

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

**HİPOKSİK İSKEMİK ENSEFALOPATİYE MARUZ KALMIŞ
YENİDOĞAN RATLARDA LİKOFELON'UN
NÖROPROTEKTİF ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Serkan KIRIK**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Erdal TAŞKIN**

**ELAZIĞ
2014**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan Orhan

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Erdal YILMAZ

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafınızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Erdal TAŞKIN _____

Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

.....	_____
.....	_____
.....	_____
.....	_____
.....	_____

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında emeği geçen, bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, her konuda desteklerini esirgemeyen hocam Doç. Dr. Erdal TAŞKIN' a, uzmanlık eğitimim boyunca yardımlarından dolayı Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Erdal YILMAZ'a ve bölüm hocalarıma sonsuz teşekkür ederim ve saygılarımı sunarım. Örneklerin çalışmasındaki katkılarından dolayı Histoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU' na, Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim görevlisi Doç. Dr. Nemciye CANACANKATAN'a ve tez istatistiklerinin yapılmasında yardımlarından dolayı Farmakoloji öğretim üyesi Doç. Dr. Selçuk İLHAN'a yardımlarını esirgemeyen Yasemin, Sema ve diğer araştırma görevlisi arkadaşlarıma, tüm yaşamım boyunca bana her türlü destek olan, fedakarlıkta bulunan sevgili anneme, babama, kardeşime eşim Yasemin' e, oğlum Eymen' e teşekkür ediyorum.

ÖZET

Hipoksik iskemik ensefalopati (HİE) prenatal, natal ve postnatal faktörlerin etkisiyle oluşan ve sistemik hipoksi sonucu serebral kan akımının azalmasıyla gerçekleşen beyin hasarıdır. Tıp alanındaki tüm gelişmelere rağmen HİE' ye bağlı mortalite ve morbidite oranı halen yüksek olarak gözlenmektedir.

Günümüzde HİE tedavisinde sadece hipotermi destekleyici tedavi olarak mevcuttur. Bu çalışmadaki amacımız daha önceki HİE tedavi çalışmalarında tek başına siklooksijenaz inhibitörlerinin ve/veya tek başına lipoksijenaz inhibitörlerinin başarısı gösterilemediğinden, hem COX hem de LOX dual inhibitörü olan likofelonun HİE tedavisindeki etkisini göstermektir.

Bu amaçla Wistar cinsi sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanları her grupta 7 hayvan olacak biçimde 4 gruba ayrıldı. Hİ grubundaki sıçanlara karotis ligasyonu uygulanarak hipoksiye maruz bırakıldı. Sonrasında gruplara likofelon, likofelon + allopurinol ve serum fizyolojik verildi. Deney sonunda sıçanlar anestezi altında dekapite edildi. Ardından sıçanların beyin dokuları hızla çıkarılıp TUNEL teknikleri uygulanarak boyandı. Sıçanlardan spektrofotometrik yöntemle Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9 aktivitesi çalışıldı.

Çalışmamızda likofelonun apoptozisi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında azalttığı tespit edildi. Kaspaz aktivitesi likofelon grubunda allopürinol+likofelon grubuna göre düşük tespit edildi.

Çalışmamızda likofelonun hipoksik iskemik hasar sonrası gecikmiş nöronal hasar incelendiğinde kaspaz aktivitesini ve apoptozisi azaltması yeni bir umut kaynağı olarak düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Hipoksik iskemik ensefalopati, likofelon, apoptozis

ABSTRACT

THE EFFECT OF THE LICOFELONE IN NEWBORN RATS WHO EXPOSED HYPOXIC ISCHEMIC ENCEPHALOPATHY

Hypoxic ischemic encephalopathy (HIE) is brain damage that occurs prenatal, natal and postnatal factors under the effect of systemic hypoxia results of a cerebral blood flow reduction. Despite all the improvements in medicine HIE connected mortality and morbidity rates are still quite high.

Today, only hypothermia as a supportive therapy in the treatment of HIE is available. The aim of this study previous HIE treatments couldn't have shown the success of the single use of COX inhibitor and/or single use of LOX inhibitors, dual inhibitor licofelone is to show effects in the treatment of HIE.

Wistar family rats performed for this purpose. Experimental animals in each group so that 7 animals were divided into 4 groups. Both rats in the hypoxic-ischemic groups were exposed to hypoxia by applying carotid ligation. Then licofelone, licofelone + allopurinol and salin were given. At the end of experiment, all groups of rats were decapitated under anesthesia. After the decapitation, brains rapidly removed and tissues were stained applying the TUNEL method. Moreover, caspase-3, caspase-8, caspase-9 activity were studied with spectrophotometric methods.

In this study, licofelone reduced apoptosis compared to control group. In licofelone group, caspase activity were lower than the allopurinol+licofelone group.

In this study, when we searched neuronal damage after HI insult was concluded licofelone decrease caspase activity and apoptosis it made a new hope light.

Key words: Hypoxic ischemic encephalopathy, licofelone, apoptosis

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
KISALTMALAR LİSTESİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Hipoksik İskemik Ensefalopati	1
1.1.1. Tanımı ve Sıklığı	1
1.1.2.1. Kronik-kısmi asfiksi	3
1.1.2.2. Akut- tama yakın asfiksi	5
1.1.3. Patoloji	6
1.1.4. Perinatal Hipoksik İskemik Beyin Hasarının Patogenezi	8
1.1.4.1. Hipoksemi	9
1.1.4.2. Hipoksi-İskemi	9
1.1.4.3. Beyin Hasarında Hücresel Mekanizma	11
1.1.5. Hipoksik İskemik Beyin Zedelenmesinin Önlenmesine Yönelik Girişimler	22
1.1.5.1. Enerji Kaybının Azaltılması	22
1.1.5.2. Glutamat Salınımının İnhibisyonu	23
1.1.5.3. Glutamat Uptake’indeki Sorunun Giderilmesi	23
1.1.5.4. Glutamat Reseptörlerinin Blokajı	24
1.1.5.5. Lökosit/mikroglial/sitokin Etkilerinin İnhibisyonu	25
1.1.5.6. Hücre İçi Olayların Progresyonunun Engellenmesi	26
1.2. Eikozanoidler ve Otakoidler	26
1.2.1. Eikozanoidlerin Biyosentezi	27
1.2.1.1. Siklooksijenaz Ürünleri (Prostaglandinler, Prostaniklinler ve Tromboksanlar)	27

1.2.1.2. Lipooksijenaz Ürünleri	28
1.2.1.3. Eikozanoid Metabolizması	29
1.2.1.4. Eikozanoidlerin Etki Mekanizması	29
1.2.2. Fosfolipaz A2 ve Hipoksik İskemik Beyin Hasarı	30
1.3. İnflamatuvar Merdiyatorlar ve Neonatal Beyin Hasarı	31
1.3.1. Prostaglandinler ve HİE	32
2. GEREÇ VE YÖNTEM	34
2.1. Tunel Metodu	35
2.2. Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 Ölçüm Yöntemleri	37
2.3. İstatistiksel Değerlendirme	37
3. BULGULAR	38
4. TARTIŞMA	45
5. KAYNAKLAR	533
6. ÖZGEÇMİŞ	656

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	Akut ve kronik asfiksini karşılaştırılması	3
Tablo 2.	HİE’ de etkilenen sistem ve organlar	5
Tablo 3.	Yenidoğan beyninin hipoksik-iskemik hasara cevabı.	6
Tablo 4.	HİE’ li yenidoğanda nöropatolojik özellikler	7
Tablo 5.	Nekroz ve apoptoz arasındaki farklılıklar	19
Tablo 6.	Apoptozisin moleküler düzeni	20
Tablo 7.	HİE’ de beyin hasarının önlenmesindeki mevcut girişimler	24
Tablo 8.	Deneysel modellerde perinatal hipoksik iskemik beyin zedelenmesinde inflamasyon ve sitokinler	26
Tablo 9.	TUNEL boyama prosedürü	36
Tablo 10.	Çalışma grubundaki ratların sol ve sağ serebral kaspaz-8 aktiviteleri	39
Tablo 11.	Çalışma grubundaki ratların sol ve sağ serebral kaspaz-9 aktiviteleri	40
Tablo 12.	Çalışma grubundaki ratların sol ve sağ serebral kaspaz-3 aktiviteleri	41
Tablo 13.	Çalışma grubundaki ratların sol ve sağ serebral apoptotik indeksleri	42

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	HİE’ de gelişen patolojik mekanizmalar	9
Şekil 2.	Akson terminalinden salınan glutamatın postsinaptik dentrit ve astrosit içerisindeki döngüsü, reseptörleri ve iyon kanalları	12
Şekil 3.	Hücre içi kalsiyum homeostazı	14
Şekil 4.	Reoksijenizasyon-reperfüzyon döneminde serbest oksijen radikallerinin oluşumu	16
Şekil 5.	Kontrol grubunda çok sayıda görülen TUNEL pozitif boyanan apoptotik hücreler (10x40).	422
Şekil 6.	Allopürinol+ Likofelon grubunda azalmış sayıdaki apoptotik hücreler(10x40).	43
Şekil 7.	Likofelon grubunda belirgin sayıda azalmış apoptotik hücreler(10x40).	433
Şekil 8.	Sham grubunda az sayıda TUNEL pozitif boyanan apoptotik hücreler (10x40).	44

KISALTMALAR LİSTESİ

ACPD	: 1-amino-siklopentan-15,3R-dikarboksilik asit
ADP	: Adenozin difosfat
AMPA	: Alfa-amino-3.hidroksi-5.metil-4.izoksazol propionik asit
ATP	: Adenozin trifosfat
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
Ca⁺²	: Kalsiyum
Cl⁻	: Klor
COX	: Siklooksijenaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDRF	: Endotelden derive edilen gevşetici faktör
eNOS	: Endoteliyal nitrik oksit sentaz
FAD	: Flavın adenin dinükleotit
GH	: Growth hormon
Hi	: Hipoksik iskemi
HiE	: Hipoksik iskemi ensefalopati
IGF-1	: İnsülin like growth faktör-1
IL-1β	: İnterlökin-1 beta
IL-6	: İnterlökin-6
iNOS	: İndüklenen nitrik oksit sentaz
K⁺	: Potasyum
KA	: Kainat
LOX	: Lipoksijenaz
5-LOX	: 5-Lipoksijenaz
LT	: Lökotrien
mPTP	: Mitokondriyal transitiyon permeabilite poru
MSS	: Merkezi sinir sistemi
Na⁺	: Sodyum
NAD	: Nikotin adenin dinükleotit
NADP	: Nikotin adenin dinükleotit fosfat
NMDA	: N-Metil-D-Aspartat
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz

NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NSAİİ	: Nonsteroidal antiinflatuar ilaçlar
O₂	: Oksijen
PG	: Prostaglandin
PVL	: Periventriküler lökomalazi
PV-İVK	: Periventriküler-intraventriküler kanama
QA	: Kuiskalat A
TGFB	: Transforming growth faktör B
TNF-α	: Tümör nekrosis faktör alfa

1. GİRİŞ

Hipoksik iskemik ensefalopati (HİE), fetus ve yenidoğan bebekte, plasental ve pulmoner gaz değişiminin bozulması ile oluşan sistemik hipoksi ve serebral kan akımının azalması sonucu ortaya çıkan beyin zedelenmesidir (1).

Hipoksik iskemi ensefalopati’de hipoksi ile hücre ölümü arasında geçen sürede (terapotik pencere) olan ve hücre ölümüne sebebiyet veren moleküler olaylar kaskadının sonlandırılarak, apoptozun(programlanmış hücre ölümü) önlenmesi HİE’ nin tedavisinde güncel yaklaşımların temelini oluşturmaktadır (2).

