunu değiştirir. Nöronlarla yapılan hücre kültür çalışmalarında fenitoinin aksiyon potansiyelini bloke ettiği gösterilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda serotonin ve norepinefrin salınımını inhibe eder, dopamin geri alımını arttırır, monoamin oksidaz aktivitesini inhibe eder. Kalsiyumun hücre membranından geçişini engeller ve bu şekilde kalsiyum bağımlı sekretuar işlevler

üzerinde inhibitör etki gösterir. Biyokimyasal süreçler üzerinde bu etkileri tam açık değildir; ancak terapötik dozlarda sodyum kanallarını bloke ettiği ve tekrarlayan aksiyon potansiyellerini inhibe ettiği bilinmektedir. Oral absorpsiyonu tamdır, yarılanma süresi 12 ile 36 saat arasındadır. Plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanır. Üremi veya hipoalbuminemi durumlarında, klinik bulgularla serbest fenitoin düzeyi arasındaki korelasyon açık değildir. Serebrospinal sıvıdaki konsantrasyonu plazma düzeylerinden bağımsızdır. Beyin, karaciğer, kas ve yağ hücrelerinin endoplazmik retikulumunda birikir (51). Yüksek dozda kullanıldığında nistagmus, ataksi ve diplopi ortaya çıkabilir, yine yüksek dozda sedatif etkisi vardır. Uzun süreli kullanımda D vitamini metabolizmasını bozarak osteomalaziye neden olabilir (52).

HİPOKAMPAL FORMASYON

Hipokampal formasyon; ‘hipokampus’, ‘gyrus dentatus’, ‘subikulum’, ‘presubikulum’, ‘parasubikulum’, ‘area entorhinalis’den oluşmaktadır (53).

HİPOKAMPUS

Filogenetik olarak beynin en eski bölümlerinden biri olan hipokampus, lateral ventrikülün arka boynuz tabanı boyunca uzanan, yaklaşık 5-8 cm uzunluğunda bir gri cevher tabakasıdır. Koronal kesitlerde ‘C’ harfi şeklinde görülür ve ‘C’ harfinin konveks yüzü ventrikül boşluğuna, konkav yüzü ise hemisferin alt yüzüne doğru yönelmiştir. ‘Cornu Ammonis’in baş harflerini temsilen CA olarak da ifade edilebilen hipokampus, hücre yapısındaki değişikliklerden dolayı CA1, CA2, CA3 ve CA4 gibi farklı alanlara bölünmüştür. Bunlardan CA1 ‘subikulum’a, CA4 ise ‘gyrus dentatus’a en yakın olan alandır (54).

Histolojik olarak; hipokampus, çeşitli tabakalardan oluşmaktadır; bunlar ventriküler yüzeyden başlayarak derine doğru şu şekilde sıralanmaktadır:

1-Alveus: Subikulum ve hipokampusa ait piramidal hücre aksonlarını içerir.

2-Stratum oriens: Esas olarak piramidal hücrelerin bazal dendritleri ile internöronların yerleştiği tabakadır.

3-Stratum pyramidalis: Hipokampusa esas şekli buradaki piramidal hücrelerin dizilimi vermektedir.

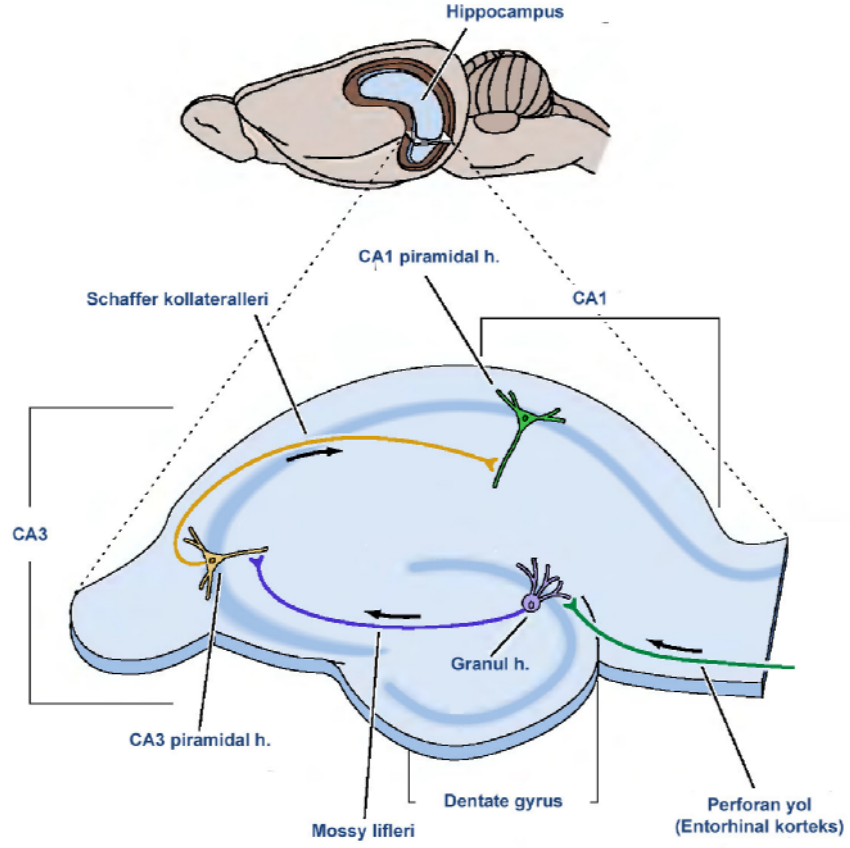
4-Stratum lusidum: CA1 ve CA2'de bulunmaz, CA3 alanındaki piramidal hücrelerle bağlantıyı sağlayan lifleri içerir.

5- Stratum radiatum

6- Stratum lakunosum

7- Stratum molekulare

Hipokampusta uyarıların alınması afferent yollarla, uyarıların iletilmesi efferent yollarla sağlanmaktadır (55). 'Area entorhinalis'den gelen duyarları hipokampusa ileten başlıca afferent yollar: 'Perforant yollar', 'Mossy lifleri', 'Schaffer kollateralleri' ve 'alvear lifler' dir. En önemli efferent yol ise forniks'dir (56). Hipokampusun yapısı karmaşıktır. Beyinde bir çok bölge ile bağlantılı olması, fonksiyonlarının açıklanmasını güçleştirmektedir. Emosyonel davranışlarımızı yöneten limbik sisteme dahil bir yapıdır; uyarılmasıyla bir çok endokrin ve davranışsal değişikliklerin ortaya çıktığı gözlenmiştir. Limbik sistemle ilişkili olarak görme, işitme, dokunma, iç organ duyarlarını alır ve davranışsal sonucun gelişimine katkıda bulunur. Kısa süreli hafıza üzerine etkilidir, sağ hipokampus görsel, sol hipokampus sözel hafıza ile ilgili fonksiyonlarda daha fazla aktivite göstermektedir (57,58).



Şekil 5: Hipokampal formasyonun bağlantıları

SIÇANLARDA HİPOKAMPUS

Sıçanlar, deneysel çalışmalarda en sık kullanılan, birçok farmakolojik deneylerde ve kanser araştırmalarında in-vivo model oluşturulan hayvan türlerindedir. Sıçanların doğumdan sonraki 15 gün içerisinde beyin ve vücut ağırlıkları orantılı olarak artar ancak daha sonraki dönemde beyin ağırlığı, vücut ağırlığına göre daha yavaş bir hızda artmaya devam eder. Ortalama vücut ağırlıkları ile ortalama beyin ağırlıkları arasında bir ilişki yoktur. Wistar Albino Cinsi Sıçanlar orta derecede doğurgan ve enfeksiyonlara oldukça dirençli bir türdür (59).

Bütün memelilerde hipokampusun yapısal organizasyonu birbirinin benzeridir. Sıçanlarda hipokampal formasyon dört basit kortikal bölgeyi kapsar (Şekil 5).

Bunlar: 1-Gyrus dentatus,

- 2-Hipokampus,
- 3-Subikular kompleks ve
- 4-Endorhinal korteks'dir.

Hipokampus ; uzun eksen boyunca kıvrılmış 'C' harfi şeklindedir ve temporal lobun ventrokaudalinde uzanır. Dört alt bölümden biri olan CA4, polimorfik hücrelerden oluşur ve 'gyrus dentatus'un hilusuna uyan bölgedir. Piramidal hücre tabakası hacim olarak birbirine yakın büyüklükte iki bölüm (CA1 ve CA3) 'dür. Bu iki bölgenin arasındaki geçiş bölgesine CA2 denir. Gyrus dentatus ve hilusa yakın olarak uzanan bölge, piramidal nöronların hücre gövdelerini içerir. Subiculum, kendine komşu hipokampustan daha az yoğun piramidal hücre içerir (60).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Deneyisel çalışmaya başlamadan önce Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulu'ndan Etik Kurul onayı alındı ve 01.04.2006- 01.05.2007 tarihleri arasında çalışıldı. Yenidoğan sıçanların kullanıldığı bu çalışma; deney hayvanları çalışma etiği kurallarına uygun şekilde, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda yapıldı. Histolojik çalışmalar Anatomi Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda ve Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Her iki cinsten, toplam 24 adet Wistar yenidoğan sıçan, Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi yardımıyla seçilerek rastgele 4 gruba ayrıldı. Sıçanların bakımı, altı plastik kaplı, üstü tel olan özel kafeslerin içinde yapıldı. Yenidoğan sıçanlar; çalışma öncesi ve sonrasında, annelerinin yanında tutuldu, ayrıca çalışma süreci de dahil olmak üzere oda ısısında (22 ± 2 °C), 50 ± 5 nem ortamında, 12'şer saatlik aydınlık-karanlık siklusu bulunan bir ortamda takip edildi. Bu çalışmada; term insan yenidoğan beynine benzerlik gösteren 9-12gr ağırlığında onüç günlük sıçanlar ve Levine'in modifiye hayvan modeli kullanıldı. Bu modelin yardımıyla; miadında doğmuş, hipoksik iskemik ensefalopatili yenidoğanların beyin hasarına histopatolojik açıdan benzeyen, tek taraflı beyin hasarı oluşturuldu (61,62).

Çalışma grupları:

1.grup: Cerrahi stres oluşturulan ve sadece boynun sol tarafına insizyon açılıp kapatılan grup, (6 adet yenidoğan sıçan)

2.grup: Hipoksi iskemi sonrası intraperitoneal (i.p.) salin (% 0.9 NaCl) uygulanan grup, (6 adet yenidoğan sıçan)

Tedavi grubu fenitoin 1 (TG-F1): Hipoksi iskemi sonrası 20mg/kg i.p. fenitoin (Phenytoin Antijen) uygulanan grup, (6 adet yenidoğan sıçan)

Tedavi grubu fenitoin 2 (TG-F2):Hipoksi iskemi sonrası 30mg/kg i.p. fenitoin (Phenytoin Antijen) uygulanan grup, (6 adet yenidoğan sıçan) şeklinde oluşturuldu.

