

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİPOKSİK İSKEMİ SONRASI NORMOBARİK OKSİJEN  
TEDAVİSİNİN YENİDOĞAN SIÇANLARDA BEYİN HASARI VE  
PLASTİSİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

TAHA KELEŞTEMUR

DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

PROF. DR. SELİM KUTLU

KONYA 2018

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİPOKSİK İSKEMİ SONRASI NORMOBARİK OKSİJEN  
TEDAVİSİNİN YENİDOĞAN SIÇANLARDA BEYİN HASARI VE  
PLASTİSİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

TAHA KELEŞTEMUR

DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

PROF. DR. SELİM KUTLU

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Koordinatörlüğü tarafından 161418008 nolu proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA 2018

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi **TAHA KELEŞTEMUR**'un "**Hipoksik iskemisi sonrası normobarik oksijen tedavisinin yenidoğan sıçanlarda beyin hasarı ve plastisitesi üzerine etkileri**" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Necmettin Erbakan Üniversitesi (N.E.Ü.) – Fizyoloji A.D. / 15.01.2018

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Selim Kutlu

Necmettin Erbakan Üniversitesi

İmzası

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç

İstanbul Medipol Üniversitesi

İmzası

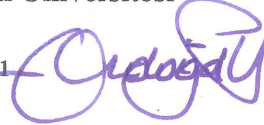


Jüri Üyesi

Prof. Dr. Ender Erdoğan

Selçuk Üniversitesi

İmzası

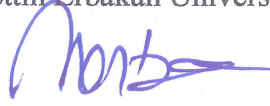


Jüri Üyesi

Doç. Dr. Ercan Kurar

Necmettin Erbakan Üniversitesi

İmzası

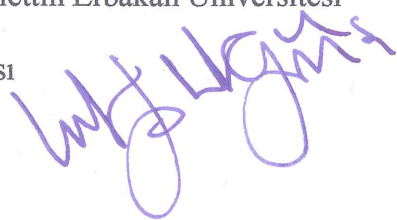


Jüri Üyesi

Yard. Doç. Dr. Z Işık Solak Görmüş

Necmettin Erbakan Üniversitesi

İmzası

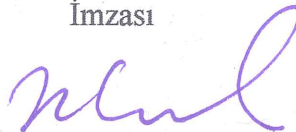


Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 15./01/2018 tarih ve 06... / 05... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Enstitü Müdürü

İmzası



APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled “**Effects of Normobaric Oxygen Treatment on the Brain Injury and Plasticity After Newborn Hypoxic Ischemia**” by *Taha KELEŞTEMUR* that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree *Doctor of Philosophy* in the Department of “**Physiology**”, Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan Konya, Turkey / 15.01.2018

Principal Advisor

Prof. Dr. Selim KUTLU

Necmettin Erbakan University

Signature

Examination Committee Member

Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ

Istanbul Medipol University

Signature

Examination Committee Member

Assoc. Prof. Dr. Ercan KURAR

Necmettin Erbakan University

Signature

Examination Committee Member

Prof. Dr. Ender Erdoğan

Selcuk University

Signature

Examination Committee Member

Assist. Prof. Dr. Z. Işık Solak GÖRMÜŞ

Necmettin Erbakan University

Signature

This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan Institute of Health Sciences.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOGLU ATALIK

Director of Institute of Health Sciences

Date and Signature

Signature

## BEYANAT

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışmam ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

15.01.2018

Taha Keleştemur



## TURNİTİN RAPORU

### YENİDOĞAN HİPOKSİK- İSKEMİSİ SONRASI NORMOBARİK OKSİJEN TEDAVİSİNİN BEYİN HASARI VE PLASTİSİTESİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ Taha Keleştemur

#### ORJİNALLİK RAPORU

%8 BENZERLİK ENDEKSİ	%7 İNTERNET KAYNAKLARI	%3 YAYINLAR	%2 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
-------------------------	------------------------------	----------------	------------------------

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	<a href="http://turkinvasivecard.org">turkinvasivecard.org</a> İnternet Kaynağı	%1
2	<a href="http://www.tubas.org.tr">www.tubas.org.tr</a> İnternet Kaynağı	%1
3	<a href="http://www.medipol.edu.tr">www.medipol.edu.tr</a> İnternet Kaynağı	%1
4	<a href="http://readgur.com">readgur.com</a> İnternet Kaynağı	<%1
5	Kartal, Ömer, Seçil Aydınöz, Ayşe Tuğba Kartal, Taha Keleştemur, Ahmet Burak Çağlayan, Mustafa Çağlar Beker, Ferhan Karademir, Selami Süleymanoğlu, Mustafa Kul, Burak Yulug, and Ertugrul Kilic. "Time dependent impact of perinatal hypoxia on growth hormone, insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor binding protein-3", <i>Metabolic Brain Disease</i> , 2016. Yayın	<%1

## Önsöz ve Teşekkür

Bu çalışmamın yürütülebilmesi için bana her türlü desteği sağlayan aynı zamanda yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Selim KUTLU'ya,

Gerek yüksek lisans gerekse doktora eğitimim boyunca bilimsel bakış açımın gelişmesine büyük rol oynayan, yaşam ile ilgili olaylara karşı bakış açımı değiştiren, her zaman her konuda yanımda olan hem ağabeyim hem hocam Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ'a,

Yedi yıldır beraber çalıştığım, her konuda benden yardımlarını esirgemeyen kardeşim gibi sevdiğim Ahmet Burak ÇAĞLAYAN ve Mustafa Çağlar BEKER'e

Ayrıca çalışmalarımnda yardımcı olan Berrak Çağlayan ve Esra YALÇIN'a ve laboratuvarımızın değerli asistanları Serdar ALTUNAY, Arman DALAY, Aysun DİLDEN, Reyda KARAÇAY ve Elif SERTEL'e,

Ve tabii ki altı senedir benim her türlü kahrımı çeken manevi olarak en büyük destekçim, hayat arkadaşım değerli eşim Seda KELEŞTEMUR'a ve koca oğlum Attila Sadri KELEŞTEMUR'a en kalbi dileklerle teşekkür ederim.

Ayrıca bu çalışmamı hayatta kendime örnek almaya çalıştığım, akademik hayata başlamamda en büyük etken olan, kendisini sadece milli değerlere adayan babam Sayın Prof. Dr. Fahrettin KELEŞTEMUR'a ithaf ediyorum.

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI .....	ii
APPROVAL.....	iii
BEYANAT .....	iv
TURNİTİN RAPORU.....	v
Önsöz ve Teşekkür.....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
Kısaltmalar ve Simgeler Listesi .....	ix
Şekiller Listesi.....	xi
<b>ÖZET</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>3</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
2.1. Yenidoğan Hipoksi İskemisi.....	4
2.2. Patofizyoloji .....	5
2.3. Eksitotoksinite .....	6
2.4. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller .....	9
2.4.1. Serbest Demir ve Fenton Reaksiyonu.....	11
2.5. Oksijen ve Akut Dönem.....	11
2.6. H <sub>1</sub> ve Apoptotik Hücre Ölümü .....	12
2.7. H <sub>1</sub> ve Kan Beyin Bariyeri.....	12
2.8. H <sub>1</sub> ve Enflamasyon .....	13
2.9. Serbest Radikallere Karşı Koruyucu Sistemler.....	13
2.9.1. Endojen Antioksidanlar.....	13
2.9.2. Eksojen Antioksidanlar.....	14
2.9.2.1. Allopurinol.....	14
2.9.2.2. Eritropietin .....	15
2.9.2.3. Resveratrol.....	15
2.9.2.4. Topiramet .....	16
2.9.2.5. N-Asetil-L-sistein .....	16
2.9.2.6. Deferoksamin.....	16
2.10. Normobarik Oksijen .....	17
2.11. Melatonin.....	17
2.12. Neonatal H <sub>1</sub> ve Plastisite.....	22
2.13. Deneysel Hipoksi İskemi Modelleri .....	23
<b>3. Gereç ve Yöntem</b> .....	<b>25</b>



3.1. Deney Dizaynı .....	25
3.2. Deneysel Hipoksik İskemi Modeli.....	25
3.3. Normobarik Oksijen Tedavisi .....	26
3.4. Davranış Testleri .....	27
3.4.1. Aydınlik Karanlık Testi.....	27
3.4.2. Rotarod Testi.....	27
3.4.3. Açık Alan Testi.....	27
3.4.4. Barnes Labirent Testi .....	27
3.5. Histopatolojik Yöntemler .....	28
3.5.1. Cresyl Violet Boyaması.....	28
3.5.1.1. Cresyl Violet Protokolü.....	28
3.5.2. TUNEL Assay .....	28
3.5.2.1. TUNEL Assay Protokolü.....	29
3.6. Western Blot .....	29
3.7. İstatistik .....	31
<b>4. Bulgular .....</b>	<b>32</b>
4.1. Hasar Alanı Dağılımı .....	32
4.2. Hüresel Sağ Kalım Analizi.....	36
4.3. Apoptoz.....	42
4.4. Protein Analizi.....	47
4.5. Davranış Testleri .....	51
4.5.1. Aydınlik Karanlık Testi.....	51
4.5.2. Rotarod Testi.....	53
4.5.3. Açık Alan Testi.....	53
4.5.4. Barnes Labirent Testi .....	57
<b>5. Tartışma ve Sonuç .....</b>	<b>58</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>66</b>
<b>Ek 1 .....</b>	<b>78</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>78</b>
<b>Ek 2 Etik Kurul Kararı.....</b>	<b>83</b>

## Kısaltmalar ve Simgeler Listesi

AFMK	N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinuramin
AMK	N1-asetil-5-metoksikinuramin
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik asit
ATP	Adenozin trifosfat
BOS	Beyin omurilik sıvısı
DFO	Deferoksamin
EAA	Eksitatör amino asit
EBF	Epidermal büyüme faktörü
EPO	Eritropoietin
GPx	Glutasyon peroksidaz
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
HBO	Hiperbarik Oksijen
Hİ	Hipoksi iskemi
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü
i.p.	İntra peritoneal
JNK	CJun N-terminal kinaz
KB	Kan basıncı
KBB	Kan beyin bariyeri
LOO	Peroksil radikali
LOOH	Lipid peroksit
MSS	Merkezi sinir sistemi
NAS	N-asetil-L-sistein
NBO	Normobarik oksijen
NGF	Sinir büyüme faktörü
NMDA	N-methyl-D-aspartat
NO	Nitrik oksit
O <sub>2</sub>	Süperoksit radikali
OH <sup>-</sup>	Hidroksil radikali
pO <sub>2</sub>	Parsiyal oksijen basıncı
ROT	Reaktif oksijen türleri
SKA	Serebral kan akımı
SOD	Süperoksit dismutaz

TNF- $\alpha$

Tümör nekroz faktör

TPM

Topiramát

VEGF

Damarsal endotelyal büyüme faktörü



## Şekiller Listesi

Şekil 1. Hipoksik iskemide enerji yoksunluğu ve onu takiben gelişen olaylar.....	6
Şekil 2. Yenidoğan hipoksi iskemisinde rol oynayan patojenik mekanizmalar.....	7
Şekil 3. Serbest oksijen radikallerinin vücuda etkisi. ....	10
Şekil.3 Antioksidan enzimlerin neonatal beyninde serbest radikaller üzerine olan etkisi.....	14
Şekil 5. Sirkadyen ritme bağlı olarak BOS ve plazmadaki melatonin konsantrasyonları. ....	18
Şekil 6. Yaşa bağlı olarak melatonin konsantrasyonu ve toplam antioksidan seviyelerindeki değişim.....	18
Şekil 7. Triptofan ve seratoninden melatoninin sentezlenme mekanizması. ....	19
Şekil 8. Antioksidan olarak melatonin metabolitleri. Siklik 3-hidroksi-melatonin, AFMK ve AMK. ....	20
Şekil 9. Melatoninin serbest radikallerinin giderilmesindeki rolü. ....	21
Şekil 10. Farklı hipoksi iskemi modelleri. ....	24
Şekil 11. Deney dizanı. ....	26
Şekil 12. Alınan koronal kesitlerden hasar alanının ölçüldüğü bölgeler. ....	32
Şekil 13. Koronal kesitlerden hesaplanan korteks bölgesinde hasar alanı.....	33
Şekil 14. Koronal kesitlerden hesaplanan Subhipokampal bölgesinde hasar alanı ...	34
Şekil 15. Koronal kesitlerden hesaplanan hipokampus bölgesinde hasar alanı .....	35
Şekil 16. Koronal kesitlerden hesaplanan total hasar alanı.....	36
Şekil 17. Hücre sağ kalım analizlerinin yapıldığı bölgeler .....	37
Şekil 18. Korteks bölgesinde hesaplanan hücresel sağ kalım analizi .....	38
Şekil 19. Subhipokampal bölgesinde hesaplanan hücresel sağ kalım analizi.....	39
Şekil 20. Dentat girus bölgesinde hesaplanan hücresel sağ kalım analizi .....	40
Şekil 21. CA1 bölgesinde hesaplanan hücresel sağ kalım analizi .....	41
Şekil 22. CA2 bölgesinde hesaplanan hücresel sağ kalım analizi .....	41
Şekil 23. CA3 bölgesinde hesaplanan hücresel sağ kalım analizi .....	42
Şekil 24. Apoptotik hücre analizinin alınan beyin kesitindeki gösterimi .....	43
Şekil 25. Korteks bölgesinde apoptotik hücre analizinin dağılımı .....	44
Şekil 26. Subhipokampal bölgesinde apoptotik hücre analizinin dağılımı .....	44
Şekil 27. Subhipokampal bölgesinde apoptotik hücre analizinin dağılımı .....	46
Şekil 28. CA1 bölgesinde apoptotik hücre analizinin dağılımı.....	46
Şekil 29. CA2 bölgesinde apoptotik hücre analizinin dağılımı.....	47
Şekil 30. CA3 bölgesinde apoptotik hücre analizinin dağılımı.....	47
Şekil 31. Hipoksi iskemi sonrası Oksijenin MMP9 anlatımına etkisi .....	48

Şekil 32. Hipoksi iskemi sonrası Oksijenin Erk1/2 anlatımına etkisi.....	49
Şekil 33. Hipoksi iskemi sonrası Oksijenin GSK3 $\alpha\beta$ anlatımına etkisi.....	50
Şekil 34. Hipoksi iskemi sonrası Oksijenin p-PTEN anlatımına etkisi .....	51
Şekil 35. Aydınlık-karanlık testinde hayvanların 28. günde aydınlık alanda geçirdikleri süreler .....	52
Şekil 36. Aydınlık-karanlık testinde hayvanların 42. günde aydınlık alanda geçirdikleri süreler .....	53
Şekil 37. Rotarod testinde hayvanların silindiri çevirme süreleri .....	54
Şekil 38. Hipoksi iskemi sonrası hayvanların açık alan testinde hareketli olduğu süre .....	54
Şekil 39. Hipoksi iskemi sonrası hayvanların açık alan testinde merkezde geçirdikleri süre .....	55
Şekil 40. Hipoksi iskemi sonrası hayvanların açık alan testinde geçiş bölgesinde geçirdikleri süre.....	56
Şekil 41. Hipoksi iskemi sonrası hayvanların açık alan testinde kenar bölgesinde geçirdikleri süre.....	56
Şekil 42. Barnesin labirenti testi .....	57

## ÖZET

T.C. NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Hipoksik İskemi Sonrası Normobarik Oksijen Tedavisinin Yenidoğan Sıçanlarda  
Beyin Hasarı ve Plastisitesi Üzerine Etkileri

Taha Keleştemur

Fizyoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2018

Yenidoğan hipoksi iskemisi günümüzde klinik alanda halen en çok karşılaşılan durumlardan bir tanesidir. Bebeğin anne karnında oksijensiz kalması erken doğum olayı, doğum esnasında veya anne karnındayken kordon dolanması sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu tür olaylar meydana geldiğinde bebeğin beynine yeteri kadar oksijen gidemez ve uzun dönemde epilepsi, mental bozukluklar gibi tedavisi zor sonuçların doğmasına sebep olabilir. Hipoksik iskeminin patofizyolojik süreçleri oksijensiz kalan dokuda hücre ölümlerine yol açmaktadır. Bu patofizyolojik süreçlerin engellenmesi kronik dönemde meydana gelebilecek telafisi mümkün olmayan sonuçların da önüne geçilmesine imkân tanıyacaktır.

Normobarik oksijen tedavisi literatürde halen tartışılmakta olan bir konudur. İskemi sonrası dokuda oksijenlenmeyi arttırmakta, bununla beraber reaktif oksijen türlerinin de ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Bu bağlamda yedi günlük sıçanlar anestezi altında sağ karotid arter bağlanmasını takiben, 2 saat süre ile %8 oksijene maruz bırakıldı. Hemen ardından sıçanlara farklı konsantrasyonlarda (%21-70-100) oksijen tedavisi uygulandı. Yüksek oksijen konsantrasyonunun daha fazla serbest radikal üreteceği ve oksijen ile bir kümülatif etkisinin olup olmadığını anlayabilmek için ve iyi bir antioksidan olan melatonin %100 Oksijen grubu ile kombine edilerek ayrıca uygulandı. Daha sonra dekapite edilen hayvanların beyinleri hızla çıkartılıp 18 µm kalınlığında kesitler alındı ve genel hasar dağılımı, yaşayan hücre sayısı, apoptotik hücre sayısı tayin edildi. Bunun yanında altta yatan patofizyolojinin daha iyi anlaşılabilmesi için hasarlı bölgeden alınan dokularda farklı protein konsantrasyonları ölçüldü. Ayrıca kronik dönemde hipoksi iskemisi sonrası uygulanan tedavinin fonksiyonel geri kazanımlar üzerine etkisinin araştırılması için aydınlık-karanlık, rotarod, açık alan ve barnes labirenti testi uygulandı.

Yapılan analizlere göre genel olarak artan oksijen konsantrasyonuna paralel olarak hücresel sağ kalımın arttığı, apoptotik hücre sayısının azaldığı, hücre ölüm mekanizmalarında görev alan proteinlerin inhibe olduğu görüldü. Ayrıca yapılan davranış testlerinin analizlerinde de yüksek oksijen konsantrasyonunun özellikle melatonin ile kombine edilerek subakut dönemde anksiyeteyi azalttığı, motor koordinasyonu düzelttiği, hafıza ve öğrenme üzerine pozitif etkilerinin olduğu saptandı.

Sonuç olarak hipoksi iskemisi sonrası uygulanan normobarik %100 Oksijen-Melatonin kombinasyonunun insanlarda bir konsept çalışması olması planlanmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** davranış, yenidoğan hipoksi iskemisi, melatonin, normobarik oksijen tedavisi, ,

## ABSTRACT

T.C. NECMETTIN ERBAKAN UNIVERSITY  
ENSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

The Role of Normobaric Oxygen Treatment on the Brain Injury and Plasticity After  
Newborn Hypoxia Ischemia

Taha Keleştemur

Department of Physiology

DOCTORATE THESIS / KONYA-2018

Newborn hypoxia is one of the most prevalent cases in the clinical status and can result from the hypoxia of the fetus in the womb. In such cases, blood supply is restricted to the fetus's brain, causing epilepsy or mental disorders that are difficult to treat in the long-term. Pathophysiological processes of hypoxic ischemia leads to cellular death in the hypoxic tissue. Inhibition of these pathophysiological processes will lead to the prevention of conditions in the chronical period.

Normobaric oxygen treatment is still under debate in the literature. It has been reported that it increases oxygenation in the post-ischemic tissue along with the formation of reactive oxygen species. In this respect, seven days old pups were subjected to right carotid artery ligation, followed by 8% oxygen treatment for 2 hours. Then, pups were given different concentrations of oxygen treatment (21%, 70% or 100%). Hyperoxia was proposed to create increased free radicals and chosen to study whether there is a cumulative effect of this free radicals with oxygen. Moreover, a strong antioxidant molecule, melatonin, was combined with 100% oxygen. The brains of the sacrificed animals were quickly removed and 18 um-thick sections were sliced. General damage area, surviving neurons and apoptotic cell numbers were analyzed in these sections. In addition, to understand the underlying pathophysiology, different protein concentrations were identified in the injured tissue. Moreover, to investigate the effect of the treatment used following hypoxic ischemia on the functional recovery, light-dark, rotarod, open field and barnes maze tests were performed.

In the light of the analyses carried out, we demonstrate that increasing oxygen concentration in general causes an increase in the cellular survival and a decrease in the number of apoptotic cells, while inhibiting the proteins involved in cellular death mechanisms. Moreover, it was shown to decrease anxiety, promote motor coordination and have positive effects on memory and learning during the subacute period when high oxygen concentration was combined with melatonin.

In conclusion, normobaric 100% oxygen-melatonin combination following hypoxic ischemia could be a concept of proof study in humans.

Key words, behaviour, melatonin, newborn hypoxia ischemia, normobaric oxygen

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hipoksik iskemi (Hİ), doğum sırasında veya erken doğumda bebeğin oksijensiz kalması sonucunda meydana gelmektedir. Yenidoğan Hİ ve müteakip beyin hasarı, dünyadaki yenidoğanlarda akut mortalitenin ve kronik sakatlığın tek en önemli nedeni olarak düşünülmekte ve halen endişe verici bir sosyo-sağlık problemi olmaya devam etmektedir (du Plessis ve Volpe 2002, Azra ve Bhutta 2006, Jiang ve ark. 2014). Hİ sonucunda yeteri kadar oksijen alamayan beyin dokusu sonucunda kişide mental bozuklukların yanında hiperaktivite, serebral palsi ve epilepsi görüldüğü tespit edilmiştir.

Yenidoğan ensefalopatisinin şiddeti travmanın yoğunluğuna, süresine ve yerine bağlıdır. Etkilenen yenidoğanların yaklaşık %15-20'si doğum sonrası dönemde ölmekte ve %25 oranında da ciddi ve kalıcı nöropsikolojik sekel gelişmektedir. Herhangi bir bedensel engel olmadan hayatta kalabilenler, şiddetli hasar gösteren bebeklerin yalnızca küçük bir yüzdesidir (Levene ve ark. 1985, Lai ve Yang 2011, Cerio ve ark. 2013).

Hİ'nin patofizyolojisi ele alındığında eksitotoksisite ve serbest radikal oluşumunun, hücre sağ kalım mekanizmalarını olumsuz yönde etkiledikleri görülmektedir. Bu nedenle bu projede normobarik oksijen tedavisiyle birlikte, çok iyi bir antioksidan ve serbest radikal giderici bir ajan olan melatonin kombine olarak kullanılmıştır. Kombine kullanımın amacı, yüksek oksijen konsantrasyonlarında ortaya çıkabilecek olan serbest oksijen radikallerinin giderilmesi ve tedavinin etkinliğinin artırılabilmesi düşüncesidir. Elde edilecek olası olumlu bulguların, klinikte yenidoğan hipoksisindeki tedavi seçeneklerine katkı sağlayabileceği öngörülmektedir.



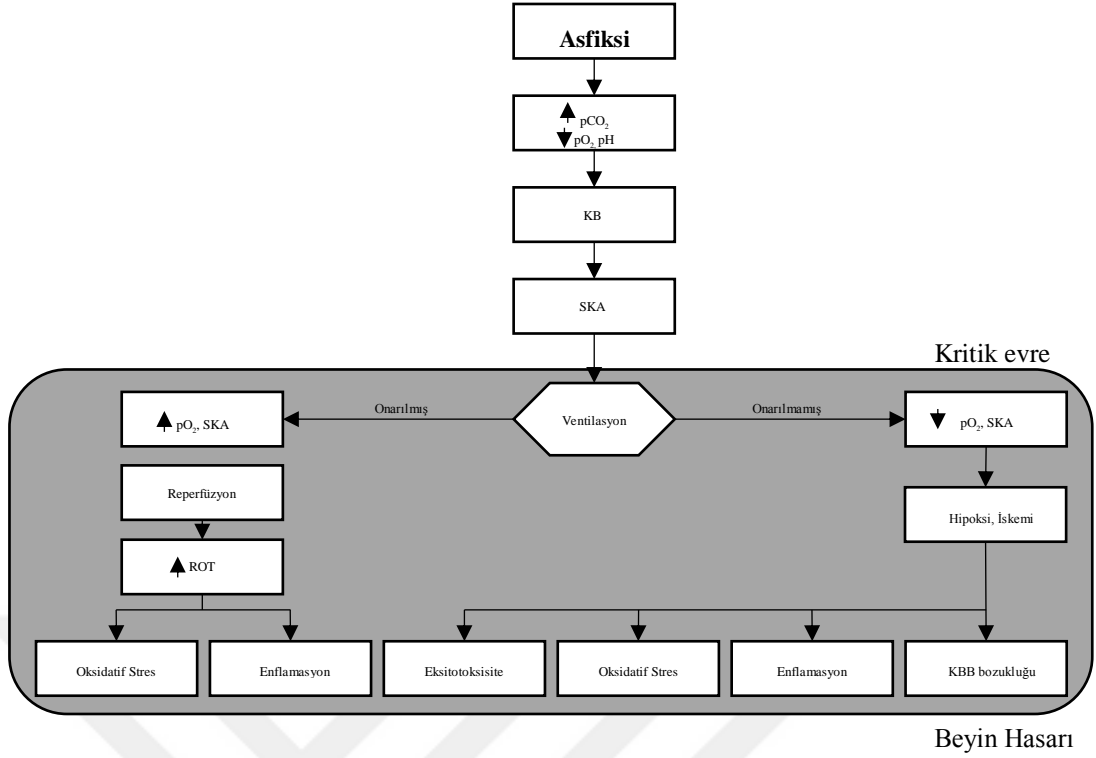
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Yenidoğan Hipoksi İskemisi

Hİ, oksijen yoksunluğundan kaynaklanan beyin hasarıdır ve uzun süreli sekeller ve sosyo-ekonomik yükler bakımından önde gelen pediatrik nörolojik durumlardan birisidir. Yapılan istatistikler, Hİ insidansının 1000 canlı doğumdan 1.5-4'e ulaştığını ve yılda yaklaşık dört milyon çocukta bu durumun görülebileceğini göstermektedir (Vannucci 2000, Vannucci ve Hagberg 2004, Mir ve Chalak 2014). Oksijensiz kalmış yenidoğanların neredeyse %20-50'si yenidoğan döneminde ölmekte ve diğerlerinde ise ciddi sağlık sonuçları ve kalıcı sekeller görülmektedir (Vannucci and Hagberg 2004). Genel olarak gelişmekte olan ülkelerde Hİ oranının ve sonuçlarının daha yüksek olduğuna inanılmaktadır (Ellis ve ark. 2000, Kurinczuk ve ark. 2010). Özünde, bu durum şiddetli sistemik hipokseminin ve serebral kan akışının azalmasının bir sonucu olarak, en sık tam dönem bebeklerde ortaya çıkmaktadır. Yenidoğanın çeşitli fizyolojik kompanze edici mekanizmalara sahip olmasına rağmen, kalıcı bir hipoksi nörolojik bozukluk spektrumuna yol açmaktadır. Bunlar davranışsal ve motor bozukluklar, genel gelişmede gecikme, epileptik nöbetler, hatta yapısal ve geri döndürülemez beyin hasarını içerir (Gadian ve ark. 2000, Badawi ve ark. 2001, Alexander ve ark. 2014). Perinatal asfiksi nedeniyle meydana gelen Hİ, bebeklerde önde gelen ölüm nedeni ve ciddi bir bozukluktur. Hİ'nin sonuçlarının şiddeti, hipoksinin sürdüğü zamana, hipoksi zamanındaki yenidoğanların ve hasarın büyüklüğüne bağlıdır. Hipoksinin geniş semptom spektrumu klinik uygulamada hızlı bir şekilde tespit edilmesini zorlaştırmaktadır. Aynı problem, hayvan modellerinin sonuçlarının mantıklı bir şekilde yorumlanmasıyla ortaya çıkmaktadır. Hİ'nin en sık görülen uzun vadeli sonuçları serebral palsy, epilepsi ve nöbet bozuklukları, şiddetli öğrenme ve mental bozukluklar, körlük ve ileri derece görme problemleri, bilişsel, gelişimsel, motor ve davranışsal problemlerdir (Lun ve ark. 1990, Boksa ve ark. 1995, Ikeda ve ark. 2001, Alexander ve ark. 2014). Hİ'nin kompleks patofizyolojisi, hastalık sürecinin farklı zamanlarında farklı hedefler üzerine yoğunlaşmayı mümkün kılar. Örneğin erken dönemdeki terapiler eksitotoksisite, oksidatif stres, apoptozun azaltılması üzerine yoğunlaşırken, ileriki safhalarda yangı, sitokinlerinin azaltılması ve yenidoğan beyinde nörotrofik faktörlerin uyarılması nöronal yenilenmeyi teşvik edebilir.

## 2.2. Patofizyoloji

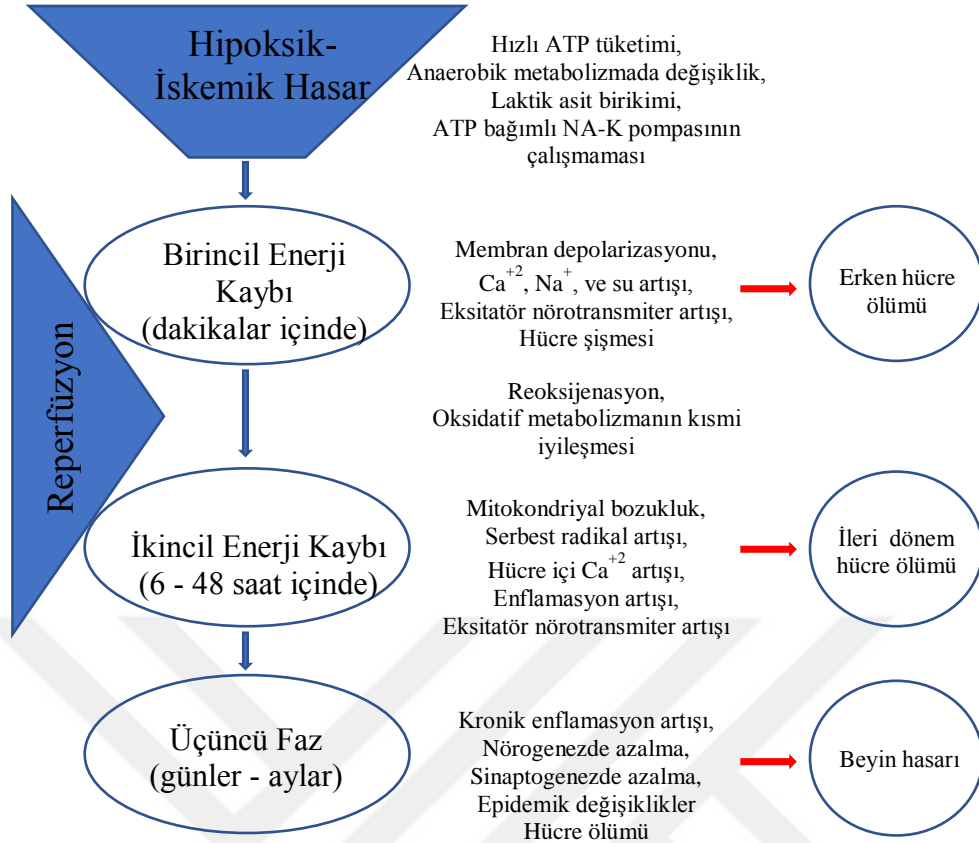
Hİ gebeliğin farklı evrelerinde görülebilir. Prenatal dönemde predispozan faktörler toksemi ve annenin sistemik hastalığını içerirken, perinatal faktörlere sepsis ve şok dâhil olmaktadır (Douglas-Escobar ve Weiss 2012). Perinatal asfiksi sonucu serebral kan akışında bozulma hem sistemik hem de hücresel düzeyde birçok süreci tetikler. Düşük kan oksijen seviyesi başlangıçta hayati organlara kan akışının yeniden dağıtılması gibi genel dengeleyici mekanizmaları hayata geçirir. Uzun süreli asfiksi bu mekanizmaların tükenmesine neden olurken, beyindeki damarların fiziksel tıkanıklığıyla ilgili beyin bölgelerinin iskemik hasarına yol açar. Yetişkinlere benzer şekilde olgunlaşmamış beyin, eksitator molekülleri serbest bırakarak, enflamasyon ve kan beyin bariyeri (KBB) bozukluğuna neden olan reaktif oksijen türleri (ROT) üretmek suretiyle hipoksik iskemik koşullara tepki verir. Bununla birlikte, perinatal Hİ patofizyolojisini tanımlarken önemli gelişim normlarının hesaba katılması gerekir. Olgunlaşmamış beynin metabolik hızı yetişkin bir kişiyle karşılaştırıldığında daha düşüktür ve esas olarak gelişim seviyesine ve sinaptik olgunlaşmaya bağlıdır (Cremer 1982, Nehlig ve Pereira de Vasconcelos 1993). Olgunlaşmamış nöronal doku, metabolik ihtiyaçlarını karşılamak için glukoz dışındaki substratları kullanma becerisini paylaşır. Buna diğerlerinin yanı sıra laktat ve keton cisimleri dahildir. İlk doğum sonrası günlerin enerji gereksinimlerinin üçte ikisi keton cisimleri tarafından sağlanır (Nehlig ve Pereira de Vasconcelos 1993). Hİ hasarı, yüksek enerjili fosfatları yenileme yeteneği olmayan ve iyon homeostazının korunması gibi beynin düzenlenmiş adenosin trifosfata (ATP) bağımlı süreçlerin kaybedilmesi ile karakterize edilen primer bir enerji yoksunluğuna neden olur (Thoresen ve ark. 1995, Wassink ve ark. 2014). Ayrıca Hİ sırasında, oksidatif fosforilasyon hızla azalır ve glutamaterjik nöronlarda enerji kaybına yol açar (Şekil-1). Hİ'nin patojenik mekanizması ele alındığında üç temel faza ayrılmaktadır: Hİ meydana geldiği anda primer enerji kaybı, reoksijenasyon ve reperfüzyon fazı ve son olarak enflamasyon fazı (Şekil-2).