Araşidonik asitten prostoglandin (PG) biyosentezindeki anahtar enzim siklooksijenaz (COX), nonsteroidal antiinflatuar ilaçların (NSAİİ) ana hedefidir (3). İyi bilinmektedir ki oksidatif stresin belli türlerine maruziyet sonrası siklooksijenaz yolu serbest radikallerin ana kaynağı olur (4). Araşidonik asit metabolizmasındaki diğer bir önemli yolak lipoksijenaz (LOX) yolağıdır. Lökotrienlerin (LT) oluşumuna neden olan 5-lipoksijenaz (5-LOX) yolağı pro-enflatuar kaskad olarak bilinmektedir (5). Serbest radikallerin hücrelere, hücre içi moleküllere zarar verebildiği; proapoptotik genleri tetikleyerek kaspaz-3 aktivasyonunu içeren ve hücreyi apoptoza götüren olaylar zincirini uyardığı ileri sürülmüştür (2).

Allopürinol, hipoksantin katabolizmasını inhibe eder. Ksantin oksidazın, serbest radikaller için önemli bir kaynak olduğu bilinmektedir (6). COX ve LOX dual inhibitörlerinin tek başına bu enzimi hedefleyen bileşiklerden daha etkili olduğu gösterilmiştir (7).

Günümüzde HİE tedavisinde sadece hipotermi destekleyici tedavi olarak mevcuttur. Bu çalışmadaki amacımız daha önceki HİE tedavi çalışmalarında tek başına siklooksijenaz inhibitörlerinin ve/veya tek başına lipoksijenaz inhibitörlerinin başarısı gösterilemediğinden, hem siklooksijenaz hem de lipoksijenaz inhibitörü olan likofelonun HİE tedavisindeki etkisini göstermektir.

1.1. Hipoksik İskemik Ensefalopati

1.1.1. Tanımı ve Sıklığı

Hipoksik iskemik ensefalopati (HİE), fetus ve yenidoğan bebekte, plasental ve pulmoner gaz değişiminin bozulması ile oluşan sistemik hipoksi ve serebral kan

akımının azalması sonucu ortaya çıkan beyin dokusunun hasarıdır. Hipoksi (anoksi), bir veya birkaç organda oksijenin kısmi veya tam yokluğudur. Hipoksemi ise kanda oksijen konsantrasyonunun azalmasıdır.

Hipoksik iskemik ensefalopatinin patogenezindeki birçok olay açıklanmış olmasına rağmen özellikle ağır olgularda tedaviye rağmen kalıcı komplikasyonlar sık görülmektedir. Gelişmiş ülkelerde bile doğan tüm bebeklerin yaklaşık 2-5: 1000’inde perinatal hipoksi-iskemi sonucu beyin zedelenmesi gelişmekte ve bu bebeklerin %20-40’ında belirgin nörolojik sekeller ve gelişme geriliği ortaya çıkmaktadır (1, 8).

Özellikle gelişmekte olan ülkelerde HİE görülme oranı yüksek olarak bildirilmektedir (9). Türkiye’de Türk Neonatoloji Derneği tarafından 1999 yılında yapılan perinatal mortalite çalışmasında perinatal ölümlerin %11’inin perinatal asfiksiye bağlı olduğu tespit edilmiştir (10).

Hipoksik iskemik ensefalopati tanı ve tedavideki ilerlemelere rağmen, halen yenidoğan yoğun bakım ünitelerinin önemli bir sorunu olmaya devam etmektedir. Perinatal asfiksi, neonatal bakımda, tanı ve tedavideki tüm gelişmelere rağmen gelişmiş ülkelerde bile yenidoğanların en önemli mortalite ve morbidite nedenlerinden birisidir. Perinatal ölümlerin %17’sinden, serebral palsinin ise %15-20’sinden perinatal asfiksini sorumlu olduğu düşünülmektedir (11). Wu ve ark. (12) 2004’de yayınladıkları retrospektif bir çalışmada perinatal asfiksi insidansını ortalama 4.5/1000 canlı doğum olarak bildirmişlerdir. Ian ve ark. (13) İsveç’te yaptıkları araştırmada perinatal asfiksi insidansını 5.4/1000 canlı doğum olarak saptamışlardır. Ülkemizde Satar ve ark. (14) yaptıkları çalışmada HİE oranını % 6.4 olarak bildirmişlerdir. Yine ülkemizde Öztürk ve ark. (15) çalışmalarda HİE oranını %12 olarak bildirmişlerdir. 1999-2005 yıllarını kapsayan 7 yıllık süre içinde ülkemizde yapılan başka bir çalışmada ise bu oran 10/1000 oranında saptandı (16).

Hipoksik iskemi ensefalopati’nin patogenezindeki birçok olay açıklanmış olmasına rağmen özellikle ağır olgularda tedaviye rağmen kalıcı komplikasyonlar sık görülmektedir (1). HİBH gelişmiş hastalarda olayın yeri ve genişliğine göre serebral palsy, nöbetler, öğrenme güçlükleri, görme ve işitme kaybı, motor kusurlar gibi pek çok kalıcı klinik durum gelişebilmektedir. Perinatal asfikside çoklu sistem ve buna bağlı organ etkilenmesi olmaktadır. MSS etkilenmesinden sonra, üriner sistemin

%50, kardiyovasküler sistemin %25, solunum sisteminin %23 oranında etkilendiği bildirilmektedir (17).

1.1.2. Asfiksi Tipleri

Perinatal asfiksi, "kronik-kısmi" ve "akut-tam" şeklinde iki ayrı grup halinde ortaya çıkmaktadır. Bu iki durum birbirinden klinik ve patolojik özellikler ile ayırt edilir (Tablo 1) (18).

Tablo 1. Akut ve kronik asfiksini karşılaştırılması

	Kronik-kısmi	Akut-tam
Riskli durumlar	Ablasyo plasenta Plasental hipoperfüzyon Uterusta hipertonisite	Ablasyo plasenta Uterus rüptürü Kordun tam obstrüksiyonu Maternal kardiyo respiratuvar arrest
Asfiksi için geçen süre	1-3 saat	> 10 dk
Serebral kan akımında yeniden düzenleme	Oluşmuş	Yetersiz
Klinik bulguların çıkışı için sessiz dönem (6 – 48 saat)	Var	Yok
Beyin ödemi	Var	Yok
Konvülzon	Var	Var/Yok
Beyin sapı bulguları	Yok	Var

1.1.2.1. Kronik-kısmi asfiksi

Hayvan çalışmalarında maternal plasental hipoperfüzyon, uterus hipertonisitesi, umbilikal kord obstrüksiyonu ve fetal perfüzyonda azalma gibi nedenlerle gelişen plasental perfüzyon bozukluklarında, olay bir saat veya daha uzun sürmüştü fetusta progresif hipoksemi ve buna bağlı asidoz geliştiği gösterilmiştir. Bu durumu karşı koymak için vücuttaki kan akımı yeniden düzenlenmekte, kan akımı vital olmayan organlardan (böbrekler, gastrointestinal sistem, karaciğer, kas ve deri), vital organlara (kalp, beyin ve adrenaller) yönlendirilmekte ve serebral kan akımı belirgin şekilde artmaktadır. Bu uyum esnasında serebral perfüzyon korunmaktadır. Ancak fetal hipoksemi bir süre daha devam ederse, böyle bir kompensasyon ile sağlanan serebral perfüzyon yetersiz olur ve merkezi sinir sistemine giden kan akımında yeni bir kompensasyon ortaya çıkar (19).

Beyin hemisferlerinin kan akımında azalma olurken, bazal metabolizmanın fazla olduğu bölgeler olan talamus, beyin sapı ve serebelluma daha fazla kan

gönderilmeye çalışılır. Serebral hemisferler, özellikle kanlanmanın en uç noktaları olan parasagittal korteks ve beyaz cevher hipoksemiden etkilenmeye başlar; küçük infarktlar veya bölgesel konvülsiyon odakları gelişir, olay ilerlerse bütün serebral alanları etkileyen infarkt odakları ortaya çıkar (8, 19).

Ortaya çıkan bulgular serebral perfüzyondaki bu değişikliklere bağlı olarak gelişmekte, birçok organda H-İ hasar görülmektedir (Tablo 2). Olguların yaklaşık % 60'ında beyne ek olarak en az iki organ daha etkilenmiştir. Üriner sistemin %50, kardiyovasküler sistemin %25, solunum sisteminin %23 oranında etkilendiği bildirilmektedir (17).

Nörolojik bulgular, hipoksik-iskemik hasarın derecesine, süresine ve yerleşimine bağlıdır. Hipoksiye maruz kalmış yenidoğan doğum sonrası beyin hasarı ve metabolik asidoz nedeni ile depresedir. Hipotoni, letarji ve nöbetler ortaya çıkabilir. Hipotoni oldukça ağır olabilir. Dakikalar veya saatler içinde bebeğin aktivitesi ve tonusunda artma olur, spontan olarak ve uyarılara bağlı tremorlar görülebilir. Nöbetler genellikle 6-12 saat sonra görülmeye başlar. Genellikle doğum sonrası ilk 24 saatte görülür. Nöbetlerin sıklığı giderek artar ve genellikle başlangıç tedavisine dirençlidir. 2-5 gün sonra konvülsiyonlar azalmaya başlar veya kaybolur. Medikal olarak kontrol edilebilir duruma gelir. Ağır hasarın olduğu vakalarda şiddetli beyin ödemi bulguları vardır. Kafa içi basınç artışı bulguları (ön fontanelde bombeleşme, kranial suturelarda açılma gibi) genellikle 24 saatten sonra başlar, 48. saatte en şiddetli seviyeye ulaşır. Bu hastalarda yeniden hipotoni gelişir, bebeğin hareketleri azalır yada tamamen kaybolur. Beyin sapı disfonksiyonuna ait bulguları (sabit pupiller, apne gibi) vardır (19, 20).

Term bebekte gözlenen HİE' de; selektif nöron nekrozu, parasagittal zedelenme ve fokal iskemik beyin nekrozu görülür. Burada önem arz eden olay selektif nöron nekrozudur. Neonatal Hİ beyin hasarı sonrası gelişen nöronal hasar özellikle apoptozis ve nekroz sonucu ortaya çıkar (21). Ek olarak iskemi sonrası geç süreçte görülen nöron ölümü DNA fragmentasyonu ile ilişkili olduğu için apoptozis olarak isimlendirilir (22).

Tablo 2: HİE’ de etkilenen sistem ve organlar (19)

Kardiyovasküler sistem	Sıvı-elektrolit dengesi
Miyokard iskemisi	Akut böbrek yetmezliği
Kalp yetmezliği	Uygunsuz ADH Salgılanması
Solunum sistemi	Hipokalsemi
Respiratuvar distres sendromu (RDS)	Hiponatremi
Apne	Hiperpotasemi
Pulmoner kanama	Metabolik
Pulmoner hipertansiyon	Hipotermi
Santral sinir sistemi	Hipoglisemi
Serebral ödem	Kanama bozuklukları
Konvülziyonlar	Dissemine intravasküler koagülasyon(DİK)
İntrakraniyal kanama	Adrenal kanama
	Gastrointestinal sistem
	Nekrotizan enterokolit (NEK)
	Hematemez, melena

Beyin hemisferlerindeki infarkt yaygın ve özellikle beyin ödemi bulguları varsa, lateral ventriküller kompresedir, serebral beyaz cevher ekojenitesinde difüz artma gelişir, serebral gri cevher (korteks ve bazal ganglionlar) ile beyaz cevher arasındaki farklılık ortadan kalkar. Bir-iki hafta sonra beyin hemisferlerindeki nekroz alanları daha da belirginleşir ve sonunda multikistik ensefalomalazi veya serebral hemisferlerin total obliterasyonu olur. Talamus, beyin sapı ve serebellum ise daha iyi korunmuştur (19, 20).