HİPOKSİ-İSKEMİ MODELİ

Anestezi uygulanan sıçanlar (20mg/kg/doz ketamin i.p.(Ketalar)) ameliyat masası üzerine alındı. Sıçanlar sırtüstü olarak yatırıldı. Dört ekstremitte toplu iğne yardımıyla tahta levha üzerine sabitlendi ve boyun hiperektansiyonda olacak şekilde pozisyon verildi. Antiseptik solüsyonla ile temizlenen boyun bölgesine, vertikal olarak ve orta hatta 0,5-1 cm'lik cilt, cilt altı insizyonu yapıldı. İnsizyon hattından boynun sol tarafına girilerek incelenen dokuda, sol a.carotis communis yeri bulundu ve 5/0 ipek ile bağlandı. İşlem sonrası karşı taraf kas grubunda seyirme ve a.carotis communiste bağlanmadan önceki pulsasyonun, bağlanmadan sonra kaybolduğu gözlemlendi. Cerrahi işlem sırasında a.carotis communiste yırtılma veya kopma olan deneklerle, kanama veya anesteziye bağlı komplikasyon gelişen denekler çalışmaya dahil edilmedi. Sıçanların vücut ısısı 36,5-37 °C tutularak hipotermiden korundu. Altı adet sıçanda açılan insizyon hattı, a.carotis communis bağlanmadan kapatıldı ve bu grup 1.grup olarak ayrıldı. İnsizyon yeri dikildikten sonra beslenmeleri için 2 saat annelerinin yanına bırakıldı. Ardından 1.grup hariç diğer gruplara ait yenidoğan sıçanlar, hipoksi kabinine alındı. Burada hayvanlara nemlendirilmiş %92 nitrojen ve %8 oksijen karışımı, 1,5 saat süre ile solutuldu (63,64).

İLAC VE SERUM FİZYOLOJİK VERİLMESİ

Birinci grup dışındaki denekler hipoksi kabininden çıkarıldı ve 5 dakika normal atmosfer havasında bırakıldı. Bunu takiben 2.grup sıçanlara 0,1 ml serum fizyolojik, TG-F1 grubuna 20mg fenitoin (Phenytoin Antijen-ampul) (0,1ml serum fizyolojik içinde 20 mg/kg), TG-F2 grubuna 30mg fenitoin (Phenytoin Antijen-ampul) (0,1ml serum fizyolojik içinde 30 mg/kg) i.p. olarak uygulandı.

DOKUNUN HAZIRLANMASI

Yenidoğan sıçanlar hipoksi-iskemi modeli oluşturulduktan sonraki 8. günde dekapitasyon ile sakrifiye edildi. Bu işlem anestezi dozunda ketamin i.p. olarak uygulandıktan sonra yapıldı. Çıkarılan beyin dokuları Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda -15C°'ye ayarlanmış olan kriyostat cihazına konuldu. Kriyostat cihazında dondurulan beyin dokularından 150 mikrometre kalınlığında horizontal kesitler alındı. Lamlar üzerine alınan kesitler aynı laboratuvar şartlarında Hematoksilen-Eozin boyası ile boyandı.

KESİTLERİN BOYANMASI

Kesitler sırayla %96-90-80 ve 70'lik alkol içeren kaplarda 10 dakika bekletildi. Bu işlemden sonra suda yıkanan preparatlar Hematoksilen'de 2,5-3 dakika bekletildi ve tekrar suda yıkandı. Asit-alkol solüsyonuna daldırılıp çıkartılmasının ardından amonyak solüsyonunda 1-2 dakika bekletildi. Tekrar suda yıkandı ve Eosin solüsyonu içinde 3-5 saniye bırakıldıktan sonra yukarıda belirtilen alkol solüsyonlarından tekrar geçirildi. Bu işlemi takiben ksilol içine alınan preparatlar 30 dakika bekletildikten sonra entellanla kapatıldı. Kesitler ışık mikroskobu altında 4, 10, 20, 40 ve 100'lük büyütmelemler kullanılarak incelendi. Kesitlerde tüm beyin dokusu görülerek sağ veya sol hemisfer ayırımı yapıldı.

STEREOLOJİK YÖNTEMLER

Gerçekte üç boyutlu olan biyolojik yapılar mikroskopta iki boyutlu kesit görüntüleri verirler. Bu iki boyutlu olarak gözlenen yapı veya cisimlerin üç boyutlu özelliklerini ortaya çıkarmak için geliştirilmiş bir bilim dalı olan stereoloji, ilk kez 1961 yılında Elias tarafından kullanılmış, 1984 yılında Sterio tarafından etkin ve tarafsız metotların tarif edilmesiyle yeni bir anlayışa kavuşmuştur (64,65). Bir yapının veya organın hacim, yüzey alanı gibi değerlerinin hesaplanması, yapı içerisinde bulunan farklı bileşenlerin birbirlerine göre hacim, uzunluk, alan v.b. yoğunluklarının bulunması, bir yapıdaki toplam tanecik sayısının ortaya çıkarılması gibi çalışmalar stereolojinin önemli konularını oluşturmaktadır. Biyolojik yapılara ilişkin bu tip sayısal verilerin elde edilmesinde kullanılabilecek bir çok yöntemin olması bu yöntemler arasında en uygun ve güvenilir olanının seçilmesini gerektirmektedir. Önemli olan biyolojik yapılarda herhangi bir niceliği hesaplar veya ölçerken, yapıdan tarafsız, yani gerçek değerden sistematik bir sapma göstermeyen sonuçların elde edilmesini sağlayacak bir yöntemin seçilmesidir. Stereolojik yöntemlerin en önemli özellikleri etkin, tarafsız ve kesin olmalarıdır. Bu yöntemlerle beyindeki toplam nöron sayısı, sinaps yoğunluğu veya toplam beyin hacmi ölçülebildiği gibi, örneğin böbrekte korteks-medulla oranı, toplam glomerül sayısı, vücuttaki damarların toplam uzunlukları, ince bağırsakların toplam yüzey alanları vb. gibi hesaplamalar da yapılabilir (65). Stereolojik yöntemler ilgilenilen yapının sistematik-tekdüze-rastgele olarak elde edilmiş örnekleri üzerinde ölçümler yaparak, o yapıdaki söz konusu sayısal niceliğin belli ve istatistiksel olarak kabul edilebilir bir

hata payı dahilinde hesaplanmasına dayanmaktadır. Makroskopik bir yapının paralel kesitlere ayrılması, bu kesitlerin mikroskopta incelenmesi, ilgilenilen doku bileşenlerinin taranması, mikroskoptaki görüntü alanlarında ardışık görüntülerin karşılaştırılması, kesit kalınlığının ölçülmesi gibi basamakların dikkatli ve kurallara uygun gerçekleştirilmesiyle güvenilir sonuçlara ulaşılmaktadır. Stereolojik yöntemlerin kuramsal, pratik ve sade oluşu birçok yeni yöntemin hızla literatüre katılmasını ve bu yöntemlerin morfolometrik çalışmalarda 'altın standart' olmasını sağlamaktadır (66).

Stereolojik metotların temel ilkelerinden birisi 'sistemik rastgele örnekleme stratejisi'dir. Klasik rastgele örnekleme herhangi bir sıralama gözetmeksizin her örneğin bir öncekinden bağımsız ve tamamen rastgele olarak seçildiği bir yöntemdir. Bunun aksine sistemik rastgele örnekleme rastgele seçilen bir başlangıç noktasından başlanarak sabit ve önceden belirlenmiş aralıklarla seçim yapmayı içerir. Sistemik olması, örnekleme önceden belirlenmiş aralıklarla yapılması; rastgele olması, bu sistemik örnekleme belirlenen örnekleme aralığı içerisindeki rastgele bir sayı ile başlamasıdır. (67).

OPTİK DİSEKTÖR VE OPTİK PARÇALAMA

Fiziksel disektörün mantığından yola çıkılarak oluşturulmuş optik disektör metodu stereolojik bir metoddur, oldukça pratik ve etkin bir yöntemdir. Bu yeni yöntem 1986'da Gundersen tarafından ortaya konulmuş olup araştırmacıyı fiziksel olarak iki ayrı kesitte karşılaştırma yapma zahmetinden kurtarmaktadır. Tek bir kalın kesit hacmi içerisinde ardı ardına alınan optik kesitlerden faydalanarak, seçilen örnekleme alanında tanecik sayımı yapılmasına olanak verir. Optik disektör yönteminde alınacak kesit kalınlığı, sayılan en uzun partikülden daha büyük olmalıdır. Bu değer genellikle 20 µm ve daha üstü olarak alınır. Kesitlerde disektör sayım kurallarının uygulanması, yani iki boyutlu sayım çerçevesinin üç boyuta sanal olarak aktarılmasıyla mikroskop başında ya da monitör görüntüsünde partikül sayımı yapılabilir. Partikül sayımında öncelikle kesitin üst yüzeyinden başlanarak odaklama yapılır. Görüntünün ilk netleştiği yüzey kesitin üst yüzeyi, görüntü netliğinin kaybolduğu yer kesitin alt yüzeyi olarak belirlenir. İki yüzey arasındaki partiküller sayılarak kaydedilir. Alt ve üst yüzey arası mesafe mikrokator adı verilen bir aletle ölçülebilir, aynı zamanda bu ölçüm kalibre edildiği yöntem ile de yapılabilir. Kesit

yüzeylerindeki artefaktları ekarte edebilmek için alt ve üst güvenlik kuşağı denilen mesafede partikül sayımı yapılmaz. Optik disektör yüksekliği partikül sayımının yapıldığı bölgedir. Toplam disektör partikül sayısı, toplam disektör hacmine bölünürse sayısal yoğunluk elde edilir, sayısal yoğunluk değeri, yapının toplam hacmiyle çarpılırsa toplam partikül sayısına ulaşılır (68). Optik parçalama, incelenecek bölge hacminin tek tip sistematik rastgele örnekleme ile elde edilen bir bölümünde, üç boyutlu sayım yöntemi ile olan optik disektörle hücre sayımıdır. Önemli özelliği dokudaki şekil değişikliklerinden, fiksasyon, takip, gömme, kesit alma, boyama gibi histolojik işlemler nedeniyle oluşabilecek büzüşme veya şişme gibi olaylardan etkilenmemesidir. Doku, kesit ve kesit alanı seviyelerinde örnekleme yapılır. Örneklenen bölgelerin, ilgilenilen yapının kaçta kaçına karşılık geldiğinin bilinmesiyle yapının tamamının sayımı yerine küçük bir parçası örneklenmiş olur. Örneklenen kısımdan elde edilen partikül sayısı, bu parçanın ana yapıya oranları ile çarpılırsa toplam partikül sayısına ulaşılmış olur (66-69).

Stereolojik yöntemin tarafsız ve doğruluğunun yüksek olması ‘tarafsız sayım çerçevesi’ temeline dayanmaktadır. Partikül sayısının sayım çerçevelerinden kaynaklanan hatalar nedeniyle farklı çıkmasına ‘kenar etkisi’ denir. Bunu ortadan kaldırmak amacıyla, etrafında özel bir emniyet alanı oluşturulan bir sayım çerçevesi kullanılmaktadır. Bu çerçeve birbiriyle kesişen iki kenarı kalın ve düz, diğer iki kenarı ince ve kesikli çizgi ile çerçevelenmiş kare veya dikdörtgen şeklindedir. Sayım sırasında, sol ve alt kenarlar ile bunların uzantılarına değen yapılar dikkate alınmazlar (yasak kenarlar). Yalnızca çerçevenin tamamen içerisinde olan veya sağ ve üst kenarlara (serbest kenarlar) değerek kısmen çerçeve içerisinde olan yapılar sayılır (60,68,72).

Optik parçalama yöntemine göre hücre sayısının hesaplanması için; kesit örnekleme oranı, alan örnekleme oranı, kesit kalınlığının ölçümü, kalınlık örnekleme oranı ve hata katsayısı değeri gerekmektedir.

KESİT ÖRNEKLEME ORANI(KeÖO)

Kriyostat -15°C'ye ayarlanarak her sıçan beyninden 150 µm kalınlıkta kesitler alındı. Sistematik rastgele örnekleme yöntemi uygulanarak, iki kesitten biri atılıp biri alındı ve beyin dokusu bitinceye kadar devam edildi. Kesitler lam üzerine alınarak numara verildi, lam taşıyıcılarına yerleştirilerek boyandı, boyanan

kesitlerde hipokampus alanı içerenlerin tümünde sayım yapıldı. Bu şekilde kesit örnekleme oranı $\frac{1}{2}$ oldu (70,71,72).