Şekil 1. Hipoksi-iskemide enerji yoksunluğu ve onu takiben gelişen olaylar. pO<sub>2</sub>: Parsiyal oksijen basıncı, KB: Kan basıncı, SKA: Serebral kan akımı, ROT: Reaktif oksijen türleri, KBB: Kan beyin bariyeri

### 2.3. Eksitotoksisite

Eksitator amino asit (EAA) glutamatın nöronlar üzerinde toksik etki oluşturduğu öne sürülmüştür (Olney ve Sharpe 1969). Hayvan deneyleri ve hücre kültürü deneylerinde, fazla miktarda EAA ve analoglarının sinir hasarına neden olduğu bilinmektedir (Dugan ve Choi 1994, Schulz ve ark. 1995). Eksitotoksisite, eksitator iletilici glutamatın kitlesel olarak salınımı ile tetiklenen ve hücre içi Ca<sup>+2</sup> miktarının aşırı artması ve nöronal ölüme yol açan en önemli mekanizmadır (Doyle ve ark. 2008). Normal koşullar altında, glutamat gibi EAA'ler erken dönemdeki beyin gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Yeni sinapsların oluşumunda sinirsel plastisiteye katkıda bulunur ve aynı zamanda iyi bir trofik faktördür (Komuro ve Rakic 1993). Bununla birlikte, HI hasar sırasında hücresel enerji rezervleri tüketilir ve nöronlarla gliyalar depolarize olurlar. Depolarize olan bu hücreler, sinaptik yarığa ve hücre dışı alana bol miktarda glutamat ve diğer EAA'leri bırakırlar.



Şekil 2. Yenidoğan hipoksi iskemisinde rol oynayan patojenik mekanizmalar. Hipoksik iskemik hasar meydana geldiği anda enerji kaybı gerçekleşir. Reperfüzyondan sonra, 6 ila 48 saat arası uzayabilen 2. bir enerji kaybı yaşanır. Sonunda 3. hasar evresine geçilir ve gelişen olaylar beyinde daha büyük bir hasara neden olur.

Glutamat geri alım mekanizmaları için yeterli enerji sağlanamaz ve glutamat iyonotropik reseptörlerinin tonik aktivasyonu, hücre hasarını ve hücre ölüm yollarının aktivasyonunu tetikler (Doble 1999). Eksitotoksisitenin ana moleküler yolları arasında, hücre içi Ca<sup>+2</sup> miktarının artması ve buna bağlı olarak Ca<sup>+2</sup> bağımlı enzimlerin aktivasyonu, mitokondriyal membran potansiyelinin kaybı ve reaktif oksijen ve azot türlerinin aşırı üretimi bulunur. Eksitotoksisitenin önemli bir kısmı glutamaterjik sistem ve onun reseptörleriyle alakalıdır. Glutamat kognisyonda, hafızanın oluşumunda ve temel uyarıcı yanıtların meydana gelmesinde önemli rol oynamaktadır (Dong ve ark. 2009b). Glutamat etkisi genel olarak iyonotropik reseptörler aracılığıyla ortaya çıkmaktadır. İyonotropik glutamat reseptörleri temel olarak üç ana alt gruba ayrılırlar; N-methyl-D-daspartik asit (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metilisokazol-4-propionat (AMPA) ve kainik asit (Mollerud ve ark. 2017, Zhu ve Gouaux 2017). Glutamat sinir hücrelerinin perisinaptik uçlarından salıvarıldığında NMDA ve AMPA reseptörlerini uyarabilen bir agonisttir.

NMDA reseptörünün iyon kanalı, dinlenme membran potansiyelinin etkisi altındadır. Magnezyum veya çinko, iyon kanalı yoluyla diğer katyonların geçişini engelleyerek potansiyeli kontrol altında tutar. Ancak membran depolarize olduğu zaman magnezyum ve çinko iyon porlarından ayrılarak sodyum ve kalsiyum iyonlarının geçişine izin verir.

AMPA reseptörlerinin dört farklı alt tipi bulunmaktadır. Bunlar heteromerik glutamat reseptörler GLUR 1-4'ten oluşmaktadır (Hollmann ve Heinemann 1994). Şayet AMPA reseptörü GLUR-2 alt biriminden yoksun ise kalsiyum, sodyum ve potasyuma geçirgen özellik gösterir. GLUR-2'nin varlığı kanalı, kalsiyum geçirgenliği bakımından kapatır (Hsu ve ark. 2010). Kâinat reseptörleri, GLuK 1-5'in kombinasyonu ile homomerik veya heteromerik şekilde olabilir. Kâinat reseptörleri pre ve postsinaptik olarak dağılmışlardır (Herb ve ark. 1992, Fletcher ve Lodge 1996, Mollerud ve ark. 2017). Gelişmekte olan merkezi sinir sistemi (MSS) içerisindeki glutamat reseptörlerinin eşit olmayan dağılımı bölgenin Hİ durumlarına spesifik duyarlılığının arka planıdır. Yapılan deneyler, Hİ koşulları altında nöronal doku hasarının bu kısımda kalsiyumun rolünün belirginliğini ve NMDA reseptörlerinin önemi göstermiştir (McDonald ve ark. 1988, Bittigau ve ark. 1999, Johnston 2005). NMDA reseptörünün aktivasyonu, Hİ koşulları altında EAA üretiminin aşırı aktive edilmesi, hücre içi kalsiyumun aşırı artması, reaktif oksijen türlerinin ve kaspazların üretilmesi ve aktivasyonu ile birlikte mitokondriyal membran depolarizasyonu gibi bir dizi hücre sel olayı başlatır (Doble 1999). Kalsiyumun glutamat reseptörleri kanalı boyunca akışı eksitotoksitede çok önemli bir olaydır. Eksitotoksitenin bir diğer önemli kısmı ozmotik bileşenlerdir. Postsinaptik membranın depolarizasyonu hücre içine  $Na^{+1}$  ve  $Cl^{-1}$  girişi olur ve bunu suyun girişi izler. Eğer bir tampon sistemi yoksa, böyle bir durumda hücre şişer ve lizise uğrar (Doble 1999). GABA ve glutamat reseptörlerinin benzersiz ontogenezi ve bunların oluşumu ve sinaptik fonksiyonel ağların olgunlaşması eşliğinde nöromedyatörlerin fizyolojisindeki dengesizlik genellikle Hİ hasarından sonra ortaya çıkan akut nöbetler için uygun bir arka plan oluşturmaktadır (Doble 1999).

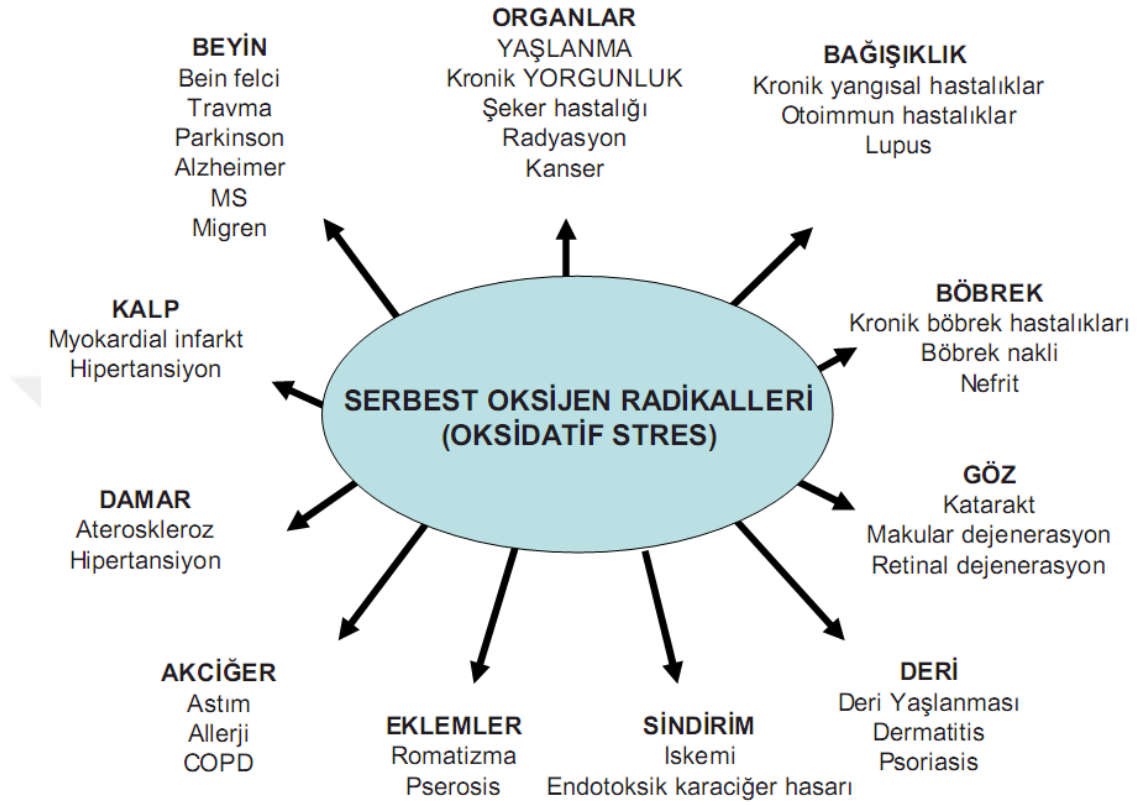
## 2.4. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

Oksijen, aerobik yaşam için şarttır, ancak perinatal dönemde hem biyolojik açıdan hem de toksik açıdan etkileri olan bir moleküldür (Smith 1899, Patz ve ark. 1952, Mach ve ark. 2011). Oksijen toksisitesi, süperoksit anyon ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), lipid peroksit (LOOH), peroksil radikalleri ( $RO^-$ ), nitrik oksit (NO) ve hidroksil radikalleri ( $OH^-$ ) gibi ROT'un ortaya çıkmasıyla gelişir (Halliwell 1991).  $OH^-$  biyolojik sıvılardaki güçlü bir oksidandır ve lipitler, proteinler, DNA, amino asitler ve diğer birkaç molekül ile reaksiyonu yoluyla dokulara zarar verebilir. Hücrelere bilinen zararlı etkilerine rağmen, ROT'un reaksiyonları, sayısız fizyolojik reaksiyonlar, hücrenin kaderi ve sinyal iletim yollarında da rol oynamaktadır. Enerji metabolizması, gen ifadesi gibi çeşitli hücresel süreçlerde önemli bir role sahiptir. Büyüme faktörleri, sitokinler ve G protein bileşimli reseptörleri de içeren ligandlara yanıt olarak üretilirler (Holmstrom ve Finkel 2014, Lismont ve ark. 2015)

Redoks potansiyelindeki değişiklikler, çeşitli faktörlere bağlı olarak yararlı veya zararlı sonuçlar doğurabilir. Yüksek ya da aşırı düşük ROT seviyeleri, biyolojik süreçler için esas teşkil eden prooksidan ve antioksidan elementler arasındaki dengeyi değiştirebilir (Martin ve Barrett 2002). Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki bir dengesizlik durumuna oksidatif stres denir ve bu durum potansiyel bir hasar nedenidir (Buonocore ve Groenendaal 2007). Oksidatif stres hafifse, hücre savunmaları genellikle ROT atık aktivitelerinin gen ekspresyonunu içeren bir mekanizma oluşabilir (Kaludercic ve ark. 2014). Öte yandan şiddetli oksidatif stres, genellikle membran yapısını değiştirerek membran geçirgenlik özelliklerini bozar ve hücre bileşenleri değiştiren bunu lipid peroksidasyonu izler. Yüksek ROT seviyesine bağlı olarak hücre zarı proteinlerinde anormallikler, örneğin bağışıklık tepkisinde hücrelerin tanınmasında değişiklikler, sonuçta apoptoz veya nekroz da dâhil olmak üzere fonksiyonel sonuçları indükleyebilir (Orient ve ark. 2007).

Serbest radikaller, eşleşmemiş elektrona sahip yüksek reaktif özellik gösteren moleküllerdir. Düz kas tonusu, bölgesel serebral kan akımının regülasyonu, yangı ve hücre haberleşmesinde kritik rol oynamaktadırlar. Bununla birlikte, HI veya reperfüzyon-reoksijenasyon gibi patolojik koşullar altında, akut ve kronik beyin hasarına yol açan dejeneratif süreçlere katılmaktadırlar. Serbest oksijen radikallerinin

varlığı birçok nörodejeneratif hastalığın patogeneğinde rol alır (Şekil 3) ve hastalığın ilerlemesinde etkin olarak göre yapar (Chan 1996).



Şekil 3. Serbest oksijen radikallerinin vücuda etkisi.

İnsanlarda en önemli serbest radikal kaynağı mitokondrideki oksidatif metabolizmadır (Otahal ve ark. 2014, Folbergrova ve ark. 2016). Mitokondriyal solunum zinciri ROT'un ana kaynağıdır. Ökaryotik hücrelerde ATP üretimi için mitokondri önemli bir rol oynamaktadır. Mitokondri içerisinde gerçekleşen oksidatif fosforilasyon olayları bir dizi elektron taşıyıcısı tarafından elektronların NADH'den O<sub>2</sub>'ye transferinin bir sonucu olarak ATP oluşumuna yol açar. Başlangıçta elektron vericiler O<sub>2</sub>'yi O<sub>2</sub>'ye dönüştürebilirler. O<sub>2</sub>'nin superoksit dismutaz (SOD) tarafından dismütasyonu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşturur. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de glutatyon peroksidaz ve katalaz ile tamamen suya redüklenebilir veya alternatif olarak, esasen demirden oluşan ancak aynı zamanda bakır ve çinko gibi redüklenmiş geçiş metalleri tarafından katalize edilen fenton reaksiyonunda kısmen hidroksil radikaline redüklenebilir. Fizyolojik koşullar altında,

O<sub>2</sub>'nin yaklaşık %98'i su oluşturacak şekilde tam bir redüksiyona uğramaktadır. Oysa elektronların %2'si sızarak oksijenin kısmi olarak redüklenmesine neden olmakta ve ROT üretmektedir (Turrens 2003).

#### 2.4.1. Serbest Demir ve Fenton Reaksiyonu

Demir, canlı organizmalar için ve özellikle yenidoğanlar için iki kenarı keskin bir bıçak gibidir. Düzgün büyüme ve normal nörolojik gelişim için oldukça önem arz ederken, bağlanmamış olduğu durumlarda toksik etki gösterebilmektedir. Vücutta demirin fazla yüklendiği koşullar altında, plazma transferrini demir ile tamamen bağlanmış durumdadır. Redüklenmiş oksijenle reaksiyona girmeye uygun hale gelir. Bu sayede, ferröz iyon varlığında oksijen serbest radikallerinin en zararlı olanlarını üretmek ve ferrik demir oluşturmak üzere Fenton-Haber Weiss reaksiyonuna kolayca girebilen toksik bağlı demir oluştururlar (25,34).

#### 2.5. Oksijen ve Akut Dönem

Akut dönemde, Hİ beyin hasarının temel basamağında hipoksi, iskemi ve enerji tükenmesi bulunur ve bu durum glutamat eksitotoksitesisi ile sonuçlanır. Glutamat eksitotoksitesisi, NMDA ve AMPA reseptörleri aracılığıyla apoptotik hücre ölümüne öncülük eden kalsiyum akışına neden olur. Kalsiyum ve diğer iyonların akışı ile süperoksit anyonu, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit üretilir. Lipazlar, proteazlar ve endonükleazlar ayrıca aktive olur ve hücre ölümünü tetikleyen karmaşık olaylar serisini tetiklerler. Bununla beraber, reperfüzyon ve reoksijenasyon tepkimesinden 3-12 saat sonra enflamasyon süreçleri ortaya çıkabilir (Ferriero 2004).

#### 2.5.1 Oksijen ve Uzun Dönem

Doğum esnasında hiperoksiye maruz kalmak uzun süreli patolojik etkilerle de ilişkilendirilebilir. Neonatal dönemde oksijene maruz kalmanın, farelerde doğal immüno-regülatör yollarında değişikliklerle beraber, solunum yolu reaktivitesinde ve kalıcı enflamasyonda artışla akciğerleri etkilediği ve bu etkinin erişkinlikte respiratuvar viral enfeksiyonlara karşı "daha zayıf direnç" gelişimine neden olduğu gösterilmiştir (O'Reilly ve ark. 2008, Kumar ve ark. 2016). Ayrıca, yenidoğan farelerin hiperoksiye maruz bırakılması, anormal davranışlar, uzaysal ve farkında olma hafızasında hasarlar ve intrakraniyal patoloji olmaksızın hipokampus boyutlarında



küçülme ile gösterildiği üzere erişkinlikte ventriküler fonksiyon bozuklukları ve nörogelişimsel hasarlar gibi uzun süreli kardiyak anomalilerine neden olabilir (Ramani ve ark. 2013, Ramani ve ark. 2015).

Serebral palsi Hİ'nin kronik dönemde en fazla görülen neticelerinden biridir. Hİ ilişkili serebral palsi oranı yaklaşık %14 civarındadır (Graham ve ark. 2008). Orta dereceli Hİ'nin neonatal nöbetlerle bağlantılı olduğu bilinse de, post-neonatal epilepsi ile bağlantılı olmadığı düşünülmektedir (Pisani ve ark. 2009). Yenidoğan nöbetleri, perinatal hipoksinin önde gelen uzun vadeli bir sonucu olabilir (Sun ve ark. 2016).

## 2.6. Hİ ve Apoptotik Hücre Ölümü

Apoptotik hücre ölümü yenidoğan Hİ beyin hasarında da rol oynamaktadır ve yenidoğanlarda, apoptozun, nekroza kıyasla hasardan sonra hücre ölümüne neden olması açısından daha önemli olabileceği öne sürülmüştür (Hossain 2005, Ma ve ark. 2012). Hİ beyin hasarının erken evrelerinde apoptozun önemli olduğunu gösteren ve bu durumun günler hatta haftalarca sürdüğü konusunda artan kanıtlar bulunmaktadır (Northington ve ark. 2011). Mitokondriyal bozukluk ve özellikle mitokondriyal membran bütünlüğünün bozulması, kaspaz-3 gibi hücre ölüm mekanizmalarının tetiklenmesine yol açar.

## 2.7. Hİ ve Kan Beyin Bariyeri

Beyin damarları tamamen astrositik uzantılarla kaplanmıştır. Bu uzantılarla beraber beyin kapillerlerinde bulunan endotel hücrelerinin sıkı bağlantıları yarı geçirgen kan beyin bariyerini (KBB) oluştururlar. Nöronlar, astrositler, perisitler ve vasküler hücreler, nörovasküler birimin bileşenleridir ve beyin mikroçevresinin homeostazı için çalışırlar (Iadecola ve Nedergaard 2007). Akut beyin hasarları KBB bileşenlerini hem moleküler hem de hücresel düzeyde ciddi şekilde etkiler ve KBB işlev bozukluğuna neden olur (Otahal ve ark. 2014). KBB'nin bozulması ve geçirgenliğin artması, plazma bileşenlerinin ve vazojenik beyin ödemenin ekstrasvazyonuna yol açar (Stanimirovic ve Friedman 2012). Lokalize ve geçici KBB bozukluğunun deneysel ortamlarda hem akut epileptiform aktiviteyi hem de kronik nöbetleri tetiklediği gösterilmiştir (Friedman 2011, Maggio ve ark. 2013).

## 2.8. Hİ ve Enflamasyon

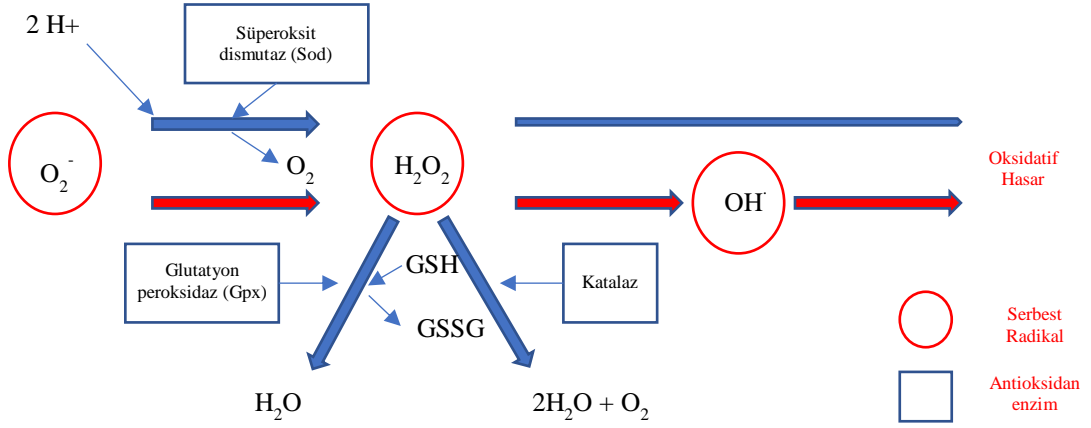
Henüz tam olarak olgunlaşmamış yenidoğan beyninin Hİ ile indüklenmiş hasarı ileri safhalarda iyileştirme kapasitesi, yangı mediyatörlerinin aktivasyonuna, trofik faktörlerin üretilmesine ve endojen rejeneratif etkinliğe bağlıdır. Bu evrede, tümör nekroz faktör (TNF- $\alpha$ ), IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 ve NFkB ve c-Jun N-terminal kinaz (JNK) gibi transkripsiyon faktörleri kritik bir role sahiptir (Ferriero 2004). BDNF, epidermal büyüme faktörü (EBF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF)-1, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), sinir büyüme faktörü (NGF) ve eritropoietin aynı şekilde kritik öneme sahiptirler. Bu faktörlerin nöroprotektif, antioksidatif ve antiapoptotik etkilere sahip olduğu ve EAA sitotoksitesini inhibe ettiği, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu stabilize ettiği belirtilmiştir (Ara ve ark. 2011).

## 2.9. Serbest Radikallere Karşı Koruyucu Sistemler

### 2.9.1. Endojen Antioksidanlar

Beyin, insan vücudundaki metabolik aktivitenin en fazla olduğu organlardan biridir. Düşük antioksidan savunması ve kolayca oksitlenebilen membran lipitlerinin yüksek içeriğinden dolayı kırılabilir bir homeostazı vardır. Fizyolojik koşullar altında, antioksidan enzim sistemleri hücre hasarına karşı koruyucu yetenektedir. Ancak asfiksi durumlarında bu koruyuculuk bozulur ve nöronlar savunmasız hale gelirler (Perrone ve ark. 2010). Hücrel enzimatik antioksidan savunma sistemi süperoksit dismutaz (SOD), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve glutatyon peroksidaz (GPx) olmak üzere üç enzim (Şekil 3) sisteminden oluşur (Volpe 2001).

Yenidoğan beyninin kendine özgü özellikleri vardır. Bol miktarda doymamış yağ asidi, yüksek miktarda oksijen tüketimi, düşük antioksidan enzim sistemi, yüksek su içeriği, düşük miyelinizasyon ve yüksek serbest demir konsantrasyonu içerir (Halliwell 1992, Towfighi ve ark. 1995, Sheldon ve ark. 2004, McLean ve Ferriero 2004, Ferriero 2004, Saugstad 2005). Reperfüzyon ve reoksijenasyon sırasında antioksidan savunma sistemi oksidatif stres yüzünden bozulur ve lipit peroksidasyonu, protein denatürasyonu, enzimlerin inaktivasyonu, DNA hasarı ve hücre iskelet yapısı hasar görür.



Şekil.3 Antioksidan enzimlerin neonatal beyinde serbest radikaller üzerine olan etkisi. Süperoksit dismutaz, süperoksit radikalının hidrojen peroksit dehidrasyonunu katalize eder. Daha sonra glutatyon peroksidaz katalaz enzimi ile birlikte hidrojen peroksitin su ve oksijene indirgenmesini katalizler. Glutatyon peroksidaz yokluğunda, oksijen hidroksil radikaline dönüştürülür ve bu hücreye oksidatif bir hasar verebilir. Siyah oklar, antioksidan enzim varlığında oksidatif hasarın azaldığını, kırmızı okalar ise herhangi bir antioksidan savunma sistemi olmadığı durumda serbest radikal üretimini temsil etmektedir (GSH: glutatyon, GSSG: glutatyon disülfid).

## 2.9.2. Eksojen Antioksidanlar

### 2.9.2.1. Allopurinol

Allopurinol, ksantin oksidazı inhibe eden ve serbest radikal giderici olarak görev yapan bir kimyasal bileşiktir. Hipoksantinın ksantin oksidaz ile ksantine dönüştürülmesinden dolayı serbest radikal oluşumu Hİ sırasında çok önemlidir. Hücreler anaerobik metabolizmaya geçtiklerinde Hİ'nin ilk fazında hipoksantin birikir ve reoksijenasyon fazında hipoksantin, ksantinoksit tarafından oksitlenir ve süperoksit serbest radikalleri üretilir. Bu nedenle, allopurinol ile ksantin oksidazın inhibisyonu, Hİ hasarının ilk evrelerinde ROT üretiminin yayılımını engellemesi açısından önemlidir. Allopurinolün ipsilateral hemisferdeki su içeriğindeki artışı düşürerek atrofiyi belirgin şekilde azalttığı bilinmektedir. Aynı zamanda immatür sıçanlarda uzun dönem serebral hasarı azaltmıştır (Palmer ve ark. 1990, Palmer ve ark. 1993)

### 2.9.2.2. Eritropietin

Eritropietin (EPO), son zamanlarda yenidoğan Hİ beyin hasarında, nöroprotektif bir ajan olarak kullanılmaktadır. EPO lipopolisakkaritlere indüklenen proinflatuar sitokin üretimini inhibe eder. Hİ hasarından sonra eksojen rekombinant EPO'nun (rEPO) verilmesi, IL-1 $\beta$ 'nin ikincil gecikmiş artışını önler ve lökositlerin hasarlı hemisfere geçişini zayıflatır (Sun ve ark. 2005). EPO ve EPO-reseptörü (EPO-R) sinyali normal beyin gelişimi için gereklidir (Yu ve ark. 2002). Hipoksi sonrası hipoksi indüklenebilir faktör-1'in (HIF-1) ifadesi stabildir. EPO ve VEGF gibi hedef büyüme faktörlerinin ekspresyonu artmaktadır. Sonuç olarak, EPO ve EPO-R nöronlar, astrositler ve mikroglialar tarafından spesifik olarak ifade edilir (Bernaudin ve ark. 1999, Bernaudin ve ark. 2002, Mu ve ark. 2005). Yapılan hayvan deneylerinde EPO'nun, beyin felci sonrası hasar hacmini azalttığı, nörogenez ve anjiyogenezi arttırarak ve nörolojik fonksiyonu iyileştirerek embolik inmede etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu hormon, antiinflamatuvar, antiapoptotik ve antioksidan etki göstermektedir. Yine hayvan modellerinde Hİ'ye karşı etkili olduğu bilinmektedir (Bernaudin ve ark. 1999, Brines ve ark. 2000, Solaroglu ve ark. 2003, Sun ve ark. 2004, Wang ve ark. 2004).

### 2.9.2.3. Resveratrol

Resveratrol üzüm, çam ve nar gibi farklı bitki türlerinden üretilen ve çoğunlukla kırmızı şarapta bulunan bir polifenoldür. Bu flavonoidler, metilen köprüsü ile bağlanmış iki aromatik halkadan oluşur. Yapılan çalışmalarda resveratrolün, antiapoptotik ve antiinflamatuvar etkisi olduğu gösterilmiştir (Venturini ve ark. 2010, Bastianetto ve ark. 2015). Ergin sıçanlarda, orta serebral arter oklüzyonu ile yapılan beyin felci çalışmalarında, resveratrolün koruyucu etkileri derinlemesine çalışılmıştır. Etki mekanizmasına bakıldığında, ksantin oksidazı inhibe ederek ve hipoksantin, ksantin ve oksijen radikallerinin üretimini önleyerek oksidatif stresin azaltılması ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Sinha ve ark. 2002, Yousuf ve ark. 2009, Li ve ark. 2011, Fang ve ark. 2015, Hermann ve ark. 2015). Resveratrol aynı zamanda, ATP içeriğini ve mitokondriyal solunum aktivitesini düzenleyerek beyin enerji metabolizmasını geliştirir. Yenidoğan çalışmalarında da Hİ sonrası yapılan araştırmalarda histolojik ve fonksiyonel sonuçları iyileştirdiği bildirilmiştir (Sinha ve ark. 2002, Yousuf ve ark. 2009). Ayrıca miyelinizasyonu korumakta ve astroglial reaktif cevabı minimize

etmektedir. Bununla birlikte nöroprotektif etkilerinin uzun sürdüğü, özellikle Hİ hasarı sonrası uzun dönem çalışmalarında kognitif bozuklukları iyileştirdiği gösterilmiştir. Yenidoğan sıçanlarda yapılan çalışmalarda, resveratrol uygulanmasıyla hem mekânsal hem de mekânsal olmayan bellek testlerinde önemli derecede iyileşme görülmüştür. Bu bulgular, gri ve beyaz cevher ve özellikle korteks ve hipokampus üzerine resveratrolün koruyucu etkilerinin olduğunu göstermiştir (West ve ark. 2007, Arteaga ve ark. 2015).

#### 2.9.2.4. Topiramamat

Yaygın olarak kullanılan bir antikonvülzan ajan olan topiramamat (TPM), glutamat reseptörleri, AMPA/Kâinat reseptörleri ve voltaj kapılı sodyum ve kalsiyum kanalları üzerindeki inhibitör etkisi sayesinde nöron koruyucu potansiyele sahiptir. TPM'nin Hİ sonrası ortaya çıkan bilinçsel bozuklukları azalttığı gösterilmiştir (Noh ve ark. 2006). Hİ beyin hasarında doğmuş domuz yavrusu modelinde, hayvanlarda TPM uygulanmasıyla nöronal hücre kaybının azaldığı, fakat ilaçla tedavi edilen grupta beyaz cevherde ciddi apopitoz ortaya çıktığı görülmüştür (Schubert ve ark. 2005).

#### 2.9.2.5. N-Asetil-L-sistein

N-asetil-L-sistein (NAS) iyi bilinen ve tiyol içeren bir antioksidandır. Oksijen radikal giderici ve glutatyonun öncüsü olarak görev yapar. NAS'ın, yetişkin sıçan beyin felci modelinde, apopitotik hücre ölümünü azalttığı, enflamatuvar sitokinleri ve NO sentezini azaltarak ROT'u temizleyebileceği bildirilmiştir. Bunun yanında glutatyon düzeyini düzeltebilir ve redoks potansiyelini azaltabilir (Sekhon ve ark. 2003, Khan ve ark. 2004).

#### 2.9.2.6. Deferoksamin

*Streptomises pilosus* tarafından üretilen bakteriyel bir makrofaj olan deferoksamin (DFO), demiri bağlar. Böylece H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından yönlendirilen fenton reaksiyonu yoluyla hidroksil oluşumunu önler (Mobarra ve ark. 2016). Hücre kültürü modelinde, DFO'nun oksijen ve glikoz yokluğundan sonra nöronal ölümü azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca DFO'nun KBB'yi geçebilen bir madde olduğu bildirilmiştir. Yedi günlük sıçanlarda yapılan bir çalışmada, EAA miktarını düşürdüğü ve hipokampusta histolojik iyileşme oluşturduğu görülmüştür. DFO, kortikal beyin

dokusunda ve plazmada serbest demir miktarını azaltarak karotis arter akımını, rölatif serebral oksijen metabolizmasını ve elektrokortikal beyin aktivitesini koruduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Shadid ve ark. 1998a, Shadid ve ark. 1998b, Sarco ve ark. 2000, Hamrick ve ark. 2005, Papazisis ve ark. 2008).

## 2.10. Normobarik Oksijen

Oksijen tedavisinin dokularda hipoksiye yol açan hastalıkların tedavisinde faydalı olduğu bilinmektedir. Oksijen tedavisi normobarik oksijen (NBO) ve hiperbarik oksijen (HBO) tedavisi olmak üzere ikiye ayrılır. Sahip olduğu yan etkiler ve pahalı bir tedavi seçeneği olduğundan dolayı HBO çok fazla tercih edilmemektedir. Buna karşın NBO kolay ulaşılabilirliği ve uygulanabilirliğinin yanında ucuz bir tedavi yöntemidir. Hİ ve beyin felci gibi beyin kan akımını doğrudan etkileyen ve beyin oksijensiz kalmasına yol açan durumlarda NBO tedavisinin kullanılmasının beyin kan akımını artırdığı, KBB geçirgenliğini azalttığı ve nörolojik olarak iyileşmeyi artırdığı bilinmektedir. NBO kullanımı dolaşımdaki oksijen yoğunluğunu arttırarak beyne oksijence zengin kanın gitmesini sağlamaktadır (Beker ve ark. 2015).

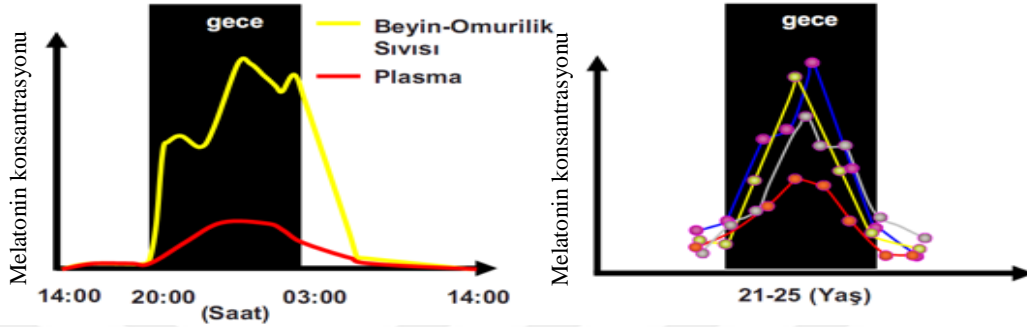
## 2.11. Melatonin

Bir nörohormon olan melatonin, memelilerde, mikroorganizmalarda ve mantarda üretilip kullanılabilen biyolojik sinyal moleküllerinden biridir (Claustrat ve ark. 2005, Reiter ve ark. 2005). Genel olarak melatonin, memelilerin temel olarak epifiz bezinden salgılanır. Aynı zamanda retinada, gastrointestinal sistemde, deri gibi birçok organ ve hücrede sentezlenip kullanılabilir (Reiter ve ark. 2004). Melatoninin salgılanma mekanizması sirkadiyen ritme bağlı olarak düzenlenir. Karanlık ortamda plazma ve beyin omurilik sıvısında (BOS) daha fazla melatonin bulunduğu tespit edilmiştir, ayrıca 21-25 yaş arası gençlerde gece salgılanan melatonin seviyesi de farklılık göstermektedir (Şekil 5, Reiter ve ark. 2005).