1.1.2.2. Akut- tama yakın asfiksi

Olay akuttur, hipoksi şiddetlidir. Olay hızlı gerçekleştiğinden organlar arası ve intrakranial kan dolaşımının yeniden düzenlenmesi yetersizdir. Buna ek olarak hasar bulguları, metabolik aktivitenin fazla, enerji depolarının yetersiz olduğu yerlerde daha fazla görülür. Serebral hemisferler daha iyi korunmuştur, beyin ödemi ortaya çıkmaz. Parsiyel asfiksinin tersine nörolojik bulguların ortaya çıkması için sessiz geçen dönem görülmez. Hayvan çalışmalarında, olay on dakikadan kısa ise, beyin hasarı bulgularının düzeldiği gösterilmiştir. 10-25 dakika kadar sürdüğünde ise talamus ve beyin sapı çekirdeklerinde ağır zedelenme görülür. 25 dakikadan uzun süren durumda ise kalp hasarı ağır olduğu için irreversible vasküler kollaps gelişir (19).

İnsanlarda tama yakın asfiksi nadirdir. Maternal kardiyopulmoner arrest gibi durumlarda görülebilir. Bu vakaların birçoğunda daha önceden başlamış olan kısmi asfiksiye ait bulgular vardır. İleri derecede etkilenmiş bebekler doğduklarında deprese ve bradikardiktir, resüsitasyon gerekir. Spontan solunum yoktur. Konvülziyonlar görülür. Beyin ödemine bağlı intrakranial basınç artışı bulguları yoktur. Sabit pupiller, kornea refleksinin yokluğu (pons zedelenmesi), öğürme refleksinin kaybı, dilde fasikülasyonlar görülebilir. Bu bulgular genelde kalıcıdır. Öğürme refleksinin azalması sebebiyle beslenme ve yutma bozuklukları görülür, biriken sekresyonlar sorun olur ve bebeğin entübe edilmesi gerekebilir. Diğer organlardaki hasara ait bulgular daha hafiftir (19).

1.1.3. Patoloji

Hipoksi sonrası beyin hasarının patolojik görünümü tek tip değildir. Oluşan beyin hasarının yeri ve şiddeti şu faktörlere bağlıdır: Asfiksiye sebep olan olayın şiddeti (total veya parsiyel), etyolojik faktörün süresi (akut veya kronik), beynin gelişimsel olgunluğu (prematüre veya term), beyinde duyarlı bölgeler (vasküler faktörler ve N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin dağılımı) (19, 23). Histolojik incelemelerle lezyonun yaşı konusunda bilgi edinilebilir (Tablo 3) (19).

Tablo 3. Yenidoğan beyninin hipoksik-iskemik hasara cevabı (19).

Bulgu	Gün
Reaktif astrositozis	12 saat- 4 gün
Mikroglial proliferasyon	8 saat- 3 gün
Nöronal karyoreksis	12 saat- 2 gün
Makrofaj infiltrasyonu	4- 6
Kapiller endotelyel reduplikasyon	5
Fibriller gliosis	6
Kist oluşumu	10- 42

Hipoksik iskemi ensefalopati esas olarak term bebeklerde geliştiği için burada daha çok nöron nekrozuna neden olan patolojik biyokimyasal olaylardan bahsedilecektir. Matür ve preterm bebeklerde nöropatolojik özellikler farklılık gösterir (Tablo 4).

Tablo 4. HİE’ li yenidoğanda nöropatolojik özellikler (24)

Miad yenidoğan	Selektif nöronal nekroz
	Bazal ganglia ve talamusun status marmoratusu
	Parasagital serebral hasar
	Fokal ve multifokal iskemik serebral nekroz
Prematür yenidoğan	Periventriküler lökomalazi
	Selektif nöronal nekroz
	Fokal ve multifokal iskemik serebral nekroz
	Periventriküler hemorajik infarkt

Hipoksik iske mi ensefalopatide gelişebilen başlıca serebral lezyonlar; selektif nöron nekrozu, bazal ganglion ve talamusta status marmoratus, parasagital serebral hasar, periventriküler lökomalazi (PVL), periventriküler-intraventriküler kanama (PV-İVK), fokal ve multifokal iskemik beyin lezyonlarıdır (19).

Selektif nöronal nekroza HİE’ de sık rastlanılır, serebral korteks, talamus, beyin sapı ve spinal kordun ön boynuz hücrelerini içerir. Fokal ve multifokal iskemik beyin hasarında ana serebral arterlerden birinin (fokal) ya da birkaçının oklüzyonu sonucu gelişen iskemik beyin hasarıdır. Prematür bebeklerde multifokal infarktlar daha sık görülür. Tromboemboli fokal beyin hasarının en olası nedeni olarak kabul edilir. Embolinin kaynağı genellikle plasental infarkt, hasarsa uğramış veya kateterize edilmiş damarlardır. Lezyon, vakaların yaklaşık yarısında orta serebral arterin beslediği alanda gözlenir. Bu tip lezyonlarda hücre organellerinin tamamında nekroz oluşur. Anoksik değişiklikten 18–24 saat sonra ışık mikroskobunda değişiklikler izlenmeye başlar.

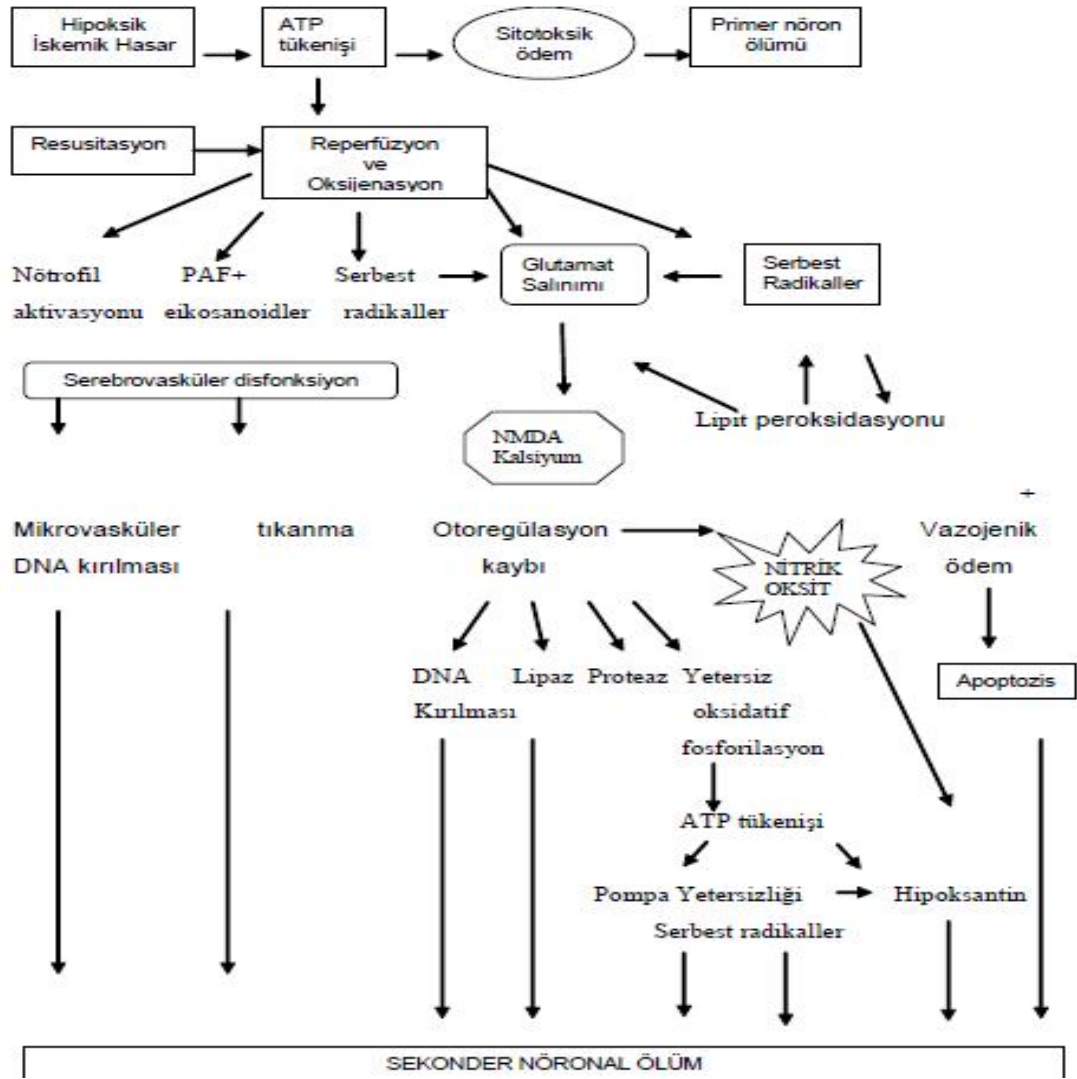
Bölgeye aktifleşmiş monosit ve makrofaj göçü olur. 36–48 saat sonra bu hücreler geniş, köpüksü makrofajlara değişir. Sonrasında astrositik hipertrofi ve proliferasyon oluşur. Bazı lezyonlarda kalsifikasyon izlense bile genelde ventrikülle bağlantılı veya bağlantısız kistik kavitasyon ortaya çıkar. Kavite oluşumuna bağlı tek büyük lezyona ‘porensefali’ denir. ‘Hidransefali’ ise bilateral ve içi BOS ile doludur. ‘Multikistik ensefalomalazi’de ise bilateral küçük kavitasyon odakları vardır. Fokal ve multifokal beyin lezyonları kraniyal USG, Beyin BT ve Beyin MR ile diğer lezyonlara göre daha kolay saptanabilirler (19, 25, 26).

1.1.4. Perinatal Hipoksik İskemik Beyin Hasarının Patogenezi

Miad bebeklerde asıl olay nöron hasarı iken prematür bebeklerde oligodendroglial/beyaz cevher hasarı daha hâkimdir. Hipoksik-iskemik hasarın önlenmesi, hücre yıkımına yol açan olayların anlaşılması ile mümkün olabilir (24).

Serebral hasar ile sonuçlanan HİE tablosunun patogenezinin hipoksi ve iskeminin birlikteliği sonucunda meydana gelen bir dizi biyokimyasal ve patolojik reaksiyonlar rol alır. Tek başına hipoksi, iskemi ya da ATP gibi enerji kaynağı olan moleküllerin azalmasının hipoksik-iskemik (H-İ) beyin hasarının oluşması için yeterli olmadığı yapılan hayvan deneylerinde gösterilmiştir (19, 27-29).