ALAN ÖRNEKLEME ORANI (AÖO)

Sistemik rastgele örnekleme ile seçilmiş olan kesitler, tarafsız sayım çerçevesi içerisinde, mikroskopta belli aralıklarla x ve y eksenleri boyunca taranır. Alan örnekleme oranı tarafsız sayım çerçevesinin, x y adımlamaya oranı olarak hesaplanır (69).

Çalışmamızda Thoma lamı mikroskoba konulup bir küçük kare X100 büyütmede belirlendi. Görüntü, mikroskoba monte edilmiş video kamera (Sony Exwave HAD Color Video Camera SSc-DC88P) ile bir monitöre (Sony LCD monitor LMD-2010) aktarıldı. Bir küçük karenin monitöre yansıyan görüntüsü netleştirildikten sonra monitör üzerine asetat kağıdı yerleştirildi. Asetat kağıdına aktarılan görüntü üzerinde kenar uzunluğu 50 μm (0.05 mm) olan bir kare elde edildi ve bu asetat kalemi ile çizildi. Kesitlerde hipokampus alanı X100 büyütme ile incelendi. Kesit görüntüsünde x ekseninde 600 μm aralıklarla ve y ekseninde 50 μm aralıklarla adımlama yapıldı (72). Böylece bu iki eksendeki adımlama alanı (x, y adımlama) = 600 μm x 50 μm = 30 000 μm^2 olarak bulundu. Asetat üzerinde elde edilen bu kare içine kenarları 10 μm olacak şekilde bir çerçeve çizildi. Serbest ve yasak kenarlar belirlendi (birbirine dik olan sol ve alt kenar yasak, diğer iki kenar serbest olarak kaydedildi). Asetat kağıdı üzerindeki, çerçeve içeren kare şekli, monitör üzerine yapıştırılarak tarafsız sayım çerçevesini uygulamak için kullanıldı. Sol hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidale tabakası, x ve y ekseninde yukarıda tanımlanan aralıklarla tarandı. Her adımlama sonucu monitöre gelen görüntünün tamamında sayım yapılmayarak, sadece ölçüleri önceden tespit edilen tarafsız sayım çerçevesinde sayım yapıldı. Tarafsız sayım çerçevesinin kenar uzunlukları 10 μm , tarafsız sayım çerçevesinin alanı 100 μm^2 olarak bulundu. Buna göre AÖO $100 \mu\text{m}^2 / 30 000 \mu\text{m}^2 = 1/300$ olarak hesaplandı.

KESİT KALINLIĞININ ÖLÇÜMÜ

Çalışmamızda bir lamelin alt ve üst yüzeylerine mavi ve kırmızı renkte birer çizgi çizilerek bu lamel bir lam üzerine yapıştırıldı. Mikroskopta, mikrovida

döndürülerek lamel üst yüzeyine çizilen kırmızı çizgi netleştirildi. Bu durumdaki mikrovida değeri derece olarak kaydedildi ve lamelin üst yüzeyi olarak kabul edildi. Daha sonra mavi çizgiye ulaşıncaya kadar mikrovida döndürüldü. Mavi çizgi hizası ise lamelin alt yüzeyi olarak kabul edildi ve bu noktadaki değer de derece olarak kaydedildi. Kırmızı ve mavi çizgiye tekabül eden iki değer arasındaki fark hesaplandı. Mikrovidadaki değerlerin gerçek karşılığını bulmak için, lamel kırıldıktan sonra dik olarak mikroskop altına yerleştirildi. Daha önceden Thoma lamı kullanılarak kalibre edilmiş monitör ekranında lamelin gerçek kalınlığı saptandı. Bu ölçüm, lamelin gerçek kalınlığı ile mikrovida döndürülerek bulunan değerlerin karşılaştırılması için yapıldı. Böylece mikrovidadaki 1 derecelik hareketin kaç μm 'ye karşılık geldiği bulunmuş oldu. Çalışmamızda mikrovidadaki 1 derecelik hareketin 0,5 μm 'ye karşılık geldiği belirlendi. Işık mikroskobunda, mikroskobun mikrovidası yardımıyla, ilk net görülen görüntü ile son net görülen görüntü arası mesafe ölçülerek kesit kalınlığı hesaplanabilmektedir (72). Doku kesitleri mikroskopta incelenirken ilk olarak net olarak görülen görüntü ile en son net olarak görülen görüntü ve bunların karşılığındaki değerler kaydedildi. İki görüntü arası mesafe kesit kalınlığı (t) olarak belirlendi. Tüm kesitlerin kesit kalınlıkları ölçüldü, takiben her hayvan için ortalama kesit kalınlığı (t_{ort}) hesaplandı.

KALINLIK ÖRNEKLEME ORANI (KaÖO)

Kesit kalınlığı belirlenmesinin ardından 5 μm üstten, 5 μm alttan olmak üzere 10 μm 'lik bir güvenlik aralığı bırakıldı. Kesit kalınlığından güvenlik aralığı çıkarılarak, her kesit için disektör yüksekliği (h) belirlendi. Ardından her hayvan için ortalama disektör (h_{ort}) yüksekliği hesaplandı. Bu değer kullanılarak her sıçan için kalınlık örnekleme oranı bulundu. Kalınlık örnekleme oranı, ortalama disektör yüksekliğinin, ortalama kesit kalınlığına (t_{ort}) oranıdır. ($\text{KaÖO} = h_{\text{ort}} / t_{\text{ort}}$).

NÖRON SAYIMI

Hipokampus alanları incelenmek üzere kesitler mikroskop üzerinde X4 büyütmede belirlendi ve sonra lam üzerine bir damla immersiyo n yağı döküldü ve görüntü X100 büyütmeye getirildi, CA1, CA2, CA3 stratum piramidale tabakası belirlendi. Daha önce tanımlanan adımlamalara uyularak, "x" ve "y" ekseninde, belirlenen kesit kalınlığı içerisinde optik disektör sayım kurallarına göre sayım işlemi

yapıldı. Hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidale tabakasında bulunan, güvenlik kuşağı dışında kalan, sadece tarafsız sayım çerçevesi ve serbest kenarlar içine giren hücrelerin nükleusları sayıldı. Her hücrenin tek nükleusu olduğu için nükleus sayısı aynı zamanda hücre sayısı olarak kabul edildi (73). Her kesit için sayılan nöron sayısı(Q⁻) kaydedilerek, bunların toplanmasıyla her sıçan için sayılan toplam (hücre sayısı) nöron sayısı (ΣQ⁻; toplam disektör partikül sayısı) bulundu.

TOPLAM NÖRON SAYISI

Hesaplanan parametreler aşağıdaki formüle uygun olarak yerleştirildi. Her sıçan için hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidale bölgesindeki toplam nöron sayıları hesaplandı (73).

$$N(\text{toplam}) = (\Sigma Q^-) \times (1/ Ke\ddot{O}O) \times (1/ A\ddot{O}O) \times (1/ Ka\ddot{O}O)$$

Örnekleme planının yeterliliği ve çalışmanın güvenilir olması, hata katsayılarının %10'un altında olmasıyla ilişkilidir. Hata katsayısı hesaplanırken, her sıçan için sayılan kesit sayısı ve her kesit için sayılan disektör partikül sayıları (Q⁻) kullanılmaktadır (73). Tablo-1'de 1.grup 4 nolu sıçana ait disektör partikül sayıları ve hata katsayısının hesaplanmasında kullanılan formül gösterilmiştir.

Tablo 1: Birinci grup-4 nolu sıçana ait kesitlerdeki disektör partikül sayıları ve hata katsayısı bulunmasında kullanılan parametreler.

Kesit No	Q ⁻	Q ⁻ x Q ⁻	Q ⁻ x (Q ⁻ +1)	Q ⁻ x (Q ⁻ +2)
1	50	2500	1600	1900
2	32	1024	1216	1312
3	38	1444	1558	1330
4	41	1681	1435	1148
5	35	1225	980	1225
6	28	784	980	924
7	35	1225	1155	1435
8	33	1089	1353	
9	41	1681		
Toplam	Σ Q ⁻ =333	A=12653	B=10277	C=9274

Q⁻: Kesite ait disektör partikül sayısı, ΣQ⁻: Toplam disektör partikül sayısı, Q⁻+1: Bir sonraki kesite ait disektör partikül sayısı, Q⁻+2: İki sonraki kesite ait disektör partikül sayısı, HK: hata katsayısı

$$HK = \sqrt{[(3A+C-4B)/12] / \Sigma Q} \text{ (65)}$$

Buna göre 1.grup-4 nolu sıçana ait hata kat sayısı 0,019 bulundu.

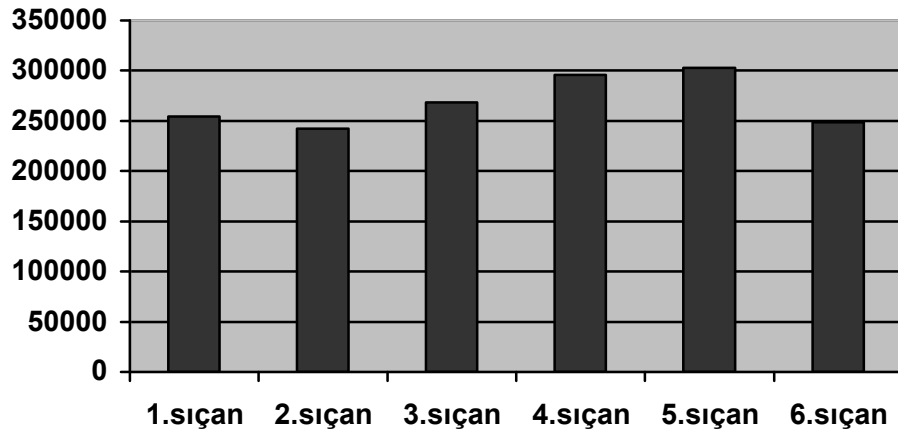
İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

İstatistik analiz “SPSS for Windows” istatistik programının 10.0 versiyonu kullanılarak yapıldı. Grupların ortalama toplam nöron sayıları arasındaki farklılık ‘Kruskal-Wallis’ testi ile değerlendirilirken, grupların kendi aralarındaki farklılıkların incelenmesinde ‘Mann-Whitney U’ testi kullanıldı.

4. BULGULAR

SIÇANLARIN HÜCRE SAYIM SONUÇLARI VE KULLANILAN PARAMETRELER

Hipoksi iskemi oluşturulmayan ve sadece cerrahi işlem uygulanan birinci grubun, toplam nöron sayısı, en yüksek 302604, en düşük 242100 olarak sayılmıştır. Nöron sayıları Şekil-6'da karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.



Şekil-6: Birinci gruptaki siçanların nöron sayıları

Altı adet hayvandan oluşan, 1. gruptaki siçanların, postnatal 13. günde bakılan vücut ağırlıkları, sol hipokampal CA1, CA2, CA3 alanlarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplanması için gereken parametreler Tablo-2'de gösterilmiştir.