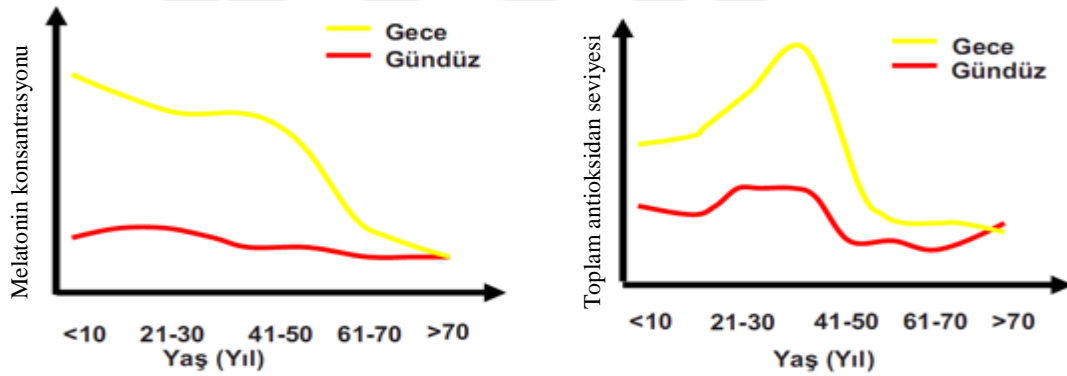
Melatonin karaciğer tarafından hızlı bir şekilde metabolize edilir ve MSS tarafından hızlı ve oldukça etkin bir biçimde kullanılır. BOS'daki melatonin miktarı plazmaya göre daha yüksektir. Çünkü melatonin bu süreçten daha az etkilenir ve daha uzun süre MSS'de reseptör bağımlı ya da bağımsız etki gösterebilmektedir. Yapılan hayvan çalışmalarında, pineal bezin çıkartılmasıyla melatonin miktarının belirgin olarak azaldığı ve sirkadiyen değişikliklerinin kaybolduğu gözlemlenmiştir. Bunun

sonucu olarak da parakrin melatonin salgılanmasının plazma ve BOS'da melatonin miktarına bir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır (Reiter ve ark. 2005).

Plazmadaki melatonin konsantrasyonu bireyler arasında değişiklikler gösterdiği gibi, epifiz bezinde ileri yaşlarda meydana gelen fizyolojik bozulma nedeniyle salgılanan melatonin miktarı da azalmaktadır (Şekil 6).



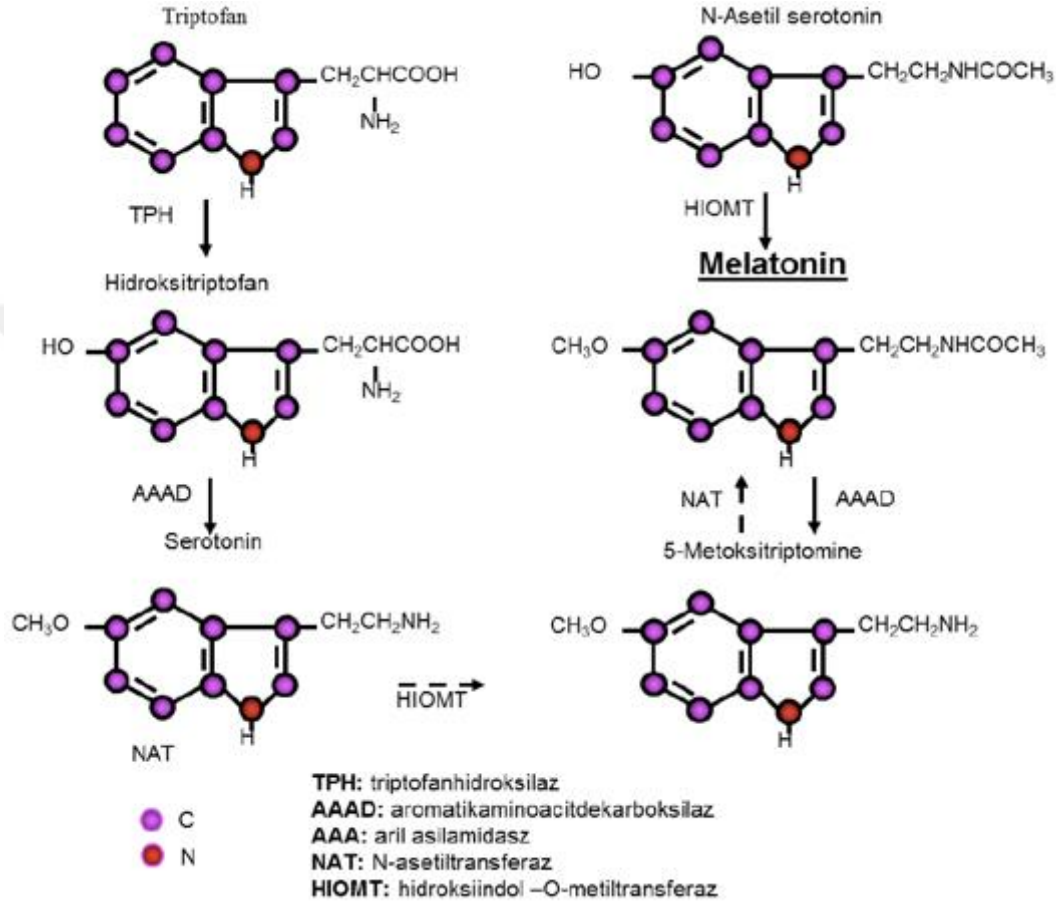
Şekil 5. Sirkadiyen ritme bağlı olarak BOS ve plazmadaki melatonin konsantrasyonları.



Şekil 6. Yaşa bağlı olarak melatonin konsantrasyonu ve toplam antioksidan seviyelerindeki değişim.

Melatonin uyku-uyanıklık, bağışıklık sistemi ve özellikle serbest radikal giderici özellikleriyle organizmadaki birçok işlevde görev alır. Normal fizyolojik koşullar altında ATP üretimi sürecinde serbest radikal üretimi olmaktadır (Martin ve ark. 2000, Leon ve ark. 2004). Meydana gelen bu serbest radikaller, endojen veya eksojen antioksidan enzimler ve melatonin tarafından uzaklaştırılmaktadır. Birçok nörodejeneratif hastalıkta da patolojik durumlarda bu denge bozulur ve antioksidatif savunma mekanizması tam olarak görevini yapamaz ve oluşan serbest radikaller bölgeden uzaklaştırılmaz (Chan 1996).

Melatonin L-triptofandan üretilen bir nörotransmitter olan serotonin (5-hidroksitriptamin) tarafından sentezlenir. Triptofan, triptofan hidroksilaz enzimi aracılığıyla 5-hidroksi-L-triptofana ve sonrasında 5-hidroksi-L-triptofan aromatik L-amino asit dekarboksilaz enzimi ile serotonine dönüştürülür. Daha sonra serotonin melatonin sentezi iki adımlı yoldan oluşur (Şekil 7).

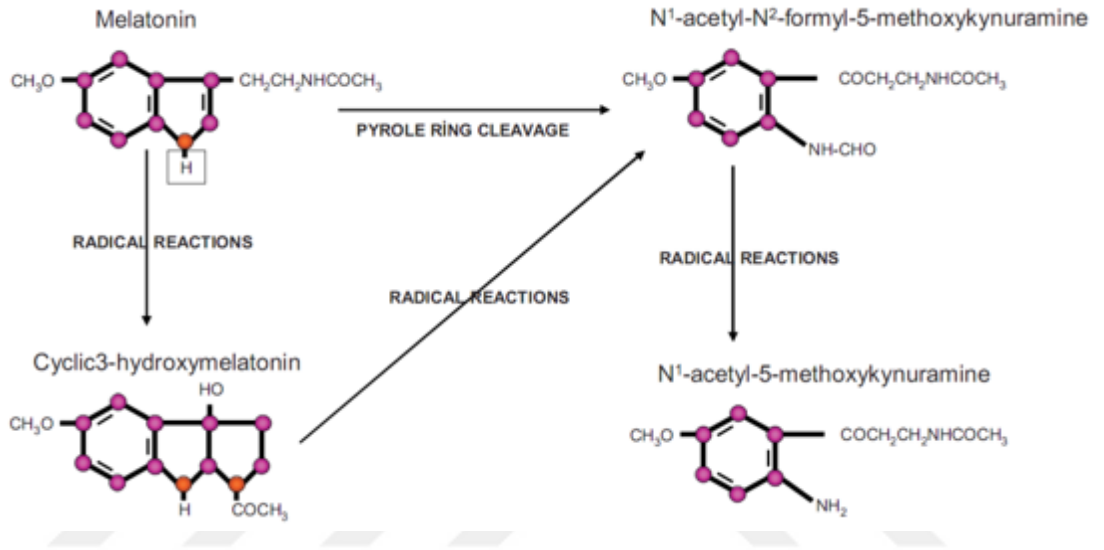


Şekil 7. Triptofan ve serotonininden melatoninin sentezlenme mekanizması.

Melatonin antioksidan etkisini direk serbest oksijen radikalleri etkisizleştirerek veya antioksidan enzimlerin sentezlerini artırarak göstermektedir. Vitamin E, vitamin C, resveratrol, glutatyon gibi diğer antioksidan moleküller ile karşılaştırıldığında onlara göre çok daha düşük konsantrasyonlarda çok daha güçlü serbest oksijen radikal giderici etkinliğe sahiptir (Martin ve ark. 2000, Lopez-Burillo ve ark. 2003, Tan ve ark. 2003). Reaktif oksijen türleri ile girdiği reaksiyonlarla melatonin, siklik-3-hidroksimelatonin ve kinuraminin türevleri olan N<sup>1</sup>-asetil-N<sup>5</sup>-formil-5-metoksikirunamin ve N<sup>1</sup>-asetil-5-metoksikinuramin'e dönüştürülebilir (Şekil 8). Melatoninin bu özelliği onu diğer antioksidan maddelerden ayıran en önemli

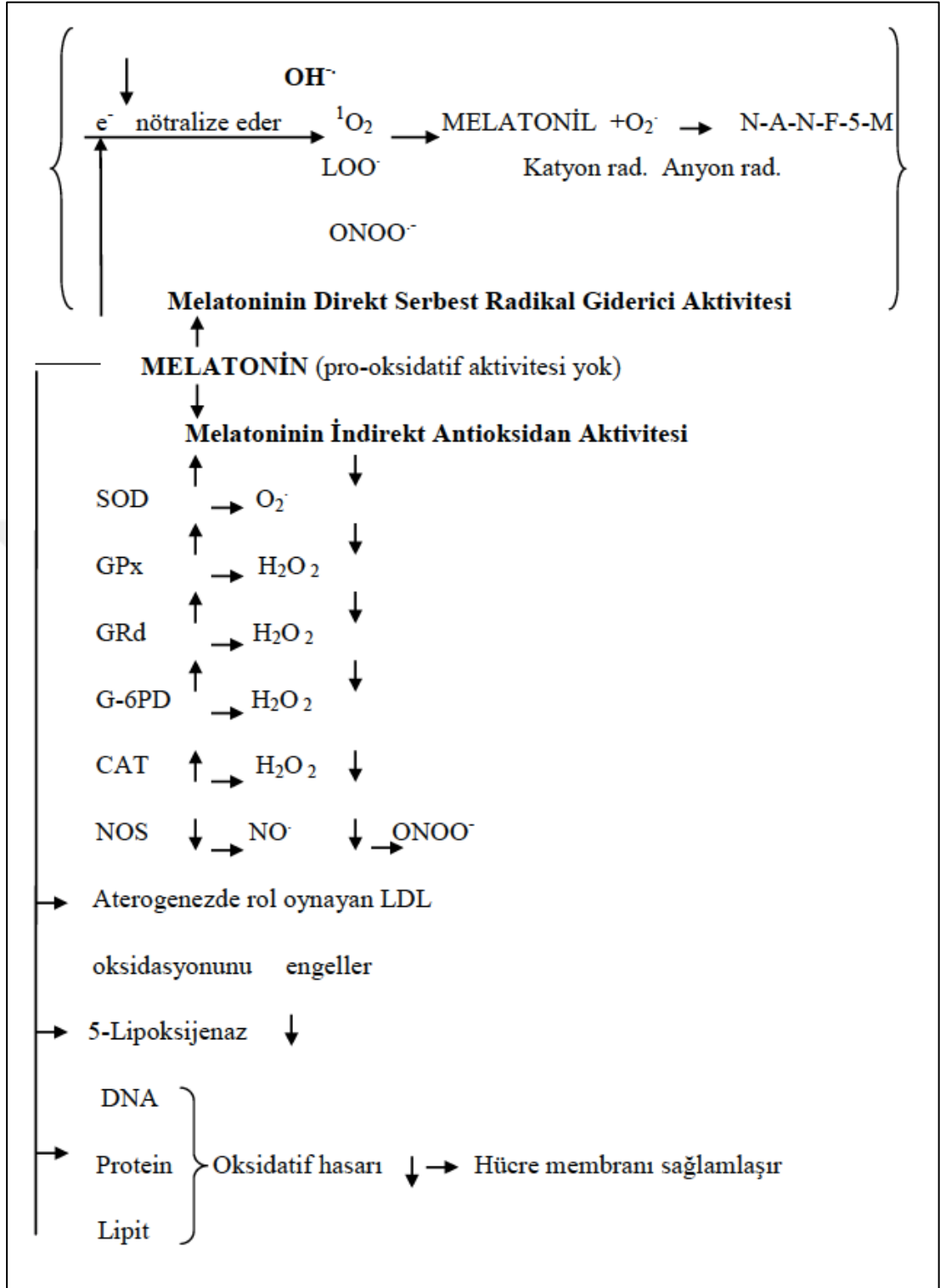


farklılığıdır. Örnek olarak C vitamini bir serbest radikal gidericidir ve ilk metaboliti prooksidan özellik taşımaktadır (Reiter ve ark. 2009). Melatonin direk antioksidan etkisi sırasında parçalanır ve toksik etkisi çok az olan inodil katyon radikaline dönüşür. Bu da süperoksit radikalini tutarak okside olur ve N<sup>1</sup>-asetil-N<sup>5</sup>-formil-5-metoksikirunamine dönüştürülür (Şekil 9). Ayrıca melatonin sentez ve salınımı yaşın ilerlemesi ile azalır ve buna paralel olarak vücudun toplam antioksidan kapasitesinde de azalma görülür (Reiter ve ark. 2005, Sanchez-Barcelo ve ark. 2010).



Şekil 8. Antioksidan olarak melatonin metabolitleri. Siklik 3-hidroksi-melatonin, AFMK ve AMK.

Beyin toplam vücut ağırlığımızın sadece %2'sini oluşturmaktadır. Buna karşın diğer dokular ile kıyaslandığı zaman beyinde çok daha fazla reaktif oksijen türünün oluştuğunu görülmektedir. Oksidasyona duyarlı doymuş yağ asitleri bakımından beyin diğer dokulara nazaran daha zengindir. Bu durumda fenton reaksiyonu üzerinden hidroksil radikallerinin oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Beyinde bazı bölgeler C vitamini bakımından zengindir. Serbest demirin olduğu ortamlarda C vitamini güçlü bir prooksidan hale gelir. Bu şekilde beyin oksidatif hasara daha duyarlı olur. Beyin dokusu göreceli olarak antioksidan enzimler açısından yetersiz bir organdır (Reiter ve ark. 2005, Reiter ve ark. 2009).



Şekil 9. Melatoninin serbest radikallerinin giderilmesindeki rolü.

İskemi gibi nörodejeneratif hastalıklarda ise ortaya çıkan aşırı miktardaki reaktif oksijen radikallerinin antioksidatif enzim mekanizmaları ile dengelenememesi beynin oksidatif strese maruz kalmasına neden olmaktadır (Chan 1996). Yukarıda bahsedilen nedenlerden dolayı da oksidatif strese en fazla maruz kalan organ beyin olup sonuçta reaktif oksijen molekülleri nöron ve gliya hücrelerinde ölüme neden olmaktadır. Bu da beyin hasarı ve beyin ödeminde artış ile sonuçlanmaktadır.

## 2.12. Neonatal Hİ ve Plastisite

Beyin plastisitesi, beynin organizmadaki değişikliklere veya çevresel değişikliklere yanıt olarak kendi organizasyonu ve işlevlerini değiştirme yeteneğini artıran moleküllerle birlikte hücresele ve fizyolojik olayları kapsamaktadır. Yenidoğan beyni erişkin beyni ile karşılaştırıldığında dış uyaranlara karşı daha hassastır. Bu durum fonksiyonel olarak iyileşmesi açısından daha avantajlı bir durum olarak kabul edilir (Giza ve Prins 2006). Hem hayvanlarda hem de insanlarda çevre uyarımı, sinir projeksiyonlarının büyümesini tetikler ve artan dendritik dallanma ve bilişsel güçlenme ile sonuçlanır (Greenough ve ark. 1973, Rosenzweig ve Bennett 1996, Johnston 2005). Gelişmekte olan beynin, daha hassas ve dolayısıyla hasardan sonra daha iyi iyileşme mekanizmalarına sahip olmasının beklenmesine rağmen, olgunlaşmamış yenidoğan beyninin, hasarın ardından bazı olumsuz gelişim sonuçlarına sahip olduğu anlaşılmaktadır (Giza ve Prins 2006). Hasar ve nöbetler, beyin gelişiminde yer alan belirli yolakların aşırı uyarılmasını tetikler. Bu koşullar altında anormal bağlantılar ve anormal sinirsel projeksiyonlar oluşabilmektedir. Bu durumda da epilepsi, motor ve kognitif bozukluklar ortaya çıkabilmektedir (Johnston ve ark. 2002, Giza ve Prins 2006). Örneğin glutamat, klasik sinir iletiminde ve beyin gelişimi sırasındaki aktiviteye bağlı plastisite için önemlidir (Johnston 2005). Glutamat içeren yolaklarda, beynin birçok bölgesinde artan miktarda sinaptik ve hücre dışı glutamat gözlemlenirken, glutamatın toksik etkileri postsinaptik reseptör tipine bağlıdır.

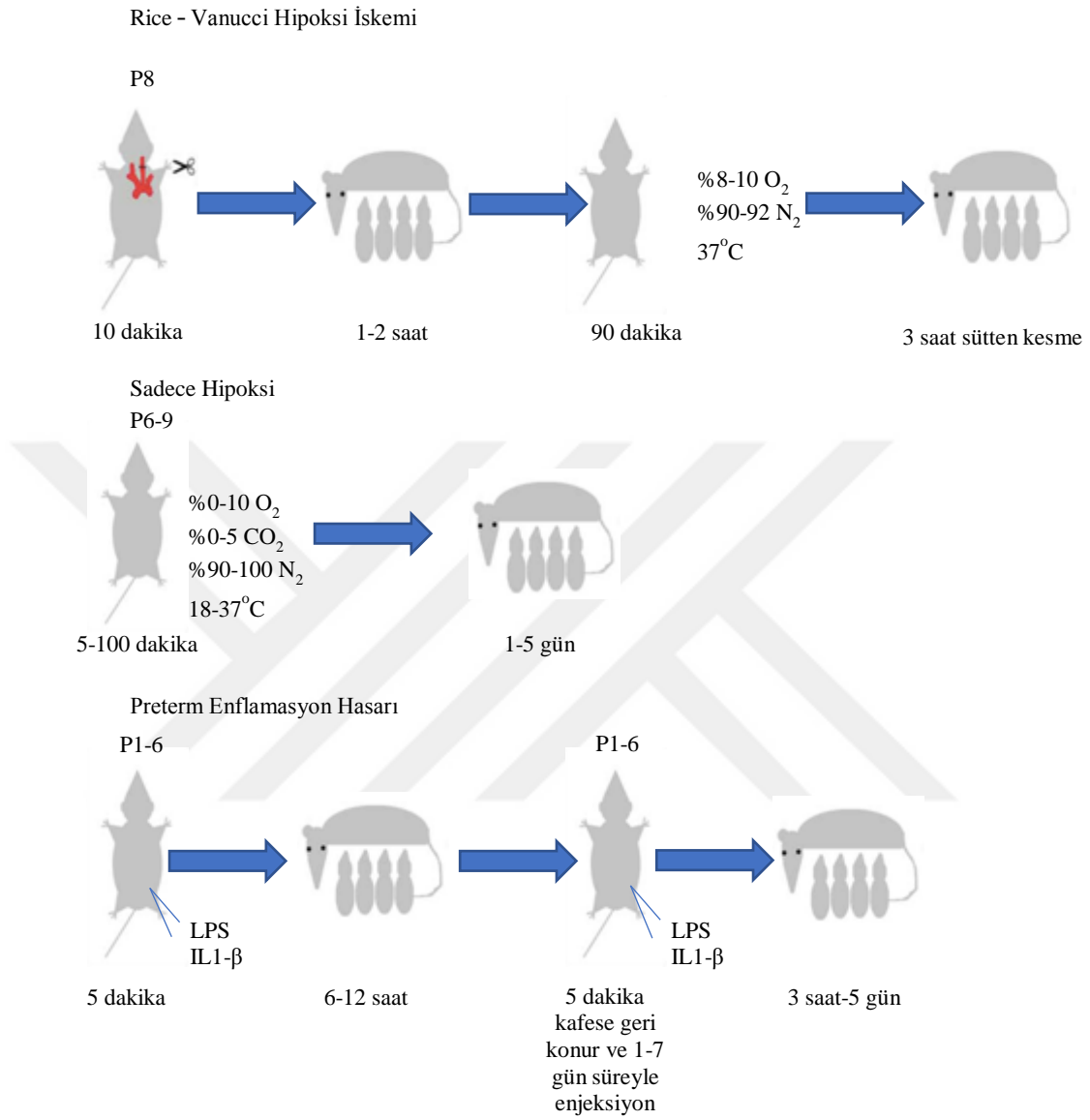
NMDA reseptörleri, aktiviteye bağlı uzun dönem potansiyelizasyon ve sinaptik bağlantıların düzenlenmesiyle ilgilidir. NMDA reseptörleri, glutamat ve glisin ile koaktivasyona ihtiyaç duyarlar, aynı zamanda voltaj bağımlıdır. Magnezyumun kanal blokajını serbest bırakması için membran depolarizasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır. Böylelikle, NMDA kanalının açılarak ve hücre içerisine kalsiyum

geçişini ortaya çıkar. Bu nedenle NMDA reseptörleri, gelişen beyindeki hasar şekli için oldukça önemlidir. Çünkü Hİ durumunda membran potansiyelindeki bozulma magnezyum bloğunu aşar ve kanalları açar (Monyer ve ark. 1994). Sıçan talamokortikal sinapslarının elektrofizyolojik çalışmaları uzun dönem potansiyelizasyon ve NMDA aracılı sinaptik akımların somatosensoriyel kortikal plastisite için kritik bir dönem olan doğum sonrası 3 ila 7. gün arasında arttığını göstermektedir. (Crair ve Malenka 1995). Dolayısıyla NMDA reseptörlerinin hasara aracılık etmesi ve NMDA kanal blokörlerinin Hİ hasarında nöron koruyucu potansiyele sahip olması muhtemeldir.

### 2.13. Deneysel Hipoksi İskemi Modelleri

Hipoksiyi ve hipoksi sonuçlarını tanımlamaya çalışan ilk modeller, geçen yüzyılın başlarında yayınlanmıştır. Potasyum siyanür enjeksiyonu, toksik ensefalomiyelopati ve MSS demiyelinizasyonuna sahiptir. Ancak araştırmacılar siyanür enjeksiyonunun gözlemlenen sonuçlarının toksisitesine bağlı olmadığını ancak “anoksik atışlarının” beyaz cevherdeki hasar mekanizması olduğunu fark etmişlerdir. Bir süre sonra sağ karotid arterin çift bağlanması takiben oluşan anoksik bir model yayınlanmıştır (Levine 1960). Daha sonraları, yenidoğan 7 günlük sıçanların genel karotid arterinin bağlanması ve ardından %8 normobarik hipoksiye kontrollü atmosfer ve sabit sıcaklıkta maruz bırakılması şeklinde Rice-Vanucci modeli izlemiştir (Rice ve ark. 1981). Günümüzde 7 günlük sıçanların MSS gelişimi 32-34 haftalık insan fetüsüne denk geldiği ve 10 günlük sıçanların da normal doğuma tekabül ettiği kabul edilmektedir (Clancy ve ark. 2001). Beyin alt bileşenleri (beyaz cevher, gliya), insanlara kıyasla farklı hızda olgunlaşır ve yeni doğmuş sıçanın büyüme hızı insanlara en yakındır (Craig ve ark. 2003, Semple ve ark. 2013, Rumajogee ve ark. 2016). Bir diğer model de her iki karotid arterin bağlanması ve ardından %8 oksijene maruz bırakılmasıdır. Bu bağlanma kısmi ya da tamamen olabilir ve postnatal gelişme döneminin farklı seviyelerinde gösterilmiştir (Uehara ve ark. 1999, Jelinski ve ark. 1999, Cai ve Rhodes 2001). Hİ koşulların benzetildiği bir diğer uygulama ise enflamasyon süreçlerine etki eden lipopolisakkarit (LPS) enjeksiyonudur (Şekil 10). Bu model pre veya postnatal dönemde uygulanabilir. Eğer LPS hamile sıçana direk olarak enjekte edilirse, prenatal enflamasyon süreçlerini uyararak, nöronal dokuda apoptoz, mikrogliya aktivasyonu ve fetusta beyaz cevher lezyonlarına sebep olabilir (Cai ve ark. 2000). Eğer LPS olgunlaşmamış sıçana uygulanırsa ve hemen ardından

normobarik hipoksiye maruz bırakılırsa orta dereceli beyaz cevher hasarı, mikroglia aktivasyonu ve KBB hasarı meydana gelir (Wang ve ark. 2010).



Şekil 10. Farklı hipoksi iskemi modelleri.

Hİ'nin patofizyolojik süreçleri ele alındığında eksitotoksisite ve yüksek serbest radikal üretimi sonrasında meydana gelen hücre ölüm mekanizmalarının, oluşan hasarın artmasında önemli rol oynadığı görülmektedir. Bu nedenle, çalışmada henüz etkisi tam olarak ortaya konmayan oksijen tedavisi ve yüksek oksijen konsantrasyonu ile kümülatif etkisinin araştırılması amacıyla ve çok iyi bir serbest radikal giderici ve antioksidatif ajan olan melatonin kullanılmıştır.

### 3. Gereç ve Yöntem

Deneyleerde yeni doğmuş 7 günlük sıçanlar cinsiyet ayırt etmeksizin kullanıldı. Akut ve kronik dönem çalışmaları için gruptaki hayvan sayıları n=10 olacak şekilde ayarlandı. Bu tezin deneysel çalışmaları Necmettin Erbakan Üniversitesi ve İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulları tarafından onaylandıktan sonra İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Rostoratif Tıp Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

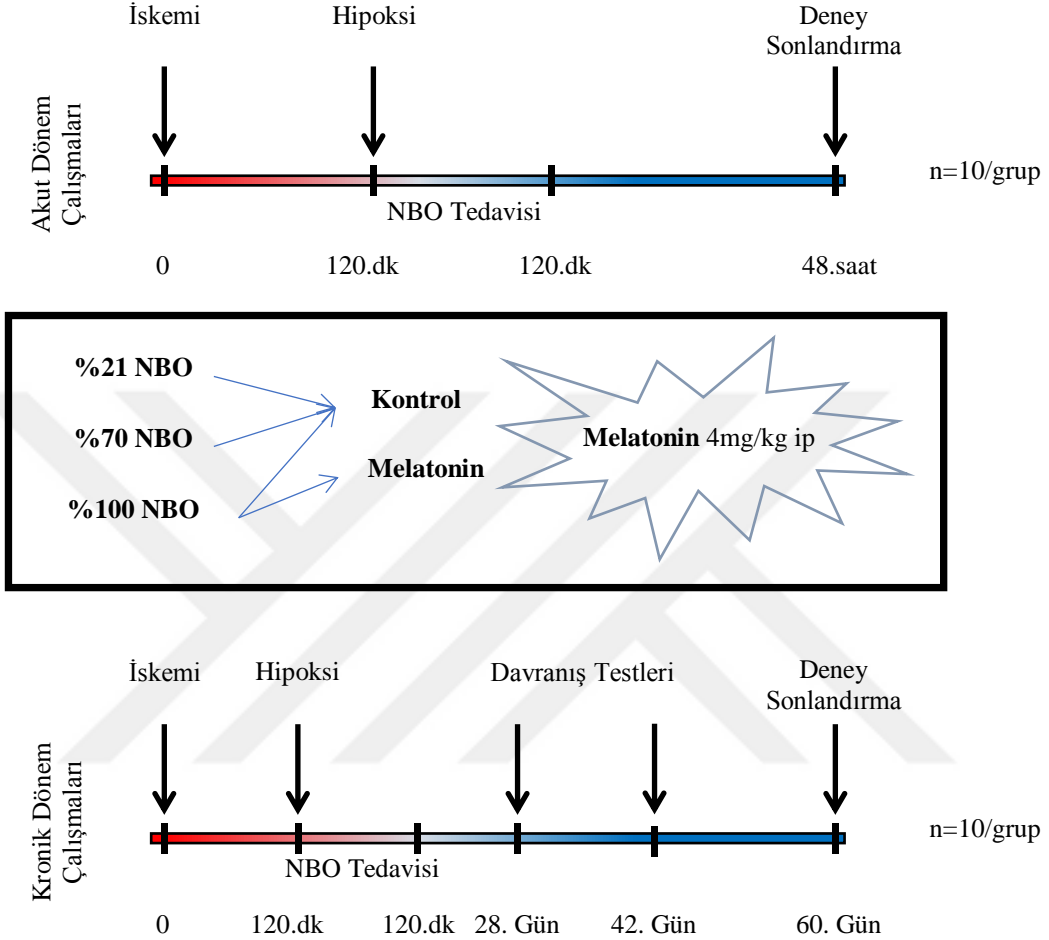
#### 3.1. Deneyle Dizaynı

Deneyleler akut ve kronik olmak üzere iki farklı set olarak dizayn edildi (Şekil 11). Çalışmada hem akut hem de kronik dönem için %21 Oksijen grubu, %70 Oksijen, %100 Oksijen ve %100 Oksijen+Melatonin grupları n=10 olacak şekilde dört farklı deneyle grubu oluşturuldu. Akut dönem çalışmaları hipoksik iskemi uygulanmasının ardından farklı konsantrasyonlarda ki NBO tedavisi uygulandı. Hİ'nin indüklenmesinden 48 saat sonra dekapite edilen hayvanların beyinleri hızla çıkartılıp kuru buz üzerine alındı ve histopatolojik incelemeler için -80 buzdolabında saklandı. Kronik dönem çalışmaları ise Hİ indüklenmesinden sonra tedavi grupları uygulandı ve iki farklı zaman diliminde sıçanlara davranış testleri uygulanmasının ardından 60. Günde dekapite edilerek beyinleri -80 buzdolabına kaldırıldı.

#### 3.2. Deneysel Hipoksik İskemi Modeli

Hİ modeli için Vanucci'nin modeli modifiye edilerek kullanıldı (Rice ve ark. 1981). 7 günlük sıçanlar 1% izofloran (30% O<sub>2</sub>; NO<sub>2</sub>) ile anesteziye alınıp, sağ karotid arter izole edilip, 6.0 naylon ip ile bağlandı ve 1 saat dinlenmeye bırakıldı. Akabinde yavru sıçanlar akut ve kronik dönem çalışmaları için 2 saat süre ile % 8 O<sub>2</sub>'ye maruz bırakıldı, hemen sonrasında yavru sıçanlar melatonin ile (4 mg/kg, i.p.) kombine ya da sadece %21, %70 ve %100 O<sub>2</sub> tedavisine alındı. Daha sonra yavrular operasyon sonrası bakım için annelerinin yanına konuldu. Akut dönem analizleri için apopitozun pik noktası olan 48. saatte yavrular sakrifiye edildi. Hemen beyinleri çıkarılarak kuru buz üzerine alınıp histolojik incelemeler için derin dondurucuda (-80 °C) saklandı. Kronik dönemde ise yavrular Hİ sonrası 2 ay süre ile yaşatılıp davranış testleri (açık alan, karanlık-aydınlık, rotarod, Barnes labirent) uygulanmasının

ardından 60. gün sonunda sakrifiye edildi ve beyinler hızla kuru buza alınıp histolojik incelemeler için derin dondurucuya (-80 °C) kaldırıldı.



Şekil 11. Deneý dizanı.

### 3.3. Normobarik Oksijen Tedavisi

Akut ve kronik HI sonrası %21, %70 veya %100 NBO tedavisi uygulamak üzere yavru sıçanlar özel olarak dizayn edilmiş ve çapı 25 cm olan desikatörlere alındılar. NBO uygulama alanlarının içerisindeki O<sub>2</sub> oranları oksijen sensörü (MX-300, Teledyne Analytical Instruments) kullanılarak tüm tedavi süresince takip edildi. NBO kullanıldığı için desikatörler içerisinde basınç manometre vasıtasıyla gerçek zamanlı olarak izlendi. Ek olarak, desikatörler içerisinde hayvanların vücut sıcaklıklarını sabit tutmak için homeotermik ısıtma sistemleri kullanıldı. Tedavi sonrası hayvanlar kendi kafeslerine geri konuldu (Beker ve ark. 2015).