Hasarın esas bulguları akut hipoksi-iskemi döneminde değil, daha çok reperfüzyon ve reoksijenasyon döneminde ortaya çıkar. Gelişen ilk olay glikozun ve oksijenin azalmasıdır. Hücre ölümüne neden olan olaylar hipoksik-iskemik olayın sonlanmasından sonra ve reperfüzyon sırasında hücre içi enerjide çok da fazla düşüş olmasını beklemeden oluşur. Sonrasında glutamat reseptörlerinin aktivasyonu gerçekleşir. Nöronların ölümüne sebep olan diğer olaylar sitoplazmik kalsiyumun artması ve kalsiyuma bağlı süperoksid anyon, hidroksi radikaller gibi serbest oksijen radikallerinin ve nitrik oksit derivelerinin oluşması gibi çeşitli olayların aktivasyonudur. Nöron ölümüne neden olan olaylar zincir hipoksik-iskemik hasarın sonlanmasından birkaç saat sonra oluşur. Bundan dolayı bu dönemde beyin hasarını azaltabilecek veya hasarın ilerlemesini engelleyebilecek önemli girişimler yapılabilir (24).



Şekil 1. HİE’ de gelişen patolojik mekanizmalar (24)

1.1.4.1. Hipoksemi

Fetüs intrauterin dönemde oksijen basıncının 22-28 mmHg arasında olduğu fizyolojik hipoksemik bir ortamdır. Bu basıncın 15 mmHg’ ya düştüğü durumlarda normal kardiyak fonksiyonlar birkaç saat sürer, sonrasında kalp hızı ve kan basıncının azalmasıyla birlikte laktik asidoz gelişir. ATP gibi yüksek enerjili rezervlerin hipoksemiye karşın korunması, sistemik hipotansiyonun eşlik ettiği hipoksemi durumlarında beyin hasarının gelişmesini yüksek olasılıkla engelleyemez (29, 30).

1.1.4.2. Hipoksi-İskemi

Hipoksiye bağlı beyin hasarında oksijen azalmasına ek bir takım faktörler de rol oynar. İlk hayvan çalışmaları Vannucci ve ark. (31) tarafından yapılmıştır.

Annelerinin abdominal aortasının ligasyonu ile asfiksi oluşturulan term maymun fetüslerinde iyileşmeyi takiben esas olarak serebral hemisferlerde hasar geliştiği gösterilmiştir. Ek olarak kortikal gri cevherde atrofi, beyaz cevherde skleroz ve bazal gangliyonlarda status marmoratus şeklinde hasarlanma gözlenmiştir. Benzer lezyonlar perinatal dönemde serebral hipoksi-iskemi meydana gelip yaşayan bebeklerde de saptanmıştır. Ek olarak Brann ve Vannucci, gaz anestezik ve halotan ile maymun annelerinde hipotansiyon oluşturarak parsiyel intrauterin asfiksiye maruz bıraktıkları term maymun fetüslerinde ağır hipoksemiye ek olarak kombine metabolik ve respiratuvar asidoz oluştuğunu tespit etmişlerdir. Doğumu ve yeniden canlandırmayı takip eden dönemde maymunların mekanik ventilasyona ihtiyaç duydukları, konvülsiyon geçirdikleri ve 96 saatten önce stabil hale gelmedikleri görülmüştür. İncelemelerde yaygın beyin ödemi ve soluklukla beraber, hemorajik nekrozun özellikle serebral korteks ve subkortikal beyaz cevherde oluştuğu gösterilmiştir. Sistemik tansiyonu daha düşük olan maymunlarda asfiksini daha ağır beyin zedelenmesine yol açtığı görülmüştür. Hipoksik kardiyovasküler depresyon sonucu sistemik hipotansiyon oluşması için oksijen basıncının %40 veya altında olması gerekir (29, 31).

Beyin hasarının oluşabilmesi için serebral hipoksi-iskeminin en az ne kadar sürmesi gerektiği önemlidir. Bu sorunun cevabı serebral hipoksi-iskeminin şiddetine, olayın olduğu zamanki beynin anatomik ve fonksiyonel maturasyonuna bağlıdır. Hipoksi-iskemi sırasında daha matür hayvanlarda daha kısa süren total asfiksi sürecinde beyin hasarı meydana gelmektedir. Parsiyel serebral H-I' de bu süre daha uzundur. Hayvan deneylerinde bu süre üç saati geçmemiştir. Üç saatten daha az hipoksi-iskemiye maruz kalan hayvanların başarılı bir şekilde resüte edildiği görülmüştür (29).

Bu verilere ek olarak klinikte sistemik hipoksemiye bağlı serebral iskeminin meydana getirdiği beyin hasarı radyolojik bulgular, olayların seyri ve postmortem sonuçlar ile değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda hipoksemi ile birlikte sistemik hipotansiyonun özellikle prematür bebeklerde subkortikal, periventriküler lökomalaziye neden olduğu tespit edilmiştir. Vannucci ve ark. (31), 31 haftanın altındaki 33 yenidoğan bebekte ortalama arteriyel kan basıncının bir saatten daha uzun süre 30 mmHg'nın altında seyretmesi halinde periventriküler beyaz cevherde

ağır hemorajik infarkt veya iskemi geliştiğini göstermiştir. Ortalama kan basıncı 30 mmHg üzerinde olan bebeklerde ise daha az lezyon gelişmiştir.

1.1.4.3. Beyin Hasarında Hücresel Mekanizma

1.1.4.3.1. Enerji Dönüşümü

Geri dönüşümsüz doku hasarına sebep olan serebral H-İ' de beynin enerji rezervinde belirgin değişiklikler söz konusudur. Hipoksiye metabolik olarak gelişen ilk yanıt anaerobik glikolizdir. Doku oksijen basıncı kritik bir değerin altına geldiğinde (<0.1 mmHg) mitokondrilerin sitokrom sistemleri ansatüre hale gelir. Redükte ajanlar birikir. Oksidatif fosforilasyonla oluşan ATP üretimi durur. ATP nöronlarında da primer enerji kaynağıdır. ATP' ye bağımlı Na pompası, Na' un hücre içi birikimine neden olarak ödeme yol açar (32).

Aerobik ortamda mitokondrilerde oksidatif fosforilasyon ile 36 mol ATP üretilirken anaerobik ortamda glikoliz ile sadece 2 mol ATP üretilir. Enerji gereksinimi için anaerobik glikoliz hızının 18 kat artması gerekir. Fakat bu kapasite en çok 4–5 kat artabilir. Bunun sebebi bu sırada biriken NADH' tan kaynaklanan H^+ iyon birikiminin glikolizin kilit enzimi olan fosfofruktokinaz (PFK) aktivitesini inhibe etmesidir. Böylece glikoliz mitokondriyal oksidasyonun yerini dolduramaz (19, 32).

H-İ sırasında primer enerji yetmezliğinin ardından ortaya çıkan ve enerjinin kısmen geri kazanıldığı bir reperfüzyon dönemi vardır. Latent faz döneminde gecikmiş hücre hasarı gerçekleşir. Bu dönem birçok çalışmanın yapıldığı ilgi çeken bir dönemdir (24).

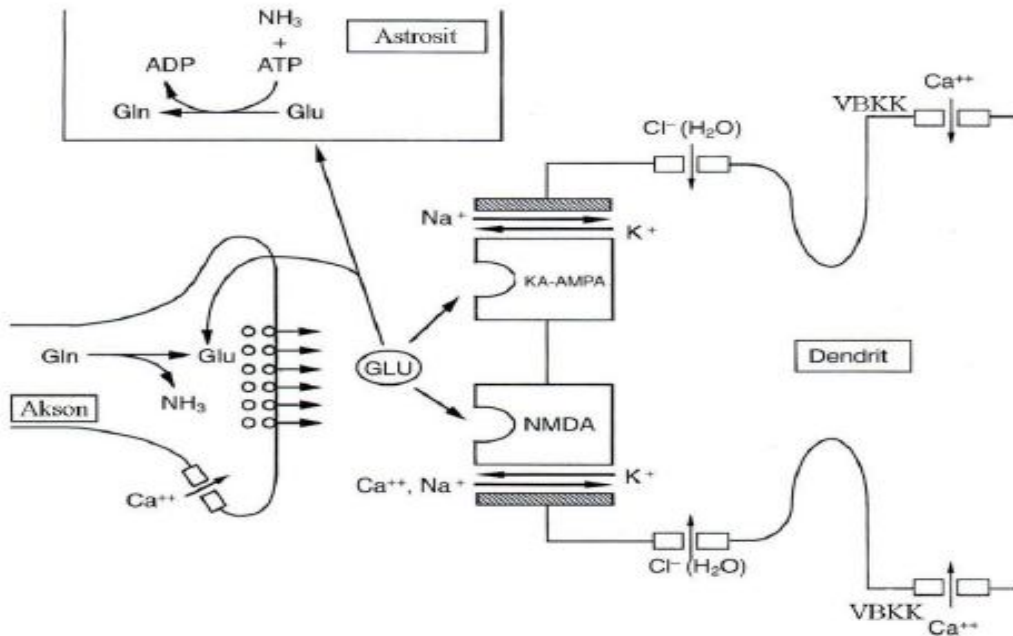
1.1.4.3.2. Hücre İçi Asidoz

Beyinde hasar oluşumuna yeten H-İ, laktik asit birikimiyle doku asidozu oluşturur (19). Hücre içi laktik asidoz, oksidatif metabolizmanın kısmi veya total anaerobik glikolizise değişimiyle oluşur. Bu esnada doku oksijeni düşer (33). H-İ sırasındaki hücresel asidoza bağlı olarak nöronal nekrozdan farklı mekanizmalar sorumlu olabilir. Bunlar arasında mitokondriyal fonksiyonun inhibe olması, iyon dengesinin bozulması, kalsiyum birikimi ve ödem oluşumu gösterilebilir (31).

1.1.4.3.3. Eksitatör Aminoasitlerin Salınması

Hipoksik-iskemi beyin hasarının önemli sebeplerinden birisi sinapslarda eksitatör nörotransmitterlerin birikmesidir. Eksitatör aminoasitlerin en önemli özelliği normal seviyeleriyle toksik seviyeleri arasındaki farkın çok az olmasıdır. İnsanda en çok bulunan ve en önemli eksitatör nörotransmitter aminoasit L-glutamattır. L-aspartat diğer bir önemli eksitatör aminoasittir (19, 23).

Hipoksik-iskemi durumunda ATP üretiminin azalması sebebiyle sinaptik aralıktan uzaklaştırılamayan L-glutamat, nörotoksik etkisini bağlandığı reseptörler aracılığıyla gösterir (Şekil-2). Bu reseptörler N-metil D-aspartat (NMDA), alfa amino 3-OH 5-metil 4 isoksazol propionik asit (AMPA), kainat (KA) ve 1-amino-siklopentan-15,3R-dikarboksilik asittir (ACPD veya kuiskalat-B). NMDA, AMPA ve KA reseptörleri postsinaptik membrandan sodyum ve kalsiyum iyon geçişini sağladıklarından dolayı bunlara iyonotropik reseptörler denir. ACPD reseptörüne ise protein kinaz-C aktivasyonu, fosfoinositol hidrolizi ve endoplazmik retikulumdan kalsiyum mobilizasyonunu sağladığı için metabolizmayı uyaran manasına gelen metabotropik reseptör denir. İyonotropik reseptörlerin tamamında Na^+ , K^+ geçişi sağlanır (19, 34).



VBKK: voltaj bağımlı kalsiyum kanalı, Glu: glutamat, Gln: glutamin.

Şekil 2. Akson terminalinden salınan glutamatın postsinaptik dentrit ve astrosit içerisindeki döngüsü, reseptörleri ve iyon kanalları

Nöronal hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda iyon bağımlı nöronal hasar mekanizması erken nörotoksisite ve gecikmiş nörotoksiste olmak üzere iki şekilde açıklanmıştır. Erken nörotoksisitede depolarizasyon esnasında nöronların içine fazla miktarda Na^+ ve Cl^- geçişiyle hücre içi ozmolaritesi artarak hücre içine su girişi olur. Sitotoksik ödem ve hücre ölümü meydana gelir.