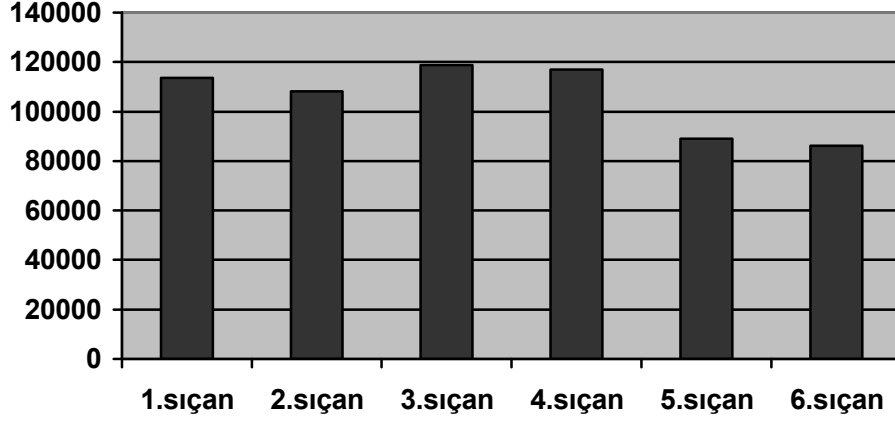
Tablo-2: Birinci grup sıçanların vücut ağırlıkları, sol hipokampal CA1, CA2, CA3 stratum pyramidale alanlarındaki toplam nöron sayıları ve kullanılan parametreler

PARAMATRELER	SIÇANLAR					
	1	2	3	4	5	6
Vücut ağırlığı	9,7	11,2	10,6	12,2	12,5	10,8
Q ⁻	275	269	300	333	334	278
1/KaÖÖ	1,54	1,50	1,49	1,48	1,51	1,49
t _{ort}	28,26	29,0	30,3	30,6	29,5	30,4
h _{ort}	18,26	19,0	20,3	20,6	19,5	20,4
HK	0,014	0,014	0,019	0,019	0,015	0,023
1/AÖÖ	300	300	300	300	300	300

n **254100** **242100** **268200** **295704** **302604** **248532**

Vücut ağırlığı: Gram, Disektör sayısı: Q⁻, Ortalama kesit kalınlığı: t_{ort} (µm), 1/Kalınlık örnekleme oranı: 1/KaÖÖ, Disektör yüksekliği: h_{ort} (µm), Hata katsayısı: HK, 1/Alan örnekleme oranı: 1/AÖÖ, n: Toplam nöron sayısı

Hipoksi-iskemi modeli oluşturulup, serum fizyolojik verilen 2.grubun toplam nöron sayısı en yüksek 118800 , en düşük 86070 olarak sayılmıştır. Nöron sayıları Şekil-7'da karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.



Şekil-7: İkinci gruptaki sıçanların nöron sayıları

Altı adet hayvandan oluşan, 2.gruptaki sıçanların, postnatal 13. günde bakılan vücut ağırlıkları, sol hipokampal CA1, CA2, CA3 alanlarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplanması için gereken parametreler Tablo-3'de gösterilmiştir.

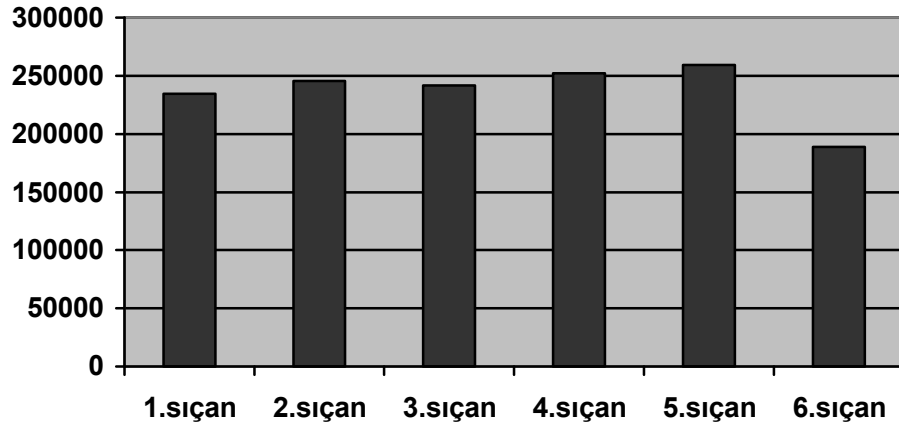
Tablo-3: İkinci grup sıçanların vücut ağırlıkları, sol hipokampal CA1, CA2, CA3 stratum pyramidale alanlarındaki toplam nöron sayıları ve kullanılan parametreler

PARAMATRELER	SIÇANLAR					
	1	2	3	4	5	6
Vücut ağırlığı	10,8	11,8	10,7	9,1	9,2	12,7
Q^-	127	121	132	130	99	95
1/KaÖO	1,49	1,49	1,51	1,50	1,50	1,51
t_{ort}	30,4	30,2	29,4	29,9	30,0	29,6
h_{ort}	20,4	20,2	19,4	19,9	20,0	19,6
HK	0,022	0,017	0,015	0,013	0,014	0,013
1/AÖO	300	300	300	300	300	300

n **113538** **108174** **118800** **117000** **89100** **86070**

Vücut ağırlığı: Gram, Disektör sayısı: Q^- , Ortalama kesit kalınlığı: t_{ort} (μm), 1/Kalınlık örnekleme oranı: 1/KaÖO, Disektör yüksekliği: h_{ort} (μm), Hata katsayısı: HK, 1/Alan örnekleme oranı: 1/AÖO, n: Toplam nöron sayısı

Hipoksi-iskemi modeli oluşturulup 20mg/kg fenitoin verilen, tedavi grubu fenitoin-1(TG-F1)'in toplam nöron sayısı en yüksek 259296, en düşük 188784 olarak sayılmıştır. Nöron sayıları Şekil-8'de karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.



Şekil-8: TG-F1 grubundaki sıçanların nöron sayıları

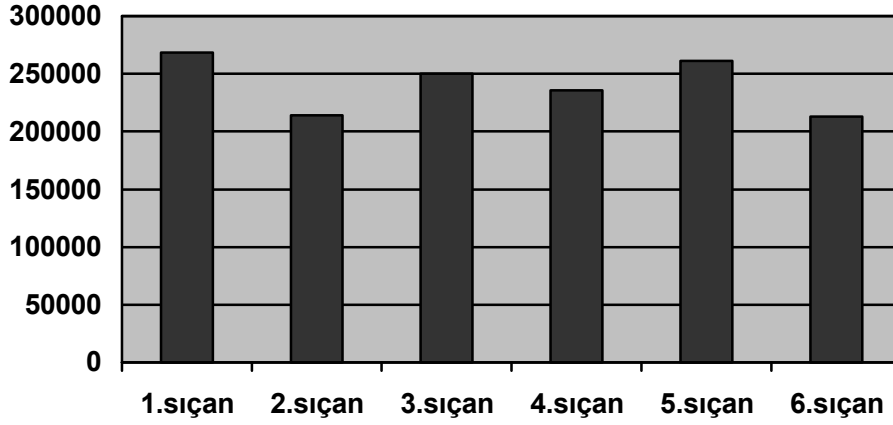
Altı adet hayvandan oluşan, TG-F1 grubundaki sıçanların, postnatal 13. günde bakılan vücut ağırlıkları, sol hipokampal CA1, CA2, CA3 alanlarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplanması için gereken parametreler Tablo- 4’de gösterilmiştir.

Tablo-4: TG-F1 grubu sıçanların vücut ağırlıkları, sol hipokampal CA1, CA2, CA3 stratum pyramidale alanlarındaki toplam nöron sayıları ve kullanılan parametreler

PARAMATRELER	SIÇANLAR					
	1	2	3	4	5	6
Vücut ağırlığı	10,8	9,7	9,5	11,7	9,3	12,7
Q^-	262	271	270	280	292	207
1/KaÖÖ	1,49	1,51	1,49	1,50	1,48	1,52
t_{ort}	30,2	29,7	30,4	30,0	30,7	28,9
h_{ort}	20,2	19,7	20,4	20,0	20,7	18,9
HK	0,022	0,015	0,018	0,018	0,021	0,017
1/AÖÖ	300	300	300	300	300	300
n	234228	245526	241380	252000	259296	188784

Vücut ağırlığı: Gram, Disektör sayısı: Q^- , Ortalama kesit kalınlığı: t_{ort} (μm), 1/Kalınlık örnekleme oranı: 1/KaÖÖ, Disektör yüksekliği: h_{ort} (μm), Hata katsayısı: HK, 1/Alan örnekleme oranı: 1/AÖÖ, n: Toplam nöron sayısı

Hipoksi-iskemi modeli oluşturulup 30mg/kg fenitoin verilen, tedavi grubu fenitoin-2 (TG-F2)'in toplam nöron sayısı en yüksek 268176, en düşük 213120 olarak sayılmıştır. Nöron sayıları Şekil-9'de karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.



Şekil-9: TG-F2 grubundaki sıçanların nöron sayıları

Altı adet hayvandan oluşan, TG-F2 grubundaki sıçanların, postnatal 13. günde bakılan vücut ağırlıkları, sol hipokampal CA1, CA2, CA3 alanlarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplanması için gereken parametreler Tablo- 5'de gösterilmiştir.

Tablo-5: TG-F2 grubu sıçanların vücut ağırlıkları, sol hipokampal CA1, CA2, CA3 stratum pyramidale alanlarındaki toplam nöron sayıları ve kullanılan parametreler

PARAMATRELER	SIÇANLAR					
	1	2	3	4	5	6
Vücut ağırlığı	12,1	9,7	10,5	9,9	10,6	12,5
Q ⁻	296	241	280	260	288	240
1/KaÖO	1,51	1,48	1,49	1,51	1,51	1,48
t _{ort}	29,3	30,6	30,2	29,6	29,4	30,5
h _{ort}	19,3	20,6	20,2	19,6	19,4	20,5
HK	0,019	0,012	0,021	0,016	0,019	0,016
1/AÖO	300	300	300	300	300	300

n **268176 214008 250320 235560 260928 213120**
Vücut ağırlığı: Gram, Disektör sayısı: Q⁻, Ortalama kesit kalınlığı: t_{ort} (µm), 1/Kalınlık örnekleme oranı: 1/KaÖO, Disektör yüksekliği: h_{ort} (µm), Hata katsayısı: HK, 1/Alan örnekleme oranı: 1/AÖO, n: Toplam nöron sayısı

GRUPLARIN HİPOKAMPAL ALANLARDAKİ TOPLAM NÖRON SAYILARI ORTALAMALARI

Birinci grupta toplam nöron sayısı ortalaması 268540 ± 25322 , 2.grupta toplam nöron sayısı ortalaması 105447 ± 14334 , TG-F1 grubunda toplam nöron sayısı ortalaması 236869 ± 25085 , TG-F2 grubunda toplam nöron sayısı ortalaması ise 240352 ± 23475 olarak saptanmıştır. Grupların toplam nöron sayısı ortalamaları şekil-10'da gösterilmiştir.

Bu çalışma grupları arasındaki toplam nöron sayısı ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olduğunu göstermiştir ($p=0,002$).

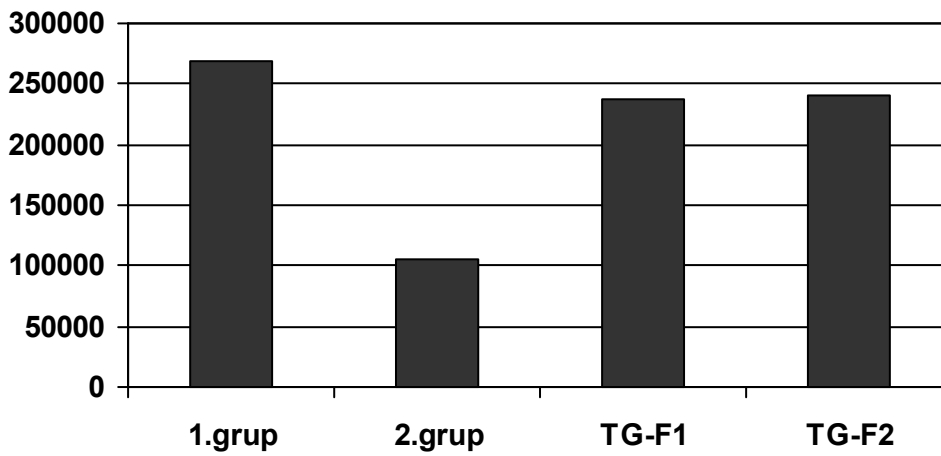
İkinci grubun toplam nöron sayısı ortalaması, 1. grubun toplam nöron sayısına ortalamasına göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur ($p=0,002$).