### 3.4. Davranış Testleri

#### 3.4.1. Aydınlık Karanlık Testi

Bu test ile hayvanların anksiyete durumları ölçüldü. Hayvanlar bir tarafı tamamen karanlık diğer tarafı ise ışık alan bir kutunun tamamen aydınlık olan kısmının kenarına yerleştirildi. Kamera yardımı ile hayvanlar 10 dakika boyunca gözlemlendi ve aydınlık alanda ne kadar süre geçirdikleri hesaplandı (Kilic ve ark. 2014).

#### 3.4.2. Rotarod Testi

Sıçanların hipoksik iskemi sonrasındaki motor koordinasyonlarındaki değişikliklerin belirlenmesi amacıyla kullanıldı. Kendi çevresinde hızı giderek artan (4 rpm'den 40 rpm'e 245 saniyede) bir silindirden oluşan rotarod testinde sıçanların bu silindir üzerinde kalabildikleri süre değerlendirildi. Test süresi maksimum 5 dakika olarak uygulandı. Test 5 kez tekrarlandı ve ortalama değeri alındı. Bu değerler operasyon öncesi ve operasyon sonrası farklı zamanlarda tekrarından elde edilen değerler ile karşılaştırıldı (Kilic ve ark. 2014).

#### 3.4.3. Açık Alan Testi

Sıçanların spontan motor aktivitelerinin ve alandaki araştırma benzeri davranışların değerlendirildiği bir metot olan açık alan testinde fareler, 150 cm çapında ve 35 cm yüksekliğinde bir ucu kapalı silindirden oluşan bir alanda 10 dakika boyunca gözlemlendiler. Sıçanların hareket ettikleri sıradaki hızları, silindirin orta, merkez veya kenarda geçirdikleri zaman süreleri, hareketli ve hareketsiz kaldıkları süre ve alanlar karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Bu değerlendirmede kameraya bağlı bir bilgisayar ile Any Maze programı kullanıldı (Kilic ve ark. 2014)

#### 3.4.4. Barnes Labirent Testi

Barnes labirent testi hayvanlarda uzaysal öğrenme ve hafızayı ölçmek için kullanıldı. Daire şeklindeki platformda 18 adet çapı 15 cm'lik delikler bulunmaktadır. Deliklerden birinin altına hayvanın kendini güvende hissedeceği bir kafes yerleştirildi ve çevreye hayvanların bu deliği bulabilmek için referans olarak kullanabilecekleri birtakım belirteçler kondu. Hayvanlara ses ya da ışık gibi bir uyaranlar verilerek ne



kadar sürede güvenli bölgeyi bulabildikleri 3 dakikalık sürelerde gözlemlendi (Li ve ark. 2012).

### 3.5. Histopatolojik Yöntemler

Akut dönemde meydana gelen histopatolojik değişikliklerin belirlenmesi amacıyla apoptoz için TUNEL, oluşabilecek nekrotik hasarın belirlenmesi yanında yaşayan nöron sayısının belirlenmesi amacıyla *cresyl violet*, protein seviyelerindeki değişikliklerin belirlenmesi için Western Blot yöntemi kullanıldı.

#### 3.5.1. *Cresyl Violet* Boyaması

*Cresyl violet* boyaması nöronların ve hücre çekirdeklerindeki nissl taneciklerini göstermek için kullanıldı. Bregma -3.60 mm seviyesinden alınan kesitler aşağıda belirtilen protokol çerçevesinde histolojik kaplama prosedürleri kullanılarak *cresyl violet* kaplaması yapıldı. Kaplanan kesitlerde *Image J* programı (NIH, US) kullanılarak hasar alanı belirlendi, toplam beyin alanından hasarsız beyin alanı çıkarılarak hesaplandı.

##### 3.5.1.1. *Cresyl Violet* Protokolü

Elde edilen koronal kesitler 30 dakika süreyle 37 °C'de kurutmaya alındı. Şalelere yerleştirilen slaytlar 7 dakika PFA ile muamele edilip distile su ile yıkayıp şaleler değiştirildi. Çalkalayıcı kullanılarak 5 dakika PBS ile yıkayıp tekrar distile su ile yıkandı. Slaytlar 2 dakika masa üzerinde, 13 dakika çalkalayıcı üzerinde *cresyl violete*'ye maruz bırakıldı. Slaytlar önceden hazırlanan ve sırasıyla %70, %90, %95, %100 (20-25 sn) alkol ile muamele edilip, 2 tane *xylene* şalesi hazırlanarak 1. şalede 2-3 dakika, 2. şalede ise 1-2 dakika bekletildi ve son olarak üzerlerine cam pastör pipet ile *mounting medium* damlatılarak kurutmaya bırakıldı (Kelestemur ve ark. 2016).

#### 3.5.2. *TUNEL Assay*

*TUNEL* DNA fregmantasyonunu göstermek amacıyla apoptozun son evresindeki hücreleri tanımlamak için kullanıldı. Çalışmada beynin hipokampus seviyesinden (bregma -3.60) belirlenen alanlardan *TUNEL (+)* hücre sayımı yapıldı.

### 3.5.2.1. TUNEL Assay Protokolü

Derin dondurucudan alınan slaytlar oda sıcaklığında 30 dakika süreyle kurutuldu. Slaytlar şalelere alınıp PFA içerisinde 10 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda, 10 dakika +4 °C' de bekletildi. Slaylatlar yeni şale ve şale yatağına alınıp 3x5 dakika çalkalayıcıda 80 RPM'de PBS ile yıkandı. Yeni bir şaleye P1 (Permeabilization Solution) konulup slayt yatağı değiştirildi, tekrar yeni bir şaleye P2 (Citrate Buffer) hazırlanıp, slaytlar P1 şalesinden alınıp P2 şalesine konuldu. Bir dakika boyunca 750 W'da mikrodalgada P2 solüsyonunda kaynatılıp, üzerine 80 ml distile su eklendi. Slaytlar hızlı bir şekilde PBS şalesine batırılıp çıkartıldı ve fazla su slaytlar üzerinden atılarak daha önceden hazırlanan nemli ortama dizildi. Beyin dokusunun etrafı maddenin dışarıya akması için hidrofobik yapıdaki PAP-PEN ile çizildi. Örnek başına yaklaşık 50µl Buffer A (%2 BSA, %1 Gelatin, %10 NGS, %0,03 PBS-T) eklenerek çalkalayıcı üzerinde 80 RPM'de 30 dakika inkübe edildi. Nemli ortamdan alınan slaytlar şale yatağına dizilip 10 dakika 80 RPM'de PBS ile çalkalanarak Roche In Situ Cell Detection Kit içerisinde hazır halde bulunan enzim 1: 50 µl + buffer 2: 550 µl karışımı buz içerisinde karanlıkta bekletildi ve örnek başına yaklaşık 30µl 1+2 eklenip üzerleri parafilm ile kapatıldı. Nemli ortamda 70 dakika 37 °C de etüvde inkübe edildi. Daha sonra yeni bir şaleye PBS konularak 3x5 dakika yıkama yapıldı. DAPI ile çekirdek boyaması yapılarak 5 dakika oda sıcaklığında bekletilip beş dakika PBS ile yıkama yapıldı. Şaleden çıkarılan slaytlar peçete ile kurulanıp, üzerlerine Mounting Medium eklendi. Slaytlar uzun *cover slip* ile kapatılarak alüminyum folyo ile çevrili olan slayt kutularına kaldırıldı ve son olarak yaklaşık 45 dakika sonra *cover slip* etrafı ojeyle çevrilip, bir gece oda sıcaklığında kurutuldu. Belirtilen bölgelerde hasar çevresi dikkate alınarak apoptotik hücre sayıları değerlendirildi (Keleştemur ve ark. 2016).

### 3.6. Western Blot

20µg protein, 5ml 2X laemmlli örnek tamponu (1610737, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, Amerika) ve geri kalanı bidistile su olacak şekilde hazırlanan 10µl protein karışımı ısıtıcı tabla kullanılarak 95°C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra +4°C buz üzerine alındı.

4'lü dikey jel elektroforez tankı (1658004, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, Amerika) içerisine *mini-Protean TGX Precast* protein jeli (4569033, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, Amerika) yerleştirildi ve dikey elektroforez için gerekli olan tampon çözeltisi (25 mM Tris, 192 mM glisin, 0.1% sodyum dodesil sülfat (SDS), pH 8.3) (1610732, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, Amerika) eklendi. Protein örnekleri ve dikey elektroforezin süresini belirlemek için kullanılan protein işaretçisi *Precision Plus Protein-All blue standards* (163-0393, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, Amerika) jel içerisine yüklendi ve güç kaynağı (1645070, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, Amerika) kullanılarak proteinler ağırlıklarına göre ayrıldı.

Elektroforez sonunda proteinler jelden PVDF (Poli-viniliden florür) membrana (162-0174, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, Amerika) transfer edebilmek için transfer tampon solusyonu (Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, Amerika) hazırlandı. PVDF membran ve filtre kâğıtları (162-0219, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, Amerika), hazırlanan transfer tampon solusyonu içerisinde ıslatıldıktan sonra *trans-blot turbo* transfer sistemi (1704155, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, Amerika) kullanılarak moleküler ağırlıklarına göre ayrılmış olan proteinler jelden PVDF membrana aktarıldı. PDVD membran 50 mM Tris-Buffered Saline (TBS-T) (%0.1 Tween içeren tamponlanmış Tris saline) ile hazırlanan %5 yağsız süt tozu (sc-2325, Santa Cruz Biotechnology) ile oda ısısında 1 saat bloklandı. TBS-T ile yıkanan membranlar bir gece p-Erk1/2 (9101; Cell Signaling), p-PTEN (9554; Cell Signaling), GSK3 $\alpha$  $\beta$  (8566; Cell Signaling), MMP9 (AB38898; ABCAM), antikorları ile inkübe edildi. Ertesi gün membranlar TBS-T ile üç kere yıkandıktan sonra %5 yağsız süt tozu içerisinde *Horseradish* Peroksidaz enzimi ekli olan ikincil antikor (31460; Thermo Scientific) verildi. 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilen membranlar inkübasyon sonunda üç kere TBS-T ile yıkandıktan sonra 5 dakika ECL Western görüntüleme solüsyonu (1705060, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, Amerika) ile inkübe edilen membranlar Chemidoc MP görüntüleme sistemi (1708280, Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, Amerika) kullanılarak görüntülendi.

Western Blot yöntemi ile elde edilen jel görüntüleri bilgisayar programı (Image J; National Institute of Health, Bethesda, MD, Amerika), yardımıyla analiz edildi. Jel

görüntüleri program yardımıyla sırasıyla 8 bit formatına çevrildikten sonra bantların yoğunlukları hesaplandı (Beker ve ark. 2015).

### 3.7. İstatistik

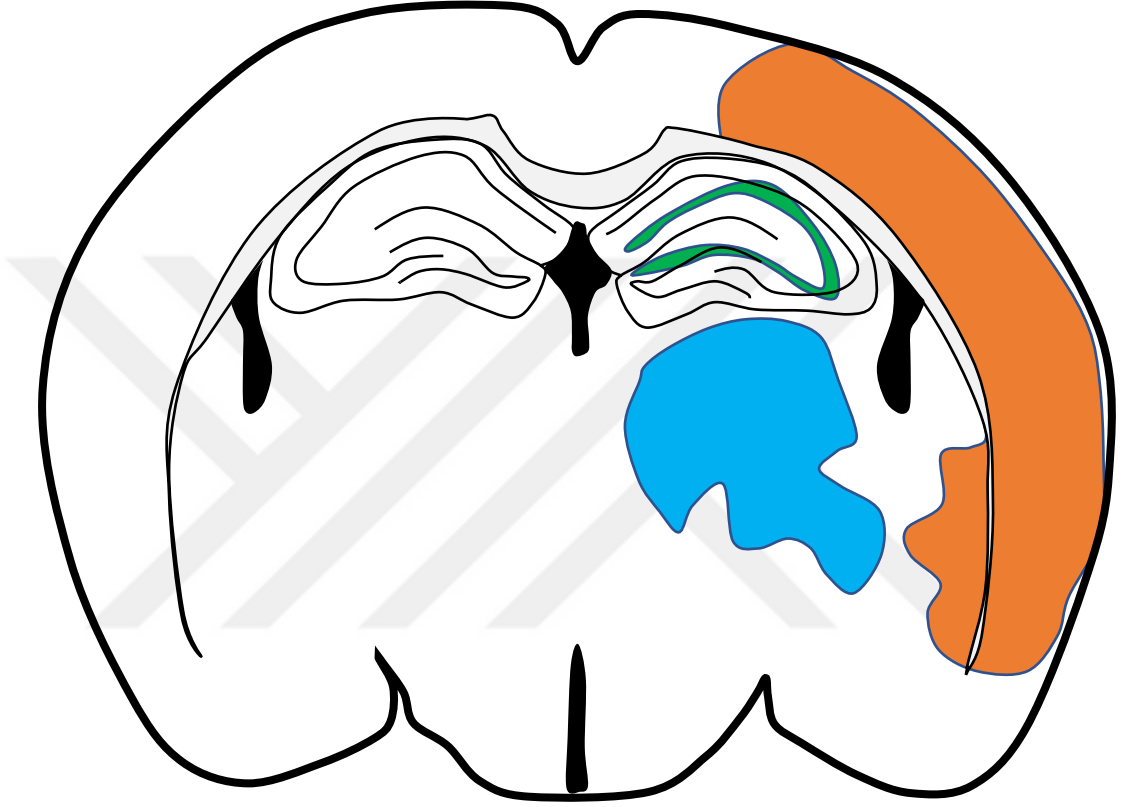
Gruplardaki hayvan sayısının belirlenmesinde "Power Analiz" programı kullanılmış olup n sayısı 10 olarak bulunmuştur. Çalışmamız sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesi amacıyla SPSS ANOVA istatistik analiz sistemi kullanılmıştır. Gruplar arasındaki anlamlılığı bulmak için One Way ANOVA'da LSD testi yapılmıştır.



## 4. Bulgular

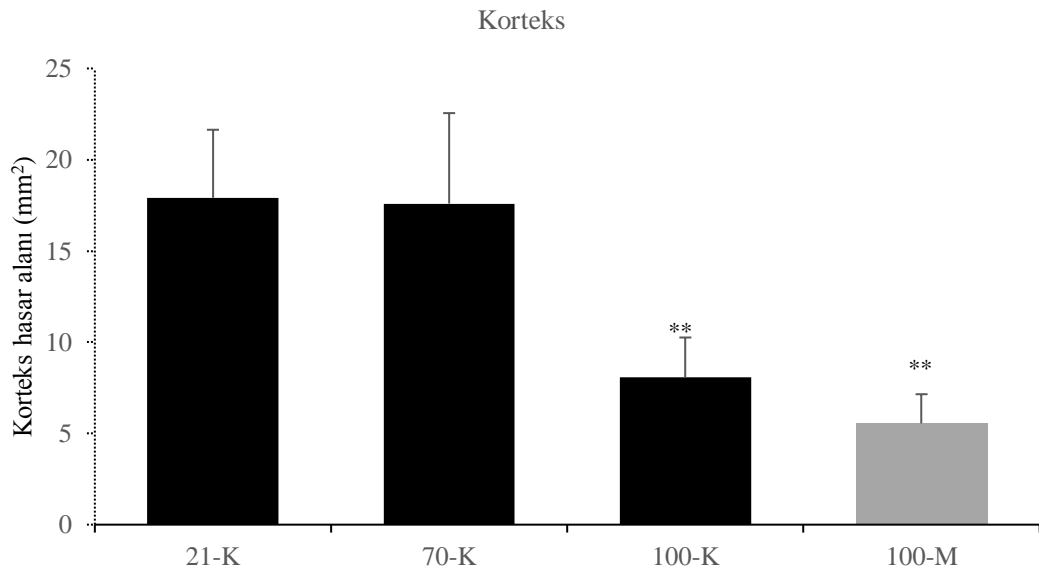
### 4.1. Hasar Alanı Dağılımı

%21 oksijen grubu ve tedavi gruplarında hasar alanı hipoksi iskemi hasarından sonra korteks (turuncu), hipokampüs (yeşil) ve subhipokampal (mavi) bölgelerinde (Şekil 12) akut dönemde 48. saatte ölçüldü.



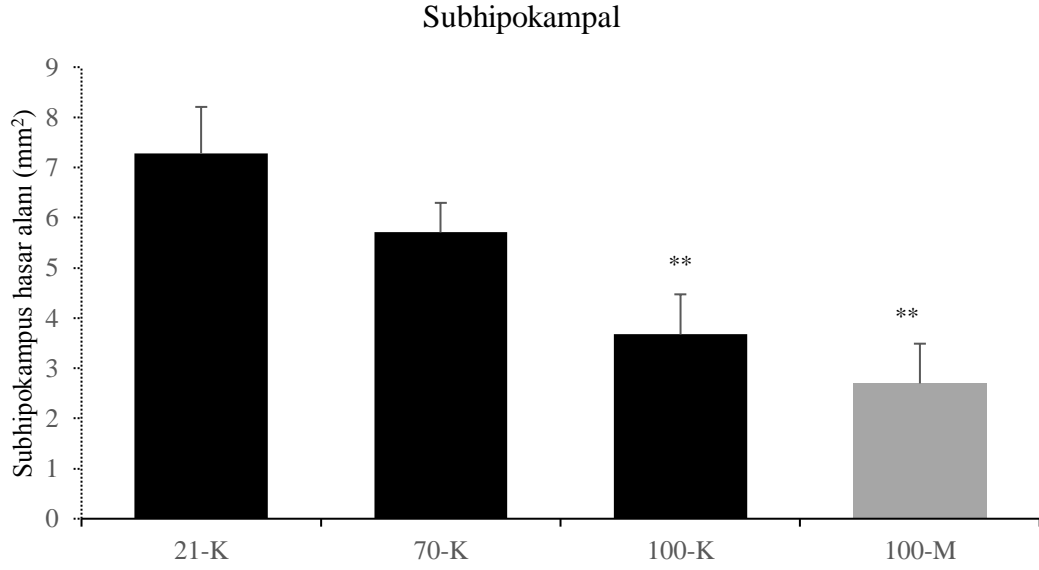
Şekil 12. Alınan koronal kesitlerden hasar alanının ölçüldüğü bölgeler.

Korteks bölgesindeki hasar alanı %21 oksijen grubunda  $17.91 \pm 3.72 \text{ mm}^2$  olarak ölçüldü ve özellikle %100 Oksijen-Melatonin kombinasyon grubunda hasar alanında yarıya yakın bir azalma görüldü. %70 Oksijen grubunda  $17.59 \pm 4.95 \text{ mm}^2$  ve %100 oksijen grubunda  $8.06 \pm 2.09 \text{ mm}^2$  ölçülürken %100 Oksijen+Melatonin kombinasyonunda  $5.54 \pm 1.59 \text{ mm}^2$  olarak ölçüldü (Şekil 13). %21 Oksijen grubu ile karşılaştırıldığında, hem %100 Oksijen hem de %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ortaya çıktı ( $p < 0.05$ ).



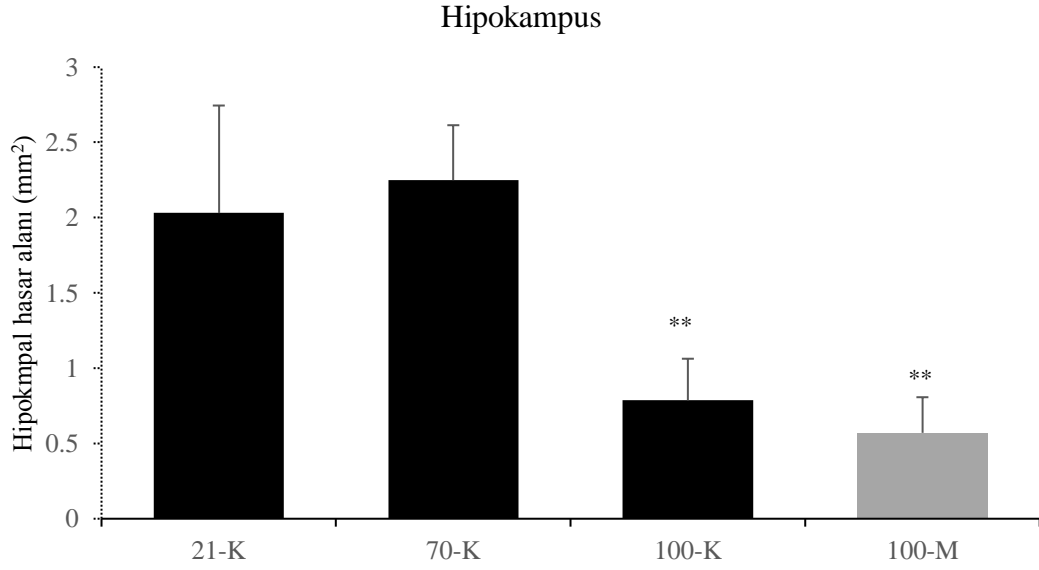
Şekil 13. Koronal kesitlerden hesaplanan korteks bölgesinde hasar alanı. Yapılan analiz sonucunda %100 Oksijen ve %100 Oksijen-Melatonin kombinasyon grubunda %21 Oksijen grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde hasar alanında azalma görülmüştür. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.  $p < 0.05$

Subhipokampal bölge değerlendirildiğinde %21 Oksijen grubundaki hasar alanı  $7.28 \pm 0.92$  olarak ölçülürken %70 Oksijen grubunda  $5.7 \pm 0.58$ , %100 Oksijen grubunda  $3.67 \pm 0.79$  ve %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon grubunda  $2.69 \pm 0.79$  olarak ölçüldü. İstatistiksel olarak analiz edildiğinde %100 Oksijen-Melatonin kombinasyon grubunda %21 Oksijen grubuna kıyasla hasar alanında %50 oranında bir azalma olduğu görüldü ( $p < 0.05$ , Şekil 14).



Şekil 14. Koronal kesitlerden hesaplanan subhipokampus bölgesinde hasar alanı. Yapılan analiz sonucunda hem %100 Oksijen hem de %100 Oksijen-Melatonin kombinasyonunda anlamlı bir azalma görüldü. Sonuçlar ortalama±SD olarak verilmiştir.  $p<0.05$

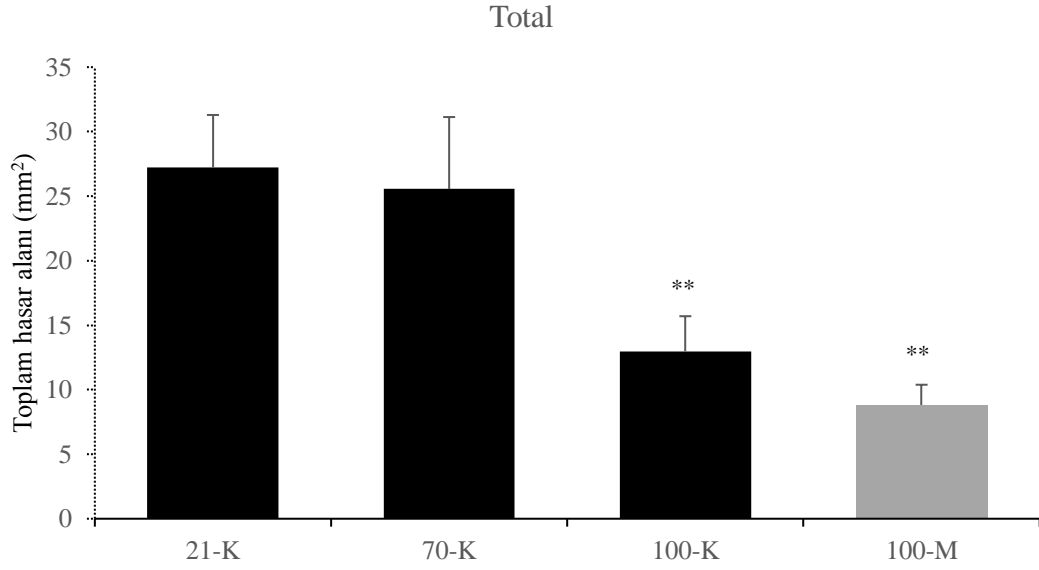
Hipokampus bölgesinde de %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon grubunun %21 Oksijen grubuna kıyasla hasar alanını çok daha fazla azalttığı belirlendi. %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon grubunda hasar alanı  $0.57\pm 0.23$  iken %21 Oksijen grubunda  $2.03\pm 0.71$  olarak ölçüldü. Hipokampus bölgesindeki hasar alanı %70 Oksijen tedavisi grubu  $2.24\pm 0.36$  ve %100 Oksijen grubu ise  $0.78\pm 0.27$  olarak tayin edildi. Toplam hasar alanı değerlendirildiğinde %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon grubunda hasar alanı %21 Oksijen grubuna kıyasla %70 oranında azalmıştı ( $p<0.05$ , Şekil 15).



Şekil 15. Koronal kesitlerden hesaplanan hipokampus bölgesinde hasar alanı. Yapılan analiz sonucunda %100 Oksijen+Melatonin kombinasyonunda %21 Oksijen grubuna kıyasla %75 dolayında hasar dağılımında anlamlı bir azalma görüldü. Sonuçlar ortalama±SD olarak verilmiştir.  $p<0.05$

Toplam hasar alanına göz önüne alındığında %100 Oksijen+Melatonin uygulanmasının hasar alanını %21 Oksijen grubuna kıyasla yaklaşık %70 olarak azalttığı gözlemlendi. Total hasar alanı %21 Oksijen grubunda  $27.22\pm 4.06$ , %70 Oksijen grubunda  $25.55\pm 5.5$ , %100 Oksijen grubunda  $12.96\pm 2.72$  olarak ölçülürken, %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon grubunda  $8.81\pm 1.56$  olarak ölçüldü (Şekil 16). İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde, %21 Oksijen grubuyla karşılaştırıldığında hem %100 Oksijen grubunda hem de %100 Oksijen+Melatonin grubunda anlamlı bir azalma ortaya çıktı ( $p<0.005$ ).

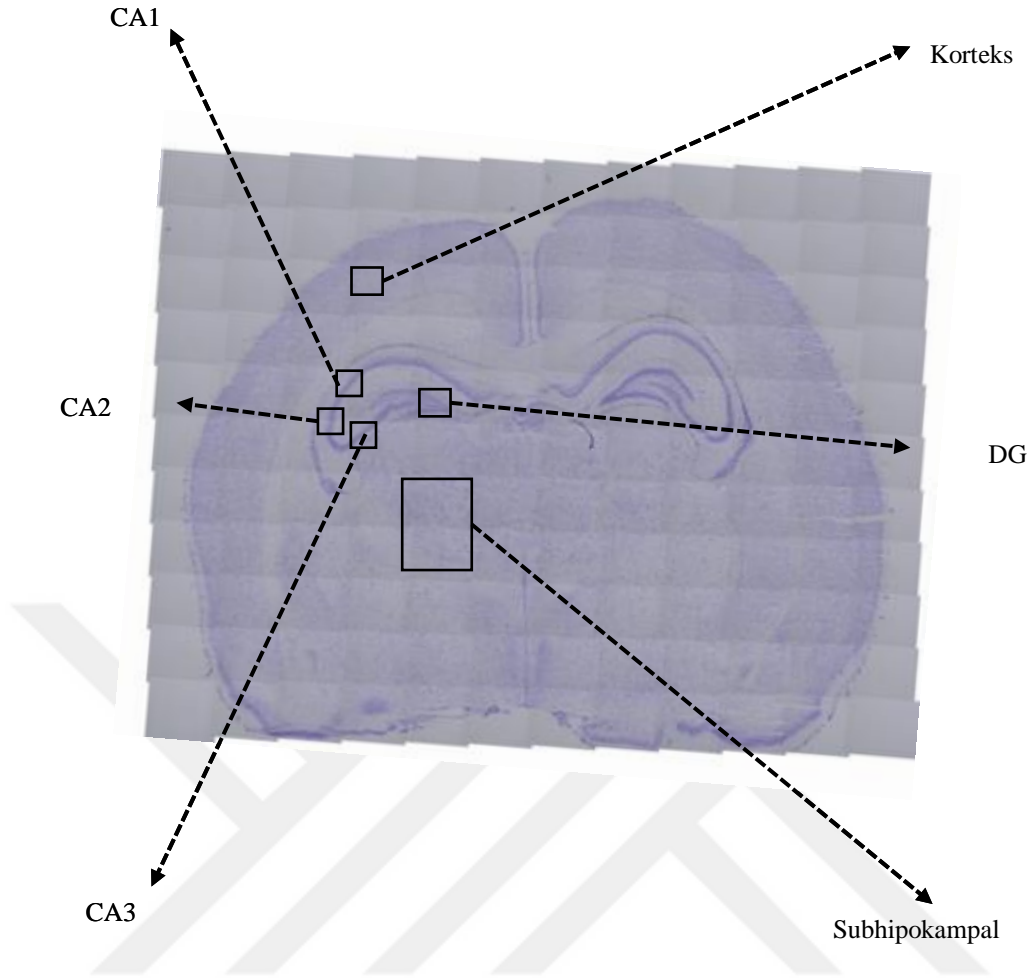




Şekil 16. Koronal kesitlerden hesaplanan total hasar alanı. Total beyin hasar dağılımına bakıldığında %100 Oksijen ve %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon gruplarında hasar dağılımını çok yüksek oranda anlamlı olarak azalttıkları gözlemlendi ( $p<0.05$ ). Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

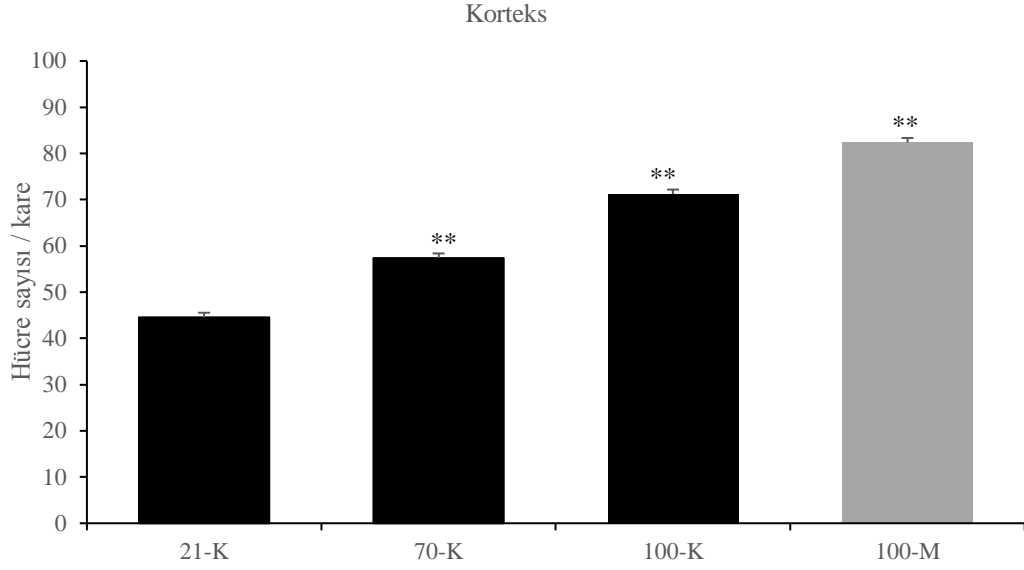
#### 4.2. Hücresel Sağ Kalım Analizi

Hİ sonrası meydana gelen hasarı hücresel boyutta incelemek için bregma -3.60 seviyesinden alınan koronal kesitlere *cresyl violet* boyaması yapıldı ve her kesitten korteks, subhipokampal bölge, dentat girus (DG), CA1, CA2 ve CA3 olmak üzere altı farklı bölgeden (Şekil 17) hücre sağ kalım analizi yapıldı.



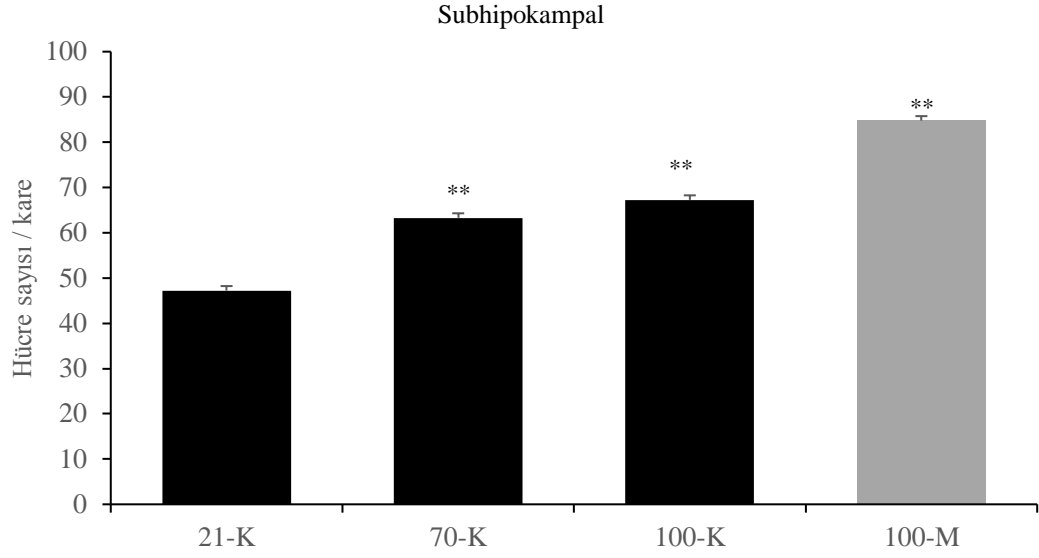
Şekil 17. Hücre sağ kalım analizlerinin yapıldığı bölgeler. DG, (dentat girus).

Korteks bölgesinde yapılan hücre sağ kalım analizinde artan oksijen konsantrasyonuna paralel olarak hayatta kalan hücre sayısının da arttığı gözlemlendi. %21 Bu sayı oksijen verilen hayvanların korteks bölgesinde ortalama  $44.54 \pm 9.41$ , %70 oksijen konsantrasyonunda  $57.36 \pm 3.48$ , %100 Oksijen grubunda  $71.18 \pm 2.09$  ve son olarak %100 Oksijen+Melatonin konsantrasyonunda  $82.35 \pm 5.08$  olarak ölçüldü (Şekil 18). %70 Oksijen, %100 Oksijen ve %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon grubunda istatistiksel olarak anlamlılık bulundu ( $p < 0.05$ ).