Gecikmiş nörotoksisitede ise NMDA reseptörlerine bağlı kanallar yoluyla hücre içine giren Ca^{+2} iyonları, biyokimyasal olayları harekete geçirirerek nöron ölümüne sebebiyet verir.

Eksitator aminoasitlerin, serebral hipokside nöronal hasarın nedeni olduğunu gösteren bazı bulgular vardır. Bunlar:

1. Beynin hipoksiye duyarlı olan bölgeleri, glutamik asit içeren sonlanmanın fazla olduğu yerlerdir.
2. HİE’ de yapılan çalışmalarda BOS’ da glutamat ve aspartat seviyelerinin arttığı gösterilmiştir.
3. Yapılan çalışmalarda beyne glutamat verilmesiyle HİE benzeri değişiklikler olmuştur.
4. Yapılan çalışmalarda glutamat reseptör antagonistlerinin hipoksik hasarı önlediği tespit edilmiştir. Burada NMDA reseptör antagonistlerinin daha etkili olduğu gösterilmiştir (35).

Magnezyumun NMDA reseptör anatagonisti olarak antikonvülzan etki göstermektedir. Buna örnek olarak şiddetli preeklampsi nedeniyle magnezyum sülfat tedavisi uygulanan annelerinin bebeklerin takiplerinde nörolojik prognozlarının daha iyi olduğu görülmüştür (36, 37).

1.1.4.3.4. Hücre İçi Kalsiyum Birikimi

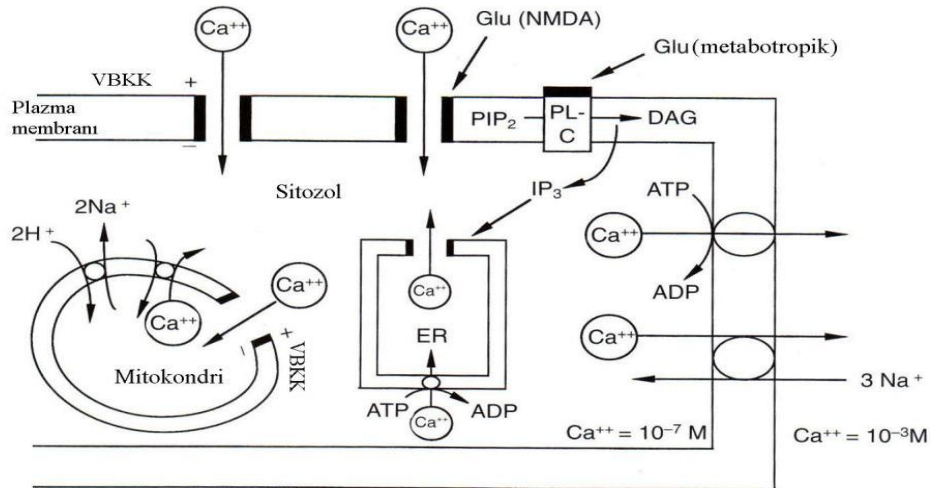
Hücresinin vital fonksiyonların sürdürebilmesi için intrasellüler ikinci bir haberci olarak görev yapan kalsiyum iyon konsantrasyonunun dar bir aralıkta tutulması gerekir. Serbest Ca^{+2} intrasellüler çok düşük düzeylerde olup, çoğu mitokondri ve endoplazmik retikulumda, kalan kısmı ise nöronun plazma membranı ve hücre içi organellerine bağlı halde bulunur. Bağlanma işlevi enerji bağımlı olur. İntrasellüler artmış Ca^{+2} membran bütünlüğünün bozulmasına ve hücre ölümüne sebebiyet verir (19).

HİE' de aşırı uyarılan glutamat reseptörleri hücre içinde serbest Ca^{+2} miktarını artırır (19). Bu artışın olası iki sebebi vardır:

1. Kalsiyumun hücre içinde serbestleşmesi
2. Plazma membranında kalsiyum geçişinin artması

Açığa çıkan serbest Ca^{+2} toksik seviyelere ulaşır. Kalsiyum birikimi; AMPA reseptörlerinin uyarılması sonrası hücre zarının sağladığı sodyum-potasyum dengesini bozar ve depolarizasyon gerçekleşir. Oluşan depolarizasyon NMDA reseptörlerindeki magnezyumun uzaklaşmasına sonuç olarak hücre içine daha fazla Ca^{+2} girmesine neden olur (19). Hipoksinin etkisiyle aktive olan glutamat reseptörlerinin uyarımı sonucu hücre içi kalsiyum yüzdesinin artışıyla fosfolipaz C ve fosfolipaz A2' nin aktive olduğu, membran fosfolipidlerinin yıkılmasıyla hücrede araşidonik asit biriktiği, araşidonik asitten siklooksijenaz ve lipoksijenaz enzimlerinin aktivasyonu ile prostoglandinler, tromboksan A2 ve lökotrienlerin oluştuğu yolak gerçekleşir. Bunun sonucu hücre hasarını oluşturan, hücre içi süperoksitleri meydana getiren ksantin birikimine neden olan, DNA' da tek zincir kırılmalarına sebep olan serbest oksijen radikalleri meydana gelir (38).

G proteinin aktivasyonu ile fosfolipaz C aktifleşir. Bu enzim hücre zarının iç kısmındaki fosfatidil inositol'ün inositol trifosfat ve diaçilgliserole parçalanmasını sağlar. İnositol trifosfat intraselüler depolardan serbest Ca^{+2} salınmasına neden olur (Şekil 3) (19).



(DAG: diaçil gliserol, PL-C: fosfolipaz- C, PIP2: fosfatidil inositol -4,5 -difosfat, IP3: inositol trifosfat)

Şekil 3. Hücre içi kalsiyum homeostazı

İntraselüler serbest Ca^{+2} 'un artması ve sonrasında birtakım olaylar gözlenir. Bunlar:

1. Proteazların aktifleşmesiyle sitoskeletal proteinler ve bazı membran proteinleri, endonükleazların aktifleşmesiyle DNA parçalanır.

2. Fosfolipaz A2 aktive olur ve membran fosfolipidlerinin yıkılır. Hücrede araşidonik asit birikir. Siklooksijenazın aktivasyonu sonucu prostoglandinler ve tromboksan A2 ortaya çıkar. Siklooksijenaz yolu ve HİE' deki rolü ilerideki bölümlerde daha detaylı anlatılacaktır. Lipooksijenaz enzimi de bu esnada aktifleşir. Bunun sonucu lökotrienlerle beraber serbest oksijen radikalleri açığa çıkar (Şekil-4).

3. ATP düzeyinde düşme gözlenir; ADP, AMP, hipoksantin ve adenozin oluşur. Ksantin, dehidrogenaz enziminin yardımıyla ksantin oksidaza çevrilir. Böylece hipoksantin parçalanır ve bol miktarda serbest oksijen radikali ortaya çıkar (19).

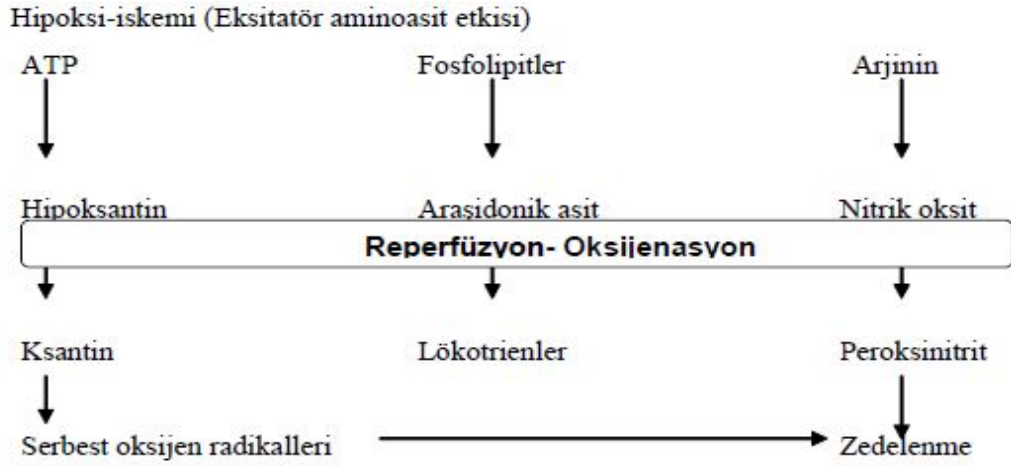
4. Ca^{+2} -kalmodülin kompleksi NOS' u aktive eder. Sonrasında NO oluşur. NO' in HİE' deki rolü ileriki bölümlerde ayrıntılı anlatılacaktır.

Nörotransmitterlerin salınması sonucunda artan hücre içi kalsiyum, Ca^{+2} -kalmodulin bağımlı protein kinaz II enzimini aktifleştirir. Bu enzim, nörotransmitter içeren vezikülleri skeletal proteinlere bağlanmasını sağlayan 'sinapsin' adlı proteini fosforile eder. Sonrasında bu veziküller serbestleşir. Serbest hale gelen veziküller Ca^{+2} yardımıyla presinaptik bölgedeki 'sinaptofizin' adlı proteinle birleşerek içerdiği biyomolekülleri sinaptik aralığa boşaltırlar. Eksitator aminoasitlerin ekstrasellüler aralığa salınması sonrasında olayın şiddeti artar. Lipaz, endonükleaz gibi çeşitli enzimlerin aktivasyonu ile diğer nöronlar da etkilenir. Kalsiyum ek olarak ksantin ve prostoglandinlerin aracılığıyla serbest O_2 radikallerinin oluşumuna sebep olur. Sonuçta hücre içi serbest Ca^{+2} un yüksek miktarları mitokondriyumda oksidatif fosforilasyona ara verilemesine neden olur (19, 39).

1.1.4.3.5. Serbest Oksijen Radikalleri

Reoksijenizasyon-reperfüzyon sürecinde prostaglandinlerin üretimi, hipoksantin parçalanması ve NO miktarındaki artış sonucu serbest radikaller açığa çıkar (Şekil- 4). Bunlar doğrudan ya da dolaylı olarak doku hasarını arttırırlar (40).

Burada toplanan lökositlerin üretmiş olduğu O₂ radikalleri, proteaz ve sitokinlerin yardımıyla hücre hasarına yol açarlar (41).



Şekil 4. Reoksijenizasyon-reperfüzyon döneminde serbest oksijen radikallerinin oluşumu (40) .