TG-F1 grubundaki toplam nöron sayısı ortalaması, 2.gruba göre anlamlı biçimde yüksek bulunmuştur ($p=0,004$).

TG-F2 grubundaki toplam nöron sayısı ortalaması, 2.gruba göre anlamlı biçimde yüksek bulunmuştur (p=0,002).

Birinci grup ve her iki fenitoin grubunun toplam nöron sayısı ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür (p<0.05).

Her iki fenitoin tedavisi verilen grubun toplam nöron sayıları ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür (p<0.05) (Tablo 6). Deney gruplarından birer sıçana ait, farklı mikroskop büyütmelerinde hipokampus görüntüleri Şekil-11’de gösterilmiştir.

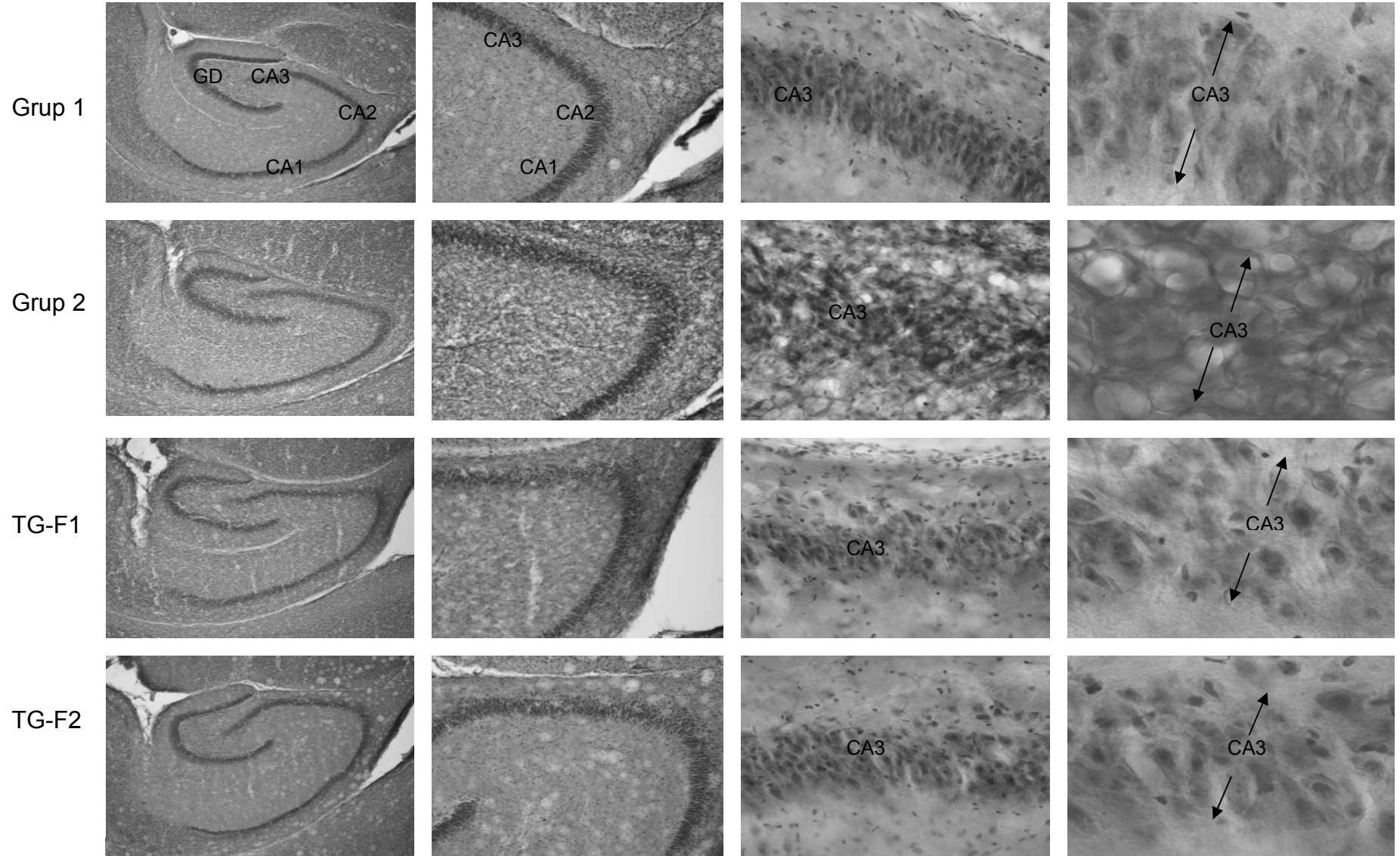


Şekil-10: Grupların toplam nöron sayısı ortalamaları

Tablo-6: ‘Mann-Whitney U’ testi kullanılarak ikili karşılaştırılan grupların istatistiksel p değerleri

İkili Karşılaştırılan Gruplar	p Değerleri
1.grup / 2.grup	0,002*
1.grup / TG-F1	0,065
1.grup / TG-F2	0,132
2.grup / TG-F1	0,004*
2.grup / TG-F2	0,002*
TG-F1/ TG-F2	0,818

* Anlamlılık düzeyi (p<0.05) olarak kabul edildi.



Şekil-11: Deney gruplarından birer sıçana ait farklı mikroskop büyötmelerinde hipokampus görüntüleri (soldan sağa sırasıyla X4, X10, X40, X100). GD: Gyrus dentatus, CA1-CA2-CA3: Hipokampusa ait stratum pyramidale'nin alt tabakaları.

5. TARTIŞMA

Perinatal hipoksik iskemik ensefalopatinin tedavi yaklaşımında genel prensip, yeterli ventilasyonun ve serebvasküler perfüzyonun sürdürülmesidir. Hastaların asid-baz dengesinin korunması, yeterli sıvı, elektrolit ve kalori desteğinin sağlanması, tansiyon arteriyel ve kan glikoz düzeylerinin normal sınırlarda tutulması gerekmektedir. Tedavinin diğer basamakları içinde, nöbet ve serebral ödem gibi komplikasyonların tedavisi bulunmaktadır (74,25). Hipoksik iskemik beyin hasarı, olayın başlangıcından reperfüzyon sonrası iyileşme periyoduna kadar devam eder. Terapötik pencere dönemi ise hasardan sonra başlayan ve birkaç saat ile günler arasında değişen bir dönemdir. Terapötik pencere dönemi içinde uygulanması gereken nöroprotektif tedavi basamağı ise hala tartışmalıdır ve bu tedaviyle ilgili çalışmalar devam etmektedir (74-77). Çalışmamızda, fenitoinin terapötik pencere dönemi içinde, nöroprotektif etkisi araştırıldı.

Serbest oksijen radikalleri oluşumunu engelleyen ilaçlar hayvan çalışmalarında incelenmiştir. Bu ilaçların içerisinde yer alan allopürinol ve oksipürinol ksantin oksidazı inhibe ederek ksantin üretimini engeller. Hipoksik iskemik beyin hasarı oluşturulmuş immatür ratlara, resusitasyondan sonraki erken iyileşme fazında verilen allopürinolün ve oksipürinolün nöron koruyucu etkisinin olduğu görülmüştür. Asfiktik infantlarda yapılan bir çalışmada, kontrol grubu ile kıyaslandığında allopürinolün kanda serbest oksijen radikal konsantrasyonunu azalttığı bulunmuştur (78,25). Fenitoinin serbest oksijen radikalleri üzerine direkt etkisi gösterilememiştir; ancak çalışmamızda matür yenidoğan ratlarda fenitoinin nöron kaybını önlediği gösterildi. Bu etkinin fenitoinin serbest yağ asitlerin oluşumunu azaltarak serbest radikal oluşumunu indirekt yoldan engellemesiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Lazaroid non-glikokortikoid bir ilaçtır ve demir bağımlı lipid peroksidasyonunu önler. Bu ilacın yetişkin ve immatür hipoksik-iskemik hayvan modellerinde nöroprotektif etkisinin olduğu görülmüştür (25). Şelatör etkili bir ilaç olan desferroksaminin hipoksi-iskemi hayvan modellerinde serbest demirden hidroksil radikali oluşumunu önlediği, beyin hasarını azalttığı gösterilmiştir (79). Antioksidan ajanların (vitamin C,E) ve hipoterminin hipoksik-iskemik hayvan modellerinde nöroprotektif olduğunu gösteren çalışmalar çoğunluktadır.

Hipoterminin koruyucu etkisinin bulunması kombine tedavilerin önünü açmıştır. Nitrik oksit sentez inhibitörleri, monosialogangliosidler, büyüme faktörleri, hücre içi kalsiyum tamponları ve apoptozis inhibitörleri için yapılmış hipoksik-iskemik hayvan çalışmalarının sonuçları tartışmalıdır (74).

Serebral iskemi sonucu hücre ölümünde en çok araştırılan nörotransmitter glutamattır. Santral sinir sisteminde miktarı en yüksek olan eksitatör nörotransmitter olup, iskemi sırasında salınımı artmaktadır. Uyarılan glutamat reseptörleri hücrede nekroz veya apoptozise neden olmaktadır (80). Yenidoğan hayvan çalışmalarında nöroprotektif etkili olduğu gösterilen magnezyum bir NMDA reseptör antagonisti olup; kalsiyumun hücre içine geçişini ve glutamatın etkilerini bloke etmektedir. Yenidoğan ratlarda NMDA'nın serebral enjeksiyonundan 15 dakika sonra verilen $MgSO_4$ ' in beyin hasarını azalttığı bulunmuştur (74,81). Perinatal hipoksik iskemik ensefalopatide nöbet sık görülür. Yenidoğan döneminde fenobarbital tedavisine yanıt vermeyen veya status gelişen hastalara fenitoin tedavisi uygulanmaktadır. Çalışmamızda, antikonvülzan etkisinin yanında nöroprotektif etkisinin kanıtlanmasının, HİE'li hastalar için bir avantaj olacağını düşünerek, fenitoin ilacını tercih ettik. Fenitoin ile nöron kültür çalışmaları yapılmış ve sodyum kanallarını bloke ederek glutamat salınımını azalttığı bulunmuştur (82). Nöron kültür çalışmaları in vivo çalışmalar kadar değerli değildir ve canlı organizmadaki ilaç etkilerini yansıtamaz. Bu çalışma in vivo bir çalışmadır. Fenitoinin eksitatör nörotoksitesisi üzerinde etkili bir ilaç olması sebebiyle planlanmış bu çalışmada; sıçanlarda hipoksi-iskemi modelinde, nöron kaybını önlediği bulunmuştur. Bu etkinin glutamat salınımını azaltarak gerçekleştiğini düşünmekteyiz.

DeneySEL çalışmalarda; HİE'de, intrasellüler kalsiyum artışının nöronal zedelenmeyi arttırdığı gösterilmiştir, bununla ilişkili olarak kalsiyum kanal blokerlerinin etkisi çalışılmıştır. Hipoksi-iskemi öncesi verilen flunarizin yenidoğan ve fetal hayvanlarda koruyucu etkisi bulunmuştur (81).