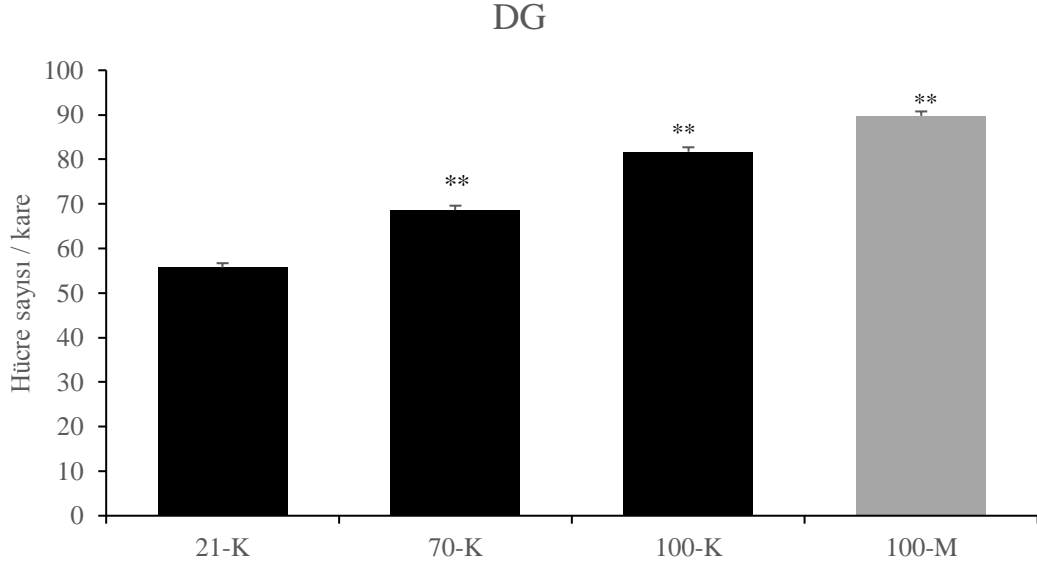
Şekil 18. Korteks bölgesinde hesaplanan hücresel sağ kalım analizi. Tedavi gruplarında %21 Oksijen grubuna kıyasla anlamlı bir hücresel sağ kalım gözlenmektedir. Sonuçlar ortalama±SD olarak verilmiştir.  $p < 0.05$

Subhipokampal bölgede yapılan analizde %100 Oksijen+Melatonin kombinasyonunda %21 Oksijen grubuna kıyasla %45'e yakın bir artış görüldü. %100 Oksijen+Melatonin grubunda yaşayan hücre sayısı  $84.75 \pm 7.29$  olarak ölçülürken %21 Oksijen grubunda  $47.21 \pm 6.78$  ölçülmüştür. %70 Oksijen grubunda  $63.29 \pm 1.73$  ve %100 Oksijen grubunda  $67.25 \pm 3.17$  sağ kalan hücre tespit edildi (Şekil 19). Tedavi gruplarındaki hücre sayısı anlamlı şekilde daha yüksek bulundu ( $p < 0.05$ ).



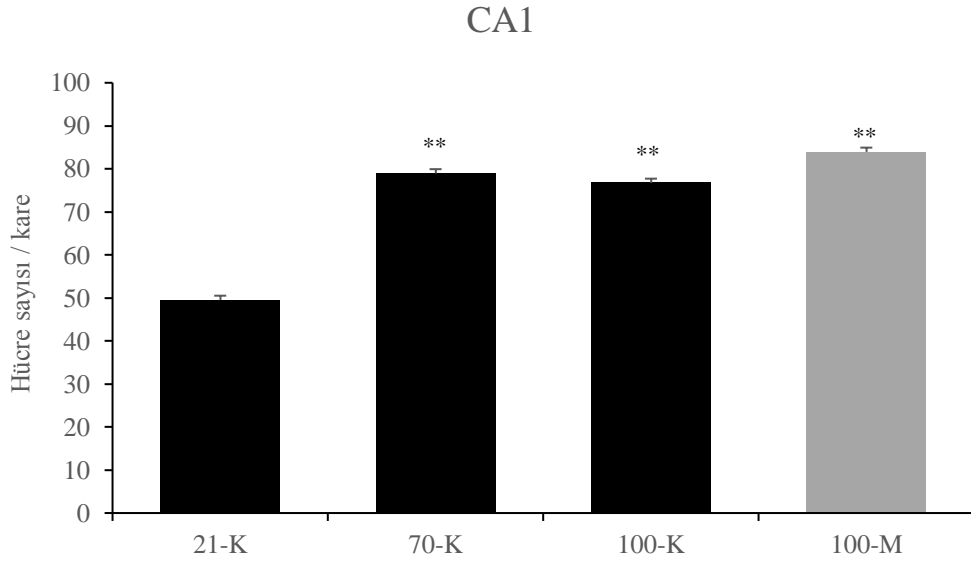
Şekil 19. Subhipokampal bölgesinde hesaplanan hücresel sağ kalım analizi. Sonuçlar ortalama±SD olarak verilmiştir.  $p<0.05$

Dentat girus bölgesindeki yaşayan hücre sayısı değerlendirildiğinde bu değer %70 Oksijen, %100 Oksijen ve %100 Oksijen+Melatonin gruplarında %21 Oksijen grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi ( $p<0.05$ ). %21 Oksijen grubunda yaşayan hücre sayısı  $55.68\pm3.92$ 'de kalırken %70 oksijen grubunda  $68.60\pm3.52$ , %100 Oksijen grubunda  $81.71\pm3.42$  ve %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon grubunda  $89.75\pm2.23$  olarak ölçülmüştür (Şekil 20).



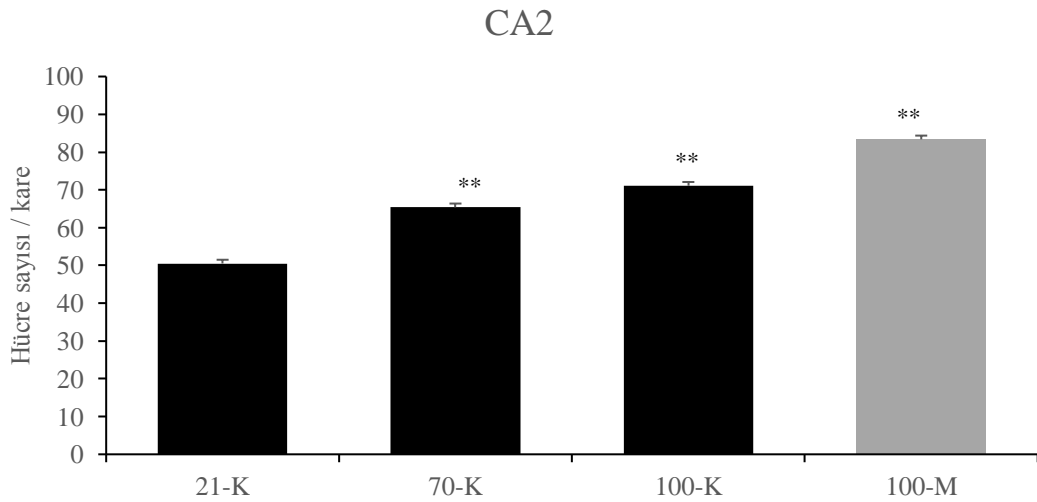
Şekil 20. Dentat girus bölgesinde hesaplanan hücresel sağ kalım analizi. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.  $p<0.05$

Hipokampus bölgesi içerisinde yer alan CA1, CA2 ve CA3 bölgelerinde de aynı şekilde artan Oksijen konsantrasyonuna bağlı olarak hücresel sağ kalımının arttığı gözlemlendi. Bu değer CA1 bölgesinde %21 Oksijen grubunda  $49.51\pm 6$ , %70 Oksijen grubunda  $78.92\pm 2.97$ , %100 Oksijen grubunda  $76.71\pm 4.74$  ve %100 Oksijen-Melatonin kombinasyonu grubunda  $83.92\pm 8.5$  olarak ölçüldü (Şekil 21). Tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış ortaya çıktı ( $p<0.05$ ).



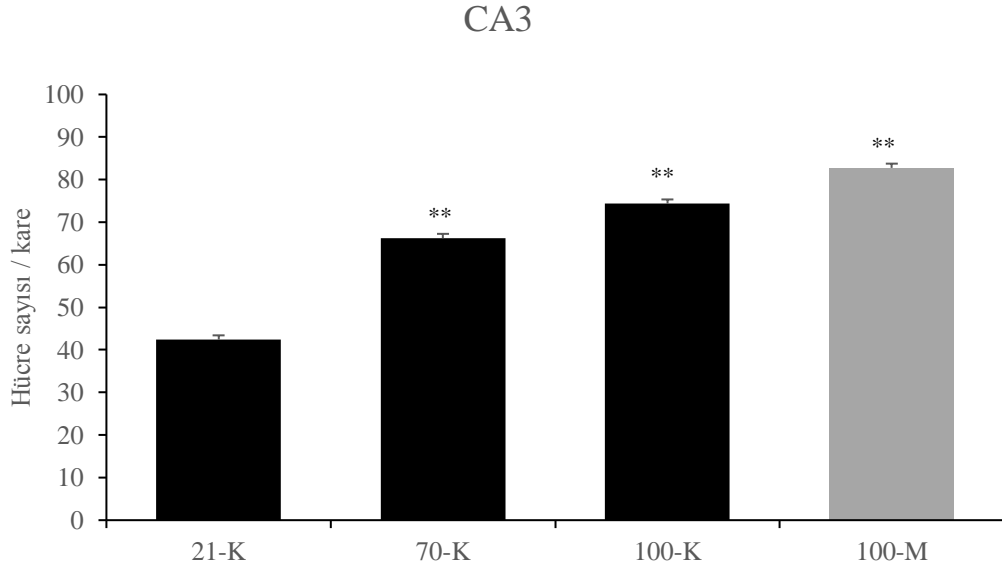
Şekil 21. CA1 bölgesinde hesaplanan hücresel sağ kalım analizi. Sonuçlar ortalama±SD olarak verilmiştir.  $p < 0.05$

CA2 bölgesindeki hücresel sağ kalım analizinde %21 Oksijen grubunda yaşayan hücre sayısı  $50.50 \pm 5.99$  olarak ölçüldü. %70 Oksijen grubunda  $65.38 \pm 3.81$ , %100 Oksijen grubunda  $71.08 \pm 5.25$  ve %100 Oksijen-Melatonin kombinasyon grubunda ise  $83.36 \pm 5.35$  olarak gözlemlendi (Şekil 22). Bütün tedavi gruplarında %21 Oksijen grubuna kıyasla anlamlı değişiklikler belirlendi ( $p < 0.05$ ).



Şekil 22. CA2 bölgesinde hesaplanan hücresel sağ kalım analizi. Sonuçlar ortalama±SD olarak verilmiştir.  $p < 0.05$

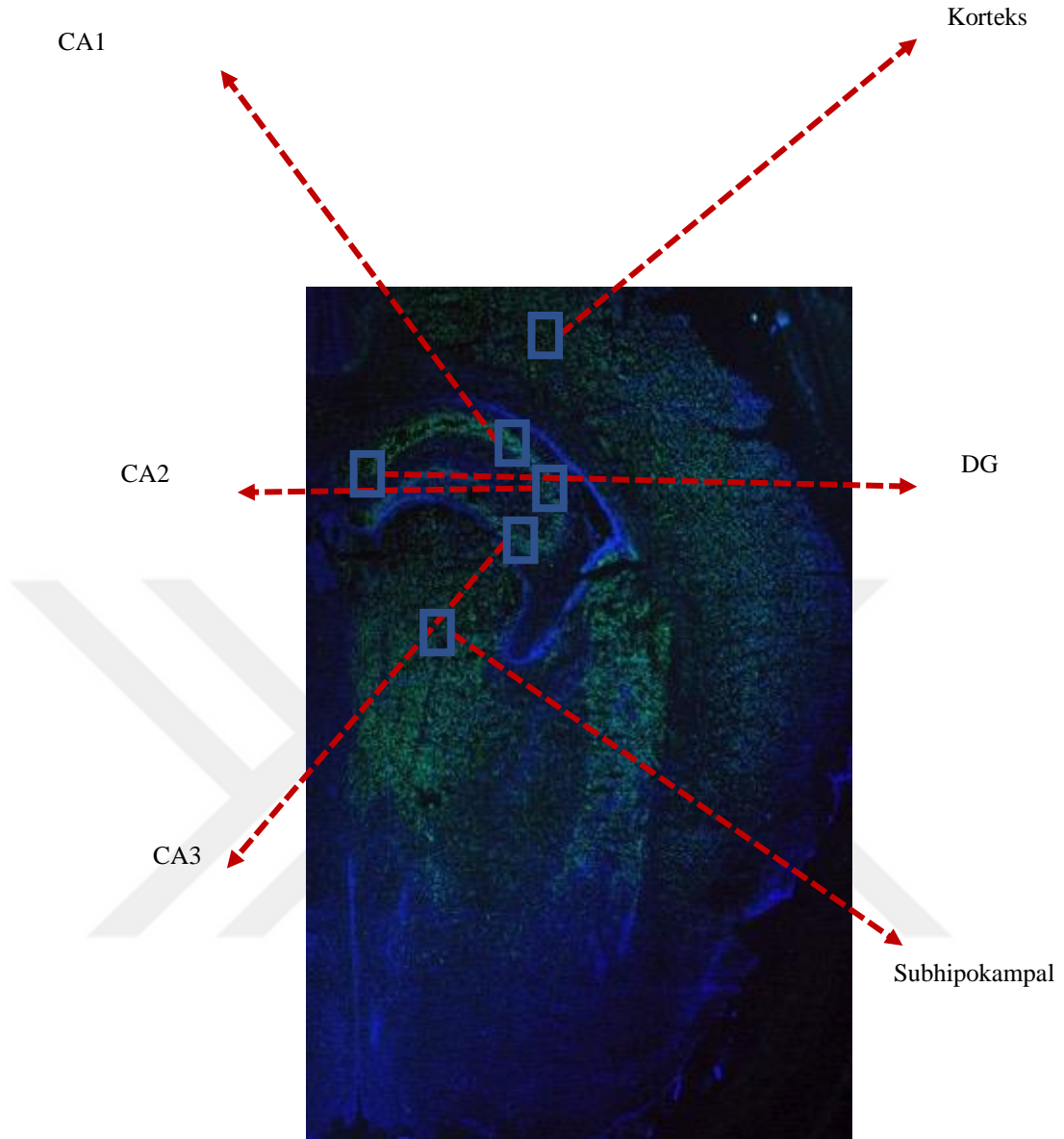
Hücre sağ kalım analizinde son olarak CA3 bölgesi incelendi ve yaşayan hücre sayısı %21 Oksijen grubunda  $42.41 \pm 12.08$  olarak ölçülürken %70 Oksijen grubunda  $66.25 \pm 3.03$ , %100 Oksijen grubunda  $74.33 \pm 3.16$  ve %100 Oksijen-Melatonin kombinasyon grubunda  $82.74 \pm 4.57$  hücrenin sağ kaldığı belirlendi (Şekil 23).



Şekil 23. CA3 bölgesinde hesaplanan hücre sağ kalım analizi.  $p < 0.05$ . Sonuçlar ortalama  $\pm$  SD olarak verilmiştir.

#### 4.3. Apoptoz

Bregma -3.60 seviyesinden alınan kesitlere, hipoksik iskemi sonrası hayvanlardaki apoptotik hücre analizinin yapılması için TUNEL uygulaması yapıldı. Korteks, subhipokampus, DG, CA1, CA2 ve CA3 bölgelerinde apoptotik hücre sayımı gerçekleştirildi (Şekil 24). Özellikle analiz yapılan bütün bölgelerde %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon grubunda apoptotik hücre sayısında anlamlı bir şekilde azalma görüldü.

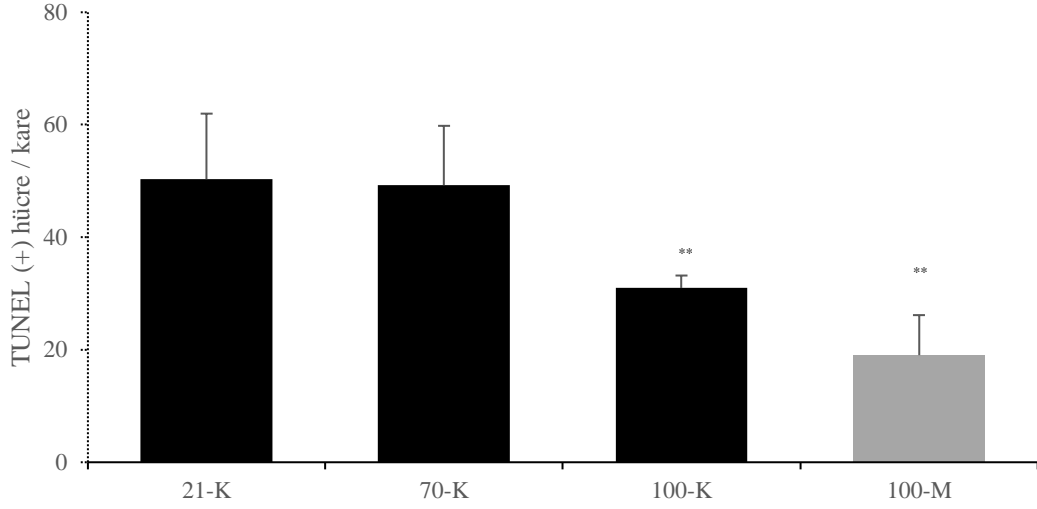


Şekil 24. Apoptotik hücre analizinin alınan beyin kesitindeki gösterimi.

Korteks bölgesinde yapılan apoptotik hücre analizinde %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon grubunda %21 Oksijen grubuna kıyasla apoptotik hücre sayısının yarı yarıya azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 25). %21 Oksijen grubunda  $50.32 \pm 11$ , %70 Oksijen grubunda  $49.26 \pm 10.54$ , %100 Oksijen grubunda  $30.97 \pm 2.22$  ve son olarak %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon grubunda  $19.03 \pm 7.12$  hücre sayıldı.



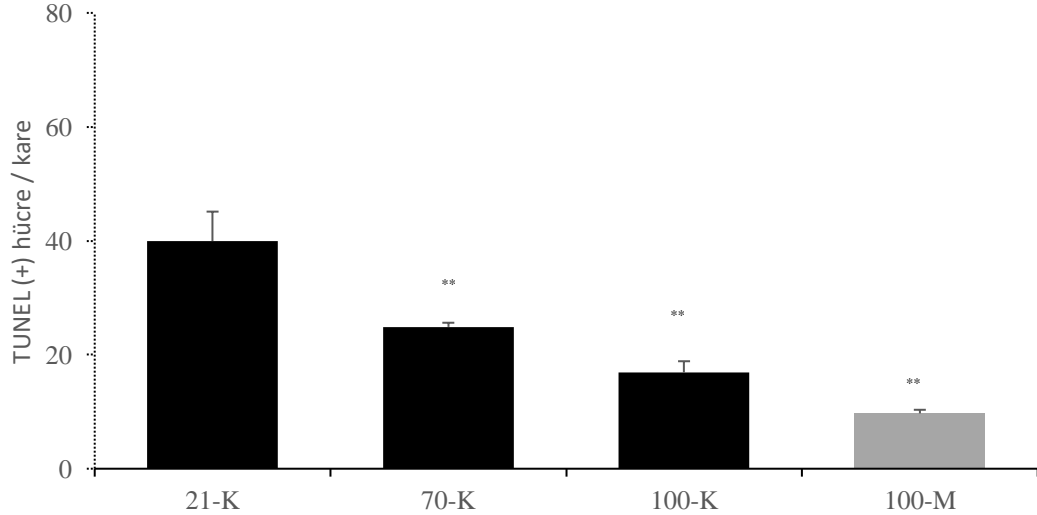
## Korteks



Şekil 25. Korteks bölgesinde apoptotik hücre analizinin dağılımı. Sonuçlar ortalama±SD olarak verilmiştir.  $p<0.05$

Subhipokampal bölgesinde yapılan analiz sonucuna göre ise %70, %100 Oksijen ve %100 Oksijen-Melatonin kombinasyon gruplarının hepsinde %21 Oksijen grubuna göre anlamlı bir azalma görüldü (Şekil 26).

## Subhipokampal

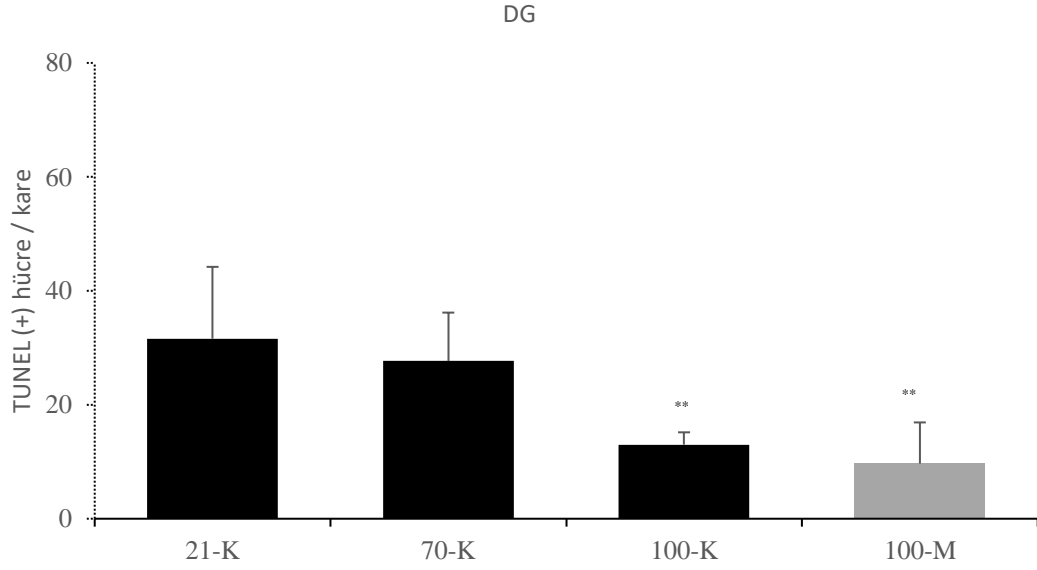


Şekil 26. Subhipokampal bölgesinde apoptotik hücre analizinin dağılımı. Sonuçlar ortalama±SD olarak verilmiştir.  $p<0.05$

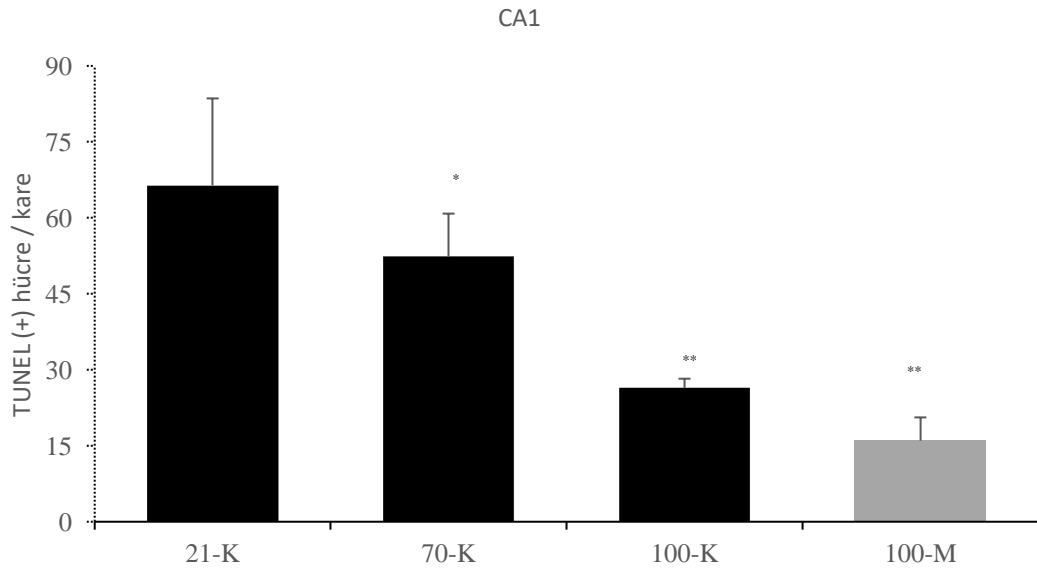
DG bölgesinde yapılan apoptotik hücre sayısında tedavi gruplarında hasar gören hücre sayısında ciddi bir azalma görüldü. Tedavi gruplarından %100 Oksijen-Melatonin kombinasyon grubunda  $9.66\pm7.22$  hücre sayılırken, %100 Oksijen

grubunda  $13\pm 2.1$ , %70 Oksijen grubunda  $27.66\pm 8.5$  ve son olarak %21 Oksijen grubunda  $31.6\pm 12.6$  apoptotik hücre sayıldı (Şekil 27).

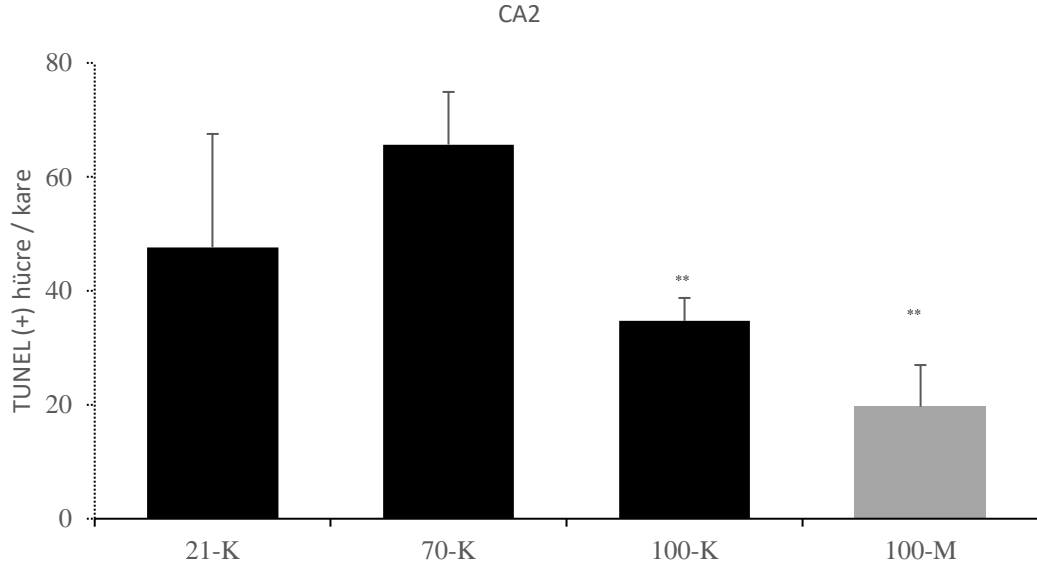
CA1, CA2 ve CA3 bölgelerinde yapılan apoptotik hücre analizi sonrasında tedavi gruplarında %21 Oksijen uygulanan hayvanlara nazaran ölen hücre sayısında ciddi bir düşüş görüldü. CA1 bölgesinde %21 Oksijen uygulanan gruba apoptotik hücre sayısı  $66.4\pm 17.18$  olarak bulunurken %70 Oksijen grubunda  $52.33\pm 8.5$ , %100 Oksijen grubunda  $26.42\pm 1.81$  ve %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon grubunda  $16\pm 8.6$  ölen hücre tespit edildi (Şekil 28). CA2 bölgesi değerlendirildiğinde %21 Oksijen grubunda  $47.6\pm 19$ , %70 Oksijen grubunda  $65.66\pm 9.23$ , %100 Oksijen uygulanan hayvanlarda  $34.71\pm 4.02$  ve %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon grubunda ölen hücre sayısı  $19.66\pm 7.3$  olarak sayıldı (Şekil 29). Son olarak hipokampusun CA3 bölgesinde %21 Oksijen grubunda  $51.5\pm 11$ , %70 Oksijen grubunda  $33\pm 11.35$ , %100 Oksijen  $25.85\pm 5.3$  ve %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon grubunda  $12\pm 6.1$  olarak ölçüldü (Şekil 30).



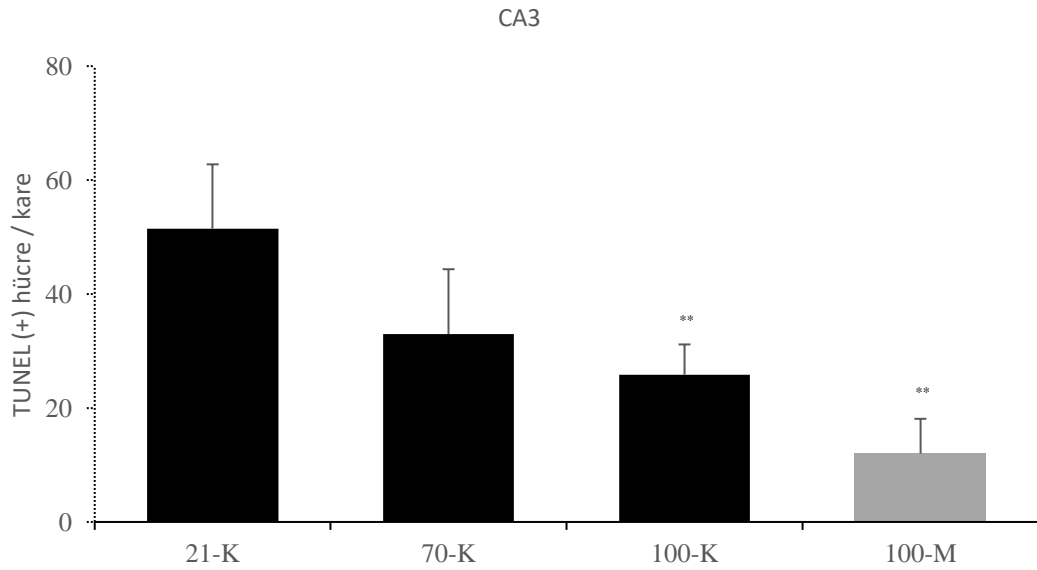
Şekil 27. Subhipokampal bölgesinde apoptotik hücre analizinin dağılımı. %100 Oksijen ve %100 Oksijen-Melatonin kombinasyonu uygulanan hayvanlarda %21 Oksijen grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş görülmektedir. Sonuçlar ortalama±SD olarak verilmiştir.  $p<0.05$



Şekil 28. CA1 bölgesinde apoptotik hücre analizinin dağılımı. %100 Oksijen ve %100 Oksijen-Melatonin kombinasyonu uygulanan hayvanlarda %21 Oksijen grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş görülmektedir. Sonuçlar ortalama±SD olarak verilmiştir.  $p<0.05$



Şekil 29. CA2 bölgesinde apoptotik hücre analizinin dağılımı. %100 Oksijen ve %100 Oksijen-Melatonin kombinasyonu uygulanan hayvanlarda %21 Oksijen grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş görülmektedir. Sonuçlar ortalama±SD olarak verilmiştir.  $p<0.05$



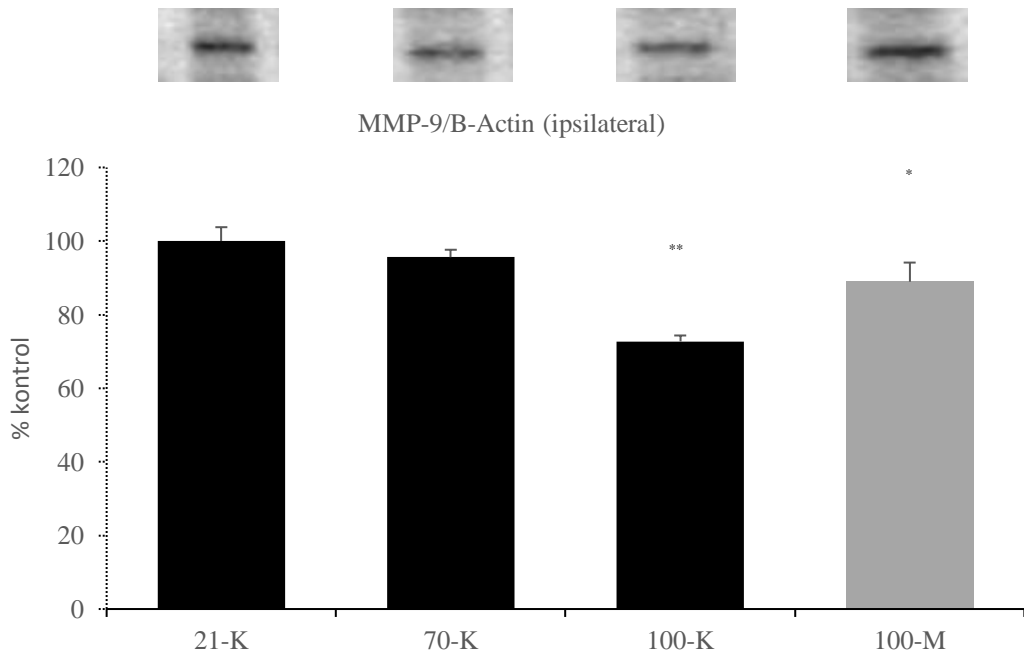
Şekil 30. CA3 bölgesinde apoptotik hücre analizinin dağılımı. %100 Oksijen ve %100 Oksijen-Melatonin kombinasyonu uygulanan hayvanlarda %21 Oksijen grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş görülmektedir. Sonuçlar ortalama±SD olarak verilmiştir.  $p<0.05$

#### 4.4. Protein Analizi

Hipoksi iskemi hasarından sonra hücresel sağ kalım ile ilgili yollara normobarik oksijen ve melatoninin etkilerinin araştırılması bakımından iskemik

dokuya Western blot protein analizi yapıldı. Dokularda *matriks metalloproteinaz-9* (MMP9), *ekstra cellular regulated kinase* (Erk1/2), glikojen sentez kinase-3 (GSK-3), fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN) protein seviyeleri analiz edildi.