1.1.4.3.6. Sitokinler

Sitokinler proinflamatuar ve inflamatuvar olarak gruplara ayrılmakta ve önemli görevler üstlenmektedir. Proinflamatuar sitokinler bazı mekanizmaların etkisi ile beyin zedelenmesine neden olurlar. İnflamatuar sitokinler doğrudan serebral sitotoksik etki göstererek oligodendrosit öncüllerinin farklılaşmasına engel olurlar (42). Oligodendrositlerin programlanmış hücre ölümünü yani apoptosini stimüle ederler (43, 44). Sonuç olarak vakuoler myelin dejenerasyonuna sebep olurlar (45). Sitokinlere ait baskın vazooklusif ve vazomotor özellikler olabilir (46, 47). Güncel bilgiler sitokin toksisitesinin glutamat transportunda meydana gelen hasarlanmalar nedeni ile olabileceğini göstermiştir (48). Hücre dışı glutamat seviyesinin düzenlenmesinde önemli rolü olan astrositler, glutamatı yaklaşık 1000 kat konsantre etme becerisine sahiptir. Glial örneklerde proinflamatuar sitokinlerden İnterlökin (İL)-1 β ve Tümör nekrozis faktör (TNF)- α 'nın glutamatın taşınmasını bozdukları ve glutamat aracılığıyla gerçekleşen oksidatif stresi arttırdıkları gösterilmiştir (48). Anti-inflamatuar sitokinlerden olan İL-4 ve İL-10 bu etkiyi pro-inflamatuar sitokinlerin yapımını engelleyerek inhibe eder. Astrositlerde biriken glutamatın ortadan kaldırılmasındaki bozulma antioksidanlar, vitamin-E ve glutatyon ile düzeltilebilir. Bu durum, astrositik glutamat taşıyıcılarının serbest radikaller ile kısmen de olsa zedelenildiğini gösterir. Sonuçta glutamat reseptörlerinin fetal gelişim

esnasında aksonlarda geçici olarak bulunduğu tanımlanmıştır, bundan dolayı aksonal hasarlanma immatür beyaz cevherdeki glutamat birikiminin diğer bir nedeni olabilir (49).

Periferik dolaşımda bulunan sitokinler, iskemi yada çeşitli nedenlerle gelişen enfeksiyona bağlı olarak oluşabilirler. Bununla birlikte IL-1 β ve TNF- α gibi inflamatuvar sitokinlerin in-situ sentezi endotoksinler aracılığı ile mikroglialar üzerinde toll-like reseptörlerin aktivasyonuna sebep olur, buda oligodendrositlerde ölüme sebebiyet verir (50).

1.1.4.3.7. Apoptozis (Programlanmış Hücre Ölümü)

Hipoksi ve iskemiyi takip eden süreçte nöronlar dejenere olur. Nöronların nasıl öldüğünü saptamak tedavi yöntemlerini belirlemek için oldukça önemlidir. Hücre ölümü apoptozis ve nekroz olmak üzere iki farklı grup olarak sınıflandırılmıştır. Bu hücre dejenerasyonlarının çeşitli yönleriyle birbirinden farklı olduğuna inanılmaktadır (19).

Apoptozis özel moleküler yollarla ilerleyen, kendine has mekanizmaların bulunduğu programlanmış hücre ölümüdür. Aktif ve organizedir. Apoptozis genelde gelişen beyin hücrelerinin fizyolojik ölümüdür. Memeli canlılarda bazı gen aileleri apoptozisi düzenler (Tablo 6). BCL-2 protoonkogen ailesi çeşitli etkileşimler yoluyla proteinleri kodlayarak apoptozisi düzenleyen bir gen grubudur. Bu BCL-2 ailesi içerisindeki etkileşimler ve olaylar hücre yaşamı ve hücre ölümüne etki eder. Sisteinil aspartat ve spesifik proteazlar gibi kaspazlar proenzimler yoluyla aktive edilirler. Nükleer proteinler, hücre iskeletini oluşturan proteinleri, sitoplazmik proteinler kaspazlar tarafından parçalanması hedeflenen proteinlerdir.

Normal hücrelerde istenmeyen apoptozisi engellemek için proapoptotik proteinlerin aktiviteleri apoptozis inhibitör proteinler tarafından kontrol edilir. Apoptoza bağlı hücre ölümü hücre zarındaki yüzey reseptörlerince başlatılır ki bunlar ölüm reseptörleri olarak adlandırılır. Tümör nekrozis faktör reseptörleri ölüm reseptörleri olarak görevlidir. Fas (CD95/Apo-1) ve p75 (afinitesi düşük nöron büyüme faktör reseptörü) bu ailenin üyeleridir. Bu mekanizmaların ışığında apoptoz Fas' ın hücre yüzeyinde birikmesi ile başlatılır. Fas ligandlarının TNF ailesinden bir üye tarafından bağlanması sonucu Fas aktivasyonu gerçekleşir. p53 ve onun iki homologue olarak bilinen p63 ve p73 ise apoptozisi başlatır (51).

Nekroz, hücre dışı saldırılardan (osmotik, termal veya travmatik) dolayı hemostazı sürdürülememesi ile sonuçlanan hücre ölümüdür. Hücrenin nekroz sürecinde hücre zarının fonksiyonel ve yapısal içeriğinin zedelenmesi, hızlı iyon ve su girişi sonuçta hücrenin çözülmesini içerir. Böylece hücresel nekroz hücre içindeki bir programa bağlı olarak değil de ani veya yavaş homostatik problemler ve fizyolojik durumlarla oluşan değişiklikler tarafından başlatılır. Hipoksi iskemiden sonra nörodejeneratif hastalıklardan farklı olan bir hücre ölümü ortaya çıkar. Burada hayvan modellerinin oluşturulması HİE için tedavi geliştirilmesine yardımcı olabilir. Bu tedaviler anahtar enzimlerin aktivasyonunun engellenmesi, hücre zarındaki iyon kanallarının (NMDA, Ca^{+2} kanalları), diğer proteinlerin veya nöronal zedelenme sürecinde meydana gelen toksik kimyasal ürünlerin (serbest oksijen radikalleri) bloke edilmesi veya aktivasyonunun engellenmesini sağlayan ilaçlar olabilir (52).

Hipoksi iskemide oluşturulmuş hayvan modelinde korpus striatum oluşan nöronal hasar daha baskın bulunmuştur (53-55). Apoptoz yenidoğan rat beyinde daha çok izlenmiştir (56-58). HİE' den sonra apoptozisin ve nekrozun nöronal mortaliteye etkisinin doğru olarak tanımlanması son derece önemlidir. Bunun nedeni yapılan klinik ve hayvan modeli çalışmalarında hipoksi-iskemiden sonra apoptozis önleyici (antiapoptotik) tedaviler önerilmiştir (59).

Hipoksi iskemiden sonra striatal nöronlarda nekroz 24 saatten sonra meydana gelir. Golgi cisminde ve endoplazmik retikulumda 3–12 saatte zedelenme oluşurken, mitokondri 12 saate kadar direnç gösterir. Mitokondride gelişen olaylar sırasıyla aktivitede bir baskılanma sonrasında zararlanma ve sonunda mitokondriyal yetmezlik gelişir. Lizozomlarda oluşan zedelenme 3-6 saatte görülür. Na-K-ATPaz enziminin inhibisyonu 3 saatte gözlenir. Hipoksinin 6. saatinde DNA ve RNA ortaya çıkan hidroksil radikallerinden zarar görür (54, 55, 60). Nöronlarda gelişen apoptozis hipoksi iskemisi sonrası ilk 24 saatte gelişen nöron ölümünün en önemli nedeni değildir. Mikroglia ve nörondaki apoptozise en büyük destek gecikmiş veya ikincil hücre ölümünde görülür (54, 55, 61). Nörodejenerasyon HİE' li yenidoğan ratlarda hem apoptozis hem de nekroz şeklinde görülmektedir. Bu iki durum bir arada da görülebilir. Yapılan çalışmalarda apoptozis beyin sapı ve talamusta, nekroz serebral kortekste daha belirgin iken hem nekroz hem de apoptozis striatum ve hipokampusta görülmektedir (57, 62).

Kortikal hasardan sonraki talamus nöron apoptozisi yapısal olarak yenidoğan rat beyindeki hipoksi iskemi sonrası talamus nöron apoptozisi ile benzerdir (56, 62). Yenidoğan rat beyinde hipoksi iskemiden sonraki apoptozise kaspaz-8 ve Fas reseptör düzeylerinde artışın eşlik ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca mitokondriden zengin hücrelerde Bax ve çözülebilir protein kısmında sitokrom c düzeyinin arttığı saptanmıştır. Bunların artışına ilaveten kaspaz-3 ve kaspaz-8' in belirgin artışına ve apoptozise neden olur (57).

Yapılan çalışmalarda talamustaki ana dejenerasyonun apoptozis olduğu bildirilmiştir (63). Elektron mikroskopisinde ise apoptozise ek olarak nekrozun da devam ettiğini göstermiştir (60, 61, 64). DNA fragmentasyonunu içeren analizler bu bilgileri desteklemektedir (65, 66).

1.1.4.3.7.1. Apoptozis ve Nekrozda Hücresel Değişiklikler

Hipoksi ve iskemi boyunca dokularda hasara neden olan metabolik değişiklikler olur. Hücrede anaerobik metabolizmaya kayma olur (67).

Tablo 5. Nekroz ve apoptoz arasındaki farklılıklar (67)

Apoptozis	Nekroz
Hücresel hemostaz sağlamdır	Hücresel hemostaz bozulur
Hücre zarında iyon akışı korunur	Hücre zarında iyon akışı artar (Na, Ca)
Sitozol yoğunlaşır	Organeler şişer
Enerji depoları korunur	Enerji tükenir
Makromoleküler sentez artar	Makromoleküler sentez azalır
Kromatin agregasyonu yoğunlaşır	Kromatin agregasyonu azalır
Aktif bozulma	Pasif atrofi

Ortaya çıkan bu olaylar sonucunda FADH, NADH ve laktik asit birikimi hidrojen iyonunu arttırır. Anaerobik süreç sonucu hücrenin enerji ihtiyacı karşılanamaz ve enerjisi yüksek fosfat depoları boşalır. Transselüler alandaki iyon pompasının yetersiz oluşu hücre içi Na⁺ ve Cl⁻ birikimine sonrasında ise su birikimi yani sitotoksik ödeme sebep olur. Ayrıca hipoksi iskemi akson uçlarından eksitator aminoasitlerin (glutamat) salınımını uyarır. Sinaptik boşluğa glutamatın salınmasıyla dendritlerdeki AMPA-QA ve NMDA yüzey reseptörlerini uyarır bunun sonucunda Na⁺ ve Ca²⁺ akışı olur. Ca iyonunun sitozoldeki birikimi hücre membranına akışı arttırır, dışarı akışı azaltır. Bu etkiyle nöron ölümüne neden olan biyokimyasal olaylar süreci başlar (67).

Hem apoptozis hem de nekroza uğrayan nöronların reperfüzyon sırasında işlevsel ve anatomik bütünlüğünde belirgin farklılıklar oluşur. Nöronal nekroz geliştiğinde yeni oksijen ve substrat ihtiyacından dolayı bazı biyokimyasal oluşumlarda tersine dönmeyi kapsayan yavaş ilerleyen metabolik bozukluklar görülür. Asidoz oluşumu ve laktat glikolizisi engeller. Sonuçta glukoz tüketiminde azalma olur ve hücre içi glukoz birikim gerçekleşir. Yeniden gerçekleşen oksidatif metabolizma sürecinde NADH ve FADH mitokondride tüketilir, hem mitokondri hem de sitozolde oksidasyon olur.

Oksijenizasyon sonrası farklı metabolik yolların etkisiyle serbest radikaller üretilir. Mitokondriyal Ca^{+2} ve serbest radikallerin birikmesi oksidatif fosforilasyonu bozar, sekonder enerji yetersizliği gerçekleşir. Hücre zarı parçalanmaya başlar ve özellikle mitokondride daha baskın olmak üzere hücre içi organellerde şişme gerçekleşir. Nükleus kromatini yoğunlaşarak piknozis gerçekleşir, sonuçta nöron çözülür ve ölür (68).

Apoptozisteki değişiklikler nekrozdaki farklıdır. En belirgin bozukluk mitokondride sonrasında ise çekirdekte görülür. Histolojik olarak nükleus DNA' sındaki değişiklikler özel bir boyama olan "terminal deoxynucleotidyl transferase nick end labeling (TUNEL)" yöntemi ile ortaya konabilir (67-71).