İyon kanal modülatörü olan bir diğer ilaç grubu antiepileptiklerdir. İskemi ile epilepsinin oluşumunda sinaptik kaskat ve intrasellüler bulgular birbirine benzemektedir. Bu benzerlik; antiepileptiklerin, iskemi hayvan modellerinde

gösterilmiş nöroprotektif etkilerini açıklamaktadır (83-85). Etki mekanizmalarına göre kalsiyum geri alımını inhibe edenler, NMDA glutamat reseptör inhibitörleri, GABA (Gamma- amino butirik asit)'erjik sistem üzerinden etkili olanlar ve sodyum geri alımını inhibe edenler (voltaj bağımlı sodyum kanalı inhibitörleri) olmak üzere 4 gruba ayrılırlar. Lamotrijin, N tipi kalsiyum kanalını ve sodyum kanalını bloke ederek etki gösteren bir antiepileptiktir. Orta serebral arter oklüzyonu yapılan rat modellerinde nöroprotektif etkisi rapor edilmiştir. Global iskemi oluşturulan çöl hayvanlarında reperfüzyondan hemen sonra verilen lamotrijinin, hipokampal CA1 nöron kaybını önlediği ve kognitif defisitten koruduğu bulunmuştur (86). İskemiden 30 dakika önce ve sonra lamotrijin verilerek yapılan başka bir çalışmada, mikrodializ yöntemle glutamat ölçülmüş, her iki grupta da glutamat salınımının azaldığı bulunmuştur (87). Bu çalışmalar sadece iskemi modellerinde yapılmıştır ve erişkin ratlarda çalışılmıştır. Çalışmamızda, fenitoinin etkisi, hipoksi-iskemi modelinde ve yenidoğan sıçanlarda araştırıldı. Çalışmamızın sonuçları nöron kaybının önlenmesi açısından lamotrijine benzer bulundu ve fenitoinin bu benzer etkisinin lamotrijin gibi glutamat salınımını azaltarak gerçekleştiğini düşünmekteyiz.

Voltaj bağımlı sodyum kanalları üzerinden etki gösteren diğer antiepileptik ajanlar karbamazepin, valproik asit, topiramamat, zonisamid ve fenitoindir. Topiramamatın fenitoinle karşılaştırıldığı global iskemi hayvan modelinde, hipokampal iskemik nöronal hasar açısından, topiramamatla ortaya çıkan bulguların, fenitoinle ortaya çıkan bulgulara benzediği görülmüştür. Bu sonuç; topiramamatın farklı etki mekanizmalarına rağmen, nöroprotektif etkisinin, sodyum kanalları üzerinden gerçekleştiğini düşündürmektedir (88). Sodyum kanalları üzerinden etkisi bilinen fenitoin, bu çalışmada farklı olarak, global iskemi yerine hipoksi-iskemi modelinde ve yenidoğan sıçanlarda çalışıldı. Hipoksi-iskemi sonrasında etkisi incelenen fenitoinin, hipokampal nöron koruyucu etkisi, bahsedilen çalışma sonuçlarına benzer bulundu.

Hipoksiye bağlı nöronal hasarda voltaj bağımlı sodyum kanalları önemli rol oynamaktadır. Altta yatan mekanizma henüz tam olarak açıklanamamakla beraber voltaj bağımlı sodyum kanalları bloke edildiğinde, hücre içi/dışı iyon dengesinin ve intrasellüler enerji düzeylerinin korunduğu düşünülmektedir. İn vitro çalışmalarda tetrodoksinin, fenitoinin ve lidokainin doz bağımlı nöroprotektif etkilerinin olduğu

gösterilmiştir (89). Başka bir rat hücre kültürü çalışmasında tetrodoksinin, lidokainin ve fenitoinin nöron hasarını önledikleri, aynı zamanda glutamat salınımını da azalttıkları bulunmuştur (90). Penumbra iskemik bölge etrafındaki alandır ve bu alanda iskemik hasara uğramış hücreler bulunur. Preklinik çalışmalarla, fenitoinin, penumbral bölgede, yaygın elektriksel depolarizasyonu (voltage bağımlı sodyum kanalları üzerinden) inhibe ederek, iskemi sonrası glutamat salınımını azalttığını gösterilmiştir (91).

Kinouchi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada wistar ratlara global iskemi modeli uygulanmış ve fenitoinin etkisi araştırılmıştır. Bir gruba iskemiden 30 dakika önce 10mg/kg fenitoin intravenöz verilmiş ve tedavi verilmeyen gruplarla, serbest yağ asidi, laktat, nükleozid trifosfat düzeyleri açısından karşılaştırılmıştır. Fenitoin ile tedavi edilen grupta, kontrol gruplara göre nükleozid trifosfat düzeyi daha yüksek, laktat ve serbest yağ asit düzeyi daha düşük bulunmuştur (92). Bu çalışma erişkin ratlarda yapılmıştır, sadece iskemi modeli çalışılmıştır ve laboratuvar testleriyle sonuca varılmıştır. Çalışmamızda ise yenidoğan sıçanlar kullanıldı. Hipoksi-iskemi modelinde ve iskemi sonrasında ilaç etkisini araştırıldı. Laboratuvar değerlerinden bağımsız olarak, daha kantitatif değerlendirme yöntemiyle hipokampal nöron sayılarını hesaplandı. Sonuçta iskemi sonrasında koruyucu etkisini gösterdiğimiz çalışma sonuçlarımızın yukarıdaki çalışmayla benzer ancak bahsedilen farklılıklarla da daha güvenilir olduğunu düşünmekteyiz.

Imaizumi ve arkadaşları global iskemi oluşturulan rat modelinde fenitoinin Na(+)-K(+)-ATPaz aktivitesi üzerine olan etkisini araştırmışlardır. Çalışmada; iskemi sonrası fenitoin verilen grupta, Na(+)-K(+)-ATPaz aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (93). Çalışmamızda Na(+)-K(+)-ATPaz aktivitesi değerlendirilmedi. Ancak fenitoin için gösterdiğimiz nöroprotektif etkinin, fenitoinin diğer etki mekanizmalarına ek olarak, enerji kullanımını azaltması ile ilişkili olabileceği kanısındayız.

Fosfenitoin; fenitoinin disodyum fosfat ester formudur, antikonvülzan özellikleri fenitoine benzemektedir. Chan ve arkadaşları; yetişkin ve erkek ratlarda global iskemi modeli oluşturmuşlar ve iskemiden 5 dakika sonra 30mg/kg i.m.

fosfenitoin tedavisi uygulamışlardır. Tedaviden 7 gün sonra öldürülen ratlarda, hipokampal piramidal nöron sayıları ve glial fibriler asidik protein immunreaktivitesi(GFAP) incelenmiştir. GFAP iskemi sonrası glial hücre kaybını değerlendirmede kullanılan bir yöntemdir. Fosfenitoin tedavisi verilen grubun GFAP immunreaktivite sonuçlarında anlamlı değişiklikler görülmemiştir. Hipokampal nöron sayıları ise tedavi verilen grupta salin verilen gruba göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Nöronal ve glial yanıtların farklı olmasına rağmen fosfenitoinin iskemi hasarında nöroprotektif olduğu düşünülmektedir (94). Daha geçerli bir değerlendirme yöntemi olan hipokampal nöron sayımı ile nöronal yanıt sonucu anlamlı (nöroprotektif) bulunmuştur. Bu çalışmaya benzer şekilde, ilacın iskemiden 5 dakika sonra uygulandığı çalışmamızda fosfenitoin yerine fenitoin kullanılmıştır. Ayrıca ilaç, yenidoğan, her iki cins sıçanlarda ve hipoksi-iskemi modelinde araştırılmıştır. Çalışmamızın nöronal yanıt sonucu fosfenitoine benzer bulunmuştur.

Fenitoin ile yapılmış iskemi çalışmaları bulunmakla beraber, yenidoğanlarda yapılmış hipoksi iskemi çalışmalarının sayısı kısıtlıdır. Boxer ve arkadaşları, yetişkin ratlarda fokal iskemi modeli kullanarak fenitoinin ve non-kompetetif NMDA reseptör antagonistlerinin (fensiklidin, MK-801) etkilerini araştırmışlardır. Ratlara orta serebral ile ipsilateral karotis arter oklüzyonundan 30 dakika ve 24 saat sonra intravenöz (i.v.) ilaç verilmiştir. Oklüzyondan 48 saat sonra beyinde enfarkte alan ölçümü yapılmıştır. Oklüzyondan 30 dakika sonra fensiklidin, MK-801 ve fenitoin tedavisi verilen gruplarda, doza bağımlı olarak, beyinde enfarkte alan volümünün anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur. Fensiklidinin; 3mg/kg dozda verildiği grupta, enfarkte volümü %36 oranında azalttığı, MK-801 'in; 0,1mg/kg dozda verildiği grupta enfarkte volümü %32 oranında azalttığı, fenitoinin; 28mg/kg dozda verildiği grupta enfarkte volümü %45 oranında azalttığı gösterilmiştir. Oklüzyondan 24 saat sonra etkili bulunmamışlardır (95). Çalışmamızda, ilaç tedavisi terapötik pencere döneminin başlangıcında (5 dakika sonra) verildi ve daha düşük dozda (20mg/kg) fenitoinin, hipokampal nöron sayılarında koruyucu etkisinin olduğu gösterildi. Enfarkte alanın hesaplandığı bu çalışmadan farklı olarak, çalışmamızda, daha kantitatif bir yöntem olan hipokampal alanda nöron sayısı hesaplandı. Yine başka bir farklılık da çalışma modelinin hipoksi-iskemi olmasıdır. Kullandığımız model

perinatal asfiksiye yakın bir model olup, HİE'li yenidoğanda ilaç etkisini yansıtmada daha güvenilirdir.

Cullen ve arkadaşları, erişkin tavşan serebral iskemi çalışmasında, iskemiden hemen sonra verilen fenitoinin etkisini değerlendirmişlerdir. Fenitoinin 15mg/kg i.v. dozda nöroprotektif etkili olduğunu bulmuşlardır. Aynı çalışmada 10mg/kg tiyopentalin etkisiz olduğunu saptamışlardır (96). Bu çalışma, erişkin ratlarda ve iskemi modelinde yapılmış olması sebebiyle, yenidoğan dönemini ve hipoksi- iskemi sürecini yansıtmamaktadır.

Rataud ve arkadaşlarının erişkin ratlarda fokal iskemi modeli oluşturarak yaptıkları çalışmada, voltaj bağımlı sodyum kanal blokerlerinin etkilerini incelemişlerdir. İskemi sonrası rat gruplarına fenitoin (2 x 100 mg/kg i.p.), karbamazepin (2 x 50 mg/kg i.p.), lamotrijin (2 x 50 mg/kg i.p.) ve RP 66055 (2 x 8 mg/kg i.p.) verilmiş olup, tedaviden 30 dakika ve 24 saat sonra beyinde enfarkte alan yüzdesi hesaplanmıştır. İlaçların sırasıyla %40, %24, %28 ve %44 oranında beyin enfarkte alan yüzdesini azalttıkları bulunmuştur (97). Çalışmamızda farklı olarak, ratlara 12 saat arayla 2 doz fenitoin verilmesi yerine, daha düşük ve tek dozda fenitoin verildi. Sitoprotektif etki, 24 saat yerine, yedi gün sonra ve enfarkte alan hesaplama yöntemi yerine hipokampal alanda nöron sayısı hesaplanarak değerlendirildi. Bu farklılıklarla beraber Rataud ve arkadaşlarının çalışmasına benzer şekilde ancak daha düşük ve tek dozda fenitoinin iskemi sonrası nöroprotektif etkili olduğu gösterildi.

Hayakawa ve arkadaşları; hipoksik-iskemik beyin hasarı oluşturulan yenidoğan ratlarda, fenitoinin nöroprotektif etkisini araştırmışlardır. Fenitoin, hipoksi-iskemi öncesi ve sonrası, 50mg/kg dozda, intraperitoneal olarak verilmiştir. Rat gruplarında enfarkte alan yüzdesi değerlendirilmiş ve hipokampal alanlarda semikantitatif hücre sayımı yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda hipoksi-iskemiden bir saat önce verilen 50mg/kg fenitoinin nöron hasarını önlediği ve beyinde enfarkte alan yüzdesini azalttığı görülmüştür (6). Çalışmamızda farklı olarak daha güvenilir bir yöntem olan kantitatif stereoloji yöntemi kullanılmıştır ve hipoksi-iskemi sonrası 20mg/kg ve 30mg/kg fenitoinin hipokampal alanda nöron kaybını önlediği bulunmuştur.