MMP9 seviyesi, %100 Oksijen ve %100 Oksijen-Melatonin kombinasyon gruplarında %21 Oksijen grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü. %21 Oksijen grubunun protein seviyesi %100 kabul edilip diğer gruplar arasında kıyaslama yapılmıştır. Buna göre %100 Oksijen verilen grup %70 seviyelerine düşerken, %100 Oksijen-Melatonin kombinasyon grubu %88 seviyelerine düştüğü görüldü (Şekil 31).

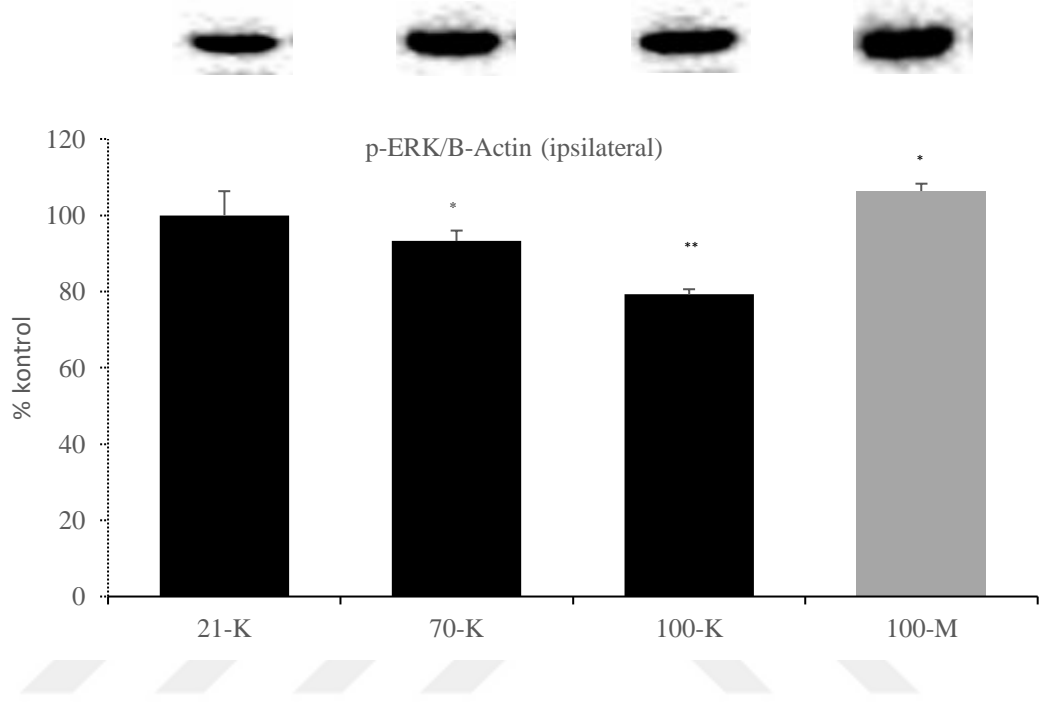


Şekil 31. Hipoksi iskemi sonrası Oksijenin MMP9 anlatımına etkisi. Sonuçlar ortalama±SD olarak verilmiştir.  $p < 0.05$

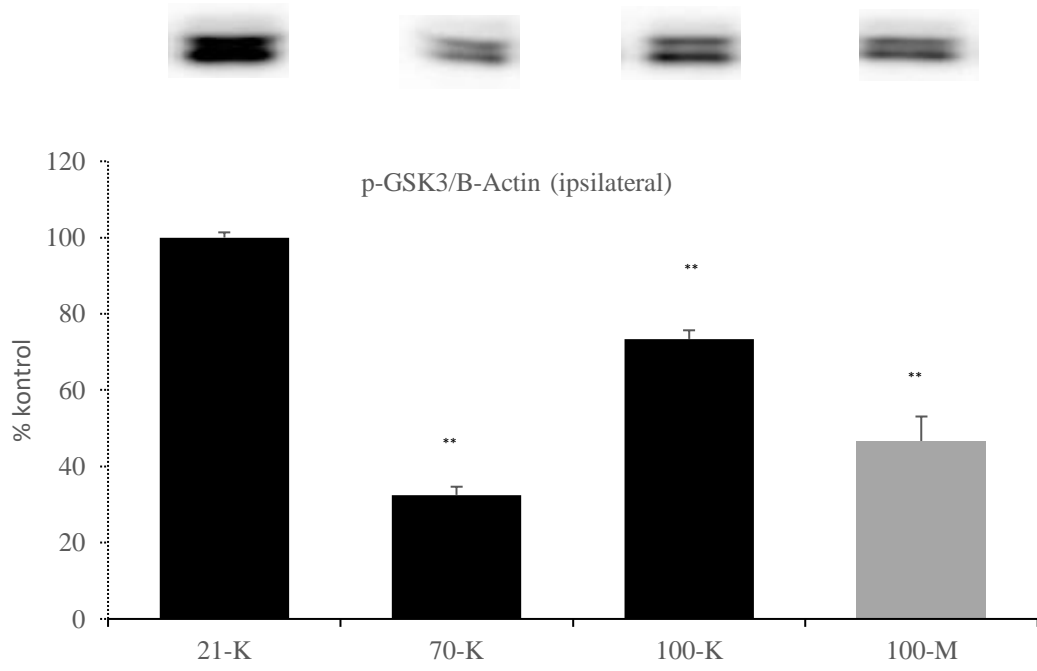
Hipoksi iskemi sonrası Erk1/2 protein seviyelerini incelendiğinde artan oksijen konsantrasyonuna bağlı olarak protein seviyelerinin düştüğü ancak sadece %100 Oksijen-Melatonin kombinasyon grubunda hafif bir artış olduğu görüldü. %70 Oksijen grubu %93 seviyelerine düşerken, %100 Oksijen uygulanan grupta bu değer %79 olarak ölçüldü. Ancak %100 Oksijen-Melatonin kombinasyonu uygulanan hayvanlarda Erk1/2 protein seviyesi %106 olarak ölçüldü (Şekil 32).

Fosforlanmış GSK3 $\beta$  protein seviyelerine bakıldığında hipoksi iskemi hasarından sonra artan oksijen konsantrasyonunda genel olarak GSK3 $\alpha$  protein

anlatımının azaldığı görüldü. %70 Oksijen verilen grupta GSK3 $\alpha\beta$  anlatımı %32 seviyelerine düşerken %100 Oksijen konsantrasyon uygulanan grupta bu seviye %46 olarak ölçüldü (Şekil 33).

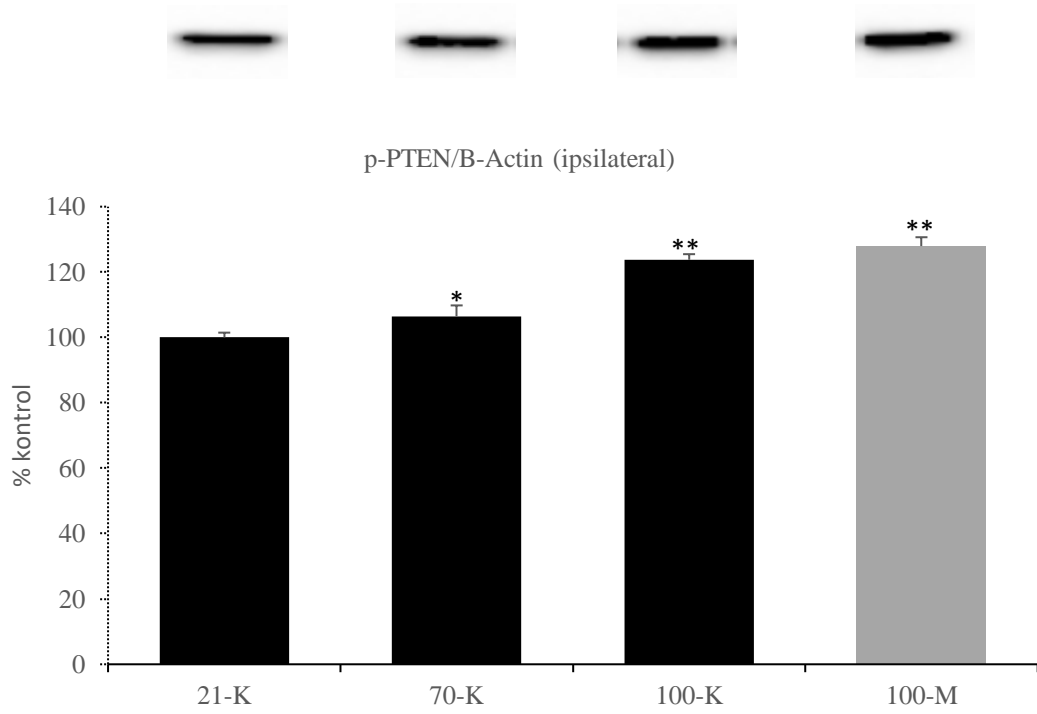


Şekil 32. Hipoksi iskemisi sonrası Oksijenin Erk1/2 anlatımına etkisi. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.  $p < 0.05$



Şekil 33. Hipoksi iskemi sonrası Oksijenin GSK3 $\alpha$ β anlatımına etkisi. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir. p<0.05

Hipoksi iskemi sonrası dokularda PTEN fosforilasyonuna bakıldığında artan oksijen konsantrasyonuna paralel olarak PTEN anlatımının anlamlı bir şekilde yükseldiği gözlemlendi. %70 Oksijen grubunda %106, %100 Oksijen uygulanan grupta %123 ve son olarak %100 Oksijen-Melatonin kombinasyon grubunda %127 olarak PTEN protein anlatımı ölçüldü (Şekil 34).



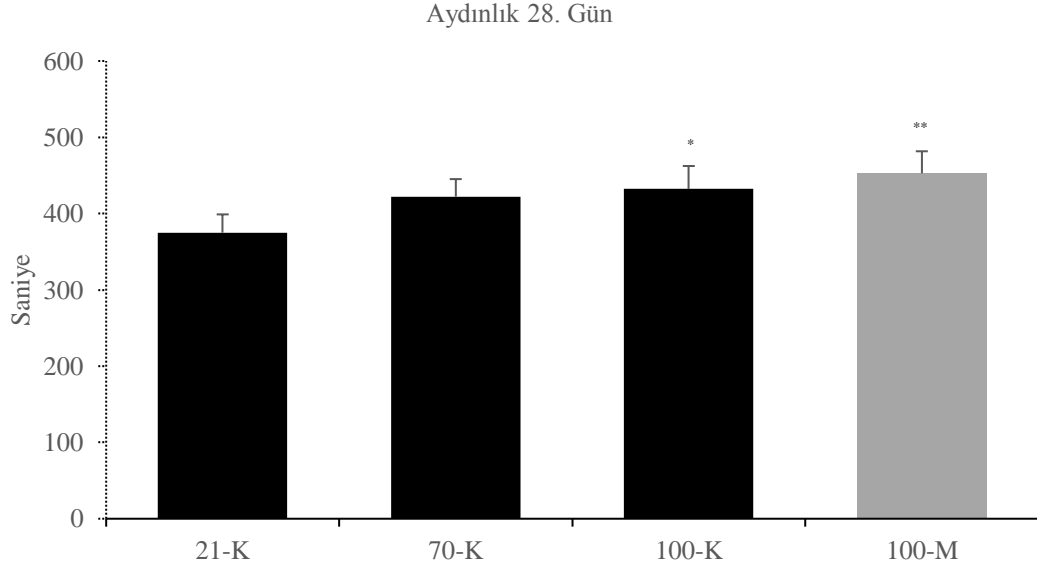
Şekil 34. Hipoksi iskemi sonrası Oksijenin p-PTEN anlatımına etkisi. Sonuçlar ortalama±SD olarak verilmiştir.  $p < 0.05$

#### 4.5. Davranış Testleri

##### 4.5.1. Aydınlik Karanlık Testi

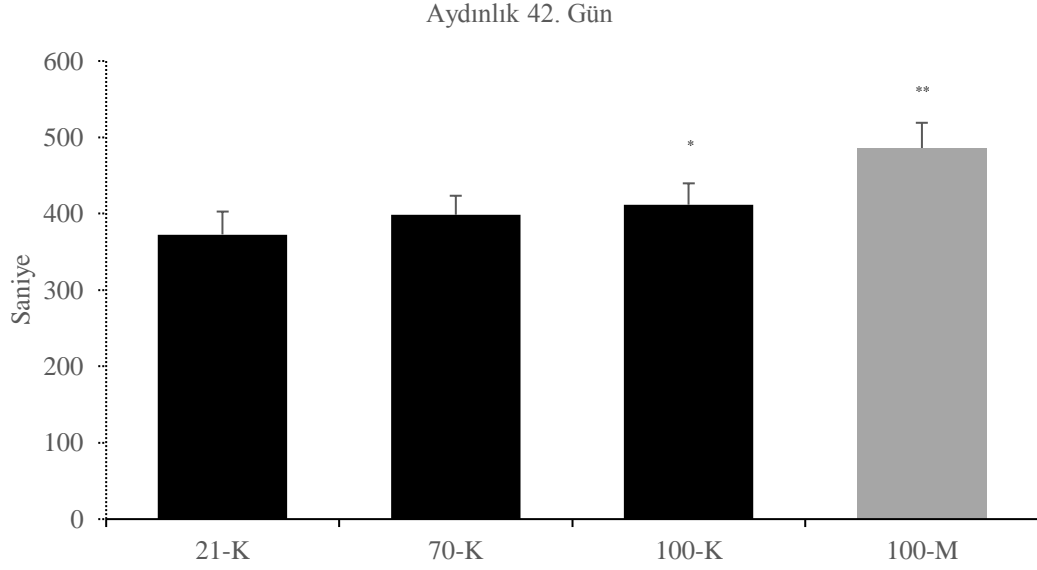
Hipoksi iskemi hasarından sonra yapılan aydınlık karanlık testinde sıçanlar 600 saniye boyunca kamera ile izlendi. Hipoksi iskemi geçirip %21 Oksijen uygulaması yapılan hayvanlar daha çok karanlıkta kalma eğilimi gösterirken artan Oksijen konsantrasyonuna bağlı olarak hasardan sonra hem 28. günde (Şekil 35) hem de 42. günde (Şekil 36) aydınlıkta geçirdikleri süreler artmaktadır.





Şekil 35. Aydınlik-karanlık testinde hayvanların 28. günde aydınlık alanda geçirdikleri süreler. Artan Oksijen konsantrasyonuna paralel olarak hayvanların aydınlık alanda geçirdikleri süreler artmaktadır. %21 Oksijen grubunda ortalama  $374 \pm 24$  saniye kalırken bu süre %70 Oksijen grubunda  $422.3 \pm 23$ , %100 Oksijen grubunda  $432.36 \pm 30$  ve %100 Oksijen-Melatonin kombinasyon grubunda  $452.66 \pm 29$  saniye olarak ölçülmüştür. Sonuçlar ortalama  $\pm$ SD olarak verilmiştir.  $p < 0.05$

Hasardan 42 gün sonra yapılan aydınlık karanlık testinde %21 Oksijen grubunda hayvanlar  $372.81 \pm 30$ , %70 Oksijen grubunda  $398.53 \pm 25$ , %100 Oksijen grubunda  $411.76 \pm 28$  ve %100 Oksijen-Melatonin kombinasyon grubunda  $486.07 \pm 33$  saniye sıçanların aydınlık alanda kaldıkları gözlemlendi.



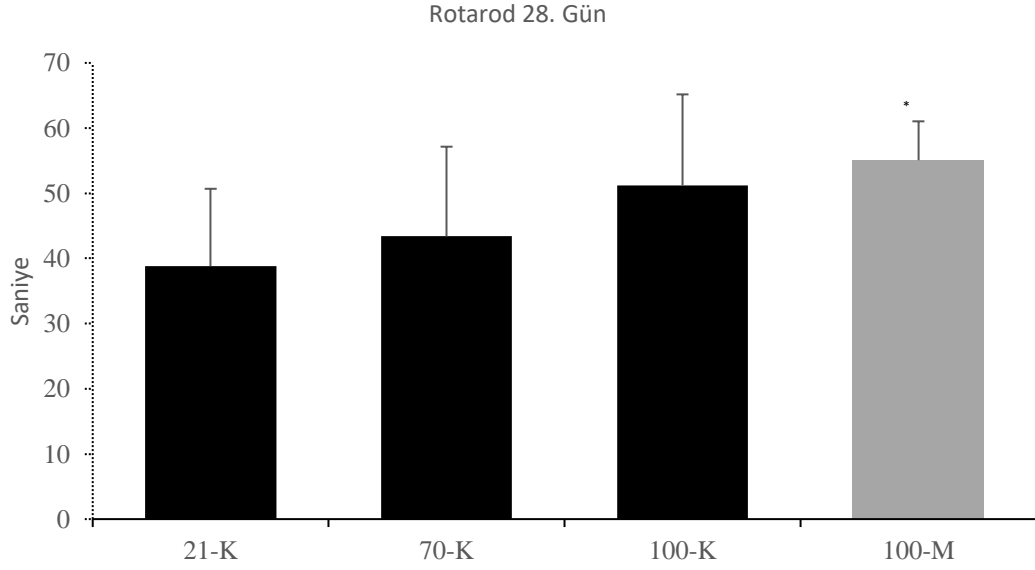
Şekil 36. Aydınlik-karanlık testinde hayvanların 42. günde aydınlık alanda geçirdikleri süreler. Özellikle %100 Oksijen-Melatonin kombinasyonunda %21 Oksijen grubuna kıyasla anlamlı bir artış gözlemlendi. Sonuçlar ortalama±SD olarak verilmiştir.  $p < 0.05$

#### 4.5.2. Rotarod Testi

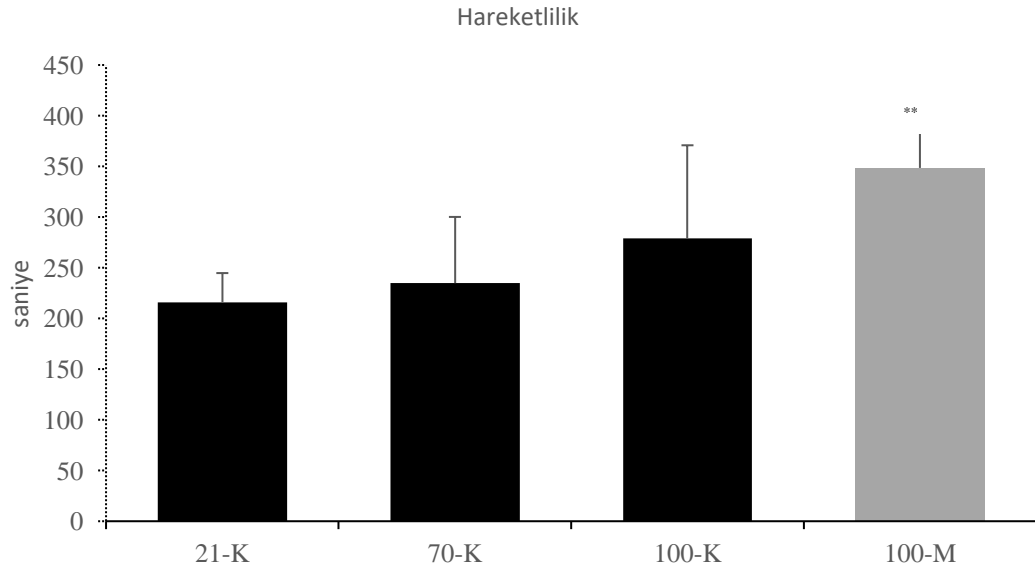
Rotarod hayvanlarda motor koordinasyonun ölçülmesi açısından kullanılan bir testtir. Hasardan sonra 28. günde yapılan motor koordinasyon testinde %100 Oksijen-Melatonin grubu %21 Oksijen uygulanan gruba göre daha uzun süre silindiri çevirdiği gözlemlendi (Şekil 37).

#### 4.5.3. Açık Alan Testi

Açık alan testi hayvanların kendiliğinden olan aktivitelerini ve buldukları yeri incelemelerini ölçen bir testtir. Açık alan testinde hayvanların açık alan kazanında toplamda 600 saniyenin ne kadarında hareketli kaldıkları ve bunun yanında merkez, geçiş ve kenar bölgelerinde ne kadar süre geçirdikleri gibi 4 farklı değerlendirme kriteri yapılmıştır. Hareketlilik sürelerine bakıldığında %100 Oksijen-Melatonin kombinasyon grubunda %21 Oksijen grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde artış görülmektedir (Şekil 38).

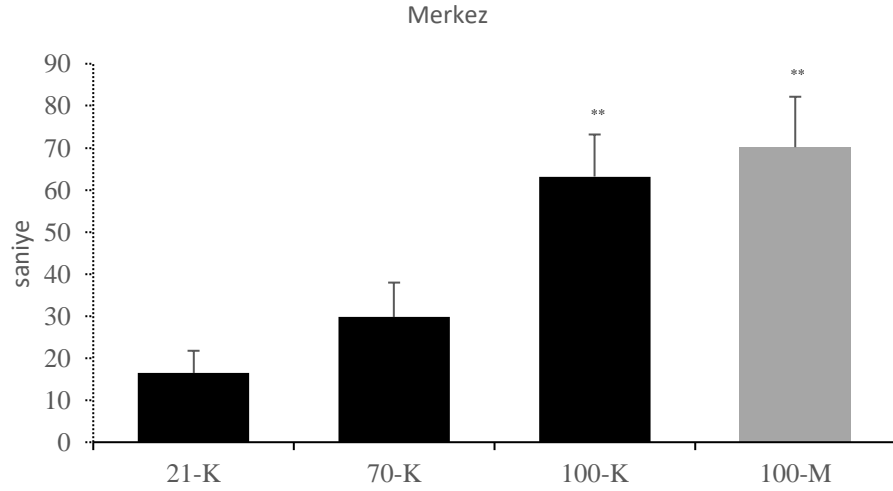


Şekil 37. Rotarod testinde hayvanların silindiri çevirme süreleri. %21 Oksijen uygulanan grup  $38.80 \pm 11.87$  saniye çevirirken, %70 Oksijen grubu  $43.38 \pm 13.76$ , %100 Oksijen grubu  $51.16 \pm 14$ , %100 Oksijen-Melatonin kombinasyon grubu ise  $55.06 \pm 5.96$  saniye silindiri çevirdiği gözlemlendi. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.  $p < 0.05$



Şekil 38. Hipoksi iskemi sonrası hayvanların açık alan testinde hareketli olduğu süre. %21 Oksijen uygulanan grup  $216.06 \pm 56.21$  saniye, %70 Oksijen grubu  $234.83 \pm 134.50$ , %100 Oksijen grubu  $278.75 \pm 14$ , %100 Oksijen-Melatonin kombinasyon grubu ise  $348.48 \pm 76.92$  saniye boyunca hareketli oldukları gözlemlendi. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.  $p < 0.05$

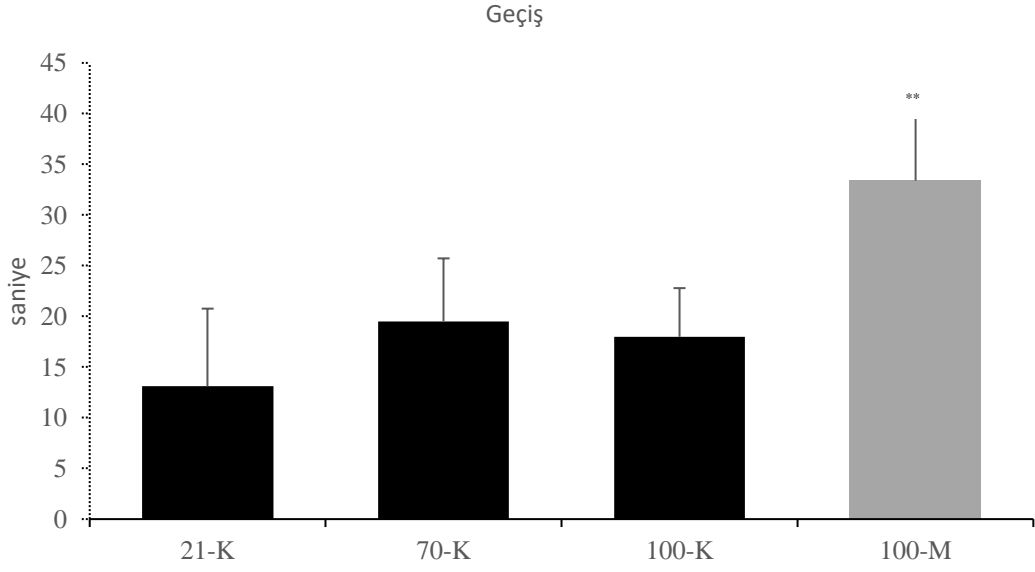
Hipoksi iskemi sonrası yapılan açık alan testinde hayvanların merkez alanda geçirdikleri süreler kamera yardımıyla izlenmiştir. Yapılan analiz sonucuna göre %100 Oksijen ve %100 Oksijen-Melatonin kombinasyon grubunda anlamlı bir artış görülmüştür (Şekil 39).



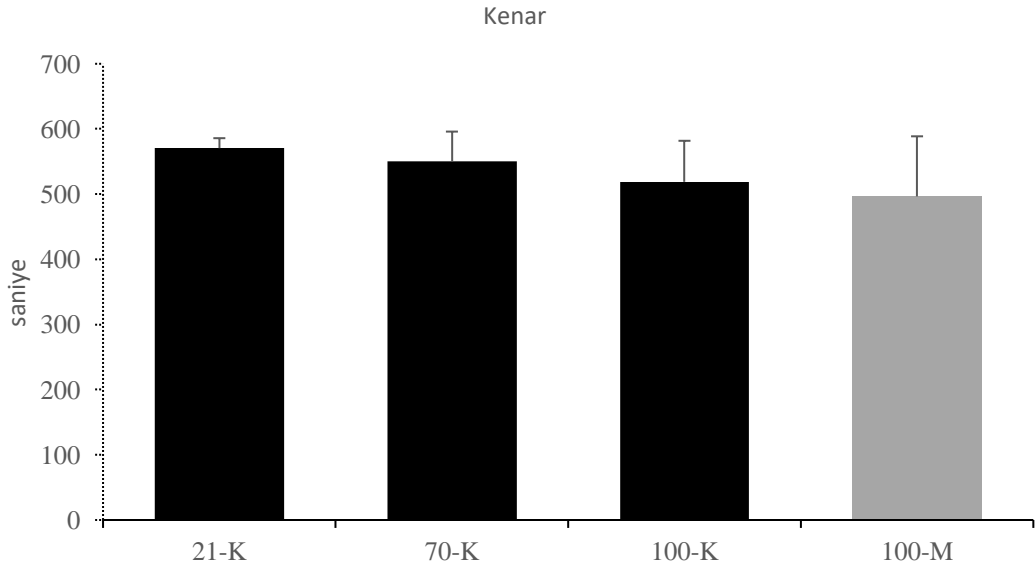
Şekil 39. Hipoksi iskemi sonrası hayvanların açık alan testinde merkezde geçirdikleri süre. %21 Oksijen uygulanan grup  $16.44\pm 5.3$  saniye, %70 Oksijen grubu  $29.76\pm 8.2$ , %100 Oksijen grubu  $63.10\pm 70.12$ , %100 Oksijen-Melatonin kombinasyon grubu ise  $70.15\pm 12$  saniye boyunca merkez bölgesinde zaman geçirdikleri gözlemlendi. Sonuçlar ortalama±SD olarak verilmiştir.  $p<0.05$

Kenar bölgesi ile merkez bölgesi arasında kalan geçiş bölgesinde geçirdikleri sürelerin analizi yapıldığında %100 Oksijen-Melatonin kombinasyon grubunun geçiş bölgesinde geçirmiş olduğu süre %21 Oksijen verilen hayvanların iki katından daha fazla olduğu görülmüştür. %21 Oksijen grubunda hayvanlar geçiş bölgesinde  $13.1\pm 7.6$  saniye vakit geçirirken sırasıyla %70 Oksijen grubunda  $22.3\pm 12.1$ , %100 Oksijen grubunda  $17.98\pm 4.8$  ve %100 Oksijen-Melatonin kombinasyon grubunda  $33.39\pm 6.9$  saniye vakit geçirdikleri gözlemlendi (Şekil 40).

Kenar bölgesinde geçirdikleri süreleri incelediğimizde düşük oksijen konsantrasyonuna maruz bırakılan hayvanların daha uzun süre kenarda bekledikleri tespit edilmiştir (Şekil 41). %21 Oksijen uygulanan grup  $570.45\pm 15.38$  saniye, %70 Oksijen grubu  $550.72\pm 45.24$ , %100 Oksijen grubu  $518.84\pm 63.12$ , %100 Oksijen-Melatonin kombinasyon grubu ise  $496.46\pm 2692$  saniye boyunca kenar bölgesinde zaman geçirdikleri gözlemlendi.



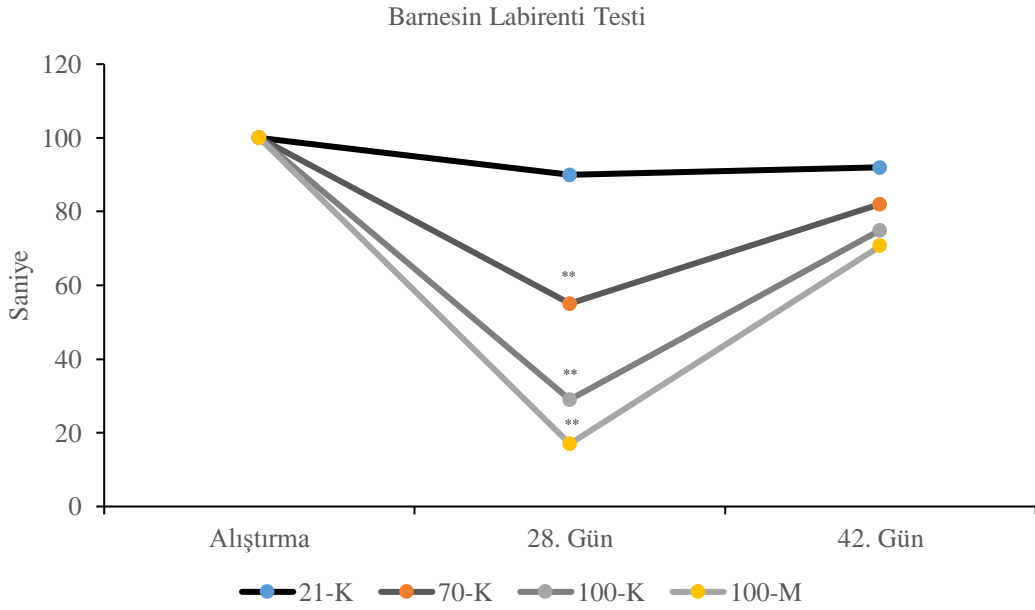
Şekil 40. Hipoksi iskemi sonrası hayvanların açık alan testinde geçiş bölgesinde geçirdikleri süre. Sonuçlar ortalama±SD olarak verilmiştir.  $p < 0.05$



Şekil 41. Hipoksi iskemi sonrası hayvanların açık alan testinde kenar bölgesinde geçirdikleri süre. Sonuçlar ortalama±SD olarak verilmiştir.

#### 4.5.4. Barnes Labirent Testi

Hayvanlarda uzaysal hafıza ve öğrenme durumunu ölçmek için *Barnes* labirent testi kullanıldı. Bir uyarı verildikten sonra etraftaki uyarıların yardımıyla hayvanların güvenli bölgeye kaç saniye sonra ulaştıkları belirlendi. Buna göre tedavi gruplarında özellikle %100 Oksijen ve %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon gruplarındaki hayvanların %21 Oksijen uygulanan hayvanlara kıyasla anlamlı bir şekilde çok daha hızlı olarak güvenli bölgeye ulaştıkları gözlemlendi. %21 Oksijen verilen hayvanlar güvenli bölgeye  $90 \pm 15$  saniyede ulaşırken, %70 Oksijen verilen hayvanlar  $65.48 \pm 14$  saniyede, %100 Oksijen uygulananlar  $29 \pm 10.96$  saniyede ve son olarak %100 Oksijen+Melatonin uygulanan sıçanlar  $17 \pm 10$  saniyede güvenli bölgeye ulaştılar (Şekil 42).



Şekil 42. Barnesin labirenti testi.  $p < 0.05$  Sonuçlar ortalama  $\pm$  SD olarak verilmiştir.

## 5. Tartışma ve Sonuç

Hİ durumu anne karnında veya doğum sırasında kordon bağının dolanması veya erken doğum olaylarında sıkça görülmektedir. Özellikle kordon bağının bebeğin boynuna dolanması durumunda beyne yeteri kadar kan gidemez ve sonrasında telafisi mümkün olmayan durumların ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Dokunun oksijensiz kalması bir süre sonra hücresel düzeyde enerji yetmezliğine yol açmaktadır. Hücresel düzeyde meydana gelen bu enerji düşüklüğü zamanla hücre membranında bulunan ve hücre iyon dengesini sağlayan kanallarda bir bozukluğa yol açmaktadır. İyon dengesinin sağlanamaması durumunda hücre içinde bol miktarda katyon birikimi gerçekleşir. İçerde biriken iyonlar hücrede ödem oluşumuna ve enflamasyona yol açacak hücresel sinyal mekanizmaları aktive etmektedir. Günlük yaşantıda sıkça rastlanan bu durum maalesef klinik olarak halen tedavi edilememektedir.

Normobarik oksijen ve melatoninin akut iskemik hasarın tedavisi için umut verici yaklaşımlar olduğuna dair yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Bununla birlikte, reperfüzyon hasarı ve altta yatan patofizyolojik mekanizma ve yüksek reaktif oksijen türlerinin varlığı halen tartışma konusudur. Bu bağlamda yapılan çalışmada yenidoğan sıçanlara hipoksik iskemi hasarı uygulanmış ve farklı konsantrasyonlarda oksijen ve serbest radikal giderici özellikteki melatonin sıçanlara hipoksik iskemi hasarından hemen sonra uygulanmıştır. Çalışmada iki farklı deney seti gerçekleştirilmiştir. İlk deney setinde hayvanlardaki akut beyin hasarını belirlenmiş ve tedavi gruplarının bu hasara olan etkileri incelenmiştir. İkinci deney setinde ise Hİ hasarının kronik olarak davranışsal parametler üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Akut dönem hasarlarının belirlenebilmesi için hücresel sağ kalım analizi, apoptotik hücre tayini yapılmıştır. Ayrıca akut dönemde protein düzeyinde meydana gelen değişiklikler belirlenmiştir. Bunun yanında oksijen ve melatoninin hipoksik iskemik hasarda uzun dönemde fonksiyonel geri kazanıma olan etkilerinin araştırılması için hayvanlara iki farklı zaman diliminde davranış ve lökomotor aktivite testleri uygulanmıştır.