Tablo 6. Apoptozisin moleküler düzeni (51)

BCL-2 Ailesi				
Antiapoptotik proteinler	Proapoptotik proteinler	Kaspaz Ailesi	Apoptoz inhibitör proteinler (AIP)	Tümör süpresor ailesi
BCL-2	BAX	Apoptozis başlatıcılar': kaspaz -2, -8, -9, -10	NAIP SMN	p53 p63 p73
BCL-X1	BAK	Apoptozis "cellâtlar" : kaspaz-3, -6, -7 Sitokin işlemciler: kaspaz -1, - 4, -5, -11, -12, -14	AIP1	
BOO	BCL-Xs BAD, BID, BİK		AIP2 XAIP	

1.1.4.3.7.2. Ekstrinsik Apoptotik Kaskad

Ölüm reseptörlerinin bulunduğu yerde adaptör proteinlerin trimerizasyonu ile apoptozisi başlatan biyomoleküller olan prokaspaz-2, -8 ve -10' un etkisi, prokaspaz-3, -6 ve -7'yi aktive eder. Bu hücre zarı reseptörleri tümör nekrozis faktörle ilişkili olan apoptozis reseptör-1 ve -2, CD95/Fas/APO-1, TWEK reseptörleri ve tümör nekrozis faktör reseptör 1 ve 2' yi içerir. FAS/APO-1 (CD95) sitokin reseptörü gibi hücre yüzeyinde yer alan reseptörler hem apoptozis hem de enflamatuvar mekanizmalara karışır (72).

1.1.4.3.7.3. İntrinsik Apoptotik Kaskad

Bu yol mitokondriye bağımlıdır, mitokondri iç zarından salınan Bcl-2 ve Bax ailesi üyeleri bu süreçte rol alır. Mitokondriyal fonksiyonların apoptotik uyarılarla bozulması sonrasında aşırı miktarda sentezlenen serbest radikallerin oluşması ve serbest radikallerin ortadan kalkmasını sağlayan glutatyon gibi serbest radikal temizleyici sistemlerin azalmasına neden olur. İskemi sonrası reperfüzyon ile birlikte ortaya çıkan serbest radikaller hücre içinde intrinsik apoptotik yolu etkin hale getirir. Ek olarak mitokondriyal fonksiyonların bozulmasıyla birlikte elektron taşıma zincirinin ve ADP fosforilasyonunun bozulmasına, Ca^{+2} nin intraselüler ortamda artmasına neden olur. Ca^{+2} artışı enerji üretimini engelleyerek mitokondriyal transiyon permeabilite poru' nun (mPTP) açılmasına neden olur. Sonuçta proapoptotik Bax' ın mitokondri içinden dışına çıkmasına neden olur (73).

Fizyolojik şartlarda Bcl-2 bir antiapoptotik proteindir olarak Bcl-2 ailesi üyesidir, mitokondri dış zarında bulunup membran bütünlüğünü ve sitokrom salınmasını düzenler. Bcl-2 burada kaspazdan bağımsız olarak apoptozisi başlatır. Prokaspaz-9 yolunun yardımıyla sitokrom C salınımı apoptozisi başlatır (72).

1.1.4.3.7.4. Kaspaza Bağlı Olmayan Apoptozis Aktivasyonu

Kaspaza bağımlı olmayan apoptozis mitokondri iç zarından salınan daha sonra hücre nükleusuna yerleşen AIF tarafından meydana gelen ölüm sinyaline bir yanıttır (72).

1.1.4.3.7.5. Kaspaza Bağlı Olan Apoptozis Aktivasyonu

Proteolitik enzimlerden olan kaspaz -3, -6 ve -7 aktif hale geldiklerinde çeşitli proteinleri parçalarlar. Parçalanan bu proteinler kinazlardan sitoskeletal proteinlere ve

transkripsiyonel düzenleyici proteinlere kadar değişebilir. PARP (poly ADP-ribose polymerase) ve CAD (Caspase activated deoxyribonuclease) aktif kaspaz parçaları olup apoptozisi gösterir ve DNA parçalanmasına katkıda bulunur. CAD sitozolden nükelusa geçip orada DNA' yı parçalar (72).

1.1.5. Hipoksik İskemik Beyin Zedelenmesinin Önlenmesine Yönelik Girişimler

Güncel çalışmalarda HİE' de hücre ölümü ile olay arasında geçen sürenin önemli olduğunun farkına varılmış ve bu süre 'terapodik pencere' olarak isimlendirilmiştir. Bu süre zarfında meydana gelen hücre ölümüne neden olan moleküler olaylar zincirinin sonlandırılması klinik açıdan oldukça yararlıdır. Bu dönem fetal koyunlardada yaklaşık 6 saat kadardır (70). Fetüste ve yenidoğanlarda olayın başladığı süreyi ve ciddiyetini bilmek güçtür. Term yenidoğanda HİE' ye neden olan prenatal asfiksini ne zaman beyin hasarına yol açtığını mutlak olarak belirleyen bir metot henüz yoktur. Ek olarak beyin zedelenmesinin çoğunlukla postnatal dönemde olduğu prematürelerdeki beyin hasarı, genellikle bulgu vermez ve sessizdir. Bundan dolayı hem prematürelerde hem de term bebeklerde beyin zedelenmesinin tespitinin geç olması 'terapodik pencere' döneminin kaçırılmasına sebep olur. Tablo 5' te hipoksik-iskemik beyin zedelenmesinin engellenmesinde değerli olan mevcut girişimler gösterilmiştir (24).

1.1.5.1. Enerji Kaybının Azaltılması

İskemiden sonra nöron ölümüne sebep olan kaskadı başlatan olay enerji kaybıdır. Enerji kaybı ciddi düzeyde olmayabilir. Glikoz, normal değerlerin çok üstüne çıktığı zaman serebral laktat düzeyleri yükselmektedir. Bu sebeple glikozun fizyolojik düzeylerde tutulması önemlidir (19).

Yüksek doz barbitürat uygulanması sonucu serebral metabolik hızın azalarak enerjinin korunmasının arttığı bilinmektedir. İnsanlarda da benzer çalışmalar mevcuttur. Hayvan çalışmalarında hafif hiperkapninin koruyucu olduğu ortaya konulmuştur. Enerji harcanmasının azaltılmasında en umut verici uygulama olarak hafif hipotermi görünmektedir. Biyokimyasal değerler bu yöntemin nöroprotektif faydalrını destekler niteliktedir. Ek olarak hafif hipotermi uygulaması reperfüzyondan saatler sonra gelişen ikincil enerji yetersizliğini de azaltır. Perinatal hayvan modellerinde hafif hipotermi, HİE' deki etkisi yapılan birçok çalışmada

değerlendirilmiş ve etkisi ortaya konmuştur. Yapılan çalışmaların neredeyse tamamında, hipotermi H-İ sırasında veya reperfüzyondan hemen sonra veya her iki dönemde birden uygulanmıştır. Buna karşın iskemik kuzularda yapılan bir çalışmada olaydan 5,5 saat sonra kranyumun hafif soğutulmasının da hasarı azalttığı elektrofizyolojik ve nöropatolojik olarak ortaya konulmuştur. Bütün bu anlatılanlar hafif hipoterminin önemli bir nöroprotektif etkisi olduğunu göstermektedir (24).

1.1.5.2. Glutamat Salınımının İnhibisyonu

Hücre dışı glutamat birikimi sonucu hem nöronal hem de oligodendroglial hücre ölümü gerçekleşir. Presinaptik uçlardan glutamat salınımının kalsiyum aracılığıyla olduğu ve magnezyumun bu olayı bloke ettiği için, kalsiyum kanal blokörleri veya magnezyumun bu aşamada faydalı olabileceği bildirilmiştir. Fakat kalsiyum kanal blokörlerinin kardiyak yan etkilerinin olması, ek olarak magnezyumun birçok HİE modelinde tam olarak yararlı olduğunun gösterilememiş olması sebebiyle rutin tedavide kullanımı önerilmemiştir (24).

Adenozin reseptörlerinin inhibisyonu sonucu glutamat salınımı inhibe olduğu için adenozin, adenozin antagonistleri ve adenozin agonistlerinin nöroprotektif etkisi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bazı perinatal hayvan modellerinde adenozin agonistlerinin etkili olduğu görülse de mevcut bilgiler yeterli sonuçlar göstermemektedir (28).

Kültürü yapılmış nöronlarda ve yenidoğan domuzlarda yapılan çalışmalarda hafif hipoterminin nöroprotektif etkisinin bir bölümünden sinaptik sinir uçlarından glutamat salınımını engellemesinin sorumlu olduğu gösterilmiştir. Buna karşın çalışmaların bazılarında bu etki gösterilememiştir (24).

Serbest radikalleri bağlayan ajanların nöroprotektif etkisi, kısmen glutamat salınım seviyesinde etki göstermesine bağlı olabilir. Çünkü serbest radikallerin bazı hayvan modellerinde nöronal glutamat salınımını arttırdığı saptanmıştır. Ek olarak fenitoin ve lamotrijinin de HİE' de faydasının görülmesi bu antikonvülzanların glutamat salınımını inhibe etmesinden kaynaklanmaktadır (24).

1.1.5.3 Glutamat Uptake'indeki Sorunun Giderilmesi

Hipoksik-iskemide ekstrasellüler glutamat artışının sebebi yalnızca artmış salınım değil aynı zamanda ortaya çıkan astrosit ve presinaptik sinir uçlarından geri alımın bozulmasıdır (Şekil-2). Hipotermi, astrositlerde iskemi sebebiyle gelişen

enerji bağımlı glutamat alımındaki bozukluğu azaltarak bir miktar nöron koruyucu etki sağlayabilir. Bu düşünceye kültür edilmiş astrositlerdeki çalışmalar sonucunda varılmıştır (24).

Tablo 7. HİE’ de beyin hasarının önlenmesindeki mevcut girişimler(19)

1. Enerji kaybının azaltılması
• Hipotermi • Barbitürat • Glukoz • Hafif hiperkapni
2. Glutamat salınımının inhibisyonu
• Kalsiyum kanal blokerleri • Magnezyum • Hipotermi • Fenitoin • Lamotrijin • Adenozin agonistleri • Serbest oksijen radikal bağlayıcıları
3. Glutamat reseptörlerinin blokajı
• NMDA reseptör antagonistlerinin (MK–801, magnezyum, ketamin, dekstrofan) verilmesi Non-NMDA reseptör antagonistlerinin (NBQX, CNQX) verilmesi
4. Glutamat uptake yetersizliğinin düzeltilmesi
• Hipotermi
5. Lökosit/ mikrogial/sitokin etkilerinin inhibisyonu
• Platelet aktivasyon faktör (PAF) antagonistleri • Antisitokin antikorları/ilaçları • Nötropeni • Anti-ICAM-1 antikoru • IL-1 reseptör antagonistleri
6. İntrasellüler olaylar kaskadının bloke edilmesi
• Hipotermi • Serbest radikal sentez inhibitörleri (allopurinol, indometazin, demir şelatörleri, magnezyum) • Serbest radikal tutucuları (vitamin E, 21-aminosteroidler) • NOS inhibitörleri/tutucuları (nitroarjinin deriveleri) • Growth faktör (İGF–1, BDNF, GH, NGF) içeren anti-apoptotik ajanlar • Monosialogangliosidler (GM–1)

1.1.5.4. Glutamat Reseptörlerinin Blokajı

Özellikle MK–801 gibi NMDA reseptör antagonistleri, magnezyum, ketamin ve destofan’ ın iskemik nöron zedelenmesinin farklı modellerinde hem kültür hem de in-vivo şartlarda nöroprotektif etkisinin olduğu gösterilmiştir. Benzer biçimde

bazı modellerde non-NMDA (AMPA/kainate) antagonistlerinin (NBQX, CNQX vs.) kullanımıyla ek fayda gösterilmiştir. Bu ajanlar daha sık olarak hasardan birkaç saat sonra veya hasarın bitiminden hemen sonra uygulandığında nöroprotektif etkisi belirgindir (24).