Vartanian ve arkadaşları; hipoksi-iskemi modeli oluşturulan yenidoğan ratlarda hipoksi-iskemi öncesi ve sonrası 3, 10 ve 30mg/kg dozlarda intraperitoneal verilen fenitoinin etkisini araştırmışlardır. Spektrin düzeyini ve beyin ağırlığını ölçerek yaptıkları değerlendirmede hipoksi-iskemi öncesinde verilen 30mg/kg dozunda fenitoinin, enfarkt alan yüzdesini ve spektrin düzeylerini azalttığını göstermişlerdir. Spektrin hücre iskeletinin yapıtaşlarından biridir ve iskemi sürecinde kalpain aktivasyonu ile yıkımı artmaktadır (98). Çalışmamızda; fenitoinin, hipoksi-iskemi sonrası 20 ve 30mg/kg dozlarda hipokampal nöron kaybını önlediği gösterilmiştir. Beyin ağırlığı ve spektrin ölçümlerinden daha değerli olan hipokampal nöron sayısı hesaplanarak bu sonuca varılmıştır. Literatürdeki çalışmalardan farklı olarak stereolojik yöntemle değerlendirilmiş çalışmamızın sonuçlarını daha güvenilir bulmaktayız.

Hipoksi-iskemi modeli oluşturulan term yenidoğan sıçanlarda fenitoinin etkilerini araştıran bu çalışmayla, literatürden farklı olarak iskemiden kısa süre sonra (5 dakika), düşük dozda (20-30mg/kg) uygulanan fenitoinin hipokampal alanda nöron kaybını önlediği gösterildi. Fenitoinin HİE'li yenidoğanlarda nöroprotektif amaçlı kullanılabilmesi için ileri prelinik çalışmaların yapılması gerekmektedir.

6. SONUÇLAR

Stereolojik yöntem kullanılarak; deneysel hipoksik iskemi modelinde, HİE nin hücre kaybına yol açtığı doğrulandı.

Miadında doğmuş yenidoğan sıçanlarda HİE oluşturuldu ve çalışmada, hipoksiden sonra erken dönemde (5 dakika sonra) i.p. verilen 20 mg/kg ve 30 mg/kg fenitoinin, hipokampal CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanlarında nöron kaybını önlediği bulundu..

Birinci grup ve fenitoin tedavisi verilen gruplar, ikinci grupla kıyaslandı. Bu karşılaştırmada hipoksi-iskeminin hipokampal alanlarda nöron kaybına yol açtığı ve hipoksi-iskemi sonrası erken dönemde düşük doz fenitoin tedavisiyle, beyin hasarının önlenebileceği sonucuna varıldı. Sitoprotektif etki açısından, fenitoinin 20 mg/kg ve 30 mg/kg dozları arasında fark bulunmadı.

Çalışmada; miad yenidoğan sıçanlarda oluşturulan hipoksik iskemi modelinde, düşük doz fenitoinin nöron kaybını önlediği gösterildi ancak fenitoinin nöroprotektif amaçlı klinik kullanımı için ileri prelinik çalışmalara ihtiyaç olduğu sonucuna varıldı.

7. ÖZET

MİAD YENİDOĞAN SIÇANLARDA OLUŞTURULAN HİPOKSİK İSKEMİK ENSEFALOPATİ MODELİNDE İNTRAPERİTONEAL OLARAK UYGULANAN FENİTOİNİN BEYİN HASARINA ETKİSİ

DR. GÜLİZ BAYRAM

Perinatal asfiksi, ciddi nörolojik sekellere ve ölüme neden olmaktadır. Hipoksik iskemik ensefalopatide; nörotoksik düzeylerde glutamat salınımı, iyon pompalarının bozulması, enerji yetersizliği ve hücre içi asidoz gelişmesi beyin hasarını tetikleyen nöropatolojik mekanizmalardandır. Antiepileptik bir ilaç olan fenitoin voltaj bağımlı sodyum kanallarını bloke ederek glutamat salınımını azaltmakta ve Na-K-ATP'azı uyararak hücreiçi/dışı iyon dengesini korumaktadır. Laktat ve serbest yağ asiti birikimini önlemektedir. Fenitoinin bu etkileri göz önünde bulundurularak; hipoksi-iskemi modeli oluşturulmuş miad yenidoğan sıçanlarda, hipokampal nöron kaybı üzerine koruyucu etkisi araştırıldı.

Araştırmada; postnatal 13 günlük, 24 Wistar sıçan kullanıldı. Toplam 6 sıçandan oluşan çalışma grupları: Hipoksi iskemide oluşturulmayan ve sadece cerrahi stres oluşturulan sıçanlar 1.grup, hipoksi-iskemi sonrası i.p. %0.9 NaCl uygulanan sıçanlar 2.grup, hipoksi-iskemiden 5 dakika sonra i.p. 20mg/kg ve 30mg/kg fenitoin tedavisi verilen sıçanlar Tedavi Grubu-Fenitoin1 (TG-F1) ve Tedavi Grubu-Fenitoin 2 (TG-F2) olarak ayrıldı. Tüm gruplar postnatal 21.günde dekapitasyon ile sakrifiye edildi. Kriyostatta dondurulan beyin dokusundan horizontal kesitler alınarak, Hematoksilen-Eozin ile boyandı. Hipokampal CA1, CA2, CA3 alanlarında, stereolojik yöntemler kullanılarak nöron sayımı yapıldı.

Toplam nöron sayısı ortalaması 1.grupta 268540 ± 25322 , 2.grupta 105447 ± 14334 , TG-F1 grubunda 236869 ± 25085 , TG-F2 grubunda 240352 ± 23475 saptandı. Nöron sayısı ortalaması 2.grupta, 1.gruba göre belirgin azalmış olarak ($p=0.002$); TG-F1 ve TG-F2 gruplarında 2.gruptan belirgin yüksek ($p=0,004$, $p=0.002$) bulundu.

Hipoksi-iskemi modeli uygulanmış, miadında doğmuş yenidoğan sıçanlarda, fenitoin tedavisinin hipokampal nöron kaybını önlediği gösterildi. Fenitoinin nöroprotektif amaçlı klinik kullanımı için ileri prelinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

SUMMARY

EFFECT OF INTRAPERITONEALLY PHENYTOIN ON HYPOXIC-ISCHEMIC BRAIN DAMAGE IN NEONATAL RATS

DR. GÜLİZ BAYRAM

Perinatal asfixia may cause severe neurological deficit and death. In hypoxic ischemic encephalopathy; glutamate release in neurotoxic levels, failure of the ion pumps, energy insufficiency and intracellular acidosis are neuropathological mechanisms which trigger brain injury. Phenytoin which is an antiepileptic drug; blocks the voltage dependent Na channels and decrease the release of glutamate and stimulate Na-K-ATPase and with these mechanisms protect the inner and outer cell environments ion equilibrium. Lactate and free fatty acid accumulation is prevented. By considering these effects of phenytoin, we investigated its protective effect on the hippocampal neuron loss in term newborn rats in hypoxic-ischemia model.

Twenty four Wistar rats, age postnatal 13 days, were included to the research. Each group contains six rats. Study groups: First group had no hypoxia-ischemia but had only surgical stress, 2. group had % 0.9 NaCl given i.p. after hypoxia-ischemia. Treatment group phenytoin 1 (TG-F1) and phenytoin 2 (TG-F2) had separately 20mg/kg and 30mg/kg phenytoin i.p. 5 min. after hypoxia-ischemia. Each group is sacrificed on the postnatal 21st day by decapitation. Horizontal cross sections are taken from the brain tissue which is frozen in cryostat and dyed with H.E. By using the stereological methods, neuron counting is made in CA1, CA2, CA3 zones.

Total neuron count in group 1 is 268540 ± 25322 , 105447 ± 14334 in group 2, 236869 ± 25085 in TG-F1, 240352 ± 23475 in group TG-F2. Number of the neurons in group 2 is significantly decreased when compared with group 1 ($p=0.002$) and significantly increase in groups TG-F1 and TG-F2 groups when compared with group 2 ($p=0.004$, $p=0.002$).

In term birth newborn rats with hypoxia-ischemia model, it is shown that phenytoin medication decreases the hippocampal neuron loss. Future preclinical investigations are needed for protective clinical usage of phenytoin.

9. KAYNAKLAR

- 1) Shaywitz BA. Perinatal asphyxia. In: McMillan JA, Deangelis CD, Feigin RD, eds. Oski's pediatrics. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999:235-237.
- 2) Brann AW. Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *Pediatr Clin North Am* 1986; 33:451-464.
- 3) Katherine B. Hypoxic-ischemic brain injury: Advancements in the understanding of mechanisms and potential avenues for therapy. *Curr Opin Pediatr* 1999; 11:223-228.
- 4) Stoll BJ, Kliegman RM. Hypoxia- Ischemia. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, eds. 18th. Nelson Textbook of Pediatrics. Philadelphia: WB Saunders Company, 2007:566-567.
- 5) Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT, Palmer C, Smith MB, Towfighi J, and Vannucci. SJ. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J. Neurosci. Res* 1999; 55:158-163.
- 6) Hayakawa T, Hamada Y, Maihara T, Hattori H, Mikawa H. Phenytoin reduces neonatal hypoxic-ischemic brain damage in rats. *Life Sciences* 1994; 54(6):387-392.
- 7) Vannucci RC. Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *Am. J Perinatology* 2000; 3(17):113-120.
- 8) Gilstrap LC, Leveno KJ, Burris J, Williams ML, Little BB. Diagnosis of birth asphyxia on the basis of fetal pH, Apgar score, and newborn cerebral dysfunction. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161: 825-830.
- 9) Legido A. Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. Current advances in diagnosis and treatment. *Int. Pediatr* 1994; 9:114-136.

- 10) Gilles FH, Leviton A, Dooling EC. The Developing Human Brain: Growth and Epidemiologic Neuropathology. John Wright PSG, Boston, 1983.
- 11) Williams CE, Gunn AJ, Mallard C, Gluckman PD. Outcome after ischemia in the developing sheep brain: An electroencephalo-graphic and histological study. *Ann Neurol* 1992; 31:14–21.
- 12) Vannucci RC. Hypoxia-ischemia: Clinical aspects. In: Fanaroff AA, Martin RJ, eds 7th. Neonatal-perinatal medicine IV. Philadelphia: Mosby-Yearbook 2002:867-879.
- 13) Wyatt JS, Edwards AD, Azzopardi D, Reynolds EO. Magnetic resonance and near infrared spectroscopy for investigation of perinatal hypoxic-ischaemic brain injury. *Arch Dis Child* 1989; 64:953-963.
- 14) Vannucci RC, Perlman MJ. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 1997; 100:1004-1114.
- 15) Grow J, Barks JD. Pathogenesis of hypoxic-ischemic cerebral injury in the term infant: Current concepts. *Clin Perinatol* 2002; 29:585-602.
- 16) Lorek A, Takei Y, Cady EB. Delayed ("secondary") cerebral energy failure after acute hypoxia-ischemia in the newborn piglet: Continuous 48-hour studies by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res*. 1994; 36: 699-706.
- 17) Vannucci RC. Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia: Relation to perinatal brain damage. *Pediatr Res* 1990; 27: 317–326.
- 18) Siesjö BK. Calcium fluxes, calcium antagonists and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia and spreading depression: A unifying hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989; 9:127.