Uygulanan tedavilerin hasara etkisinin detaylı olarak araştırılabilmesi için beynin farklı bölgelerinde (korteks, talamik bölge, hipokampus) meydana gelen hasar alan dağılımları değerlendirilmiştir. Korteks bölgesinde meydana gelen hasar oksijen ve melatonin uygulanmasıyla anlamlı ölçüde azalmıştır. Benzer şekilde talamik bölge ve hipokampusta da kortekse paralel sonuçlar gözlenmiştir. Hasardaki azalma ölmekte

olan hücreye daha fazla oksijen verilmesiyle oksijen azlığından kaynaklı enerji eksikliğini giderilmesi sonucu hayatta kalan hücre sayısının korunması sonucu olabilir. Ancak bu eksiklik giderilirken, hasarlı dokuya yüksek konsantrasyonda oksijen verilmesi oksidatif stresi arttırabileceği için kötü sonuçlar da doğurabilir. Bunun önüne geçebilmek için %100 oksijen tedavisi melatonin tedavisi ile kombine edilerek, ortaya çıkacak serbest radikallerin giderilmesi hedeflenmiştir. Beklenen şekilde %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon grubunda %100 Oksijen grubuna kıyasla hasarın daha da düşük olduğu görülmüştür. Yapılan bir çalışmada hamile hayvanlara düşük doz melatonin enjeksiyonunun, doğum sırasında meydana gelebilecek hipoksi hasarını azalttığı ve bununla birlikte aktif kaspaz-3 miktarını düşürdüğü görülmüştür (Hutton ve ark. 2009). Bir başka çalışmada Hİ hasarı sonrası melatoninin endoplazmik retikulum stresi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada melatonin Hİ sonrası azalan SIRT-1 seviyesini koruduğu ve bu sayede hasarı azalttığı belirtilmiştir (Carloni ve ark. 2014). Literatürdeki bu bilgilere paralel şekilde %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon tedavisi grubunda hasar minimum durumda kaldığı görülmüştür.

CA1, CA2, CA3 ve dentat girüs bölgelerinde temel olarak uzaysal hafıza ile öğrenmede görev alan hücrelerin yoğun olarak bulunduğu bilinmektedir. Bu bölgelerdeki hücrelerin hasardan sonra hayatta kalması öğrenme ve uzaysal mekan değerlendirmesi açısından önem arz etmektedir. Nekrotik hasarın dışında hücresel sağ kalımın değerlendirilebilmesi için beyinlerden alınan koronal kesitlere *cresyl violet* boyaması yapılmış ve her kesitten korteks, talamik bölge, dentat girüs, CA1, CA2 ve CA3 olmak üzere altı farklı bölgeden hücre sağ kalım analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz yapılan tüm bölgelerde hayatta kalan sinir hücresi sayısı %100 Oksijen ve %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon gruplarında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artmıştır. Hİ sonrası oksijen tedavisinin beyindeki enerji mekanizması üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada hiperbarik ve normobarik oksijen tedavilerinin etki mekanizmaları tartışılmıştır (Calvert ve Zhang 2007). Hiperbarik oksijen tedavisi ile kıyaslandığında normobarik oksijen tedavisinin beyin ödemi anlamlı olarak azalttığı bunu yanında yüksek enerji metaboliti olan ATP miktarındaki düşüşü geri çevirdiği belirtilmiştir. Ayrıca hipokampus (DG, CA1, CA2, CA3) korteks, frontoparyetal korteks ve basal gangliyada hücresel sağ kalım analizi yapılmış ve sonuç olarak her bölgede de normobarik oksijen tedavisinin hücresel hayatta kalımı arttırdığı



gösterilmiştir. Literatürde farelerde yapılan bir çalışmada %100 Oksijen ile normal atmosferik oksijenin (%21 Oksijen) hipoksik iskemi sonrası etkisinin karşılaştırılması sonucu %100 Oksijen verilen grupta serebral kanlanma ve hipokampal atrofinin azaldığı gösterilmiştir. %21 Oksijen verildiğinde CA1, CA2 ve CA3 bölgelerindeki granüler zonda dejenerasyonun %100 Oksijen verilen gruba kıyasla daha fazla olduğu bildirilmiştir (Presti ve ark. 2006). Literatüre paralel olarak %100 Oksijen grubundaki hücre sel hayatta kalma oranı %21 Oksijen grubuna göre daha iyi durumda iken %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon grubunun bu iyileşmeyi daha fazla arttırdığı gözlemlenmiştir.

Hİ sonrası kaspaz-3 aktivasyonunun arttığı ve buna bağlı olarak apoptotik hücre ölümünün indüklendiği bilinmektedir (Nakajima ve ark. 2000). Bu çalışmada apoptotik ve nekrotik hasarın korteks, subhipokampal bölge (CA1, CA2, CA3 ve dentat girüs) ve hipokampüse dağılım gösterdiği belirtilmiştir. Bu bilgiler ışığında apoptotik hücre ölümüne, uygulanan tedavilerin etkisinin detaylı olarak araştırılabilmesi için beynin farklı bölgelerinde (korteks, subhipokampal bölge, hipokampus) meydana gelen hücre ölümleri TUNEL boyaması ile değerlendirilmiştir. CA2 bölgesi hariç tüm bölgelerde artan oksijen konsantrasyonuna bağlı olarak hücre ölümünün azaldığı, melatoninin ise hücre ölümünü daha da azalttığı görülmüştür. Kaspaz-3 inhibisyonunun hipoksik iskemi sonrası apoptotik hücre ölümünü azalttığı gösteren birçok çalışma vardır (Han ve ark. 2001, Arvin ve ark. 2002, Han ve ark. 2002). Ancak literatürde kaspaz-3 ifade edilmeyen farelerde yapılan çalışmada bu farelerin Hİ hasarına hassas olduğu gösterilmiştir (West ve ark. 2006). Bu durum da kaspaz-3'ten bağımsız sinirsel hücre ölüm mekanizmalarının da araştırılması gerektiği sonucunu doğurmaktadır.

Hİ sonrası uygulanan farklı oksijen konsantrasyonlarının hücre içi sinyal yollarına olan etkilerinin araştırılması için Western blot yöntemi ile MMP9, Erk1/2, GSK-3, PTEN proteinlerinin miktarları analiz edilmiştir. Artan oksijen konsantrasyonu MMP9 seviyesini azaltırken %100 Oksijen+Melatonin kombinasyonu uygulanan grupta bu azalma tersine çevrilmiştir. İskemi sonrası eksitotoksisite, sinirsel hasar, apoptoz ve kan beyin bariyerindeki geçirgenliğin atmasından sorumlu olan MMP9 proteininin seviyesinin arttığı gösterilmiştir (Rivera ve ark. 2010). bununla birlikte iskemiden etkilenen alanlarda MMP9 ifadesinin arttığı ve bunun inhibe edilmesinin potansiyel tedavi seçeneği olduğu bildirilmiştir (Dong ve ark. 2009a).

Ayrıca matriks metalopeptidazların ve bunların dokudaki inhibitörlerinin hem gelişimsel evrede hem de yetişkinlerde birçok mekanizmada görev aldığı ve yenidoğan HI gibi birçok patofizyolojik süreçte de rol aldığı ifade edilmiştir (Dzwonek ve ark. 2004, Ranasinghe ve ark. 2009). Özellikle HI'den 24 saat sonra bu proteinin ifadesinin en yüksek seviyeye ulaştığı gösterilmiştir (Zhao ve ark. 2006). Her ne kadar akut dönemde bu proteinin kan beyin bariyeri geçirgenliğini bozup hasarı arttırdığı düşünülse de iskemi sonrası uzun dönemde nörovasküler modellemede ve fonksiyonel geri kazanımda iyi sonuçlar verdiği gösterilmiştir (Cunningham ve ark. 2005, Zhao ve ark. 2006). Bu sonuçlar MMP9 proteininin akut dönemde ve uzun dönemde farklı iki görevi olduğunu göstermektedir. Akut dönemde MMP9 proteininin inhibisyonunun kan beyin bariyerini koruyarak apoptozu azalttığı ve eksitotoksisite kaynaklı hücre ölümünü azaltmasına rağmen uzun dönemde bu proteinin bulunması fonksiyonel geri kazanım açısından önemlidir.

Mitojenle aktifleşen protein kinaz ailesinin (MAPK) hücre içerisinde ölüm, büyüme, yayılma gibi birçok mekanizmayı düzenledikleri bilinmektedir (Alessandrini ve ark. 1999). Bu aileden JNK ve P38 bakteriyel lipopolisakkaritler ve sitokinler tarafından uyarıldıklarında hücreyi ölüm yolağına sokarken Erk'nın mitojenik uyarılar tarafından uyarılması sonucu hücre içerisinde birçok transkripsiyonel faktör aktive olur ve bunun sonucunda hücre yayılma ve farklılaşmaya uğrar (Oppenheim 1991). Artan oksijen konsantrasyonunda Erk1/2 proteinin seviyesinde bir azalma görülürken %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon grubunda %21 Oksijen grubuna göre anlamlı bir şekilde artma görülmüştür. Literatürdeki çalışmalarda hipoksi sonrası Erk1/2 proteininin seviyesinin arttığı gösterilmesine rağmen (Minet ve ark. 2000). Bu artış artan oksijen konsantrasyonlarında görülmemiştir. Ancak %100 Oksijen ile melatoninin kombinasyonu %21 Oksijen ile kıyaslandığında hücresel sağ kalımdan sorumlu olan Erk1/2 protein seviyesini arttırmıştır.

GSK3 $\beta$  bütün dokularda ifade edilmesine rağmen MSS'nde serebral korteks, hipokampus ve serebellum bölgelerinde diğer bölgelere nazaran daha fazla ifade edilmektedir (Woodgett 1990, Yao ve ark. 2002). Fizyolojik şartlarda nöronal polarizasyonda, nörogenezde ve aksonal büyümede görev alan GSK3 $\beta$ 'nın patolojik şartlar altında aşırı miktarda aktive olarak nöronlarda apoptozu indüklediği ve nöronal gelişimde yok edici etkisinin olduğu gösterilmiştir (Spittaels ve ark. 2002, Shi ve ark.

2004, Zhou ve ark. 2004). GSK3 $\beta$ 'nin seçici inhibisyonunun Hİ sonrası serebral enfarktüsü, oksidatif stresi ve apoptozu azalttığı gösterilmiştir. GSK3 $\beta$ 'nin inhibisyonunun PI3K-AKT sinyal yolağı, MAPK sinyal yolağı ve NFK $\beta$  sinyal yolağı ile etkileşerek hipoksik iskemi gibi patofizyolojik koşullarda koruyucu olduğu bilinmektedir (Kelly ve ark. 2004, Collino ve ark. 2008). GSK3'ün aktivitesi serin bölgesinin fosforlanması sonucu inhibe olur (Fang ve ark. 2000). %70 Oksijen ve %100 Oksijen+Melatonin kombinasyonunda GSK3 $\beta$ 'nin aktivitesi %21 Oksijen grubuna kıyasla yarı yarıya azalırken bu düşüş %100 Oksijen grubunda %75 seviyesindedir.

Hİ sonrası artan oksijen konsantrasyonuna bağlı olarak anlamlı bir şekilde p-PTEN proteinin ifadesinin arttığı gözlemlendi. Kromozom 10'da kaybolan PTEN, hem bir protein tirozin fosfatazı hem de lipid fosfataz olarak işlev görür ve PI3K sinyal yolağını olumsuz olarak etkiler. Hücre yayılımı, hücre göçü ve apoptoz gibi hücre için kritik olaylarda görev yaptığı bilinmektedir (Kitagishi ve Matsuda 2013). Daha önceden yapılan çalışmalarda PTEN aktivasyonunun gelişen sıçan beyninde Hİ sonrası nöronal apoptozu arttırdığı gösterilmiştir (Li ve ark. 2009). PTEN'in inhibisyonu veya PI3K/Akt yolağının amplifikasyonu da akson büyümesine yol açar. PTEN MSS'nde bolca ifade edilir ve özellikle nöronlardaki ekspresyonu daha fazladır. Birçok patofizyolojik durumda beynin gelişimi ve normal fonksiyonların yerine getirebilmesi için önemlidir.

Aydınlık-karanlık testi hayvanlarda anksiyete durumunu ölçmek için kullanılan bir test olup, arada bağlantının bulunduğu biri kapalı bir açık olmak üzere birbirine eşit iki farklı alanda geçirdikleri süre ve içinde buldukları patofizyolojik durumun anksiyeteleri üzerine ne gibi etkilerinin olduğunu anlamak için kullanılmıştır. Beyin felci sonrası farelerde yapılan bir çalışmada rozuvastatin verilmiş ve beş farklı zaman diliminde aydınlık karanlık test uygulanmıştır. Kontrol grubuyla yapılan kıyaslama sonucu rozuvastatin verilen grup subakut dönemde bir kötüleşme görülürken ileri zamanlarda aydınlık bölgede geçirdikleri sürenin anlamlı bir şekilde fazla olduğu gösterilmiştir (Kilic ve ark. 2014). Sıçanlarda yapılan bir başka çalışmada hayvanlara Hİ uygulanıp daha sonra hayvanlara kordon bağı kan hücreleri enjekte edilmiş ve 8-10 hafta sonra aydınlık-karanlık testi yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda göbek bağı enjekte edilen grupta aydınlık alanda kalma sürelerinin anlamlı

bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir (Bae ve ark. 2012). Hİ sonrası verilen oksijen konsantrasyonlarına paralel olarak hayvanların hem 28. günde hem de 42. günde aydınlık alanda geçirdikleri sürelerin arttığı gözlemlendi. Ayrıca 42. günde %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon grubunda aydınlık alanda geçirdikleri süre daha fazla bulundu. Bu durum yüksek konsantrasyonda oksijenin ve beraberinde melatoninin anksiyeteyi azalttığını göstermektedir.

Rotarod testi hayvanlarda motor aktivitenin ve koordinasyonun ölçüldüğü bir testtir. Hayvanlar zamanla hızının arttığı bir silindirin üzerinde yürümeye bırakılarak ekstremitelerini ne kadar süre ile koordineli olarak kullanabildikleri ölçülür. İskemik bir hasar geçiren hayvanların motor korteks bölgelerinde bir hasar oluştuğu ve buna bağlı olarak motor aktivitelerinin düştüğü bilinmektedir (Ten ve ark. 2004, Kilic ve ark. 2014). Yapılan başka bir çalışmada Hİ sonrası uzun dönemde de motor aktivitenin bozulduğu ve bu durumun 3 ile 9 hafta arasında kendini gösterdiği bildirilmiştir (Jansen ve Low 1996). Yenidoğan sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada da sensorimotor fonksiyonların 5-6 hafta sonra bozulduğu bildirilmiştir. Artan oksijen konsantrasyonuna paralel olarak sıçanların rotarod cihazı üzerinde kaldıkları zamanın özellikle %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon grubunda anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. Dışardan verilen yüksek konsantrasyondaki oksijenin dokudaki oksijenlenmeyi artırır ve buna bağlı olarak bölgeye daha fazla oksijenlenmiş kanın ulaşmasını sağlar. Bu durum hipoksi sonrası hücrelerdeki enerji yoksunluğunu devre dışı bırakıp bölgenin daha aktif bir şekilde alıştığını göstermektedir. Melatonin de iyi bir serbest radikal giderici olduğundan %100 Oksijen ile güçlü bir etki ortaya çıkarmış ve motor koordinasyonun düzenlenmesinde ayrıca etkili olduğunu gözlenmiştir.

Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada melatoninin travmatik beyin hasarı sonrası nöronal sağ kalımı arttırdığı ve buna paralel olarak spontan aktivitenin ve bunun yanında anksiyetik durumu azalttığı gösterilmiştir (Kelestemur ve ark. 2016). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada da beyin felci sonrası uygulanan melatonin tedavisinin hücresel sağ kalımı arttırdığı, motor fonksiyonların geri kazanımını ve iskemi sonrası meydana gelen hiperaktivite ve anksiyeteyi azalttığı gösterilmiştir. (Kilic ve ark. 2008). Yapılan analiz sonucunda %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon uygulanan hayvanların %21, %70 ve %100 Oksijen konsantrasyonlarına nazaran açık alan içerisinde anlamlı bir şekilde daha hareketli oldukları gözlemlenmiştir. Açık alan testinde ayrıca hayvanların korku, anksiyete gibi durumları

da analiz edilebilmektedir. Normal durum sergileyen hayvanlar daha çok merkez bölgesinde vakit geçirirken anksiyetik veya korku içerisindeki hayvanlar kenar bölgesinde kalmayı tercih etmektedirler. Alınan sonuçlara göre %21 Oksijen verilen grup kenar bölgesinde daha uzun süre geçirirken artan oksijen konsantrasyonuna bağlı olarak anlamlı olmasa da kenar bölgesinde %21 Oksijen grubuna kıyasla daha az vakit geçirmişlerdir. Özellikle geçiş ve merkez bölgelerinde %100 Oksijen ve %100 Oksijen+Melatonin uygulanan hayvanlar bu bölgelerde %21 Oksijen verilen sıçanlara kıyasla daha fazla vakit geçirmişlerdir. Bu sonuçlar ışığında %100 Oksijen+Melatonin kombinasyonunun hayvanlarda spontan aktiviteyi arttırdığı ve anksiyeteyi azalttığı söylenebilir.

*Barnes* labirent testi hayvanlarda uzun dönem öğrenmenin ve uzaysal hafızanın ölçüldüğü bir testtir. Hipokampal bölgesinde (CA1, CA2, CA3, DG) bulunan hücrelerin öğrenme ve uzaysal hafıza ile ilgili oldukları bilinmektedir. Hipoksik iskemi ve travmatik beyin hasarı gibi beyine ciddi hasar veren patofizyolojik durumlarda bu bölgelerde meydana gelebilecek bir hasar ve sonrasında gerçekleşecek hücre ölümünün ilerde ciddi hafıza problemlerinin yaşanmasına sebep olduğu düşünülmektedir (Kovesdi ve ark. 2011). Hipokampal nörogenezin erişkin beyinde normal davranışsal fonksiyonları yerine getirebilmesi açısından kritik öneme sahiptir (Kempermann ve Kronenberg 2003). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada melatoninin HI sonrası akut ve kronik dönemde fonksiyonel geri kazanımı ve hücre yayılımını arttırdığı ayrıca hipokampal bölgede yangıyı azalttığı gösterilmiştir (Wang ve ark. 2013). Bu bilgiler ışığında yapılan analiz sonucunda subakut dönemde (28. gün) artan oksijen konsantrasyonuna paralel olarak sıçanlar güvenli bölgeye özellikle %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon grubu %21 Oksijen verilen hayvanlara kıyasla anlamlı bir şekilde daha kısa sürede ulaştıkları görüldü. Kronik dönemde (42. gün) subakut döneme kıyasla hayvanlar güvenli bölgeye daha uzun sürede ulaşırsa da kendi aralarındaki kıyaslama sonucu %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon grubu en iyi iyileşmeyi sağlamıştır. Etkili bir stres cevabı oluşturmada glikokortikoidlerin gerekliliği bilinse de aşırı miktarda sekresyonu hipokampal dejenerasyonu artırmaktadır. Ayrıca ani stres durumunda kortizolün hipokampal bölgede kanlanmayı azalttığı ve bölgeye yeteri miktarda oksijenin gitmesini önlediği bilinmektedir (Conrad 2008). Bu durum antiapoptotik etkinin yanında hipokampal bölgede sağ kalan hücre sayısını artışı ve mevcut hücresel ağın kullanılması ile açıklanabilir.

Bu tezde yenidoğan 7 günlük sıçanlara Hİ hasarı uygulanmış olup yavrulara hasarın hemen ardından normal atmosferik oksijen değeri olan %21 Oksijen verildi. Bunun yanında yüksek oksijen konsantrasyonlarının (%70 Oksijen, %100 Oksijen), Hİ'ye nasıl bir yanıt oluşturacağı araştırılırken, yüksek oksijen miktarının olası serbest radikal üretimini tetikleyeceği düşünülüp %100 Oksijen grubu ayrıca melatonin ile kombine edilerek hayvanlara uygulandı ve histolojik (hasar alan dağılımı, hücresel sağ kalımı, apoptotik hücre ölümü), davranışsal (anksiyete, motor koordinasyon, spontan aktivite ve hareketlilik, öğrenme ve uzaysal hafıza) ve altta yatan patofizyolojik süreçler (hücresel protein düzeyleri) incelenmiştir. Sonuç olarak artan oksijen konsantrasyonu ile birlikte bir iyileşme görülse de %100 Oksijen+Melatonin kombinasyonunun hasar alan dağılımını azalttığı, nöronal sağ kalımı arttırdığı ve özellikle hipokampal bölgede apoptotik hücre ölümünü azalttığı görüldü. Yapılan hücresel protein analizlerinde hücresel sağ kalımda önemli rolü olan Erk1/2 protein seviyesinin %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon grubunda anlamlı bir şekilde arttığı belirlendi. Protein düzeyindeki değişiklikler ile birlikte sağ kalan nöronların korunması ve hücresel ağın veya bağlantıların sürdürülebilmesi sonucu anksiyetenin azalması, motor koordinasyonun düzelmesi, spontan aktivitenin ve hareketliliğin artması, uzaysal hafıza ve öğrenmenin düzelmesi gibi fonksiyonel geri kazanımda da artan oksijen konsantrasyonuna bağlı olarak bir iyileşme ortaya çıktı. Bunun yanında %100 Oksijen+Melatonin kombinasyon grubunun fonksiyonel iyileşmede en iyi cevabı verdiği görüldü.

Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında geç dönemdeki nörodavranışsal sonuçların daha ziyade yeni hücresel ağ oluşumu yani postadaptif nöroplastisiteden kaynaklandığı düşünülmektedir. Akut dönemde görülen nörodavranışsal uyumlu sonuçların ise akut dönemdeki koruyucu yanıt ve bununla ilişkili sağlam kalan nöronların mevcut hücresel ağı idare ettirmesine bağlı gibi görünmektedir. Bu bağlamda alınan sonuçların antiapoptotik etkiden ziyade sağlam nöronların katılımı ile gerçekleştiği düşünülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Alessandrini A, Namura S, Moskowitz MA, Bonventre JV. MEK1 protein kinase inhibition protects against damage resulting from focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 12866-9.
2. Alexander M, Garbus H, Smith AL, Rosenkrantz TS, Fitch RH. Behavioral and histological outcomes following neonatal HI injury in a preterm (P3) and term (P7) rodent model. *Behav Brain Res*. 2014; 259: 85-96.
3. Ara J, Fekete S, Frank M, Golden JA, Pleasure D, Valencia I. Hypoxic-preconditioning induces neuroprotection against hypoxia-ischemia in newborn piglet brain. *Neurobiol Dis*. 2011; 43: 473-85.
4. Arteaga O, Revuelta M, Uriguen L, Alvarez A, Montalvo H, Hilario E. Pretreatment with Resveratrol Prevents Neuronal Injury and Cognitive Deficits Induced by Perinatal Hypoxia-Ischemia in Rats. *PLoS One*. 2015; 10: e0142424.
5. Arvin KL, Han BH, Du Y, Lin SZ, Paul SM, Holtzman DM. Minocycline markedly protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Ann Neurol*. 2002; 52: 54-61.
6. Azra HB, Bhutta ZA. Birth asphyxia in developing countries: current status and public health implications. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2006; 36: 178-88.
7. Badawi N, Keogh JM, Dixon G, Kurinczuk JJ. Developmental outcomes of newborn encephalopathy in the term infant. *Indian J Pediatr*. 2001; 68: 527-30.
8. Bae SH, Kong TH, Lee HS, Kim KS, Hong KS, Chopp M, Kang MS, Moon J. Long-lasting paracrine effects of human cord blood cells on damaged neocortex in an animal model of cerebral palsy. *Cell Transplant*. 2012; 21: 2497-515.
9. Bastianetto S, Menard C, Quirion R. Neuroprotective action of resveratrol. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1852: 1195-201.
10. Beker MC, Caglayan AB, Kelestemur T, Caglayan B, Yalcin E, Yulug B, Kilic U, Hermann DM, Kilic E. Effects of normobaric oxygen and melatonin on reperfusion injury: role of cerebral microcirculation. *Oncotarget*. 2015; 6: 30604-14.
11. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999; 19: 643-51.
12. Bernaudin M, Tang Y, Reilly M, Petit E, Sharp FR. Brain genomic response following hypoxia and re-oxygenation in the neonatal rat. Identification of genes that might contribute to hypoxia-induced ischemic tolerance. *J Biol Chem*. 2002; 277: 39728-38.
13. Bittigau P, Sifringer M, Pohl D, Stadthaus D, Ishimaru M, Shimizu H, Ikeda M, Lang D, Speer A, Olney JW, Ikonomidou C. Apoptotic neurodegeneration following trauma is markedly enhanced in the immature brain. *Ann Neurol*. 1999; 45: 724-35.
14. Boksa P, Krishnamurthy A, Brooks W. Effects of a period of asphyxia during birth on spatial learning in the rat. *Pediatr Res*. 1995; 37: 489-96.

15. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 10526-31.
16. Buonocore G, Groenendaal F. Anti-oxidant strategies. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2007; 12: 287-95.
17. Cai Z, Pan ZL, Pang Y, Evans OB, Rhodes PG. Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatr Res*. 2000; 47: 64-72.
18. Cai Z, Rhodes PG. Intrauterine hypoxia-ischemia alters expression of the NMDA receptor in the young rat brain. *Neurochem Res*. 2001; 26: 487-95.
19. Calvert JW, Zhang JH. Oxygen treatment restores energy status following experimental neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatr Crit Care Med*. 2007; 8: 165-73.
20. Carloni S, Albertini MC, Galluzzi L, Buonocore G, Proietti F, Balduini W. Melatonin reduces endoplasmic reticulum stress and preserves sirtuin 1 expression in neuronal cells of newborn rats after hypoxia-ischemia. *J Pineal Res*. 2014; 57: 192-9.
21. Cerio FG, Lara-Celador I, Alvarez A, Hilario E. Neuroprotective therapies after perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Sci*. 2013; 3: 191-214.
22. Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke*. 1996; 27: 1124-9.
23. Clancy B, Darlington RB, Finlay BL. Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience*. 2001; 105: 7-17.
24. Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev*. 2005; 9: 11-24.
25. Collino M, Thiemermann C, Mastrocola R, Gallicchio M, Benetti E, Miglio G, Castiglia S, Danni O, Murch O, Dianzani C, Aragno M, Fantozzi R. Treatment with the glycogen synthase kinase-3beta inhibitor, TDZD-8, affects transient cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat hippocampus. *Shock*. 2008; 30: 299-307.
26. Conrad CD. Chronic stress-induced hippocampal vulnerability: the glucocorticoid vulnerability hypothesis. *Rev Neurosci*. 2008; 19: 395-411.
27. Craig A, Ling Luo N, Beardsley DJ, Wingate-Pearse N, Walker DW, Hohimer AR, Back SA. Quantitative analysis of perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human. *Exp Neurol*. 2003; 181: 231-40.
28. Crair MC, Malenka RC. A critical period for long-term potentiation at thalamocortical synapses. *Nature*. 1995; 375: 325-8.
29. Cremer JE. Substrate utilization and brain development. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1982; 2: 394-407.
30. Cunningham LA, Wetzel M, Rosenberg GA. Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia. *Glia*. 2005; 50: 329-39.
31. Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther*. 1999; 81: 163-221.



32. Dong X, Song YN, Liu WG, Guo XL. Mmp-9, a potential target for cerebral ischemic treatment. *Curr Neuropharmacol*. 2009a; 7: 269-75.
33. Dong XX, Wang Y, Qin ZH. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin*. 2009b; 30: 379-87.
34. Douglas-Escobar M, Weiss MD. Biomarkers of hypoxic-ischemic encephalopathy in newborns. *Front Neurol*. 2012; 3: 144.
35. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*. 2008; 55: 310-8.
36. du Plessis AJ, Volpe JJ. Perinatal brain injury in the preterm and term newborn. *Curr Opin Neurol*. 2002; 15: 151-7.
37. Dugan LL, Choi DW. Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes. *Ann Neurol*. 1994; 35 Suppl: S17-21.
38. Dzwonek J, Rylski M, Kaczmarek L. Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in neuronal physiology of the adult brain. *FEBS Lett*. 2004; 567: 129-35.
39. Ellis M, Manandhar N, Manandhar DS, Costello AM. Risk factors for neonatal encephalopathy in Kathmandu, Nepal, a developing country: unmatched case-control study. *BMJ*. 2000; 320: 1229-36.
40. Fang L, Gao H, Zhang W, Zhang W, Wang Y. Resveratrol alleviates nerve injury after cerebral ischemia and reperfusion in mice by inhibiting inflammation and apoptosis. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8: 3219-26.
41. Fang X, Yu SX, Lu Y, Bast RC, Jr., Woodgett JR, Mills GB. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 11960-5.
42. Ferriero DM. Neonatal brain injury. *N Engl J Med*. 2004; 351: 1985-95.
43. Fletcher EJ, Lodge D. New developments in the molecular pharmacology of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate and kainate receptors. *Pharmacol Ther*. 1996; 70: 65-89.
44. Folbergrova J, Jesina P, Kubova H, Druga R, Otahal J. Status Epilepticus in Immature Rats Is Associated with Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction. *Front Cell Neurosci*. 2016; 10: 136.
45. Friedman A. Blood-brain barrier dysfunction, status epilepticus, seizures, and epilepsy: a puzzle of a chicken and egg? *Epilepsia*. 2011; 52 Suppl 8: 19-20.
46. Gadian DG, Aicardi J, Watkins KE, Porter DA, Mishkin M, Vargha-Khadem F. Developmental amnesia associated with early hypoxic-ischaemic injury. *Brain*. 2000; 123 Pt 3: 499-507.
47. Giza CC, Prins ML. Is being plastic fantastic? Mechanisms of altered plasticity after developmental traumatic brain injury. *Dev Neurosci*. 2006; 28: 364-79.

48. Graham EM, Ruis KA, Hartman AL, Northington FJ, Fox HE. A systematic review of the role of intrapartum hypoxia-ischemia in the causation of neonatal encephalopathy. *Am J Obstet Gynecol.* 2008; 199: 587-95.
49. Greenough WT, Volkmar FR, Juraska JM. Effects of rearing complexity on dendritic branching in frontolateral and temporal cortex of the rat. *Exp Neurol.* 1973; 41: 371-8.
50. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med.* 1991; 91: 14S-22S.
51. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem.* 1992; 59: 1609-23.
52. Hamrick SE, McQuillen PS, Jiang X, Mu D, Madan A, Ferriero DM. A role for hypoxia-inducible factor-1alpha in desferoxamine neuroprotection. *Neurosci Lett.* 2005; 379: 96-100.
53. Han BH, DeMattos RB, Dugan LL, Kim-Han JS, Brendza RP, Fryer JD, Kierson M, Cirrito J, Quick K, Harmony JA, Aronow BJ, Holtzman DM. Clusterin contributes to caspase-3-independent brain injury following neonatal hypoxia-ischemia. *Nat Med.* 2001; 7: 338-43.
54. Han BH, Xu D, Choi J, Han Y, Xanthoudakis S, Roy S, Tam J, Vaillancourt J, Colucci J, Siman R, Giroux A, Robertson GS, Zamboni R, Nicholson DW, Holtzman DM. Selective, reversible caspase-3 inhibitor is neuroprotective and reveals distinct pathways of cell death after neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *J Biol Chem.* 2002; 277: 30128-36.
55. Herb A, Burnashev N, Werner P, Sakmann B, Wisden W, Seeburg PH. The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron.* 1992; 8: 775-85.
56. Hermann DM, Zechariah A, Kaltwasser B, Bosche B, Caglayan AB, Kilic E, Doepfner TR. Sustained neurological recovery induced by resveratrol is associated with angiogenesis rather than neuroprotection after focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis.* 2015; 83: 16-25.
57. Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci.* 1994; 17: 31-108.
58. Holmstrom KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15: 411-21.
59. Hossain MA. Molecular mediators of hypoxic-ischemic injury and implications for epilepsy in the developing brain. *Epilepsy Behav.* 2005; 7: 204-13.
60. Hsu CI, Wang TC, Hou SY, Chin TY, Chang YC. Quantitative study of the developmental changes in calcium-permeable AMPA receptor-expressing neurons in the rat somatosensory cortex. *J Comp Neurol.* 2010; 518: 75-91.
61. Hutton LC, Abbass M, Dickinson H, Ireland Z, Walker DW. Neuroprotective properties of melatonin in a model of birth asphyxia in the spiny mouse (*Acomys cahirinus*). *Dev Neurosci.* 2009; 31: 437-51.