- 19) Lowry OH. Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. *J Biol Chem* 1976; 18:239.
- 20) Melzian D, Scheufler E, Grieshaber M, Tegtmeier F. Tissue swelling and intracellular pH in the CA1 region of anoxic rat hippocampus. *J Neurosci Methods* 1996; 65:183-187.
- 21) Siesjo BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia, part I, Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurgery* 1992; 77:169-184.
- 22) Yao H, Hadda GG. Calcium and pH homeostasis in neurons during hypoxia and ischemia. *Cell Calcium* 2004; 36:247-255.
- 23) Guyot LL, Diaz FG, O'Regan MH, Song D, Phillis JW. Real-time measurement of glutamate release from the ischemic penumbra of the rat cerebral cortex using a focal middle cerebral artery occlusion model. *Neurosci Lett* 2001; 299: 37-40.
- 24) Fridovic I. The biology of oxygen radicals. *Science* 1978; 201:875-80.
- 25) Perlman J.M. Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury. *Clin Ther* 2006; 28:1353-1365.
- 26) Milde LN, Weglinski MR. Pathophysiology of metabolic brain injury. In: James EC, David SS eds. *Anesthesia and Neurosurgery*, Philadelphia: Mosby, 1994:1-15.
- 27) Cheeseman KH. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Mol Aspects Med* 1993; 14(3):191-197.
- 28) Perlman J.M, Shalak L. Hypoxic-ischemic brain injury in the term infant-current concepts. *Early Hum Dev* 2004; 80:125-141.

- 29) Budd LS. Mechanisms of neuronal damage in brain hypoxia/ischemia: Focus on the role of mitochondrial calcium accumulation. *Pharmacol Ther* 1998; 80(2):203–229.
- 30) Delivoria-Papadopoulos M, Mishra OP. Mechanisms of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategies for prevention. *J Pediatr* 1998; 132:30-34.
- 31) Johnston VM, Trescher WH, Ishida A, Nakajima W. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatr Res* 2001; 49(6):735-41.
- 32) Berger R, Garnire Y. Perinatal brain injury. *J Perinat Med* 2000; 28:261-285.
- 33) Greenberg DA. Calcium channels and calcium channel antagonists. *Ann Neurol* 1987; 21:317.
- 34) Deshpande JK. Calcium accumulation and neuronal damage in the rat hippocampus following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1987; 7:89.
- 35) Toescu EC. Hypoxia sensing and pathways of cytosolic calcium increases. *Cell Calcium* 2004; 36:187-19.
- 36) Wilcockson DC, Campbell SJ, Anthony DC, Perry VH. The systemic and local acute phase response following acute brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22(3): 318–26.
- 37) Campbell SJ, Hughes PM, Iredale JP, Wilcockson DC, Waters S, Docagne F. CINC-1 is an acute-phase protein induced by focal brain injury causing leukocyte mobilization and liver injury. *FASEB J* 2003; 17(9): 1168–70.
- 38) Anthony D, Dempster R, Fearn S, Clements J, Wells G, Perry VH. CXC chemokines generate age-related increases in neutrophil mediated brain inflammation and blood–brain barrier breakdown. *Curr Biol* 1998; 8(16): 923–6.

- 39) Bona E, Andersson AL, Blomgren K, Gilland E, Puka-Sundvall M, Gustafson K. Chemokine and inflammatory cell response to hypoxia–ischemia in immature rats. *Pediatr Res* 1999; 45(4): 500–9.
- 40) Vexler ZS, Tang NX, Yenari AM. Inflammation in adult and neonatal stroke clin. *Neuro Res* 2006; 6:293-313.
- 41) Siesjo BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurgery* 1992; 77:337-354.
- 42) Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury :A review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery* 2004; 24: 468-475.
- 43) Maxwell SRJ, Lip GYH. Reperfusion injury:A review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int J Cardiol* 1997; 58:95-117.
- 44) Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000; 190:255-266.
- 45) Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 1999; 79:1431-1568.
- 46) Nixon RA, Cataldo AM, Mathews PM. The lysosomal system in neuronal death: a review. *Ann NY Acad Sci* 1993; 679:87-109.
- 47) Thomson C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267:1456-1462.
- 48) Aral H. Apoptosis. *Sendrom* 1996; 1:33-37.
- 49) Cohen JJ. Apoptosis. To be or not to be. *Postgraduate Syllabus* 1998; 1:1-19.
- 50) Perlman JM. Pathogenesis of hypoxic-ischemic brain injury. *J Perinatol* 2007; 27: 39–46.

- 51) Katzung BG. Basic and clinical pharmacology.1998 :388-391.
- 52) Hardman JG, Gilman GA, Limbird LE. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 1996:468-471.
- 53) El Falougy H, Benuska J. History, anatomical nomenclature, comparative anatomy and functions of the hippocampal formation. Bratisl Lek Listy 2006; 107 (4):103-106.
- 54) Barr ML, Klerman JA. The Human Nervous System. 5th ed. Philadelphia: JB Lippincott Comp, 1988: 266-9.
- 55) Mayer A. Historical Aspects of Cerebral Anatomy (2nd ed). London: Oxford University Press, 1971: 230.
- 56) Songur A, Ozen O.A, Sarsilmaz M. Hipokampus. T Klin Tıp Bilimleri 2001; 21: 427-431.
- 57) Green JD. The Hippocampus. In: Field J. editor. Handbook of Physiology (1st Ed). Vol. 2. Washington: American Physiological Society, 1960; 1373-89.
- 58) Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. Principles of Neural Science 4th ed. New York: McGraw-Hill Comp. 2000; 1233.
- 59) Green EL. Biology of Laboratory Mouse. Philadelphia: The McGraw-Hill Companies. 1980.
- 60) Akdoğan I, Ünal N, Adıgüzel E: Estimation of the number of neurons in the hippocampus of rats with penicillin induced epilepsy. Image Analysis and Stereology 2002, 21: 117-120.

- 61) Vanucci RC, Connor JR, Mauger DT, Palmer C, Smith MB, Towfighi J, Vanucci SJ. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Neurosci Res* 1999; 55:158–163.
- 62) Levine S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* 1960; 36:1-17.
- 63) Resuscitative hypothermia protects the neonatal rat brain from hypoxic-ischemic injury. *Brain Pathology* 2000; 10: 61-71.
- 64) Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *Journal of Microscopy* 1984; 134(2):127-136.
- 65) Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard iR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96:379-394.
- 66) Canan S, Bahadır A, Yıldırım Ş, Odacı E, Şahin B, Baş O, Çolakoğlu S, Bilgiç S, Kaplan S. Stereolojik uygulamalarda kullanılan pratik gereçler ve bilgisayar destekli stereolojik analiz cihazları. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2004; 24:672-680.
- 67) West MJ. New stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. *Trends Neurosci* 1999; 22: 51-61.
- 68) Gundersen HJG. Stereology of arbitrary particles. *J Microsc* 1986;143: 3-45.
- 69) Dorph-Petersen KA, Nyengaard JR, Gundersen HJG. Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. *Journal of Microscopy* 2001; 204(3): 232-246.
- 70) Gundersen HJG, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of Microscopy* 1987; 147(3):229-263.

- 71) West MJ. New stereological methods for counting neurons. *Neurobiology of Aging*. 1993; 14:275-285.
- 72) Korkmaz A, Tumkaya L. Estimation of the section thickness and optical disector height with a simple calibration method. *Journal of Microscopy* 1997; 187(2):104-109.
- 73) West MJ, Siomianka L, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 1991; 231(4):482-97.
- 74) Legido A, Katsetos CD, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Perinatal hypoxic ischemic encephalopathy: current and future treatments. *International pediatrics* 2000; 15:143-151.
- 75) Memezawa H, Minamisawa H, Smith ML, Siesjo BK. Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *Exp Brain Res*. 1992; 89:67-78.
- 76) Hossmann K-A. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 1994; 36:557-565.
- 77) Linnik MD, Zobrist RH, Hatfield MD. Evidence supporting a role for program cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1993; 24:2002-2009.
- 78) Van Bel F, Shadid M, Moison RM. Effect of allopurinol on postasphyxial free radical formation, cerebral hemodynamics, and electrical brain activity. *Pediatrics* 1998;101: 185-193.
- 79) Peeters-Scholte C, Braun K, Koster J. Effects of allopurinol and de-feroxamine on reperfusion injury of the brain in newborn piglets after neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatr Res*. 2003; 54: 516-522.

- 80) Madikians A, Giza C.C. A Clinician's Guide to the Pathophysiology of Traumatic Brain Injury IJNT 2006;3(1): 9-17.
- 81) Cheng YD, Al-Khoury L, Zivin AJ. Neuroprotection for Ischemic Stroke: Two Decades of Success and Failure. NeuroRx 2004; 1: 36-45.
- 82) Volpe JJ. Perinatal brain injury: From pathogenesis to neuroprotection Ment Retard Dev Disabil Res Rev 2000 ; 7: 56–64.
- 83) Moshe SL Mechanisms of action of anticonvulsant agents. Neurology 2000;55(1):S32–S40.
- 84) Lee J-M, Zipfel GJ, Choi DW. Changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. Nature 1999;399(suppl 24): A7–A14.
- 85) Calabresi P, Centonze D, Bernardi G. Cellular factors controlling neuronal vulnerability in the brain. A lesson from the striatum. Neurology 2000; 55: 1249 – 1255.
- 86) Wiard RP, Dickerson MC, Beek O, et al. Neuroprotective properties of the novel antiepileptic lamotrigine in a gerbil model of global cerebral ischemia. Stroke 1995;26:466–472.
- 87) Shuaib A, Mahmood RH, Wishart T, et al. Neuroprotective effects of lamotrigine in global ischemia in gerbils. A histological, in vivo microdialysis and behavioral study. Brain Res 1995; 702:199 –206.
- 88) Calabresi P, Cupini LM, Centonze D, Pisani F, Bernardi G. Antiepileptic drugs as a possible neuroprotective strategy in brain ischemia .Ann Neurol 2003; 53: 693–702.
- 89) Fung ML. Role of voltage-gated Na⁺ channels in hypoxia-induced neuronal injuries. Clin Exp Pharmacol Physiol 2000; 27: 569–574.

- 90) Probert AW, Borosky S, Marcoux FW, Taylor CP. Sodium channel modulators prevent oxygen and glucose deprivation injury and glutamate release in rat neocortical cultures. *Neuropharmacology*, 1997 ; 36(8): 1031-1038.
- 91) Labiche LA, Grotta JC. Clinical trials for cytoprotection in stroke. *NeuroRx* 2004; 1:46-70.
- 92) Kinouchi H, Imaizumi S, Yoshimoto T, Motomiya M. Phenytoin affects Metabolism of Free Fatty Acids and Nucleotides in Rat Cerebral Ischemia Stroke 1990;21:1326-1332.
- 93) Imaizumi S, Kurosawa K, Kinouchi H, Yoshimoto T. Effect of phenytoin on cortical Na(+)-K(+)-ATPase activity in global ischemic rat brain *J Neurotrauma* 1995; 12(2): 231-4.
- 94) Chan SA, Reid KH, Schurr A, Miller JJ, Iyer V, Tseng MT. Fosphenytoin reduces hippocampal neuronal damage in rat following transient global ischemia. *Acta Neurochir (Wien)* 1998; 140(2): 175-80.
- 95) Boxer PA, Cordon JJ, Mann ME, Rodolosi LC, Vartanian MG, Rock DM, Taylor CP, Marcoux FW. Comparison of phenytoin with noncompetitive N-methyl-D-aspartate antagonists in a model of focal brain ischemia in rat. *Stroke* 1990; 11(21): 47-51.
- 96) Cullen JP, Aldrete JA, Jankovsky L, Romo-Salas F. Protective action of phenytoin in cerebral ischemia. *Anesth Analg* 1979; 58(3): 165-9.
- 97) Rataud J, Debarnot F, Mary V, Pratt J, Stutzmann JM. Comparative study of voltage-sensitive sodium channel blockers in focal ischaemia and electric convulsions in rodents. *Neurosci Lett* 1994;172(1-2):19-23.

98) Vartanian M, Cordon JJ, Kupina CN, Schielke GP, Posner A, Raser JK, Wang KKW, Taylor CP. Phenytoin pretreatment prevents hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats. *Dev Brain Res.*1996; 95: 169-175.