62. Iadecola C, Nedergaard M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci.* 2007; 10: 1369-76.
63. Ikeda T, Mishima K, Yoshikawa T, Iwasaki K, Fujiwara M, Xia YX, Ikenoue T. Selective and long-term learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats. *Behav Brain Res.* 2001; 118: 17-25.
64. Jansen EM, Low WC. Long-term effects of neonatal ischemic-hypoxic brain injury on sensorimotor and locomotor tasks in rats. *Behav Brain Res.* 1996; 78: 189-94.
65. Jelinski SE, Yager JY, Juurlink BH. Preferential injury of oligodendroblasts by a short hypoxic-ischemic insult. *Brain Res.* 1999; 815: 150-3.
66. Jiang H, Lei JJ, Zhang YH. Protective effect of topiramate on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rat. *Asian Pac J Trop Med.* 2014; 7: 496-500.
67. Johnston MV. Excitotoxicity in perinatal brain injury. *Brain Pathol.* 2005; 15: 234-40.
68. Johnston MV, Nakajima W, Hagberg H. Mechanisms of hypoxic neurodegeneration in the developing brain. *Neuroscientist.* 2002; 8: 212-20.
69. Kaludercic N, Deshwal S, Di Lisa F. Reactive oxygen species and redox compartmentalization. *Front Physiol.* 2014; 5: 285.
70. Kelestemur T, Yulug B, Caglayan AB, Beker MC, Kilic U, Caglayan B, Yalcin E, Gundogdu RZ, Kilic E. Targeting different pathophysiological events after traumatic brain injury in mice: Role of melatonin and memantine. *Neurosci Lett.* 2016; 612: 92-7.
71. Kelly S, Zhao H, Hua Sun G, Cheng D, Qiao Y, Luo J, Martin K, Steinberg GK, Harrison SD, Yenari MA. Glycogen synthase kinase 3beta inhibitor Chir025 reduces neuronal death resulting from oxygen-glucose deprivation, glutamate excitotoxicity, and cerebral ischemia. *Exp Neurol.* 2004; 188: 378-86.
72. Kempermann G, Kronenberg G. Depressed new neurons--adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. *Biol Psychiatry.* 2003; 54: 499-503.
73. Khan M, Sekhon B, Jatana M, Giri S, Gilg AG, Sekhon C, Singh I, Singh AK. Administration of N-acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a rat model of experimental stroke. *J Neurosci Res.* 2004; 76: 519-27.
74. Kilic E, Kilic U, Bacigaluppi M, Guo Z, Abdallah NB, Wolfer DP, Reiter RJ, Hermann DM, Bassetti CL. Delayed melatonin administration promotes neuronal survival, neurogenesis and motor recovery, and attenuates hyperactivity and anxiety after mild focal cerebral ischemia in mice. *J Pineal Res.* 2008; 45: 142-8.
75. Kilic E, Reitmeir R, Kilic U, Caglayan AB, Beker MC, Kelestemur T, Ethemoglu MS, Ozturk G, Hermann DM. HMG-CoA Reductase Inhibition Promotes Neurological Recovery, Peri-Lesional Tissue Remodeling, and Contralesional Pyramidal Tract Plasticity after Focal Cerebral Ischemia. *Front Cell Neurosci.* 2014; 8: 422.

76. Kitagishi Y, Matsuda S. Diets involved in PPAR and PI3K/AKT/PTEN pathway may contribute to neuroprotection in a traumatic brain injury. *Alzheimers Res Ther.* 2013; 5: 42.
77. Komuro H, Rakic P. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science.* 1993; 260: 95-7.
78. Kovesdi E, Gyorgy AB, Kwon SK, Wingo DL, Kamnaksh A, Long JB, Kasper CE, Agoston DV. The effect of enriched environment on the outcome of traumatic brain injury; a behavioral, proteomics, and histological study. *Front Neurosci.* 2011; 5: 42.
79. Kumar VH, Lakshminrusimha S, Kishkurno S, Paturi BS, Gugino SF, Nielsen L, Wang H, Ryan RM. Neonatal hyperoxia increases airway reactivity and inflammation in adult mice. *Pediatr Pulmonol.* 2016; 51: 1131-1141.
80. Kurinczuk JJ, White-Koning M, Badawi N. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Hum Dev.* 2010; 86: 329-38.
81. Lai MC, Yang SN. Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011: 609813.
82. Leon J, Acuna-Castroviejo D, Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci.* 2004; 75: 765-90.
83. Levene ML, Kornberg J, Williams TH. The incidence and severity of post-asphyxial encephalopathy in full-term infants. *Early Hum Dev.* 1985; 11: 21-6.
84. Levine S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol.* 1960; 36: 1-17.
85. Li D, Qu Y, Mao M, Zhang X, Li J, Ferriero D, Mu D. Involvement of the PTEN-AKT-FOXO3a pathway in neuronal apoptosis in developing rat brain after hypoxia-ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009; 29: 1903-13.
86. Li H, Yan Z, Zhu J, Yang J, He J. Neuroprotective effects of resveratrol on ischemic injury mediated by improving brain energy metabolism and alleviating oxidative stress in rats. *Neuropharmacology.* 2011; 60: 252-8.
87. Li J, Sheng W, Feng C, Zuo Z. Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates brain Abeta increase and improves long-term neurological outcome in rats after transient focal brain ischemia. *Neurobiol Dis.* 2012; 45: 564-72.
88. Lismont C, Nordgren M, Van Veldhoven PP, Fransen M. Redox interplay between mitochondria and peroxisomes. *Front Cell Dev Biol.* 2015; 3: 35.
89. Lopez-Burillo S, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin, xanthurenic acid, resveratrol, EGCG, vitamin C and alpha-lipoic acid differentially reduce oxidative DNA damage induced by Fenton reagents: a study of their individual and synergistic actions. *J Pineal Res.* 2003; 34: 269-77.
90. Lun A, Dominick B, Gross J. An animal model of perinatal hypoxic brain damage: behavioural aspects. *Biomed Biochim Acta.* 1990; 49: 1021-6.
91. Ma H, Sinha B, Pandya RS, Lin N, Popp AJ, Li J, Yao J, Wang X. Therapeutic hypothermia as a neuroprotective strategy in neonatal hypoxic-ischemic brain injury and traumatic brain injury. *Curr Mol Med.* 2012; 12: 1282-96.

92. Mach WJ, Thimmesch AR, Pierce JT, Pierce JD. Consequences of hyperoxia and the toxicity of oxygen in the lung. *Nurs Res Pract.* 2011; 2011: 260482.
93. Maggio N, Blatt I, Vlachos A, Tanne D, Chapman J, Segal M. Treating seizures and epilepsy with anticoagulants? *Front Cell Neurosci.* 2013; 7: 19.
94. Martin KR, Barrett JC. Reactive oxygen species as double-edged swords in cellular processes: low-dose cell signaling versus high-dose toxicity. *Hum Exp Toxicol.* 2002; 21: 71-5.
95. Martin M, Macias M, Escames G, Reiter RJ, Agapito MT, Ortiz GG, Acuna-Castroviejo D. Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *J Pineal Res.* 2000; 28: 242-8.
96. McDonald JW, Silverstein FS, Johnston MV. Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. *Brain Res.* 1988; 459: 200-3.
97. McLean C, Ferriero D. Mechanisms of hypoxic-ischemic injury in the term infant. *Semin Perinatol.* 2004; 28: 425-32.
98. Minet E, Arnould T, Michel G, Roland I, Mottet D, Raes M, Remacle J, Michiels C. ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett.* 2000; 468: 53-8.
99. Mir IN, Chalak LF. Serum biomarkers to evaluate the integrity of the neurovascular unit. *Early Hum Dev.* 2014; 90: 707-11.
100. Mobarra N, Shanaki M, Ehteram H, Nasiri H, Sahmani M, Saeidi M, Goudarzi M, Pourkarim H, Azad M. A Review on Iron Chelators in Treatment of Iron Overload Syndromes. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2016; 10: 239-247.
101. Mollerud S, Frydenvang K, Pickering DS, Kastrup JS. Lessons from crystal structures of kainate receptors. *Neuropharmacology.* 2017; 112: 16-28.
102. Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron.* 1994; 12: 529-40.
103. Mu D, Chang YS, Vexler ZS, Ferriero DM. Hypoxia-inducible factor 1alpha and erythropoietin upregulation with deferoxamine salvage after neonatal stroke. *Exp Neurol.* 2005; 195: 407-15.
104. Nakajima W, Ishida A, Lange MS, Gabrielson KL, Wilson MA, Martin LJ, Blue ME, Johnston MV. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. *J Neurosci.* 2000; 20: 7994-8004.
105. Nehlig A, Pereira de Vasconcelos A. Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. *Prog Neurobiol.* 1993; 40: 163-221.
106. Noh MR, Kim SK, Sun W, Park SK, Choi HC, Lim JH, Kim IH, Kim HJ, Kim H, Eun BL. Neuroprotective effect of topiramate on hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Exp Neurol.* 2006; 201: 470-8.

107. Northington FJ, Chavez-Valdez R, Martin LJ. Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol.* 2011; 69: 743-58.
108. O'Reilly MA, Marr SH, Yee M, McGrath-Morrow SA, Lawrence BP. Neonatal hyperoxia enhances the inflammatory response in adult mice infected with influenza A virus. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 177: 1103-10.
109. Olney JW, Sharpe LG. Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science.* 1969; 166: 386-8.
110. Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 1991; 14: 453-501.
111. Orient A, Donko A, Szabo A, Leto TL, Geiszt M. Novel sources of reactive oxygen species in the human body. *Nephrol Dial Transplant.* 2007; 22: 1281-8.
112. Otahal J, Folbergrova J, Kovacs R, Kunz WS, Maggio N. Epileptic focus and alteration of metabolism. *Int Rev Neurobiol.* 2014; 114: 209-43.
113. Palmer C, Towfighi J, Roberts RL, Heitjan DF. Allopurinol administered after inducing hypoxia-ischemia reduces brain injury in 7-day-old rats. *Pediatr Res.* 1993; 33: 405-11.
114. Palmer C, Vannucci RC, Towfighi J. Reduction of perinatal hypoxic-ischemic brain damage with allopurinol. *Pediatr Res.* 1990; 27: 332-6.
115. Papazisis G, Pourzitaki C, Sardeli C, Lallas A, Amaniti E, Kouvelas D. Deferoxamine decreases the excitatory amino acid levels and improves the histological outcome in the hippocampus of neonatal rats after hypoxia-ischemia. *Pharmacol Res.* 2008; 57: 73-8.
116. Patz A, Hoeck LE, De La Cruz E. Studies on the effect of high oxygen administration in retrolental fibroplasia. I. Nursery observations. *Am J Ophthalmol.* 1952; 35: 1248-53.
117. Perrone S, Negro S, Tataranno ML, Buonocore G. Oxidative stress and antioxidant strategies in newborns. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010; 23 Suppl 3: 63-5.
118. Pisani F, Sisti L, Seri S. A scoring system for early prognostic assessment after neonatal seizures. *Pediatrics.* 2009; 124: e580-7.
119. Presti AL, Kishkurno SV, Slinko SK, Randis TM, Ratner VI, Polin RA, Ten VS. Reoxygenation with 100% oxygen versus room air: late neuroanatomical and neurofunctional outcome in neonatal mice with hypoxic-ischemic brain injury. *Pediatr Res.* 2006; 60: 55-9.
120. Ramani M, Bradley WE, Dell'Italia LJ, Ambalavanan N. Early exposure to hyperoxia or hypoxia adversely impacts cardiopulmonary development. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2015; 52: 594-602.
121. Ramani M, van Groen T, Kadish I, Bulger A, Ambalavanan N. Neurodevelopmental impairment following neonatal hyperoxia in the mouse. *Neurobiol Dis.* 2013; 50: 69-75.

122. Ranasinghe HS, Williams CE, Christophidis LJ, Mitchell MD, Fraser M, Scheepens A. Proteolytic activity during cortical development is distinct from that involved in hypoxic ischemic injury. *Neuroscience*. 2009; 158: 732-44.
123. Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, Tan DX. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2009; 44: 175-200.
124. Reiter RJ, Tan DX, Gitto E, Sainz RM, Mayo JC, Leon J, Manchester LC, Vijayalaxmi, Kilic E, Kilic U. Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage. *Pol J Pharmacol*. 2004; 56: 159-70.
125. Reiter RJ, Tan DX, Leon J, Kilic U, Kilic E. When melatonin gets on your nerves: its beneficial actions in experimental models of stroke. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2005; 230: 104-17.
126. Rice JE, 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol*. 1981; 9: 131-41.
127. Rivera S, Khrestchatisky M, Kaczmarek L, Rosenberg GA, Jaworski DM. Metzincin proteases and their inhibitors: foes or friends in nervous system physiology? *J Neurosci*. 2010; 30: 15337-57.
128. Rosenzweig MR, Bennett EL. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav Brain Res*. 1996; 78: 57-65.
129. Rumajogee P, Bregman T, Miller SP, Yager JY, Fehlings MG. Rodent Hypoxia-Ischemia Models for Cerebral Palsy Research: A Systematic Review. *Front Neurol*. 2016; 7: 57.
130. Sanchez-Barcelo EJ, Mediavilla MD, Tan DX, Reiter RJ. Clinical uses of melatonin: evaluation of human trials. *Curr Med Chem*. 2010; 17: 2070-95.
131. Sarco DP, Becker J, Palmer C, Sheldon RA, Ferriero DM. The neuroprotective effect of deferoxamine in the hypoxic-ischemic immature mouse brain. *Neurosci Lett*. 2000; 282: 113-6.
132. Saugstad OD. Oxidative stress in the newborn--a 30-year perspective. *Biol Neonate*. 2005; 88: 228-36.
133. Schubert S, Brandl U, Brodhun M, Ulrich C, Spaltmann J, Fiedler N, Bauer R. Neuroprotective effects of topiramate after hypoxia-ischemia in newborn piglets. *Brain Res*. 2005; 1058: 129-36.
134. Schulz JB, Matthews RT, Jenkins BG, Ferrante RJ, Siwek D, Henshaw DR, Cipolloni PB, Mecocci P, Kowall NW, Rosen BR, et al. Blockade of neuronal nitric oxide synthase protects against excitotoxicity in vivo. *J Neurosci*. 1995; 15: 8419-29.
135. Sekhon B, Sekhon C, Khan M, Patel SJ, Singh I, Singh AK. N-Acetyl cysteine protects against injury in a rat model of focal cerebral ischemia. *Brain Res*. 2003; 971: 1-8.
136. Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein LJ. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol*. 2013; 106-107: 1-16.

137. Shadid M, Buonocore G, Groenendaal F, Moison R, Ferrali M, Berger HM, van Bel F. Effect of deferoxamine and allopurinol on non-protein-bound iron concentrations in plasma and cortical brain tissue of newborn lambs following hypoxia-ischemia. *Neurosci Lett*. 1998a; 248: 5-8.
138. Shadid M, Moison R, Steendijk P, Hiltermann L, Berger HM, van Bel F. The effect of antioxidative combination therapy on post hypoxic-ischemic perfusion, metabolism, and electrical activity of the newborn brain. *Pediatr Res*. 1998b; 44: 119-24.
139. Sheldon RA, Jiang X, Francisco C, Christen S, Vexler ZS, Tauber MG, Ferriero DM. Manipulation of antioxidant pathways in neonatal murine brain. *Pediatr Res*. 2004; 56: 656-62.
140. Shi SH, Cheng T, Jan LY, Jan YN. APC and GSK-3beta are involved in mPar3 targeting to the nascent axon and establishment of neuronal polarity. *Curr Biol*. 2004; 14: 2025-32.
141. Sinha K, Chaudhary G, Gupta YK. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life Sci*. 2002; 71: 655-65.
142. Smith JL. The pathological effects due to increase of oxygen tension in the air breathed. *J Physiol*. 1899; 24: 19-35.
143. Solaroglu I, Solaroglu A, Kaptanoglu E, Dede S, Haberal A, Beskonakli E, Kilinc K. Erythropoietin prevents ischemia-reperfusion from inducing oxidative damage in fetal rat brain. *Childs Nerv Syst*. 2003; 19: 19-22.
144. Spittaels K, Van den Haute C, Van Dorpe J, Terwel D, Vandezande K, Lasrado R, Bruynseels K, Irizarry M, Verhoye M, Van Lint J, Vandenheede JR, Ashton D, Mercken M, Loos R, Hyman B, Van der Linden A, Geerts H, Van Leuven F. Neonatal neuronal overexpression of glycogen synthase kinase-3 beta reduces brain size in transgenic mice. *Neuroscience*. 2002; 113: 797-808.
145. Stanimirovic DB, Friedman A. Pathophysiology of the neurovascular unit: disease cause or consequence? *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012; 32: 1207-21.
146. Sun H, Juul HM, Jensen FE. Models of hypoxia and ischemia-induced seizures. *J Neurosci Methods*. 2016; 260: 252-60.
147. Sun Y, Calvert JW, Zhang JH. Neonatal hypoxia/ischemia is associated with decreased inflammatory mediators after erythropoietin administration. *Stroke*. 2005; 36: 1672-8.
148. Sun Y, Zhou C, Polk P, Nanda A, Zhang JH. Mechanisms of erythropoietin-induced brain protection in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004; 24: 259-70.
149. Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Poeggeler B, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM, Reiter RJ. Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. *J Pineal Res*. 2003; 34: 249-59.



150. Ten VS, Wu EX, Tang H, Bradley-Moore M, Fedarau MV, Ratner VI, Stark RI, Gingrich JA, Pinsky DJ. Late measures of brain injury after neonatal hypoxia-ischemia in mice. *Stroke*. 2004; 35: 2183-8.
151. Thoresen M, Penrice J, Lorek A, Cady EB, Wylezinska M, Kirkbride V, Cooper CE, Brown GC, Edwards AD, Wyatt JS, et al. Mild hypothermia after severe transient hypoxia-ischemia ameliorates delayed cerebral energy failure in the newborn piglet. *Pediatr Res*. 1995; 37: 667-70.
152. Towfighi J, Zec N, Yager J, Housman C, Vannucci RC. Temporal evolution of neuropathologic changes in an immature rat model of cerebral hypoxia: a light microscopic study. *Acta Neuropathol*. 1995; 90: 375-86.
153. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003; 552: 335-44.
154. Uehara T, Kaneko M, Tanaka S, Okuma Y, Nomura Y. Possible involvement of p38 MAP kinase in HSP70 expression induced by hypoxia in rat primary astrocytes. *Brain Res*. 1999; 823: 226-30.
155. Vannucci RC. Hypoxic-ischemic encephalopathy. *Am J Perinatol*. 2000; 17: 113-20.
156. Vannucci SJ, Hagberg H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J Exp Biol*. 2004; 207: 3149-54.
157. Venturini CD, Merlo S, Souto AA, Fernandes Mda C, Gomez R, Rhoden CR. Resveratrol and red wine function as antioxidants in the nervous system without cellular proliferative effects during experimental diabetes. *Oxid Med Cell Longev*. 2010; 3: 434-41.
158. Volpe JJ. Perinatal brain injury: from pathogenesis to neuroprotection. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2001; 7: 56-64.
159. Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke*. 2004; 35: 1732-7.
160. Wang LW, Chang YC, Lin CY, Hong JS, Huang CC. Low-dose lipopolysaccharide selectively sensitizes hypoxic ischemia-induced white matter injury in the immature brain. *Pediatr Res*. 2010; 68: 41-7.
161. Wang Z, Liu D, Zhan J, Xie K, Wang X, Xian X, Gu J, Chen W, Hao A. Melatonin improves short and long-term neurobehavioral deficits and attenuates hippocampal impairments after hypoxia in neonatal mice. *Pharmacol Res*. 2013; 76: 84-97.
162. Wassink G, Gunn ER, Drury PP, Bennet L, Gunn AJ. The mechanisms and treatment of asphyxial encephalopathy. *Front Neurosci*. 2014; 8: 40.
163. West T, Atzeva M, Holtzman DM. Caspase-3 deficiency during development increases vulnerability to hypoxic-ischemic injury through caspase-3-independent pathways. *Neurobiol Dis*. 2006; 22: 523-37.
164. West T, Atzeva M, Holtzman DM. Pomegranate polyphenols and resveratrol protect the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Dev Neurosci*. 2007; 29: 363-72.

165. Woodgett JR. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J.* 1990; 9: 2431-8.
166. Yao HB, Shaw PC, Wong CC, Wan DC. Expression of glycogen synthase kinase-3 isoforms in mouse tissues and their transcription in the brain. *J Chem Neuroanat.* 2002; 23: 291-7.
167. Yousuf S, Atif F, Ahmad M, Hoda N, Ishrat T, Khan B, Islam F. Resveratrol exerts its neuroprotective effect by modulating mitochondrial dysfunctions and associated cell death during cerebral ischemia. *Brain Res.* 2009; 1250: 242-53.
168. Yu X, Shacka JJ, Eells JB, Suarez-Quian C, Przygodzki RM, Beleslin-Cokic B, Lin CS, Nikodem VM, Hempstead B, Flanders KC, Costantini F, Noguchi CT. Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development.* 2002; 129: 505-16.
169. Zhao BQ, Wang S, Kim HY, Storrie H, Rosen BR, Mooney DJ, Wang X, Lo EH. Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. *Nat Med.* 2006; 12: 441-5.
170. Zhou FQ, Zhou J, Dedhar S, Wu YH, Snider WD. NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3 $\beta$  and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron.* 2004; 42: 897-912.
171. Zhu S, Gouaux E. Structure and symmetry inform gating principles of ionotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology.* 2017; 112: 11-15.

## Ek 1

### ÖZGEÇMİŞ

**1. Adı Soyadı** : Taha Keleştemur

**İletişim Bilgileri**

**Adres** : Ferah mah. Çamlıbahçe sk. No:3/8 Üsküdar İstanbul

**Telefon** : 0533 638 93 80

**Mail** : tkelestemur@medipol.edu.tr

**2. Doğum Tarihi** : 21.03.1984

**3. Unvanı** : Dr

#### **4. Öğrenim Durumu**

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	İstanbul Üniversitesi	2009
Yüksek Lisans	Fizyoloji	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2013
Doktora	Sinirbilim	İstanbul Medipol Üniversitesi	Devam
Doktora	Fizyoloji	Necmettin Erbakan Üniversitesi	Devam

#### **5. Akademik ve Mesleki Deneyimler**

Görevi	Kurum	Süre
Stajyer	Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik	2005 - 2007
Fizyoloji Asistanı	Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi	Kasım 2010 – Mart 2013
Biyolog	İstanbul Medipol Üniversitesi	Nisan 2013 – Nisan 2014
Öğr. Gör.	İstanbul Medipol Üniversitesi	Nisan 2014 - Halen

#### **6. Yönetilen Yüksek Lisans ve Doktora Tezleri**

##### **6.1. Yüksek Lisans Tezleri**

##### **6.2. Doktora Tezleri**

## 7. Yayınlar

### 7.1 Uluslararası SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayımlanan makaleler

1. Caglayan B, Caglayan AB, Beker MC, Yalcin E, Beker M, **Kelestemur T**, Sertel E, Ozturk G, Kilic U, Sahin F, Kilic E (2017). Evidence that activation of P2X7R does not exacerbate neuronal death after optic nerve transection and focal cerebral ischemia in mice. *Exp Neurol*. 2017 Jun 29;296:23-31. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.06.024.
2. Beker MC, Caglayan B, Yalcin E, Caglayan AB, Turkseven S, Gurel B, Kelestemur T, Sertel E, Sahin Z, Kutlu S, Kilic U, Baykal AT, Kilic E. (2017). Time-of-Day Dependent Neuronal Injury After Ischemic Stroke: Implication of Circadian Clock Transcriptional Factor Bmal1 and Survival Kinase AKT. *Mol Neurobiol*. 2017 Apr 18. doi: 10.1007/s12035-017-0524-4
3. Kilic U, Caglayan AB, Beker MC, Gunal MY, Caglayan B, Yalcin E, **Kelestemur T**, Gundogdu RZ, Yulug B, Yılmaz B, Kerman BE, Kilic E. (2017) Particular phosphorylation of PI3K/Akt on Thr308 via PDK-1 and PTEN mediates melatonin's neuroprotective activity after focal cerebral ischemia in mice. *Redox Biol*. 2017 Aug;12:657-665. doi: 10.1016/j.redox.2017.04.006. Epub 2017 Apr 5.
4. Kartal O, Aydinöz S, Kartal AT, **Kelestemur T**, Caglayan AB, Beker MC, Karademir F, Suleymanoglu S, Kul M, Yulug B, Kilic E (2016) Time dependent impact of perinatal hypoxia on growth hormone, insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor binding protein-3. *Metabolic brain disease*.
5. **Kelestemur T**, Yulug B, Caglayan AB, Beker MC, Kilic U, Caglayan B, Yalcin E, Gundogdu RZ, Kilic E (2016) Targeting different pathophysiological events after traumatic brain injury in mice: Role of melatonin and memantine. *Neuroscience letters* 612:92-97.
6. Beker MC, Caglayan AB, **Kelestemur T**, Caglayan B, Yalcin E, Yulug B, Kilic U, Hermann DM, Kilic E (2015) Effects of normobaric oxygen and melatonin on reperfusion injury: role of cerebral microcirculation. *Oncotarget* 6:30604-30614.
7. Kilic E, Reitmeir R, Kilic U, Caglayan AB, Beker MC, **Kelestemur T**, Ethemoglu MS, Ozturk G, Hermann DM (2014) HMG-CoA Reductase Inhibition Promotes Neurological Recovery, Peri-Lesional Tissue Remodeling, and Contralesional Pyramidal Tract Plasticity after Focal Cerebral Ischemia. *Frontiers in cellular neuroscience* 8:422.

## 7.2 Uluslararası hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

**Kelestemur T**, Caglayan AB, Beker MC, Caglayan B, Yalcin E, sertel E, Kilic E Beyin Felci Sonrası Gelişen Patofizyolojik Süreçlerin İleri Mikroskopik Teknikleri ile İncelenmesi 15. Ulusal Sinirbilim Kongresi 2017 Sakarya

**Sözlü- Kelestemur T**, Beker MC, Caglayan AB, Yalcin E, Altunay S, Dalay A, Sertel E, Dilden A, Kilic E. Role of Normobaric Oxygen Treatment on Newborn Hypoxia-Ischemia 42. Ulusal Fizyoloji Kongresi 2016 Düzce

**Poster-** Caglayan AB, Beker MC, Caglayan B, Altunay S, Dalay A, Dilden A, Sertel E, **Kelestemur T**, Yalcin E, Kilic U, Sarma M, Kilic E, “The role of cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) in the development of brain plasticity and repair: Role of axonal outgrowth inhibitors and cell signaling”, 7th EMBO Meeting, Germany, 2016.

**Poster-** Caglayan B, Caglayan AB, Beker MC, Kilic U, Yalcin E, Altunay S, **Kelestemur T**, Gunal MY, Hanoglu L, Yulug B, Kilic E, “Repetitive transcranial magnetic stimulation promotes neuronal survival in the acute phase and stroke-recovery in the sub-acute phase of focal cerebral ischemia” 7th EMBO Meeting, Germany, 2016.

**Poster-** Yalcin E, Caglayan AB, Beker MC, Gurel B, **Kelestemur T**, Caglayan B, Dalay A, Dilden A, Altunay S, Sertel E, Yulug B, Kilic U, Kilic E, “Oatp1a5 transporter is a gateway for pharmacological compounds to the ischemic brain” 7th EMBO Meeting, Germany, 2016.

**Poster-** Kilic U, Beker MC, Caglayan AB, Elibol B, Karakas M, Altug B, Gok O, **Kelestemur T**, Kilic E, “Melatonin promotes neurological recovery, peri-lesional tissue remodeling, and contralesional pyramidal tract plasticity after focal cerebral ischemia” Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2015. Online.

**Poster- Kelestemur T**, Caglayan AB, Beker MC, Kilic U, Altunay S, Caglayan B, Yalcin E, Gundogdu RZ, Kilic E, “Effects of normobaric oxygen treatment on brain injury after hypoxia-ischemia in newborn mice” Neuroscience Meeting Planner. Chiago: Society for Neuroscience, 2015. Online.

**Poster- Kelestemur T**, Caglayan AB, Beker MC, Yalcin E, Ozturk G, Kilic E “Inhibition but not activation of P2X7 receptors improves brain epileptiform activity in mice: Role of iNOS activation” Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2014. Online.

**Poster-** Beker MC, Caglayan AB **Kelestemur T**, Yalcin E, Ozturk G, Kilic E, “Roles of oxygen treatment in the development of ischemic brain injury, signal transduction and brain microcirculation after focal cerebral ischemia” Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2014. Online.

**Poster-** Caglayan AB, Beker MC, Kilic U, Caglayan B, **Kelestemur T**, Gundogdu RZ, Kilic E “Roles of P2X7 receptors in neuronal injury after optic nerve transaction and focal cerebral ischemia” The 5th EMBO Meeting, 2013.

Poster- Kelestemur T “A Reproducible Model of Traumatic Brain Injury in Rats: The Roles of Phosphorylated JNK-1/2” FEPS September 2012 / Santiago de Compostela / Spain

**Poster- Kelestemur T** “Endocrine disruptive effects of polychlorinated biphenyls in transfected MCF-7 human breast cancer and H4IIE rat hepatoma cells using luciferase assay” BSN July 2011 / Cambridge / England

### **7.3 Ulusal hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayımlar**

**Sözlü Sunum- Kelestemur T**, Caglayan AB, Beker MC, Yalcin E, Altunay S et al. : Yenidoğan İskemisinde Normobarik Oksijen Tedavisinin Rolü. Ulusal Fizyoloji Kongresi 2016, 16/23, Düzce, 2016

**Sözlü Sunum-** Caglayan AB, Yalcin E, Beker MC, Caglayan B, **Kelestemur T**, Ozturk G, Kilic E “In vivo ve in vitro P2X7 receptörü aracılı nöronal sağkalım mekanizması” 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 2015.

**Poster- Kelestemur T**, Caglayan AB, Beker MC, Yalcin E, Ozturk G, Kilic E “P2X7 reseptörünün farede epilepsi sonrası rolü” 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 2015.

**Poster-** Beker MC, Caglayan AB, **Kelestemur T**, Yalcin E, Caglayan B, Kilic E “Melatonin ve normobarik oksijen tedavisinin reperfüzyon hasarına etkileri” 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 2015.

**Poster- Kelestemur T**, Caglayan AB, Beker MC, Yalcin E, Ozturk G, Kilic E “P2X7 reseptör baskılanması ve aktivasyonunun beyin epileptiform aktivitesi, mikrodolaşımı ve hücre içi sinyal iletim molekülleri üzerine olan etkileri” 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2014.

**Poster-** Beker MC, Caglayan AB, **Kelestemur T**, Yalcin E, Ozturk G, Kilic E “Normobarik oksijen tedavisinin beyin felci sonrası gelişen hasar, sinyal mekanizmaları ve beyin kan dolaşımına olan etkileri” 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2014

**Sözlü sunum- Kelestemur T**, Caglayan AB, Beker MC, Yilmaz B, Kilic E “Sıçanlarda memantin ve melatonin tedavisinin travmatik beyin hasarı sonrası etkilerinin araştırılması” 11. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 2013.

**Sözlü Sunum- Keleştemur T** “Investigation of the Pathophysiological Changes in the Signalling Pathway and Sensory and Motor Behavioral Changes after Traumatic Brain Injury in Rats” TFBD 38 th. National Physiology Meeting September 2012 / Trabzon / Turkey

## 8.Projeler

## 9.İdari Görevler

İstanbul Medipol Üniversitesi Yerel Etik Kurul Üyesi

## 10.Bilimsel Kuruluşlara Üyelikleri

Türk Nöroendokrin Derneği

Türkiye Fizyolojik Bilimler Derneği

Türkiye Beyin Araştırmaları ve Sinirbilimleri Derneği

## 11.Ödüller

15. Ulusal Sinirbilim Kongresi Sözlü Sunum 1.lık ödülü Sakarya 2017

13. Ulusal Sinirbilim Kongresi Poster 1.lık ödülü Konya 2015

## 12. Verdiği Dersler

Akademik Yıl	Dönem	Ders Adı	T	U	Öğrenci Sayısı
2010-2011	2.	Tıp Fak. Öğr. Lab		x	25
2011-2012	2.	Diş Hekm. Öğr. Lab		x	20
2014-2015	2.	Sağlık Bil. Fak./Fizyoloji	x		110
2015-2016	1.	SHYMO/Fizyoloji	x		215
2015-2016	2.	Diş Hek. 2. Sınıf /Fizyoloji	x		130
2016-2017	1.	Diş Hek. 1. Sınıf /Fizyoloji	x		120
2016-2017	1.	Diş Hek. 2. Sınıf /Fizyoloji	x		140
2016-2017	2.	Diş Hek. 2. Sınıf /Fizyoloji	x		140



T.C.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
23/02/2018	16		Dr. Taha KELEŞTEMUR

“Hipoksik İskemisi Sonrası Normobarik Oksijen Tedavisinin Yenidoğan Sıçanlarda Beyin Hasarı Ve Plastisitesi Üzerine Etkileri” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliği” ile karar verilmiştir.

**Etik Onay Geçerlilik Süresi: 2 yıl**

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Turan DEMİRCAN	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet OZANSOY	
Üye	Öğr. Gör. Dr. Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	





T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve  
Araştırma Merkezi Müdürlüğü



Karar Sayısı: 2018 – 002

Karar Tarihi: 23.02.2018

**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI**

Proje yürütücüsünün başvurusu doğrultusunda **2016-041** etik sayılı **"Yeni doğan sıçanlarda deneysel hipoksik iskemi sonrası normobarik oksijen ve melatonin uygulamasının beyin hasarı ve plastisitesi üzerine etkileri"** başlıklı projenin isminin, **"Hipoksik iskemi sonrası normobarik oksijen tedavisinin yeni doğan sıçanlarda beyin hasarı ve plastisitesi üzerine etkileri"** olarak değiştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof.Dr.Selim KUTLU  
Başkan-Katılmadı

Prof.Dr.Lema TAVLI  
Üye

Prof.Dr.Ayşe Saide  
ŞAHİN  
Üye

Prof.Dr. Mehmet GÜL  
Üye

Doç.Dr.Ercan KURAR  
Üye

Doç.Dr.Tevfik  
KÜÇÜKKARTALLAR  
Üye

Doç.Dr.Hasan  
Hüseyin KOZAK  
Üye

Yrd.Doç.Dr.Ömer  
TANYELİ  
Üye

Vet.Hek.Halil Aydın  
ŞİMŞEK  
Üye

Vet.Hek.Alpaslan OZKURKÇÜLER  
Üye

Mustafa ŞİRİN  
Üye

**Adres** : Meram Tıp Fakültesi Kampüsü 42080 Akyokuş – Meram / KONYA

**Tel** : +90 332 223 71 11

**Faks** : +90 332 223 71 24

**e-posta** : [konudam@konya.edu.tr](mailto:konudam@konya.edu.tr)

**Elektronik Ağ** : <http://www.konya.edu.tr/merkezler/konudam>