N-Metil-D-Aspartat olmayan (Non-NMDA) reseptörlerin inhibisyonu sadece nöronal zedelenmeyi değil ayrıca oligodendroglial hasarlanmayı da inhibe eder. Gerçekleştirilen son çalışmalar AMPA/kainate reseptörlerinin aktivasyonunun kültür edilmiş oligodendrositlerin ve in-vivo çalışmalarda oligodendrogliaların ölümüne sebep olduklarını göstermiştir (24). Elde edilen bu bulguların tamamı birlikte değerlendirildiğinde glutamatin hem reseptör hem de non-reseptör aracılıklı mekanizmalar ile olgunlaşmamış oligodendroglialara toksik etki gösterdiği izlenmektedir. Her iki mekanizma ele alındığında non-reseptör aracılıklı olanlar serbest radikal bağlayıcıları ile; reseptör aracılıklı olanlar da spesifik reseptör antagonistleri ile önlenebilir. Non-NMDA antagonistlerinin değişiklik gösteren oligodendrositleri H-İ hasardan korumadaki faydalı etkisinden dolayı bu ajanlar hem nöronal hem de beyaz cevher hasarına karşı koruyucu olabilir. NMDA antagonistleri oligodendroglial korumada önemli görünmemektedir. Nöronlardan farklı olarak oligodendrositler NMDA reseptörü eksprese etmezler (24).

1.1.5.5. Lökosit/mikroglial/sitokin Etkilerinin İnhibisyonu

Hipoksik-iskemiye uğrayan immatür oligodendrositler, sitokinlerin zararını en fazla gören hücrelerdir (2). Lökositlerin yapışması, sitokin etkisi ve mikroglial aktivasyon HİE' de önemli görülmesine karşın perinatal modellerde bu düzeyde nöroproteksiyonla ilgili çalışmalar azdır. İn-vivo perinatal Hİ zedelenmede H-İ öncesi oluşturulan nötropenin yararlı etkisi olduğu gösterilmiştir (24). İskemi/reperfüzyon sonucu artan PAF lökosit adezyonunda ve daha sonra gelişen inflamatuvar süreçte önemlidir. PAF antagonistinin hem tedavi öncesi hem de tedavi sonrası reperfüzyondan sonra uygulanmasının immatür rata uygulanmasıyla infarkt alanını azalttığı gösterilmiştir (24, 75).

Erişkin hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda lökosit adezyon molekülleri ve değişik sitokinlerin üzerine etki eden antikor ve/veya ilaçların önemli nöron koruyucu etkisi olduğu saptanmıştır. IL-1 β mikrogliaların önemli bir ürünüdür. IL-1 β , TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınmasını sağlar. H-İ

oluşturulmuş yenidoğan ratta IL-1 β reseptör antagonistinin olay öncesi ve reperfüzyon esnasında kullanılmasının yararlı etkileri olduğu saptanmıştır. Fosfodiesteraz inhibitörü olan pentoksifilin' in, H-İ' den sonra beyinde arttığı ve TNF- α üretimini inhibe ettiği bilinmektedir ve H-İ' den hemen önce uygulandığında hipoksik-iskemik zedelenmeyi azalttığı saptanmıştır (Tablo 8) (24).

Tablo 8. Deneysel modellerde perinatal hipoksik iskemik beyin zedelenmesinde inflamasyon ve sitokinler (24)

H-İ sonrası hızlı ve aktif bir şekilde mikrogliya aktivasyonu olur
Nötropeni koruyucu özelliktedir
Sitokinler (özellikle de IL-1 β ve TNF- α) H-İ' den sonra hızlı bir şekilde artar
TNF- α antagonisti olan pentoksifilin H-İ' den hemen önce uygulandığında H-İ beyin hasarını azaltır
IL-1 β reseptör antagonistleri H-İ' den önce veya H-İ bitiminden hemen sonra uygulandığında H-İ beyin hasarını azaltmaktadır

1.1.5.6. Hücre İçi Olayların Progresyonunun Engellenmesi

Hücre ölümüne sebebiyet veren hücre içi biyokimyasal olayların akışının bloke edilmesi, serbest oksijen radikallerinin oluşumu, kalsiyumla aktifleşen işlemler, nitrik oksit sentezi ve apoptotik/nekrotik hücre ölümüdür. Hipotermi bu akışta birçok aşamaya etki eder. Ancak bunlar arasında en belirgin olanları serbest radikal oluşumu ve nitrik oksit üretimindeki azalmadır. Farklı H-İ modellerinde nöroprotektif olduğu gösterilen serbest radikal inhibitörleri; ksantin oksidazı inhibe eden allopurinol, siklooksijenaz enzimini inhibe eden indometazin, Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikallerin üretimini azaltan demir şelatörleri ve lipid peroksidasyonunu engelleyen magnezyum' dur. Serbest radikal bağlayıcılarının (idebenon, vitamin E, 21-aminosteroidler) nöron koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (24).

1.2. Eikozanoidler ve Otakoidler

Eikozanoidler araşidonik asit metabolitleridir. Eikozanoid biyosentezinin öncüsü olan araşidonik asit (5, 8, 11, 14-eikosatetraenoik asit) fosfolipit hücre zarında en sık karşılaşılan çoklu doymamış yağ asitidir. Hücre membranı fosfolipitlerinden fosfolipaz A2'nin (PLA2) aktivasyonu ile salınan araşidonik asit

yapısında cis pozisyonda dört çift bağ içermesi sebebiyle oksijenle tepkimeye girmeye oldukça yatkındır (76).

Eikozanoidler ('eicosa' Yunanca yirmi anlamındadır.) yirmi karbon atomlu yağ asitlerinden üretilen ve güçlü biyolojik etkileri olan endojen maddelerdir. Yağ asidi iskeleti üzerinde yer alan yapısal değişikliklere göre, doğrudan biyolojik etkinliği olan primer eikozanoidler farklı alt gruplarda toplanırlar. Bu maddeler dokularda araşidonik asid ve diğer öncül yağ asitleri üzerine belirli enzimlerin etkisi sonucu oluşurlar. Bu enzimlerin adları siklooksijenazlar, lipooksijenazlar ve sitokrom P450 monooksijenaz'dır (77).

Eikozanoidler, üretiminde yer alan bu enzim türünlerine göre siklooksijenaz ürünleri, lipooksijenaz ürünleri ve 450 mono oksijenaz ürünleri olarak üç gruba ayrılır. Bu ürünlerin etkileri ve katkıları bakımından aralarında belirgin farklar vardır (77).

1.2.1. Eikozanoidlerin Biyosentezi

Araşidonik asidin hücre zarındaki fosfolipidler veya diğer kompleks lipidlerden fosfolipaz A2 (PLA2) gibi eikozanoid sentez enzimleri aracılığı ile mobilize edilmesine veya salınmasıyla gerçekleşir. Araşidonik asitlerin bir kısmı da fosfatidilinozitidlerden fosfolipaz C ve digliserid lipaz kombinasyonu aracılığı ile sentezlenmektedir (78, 79).

Eikozanoidlerin sentezindeki artış, genel olarak metabolik, fiziksel, kimyasal ve hormonal uyarılara bağlı olarak oluşmakta veya düzenlenmektedir. İleriki aşamada araşidonik asid, dört farklı sentez yolağına girer: siklooksijenaz (prostaglandin endoperoksidaz sentaz), lipooksijenaz, P450 epoksijenaz (sitokrom P450) ve izoprostan (Şekil 1) (79).

1.2.1.1. Siklooksijenaz Ürünleri (Prostaglandinler, Prostatiklinler ve Tromboksanlar)

Siklooksijenaz (prostaglandin endoperoksit H sentaz) enzimleri, siklooksijenaz ve peroksidaz aktivitesi olan çift fonksiyonlu proteinlerdir ve araşidonik asitten prostaglandin endoperoksidaz ara ürünlerinin (PGG2 ve PGH2) sentezini sağlarlar. Siklooksijenaz reaksiyonunda araşidonik asite iki molekül oksijenin eklenmesiyle PGG2'ye çevrilirken, peroksidaz reaksiyonu ile PGG2 PGH2'ye indirgenir (80). PGH2 dokuya özgül sentazlar aracılığıyla PGD2, PGE2, PGF2 α , PGI2 (prostatiklin) ve TXA2'ye metabolize olmaktadır. Bu COX

ürünlerinin biyosentezi hücreye özgüdür ve prostanoid üreten hücre bu bileşiklerden yalnızca bir tanesini ana ürün olarak oluşturma eğilimindedir. Örnek olarak beyin ve mast hücrelerinde PGH2 sitozolik enzim olan PGD sentaz aracılığıyla PGD2'ye dönüştürülür. PGF2 α asıl olarak uterusu yer alan PGF sentaz aracılığıyla sentezlenir. Vasküler endotel hücreler PGI sentaz ile PGH2'den PGI2 sentezlerken, trombositler TX sentaz ile TXA2 oluşturur. PGI2 ve TXA2 dayanıklı olmayıp sırasıyla 6-keto-PGF1 α ve TXB2'ye hidroliz olurlar (81).

Birçok hücrede sentezlenen PGE2, PGE sentaz (PGES) aracılığıyla sentezlenmektedir. Güncel çalışmalarda sitozolik PGES (cPGES), mikrozomal PGES-1 (veya zara bağlı PGES) ve mPGES-2 olmak üzere üç farklı PGES izoformu tanımlanmıştır (82-84).

Bu sentez basamaklarında NSAİİ (nonsteroid anti-inflamtuvar ilaçlar) kendi terapötik etkilerini göstermesi açısından büyük önem taşır. Sulindak ve indometazin başlıca COX-1 üzerinden etkisini sağlar. İbuprofen ve meklofenamat COX- 1 ve COX-2 üzerinde aynı derecede potent etki gösterirken; selokoksib ve rofekoksib daha çok COX-2' yi inhibe etmektedir. Aspirin her iki enzimi de farklı uzantılarda asetiller ve inhibe eder. Selektif COX-2 inhibitörleri, COX-1 inhibitörlerine göre daha az gastrik yan etkiye neden olmakta ve kronik inflamasyonun tedavisinde daha sık tercih edilmektedir (19, 85).

1.2.1.2. Lipooksijenaz Ürünleri

Lipoksijenazlar, (Z,Z)-1,4-pentadien yapısı içeren çoklu doymamış yağ asitlerine, oksijen katılmasını katalizleyerek, hidroperoksi türevleri oluşturan dioksijenazlardır. Her molekül için hem konfigürasyonunda olmayan bir demir atomuna ihtiyaç duyarlar (86, 87). Üç farklı major lipoksijenaz izoformu memelilerde 5-LOX, 12-LOX ve 15-LOX bulunmaktadır. Bunlar araşidonik asitin 5, 12 ve 15. lokalizasyonlarına oksijen eklerler ve sırasıyla 5-, 12- ve 15-HPETE (hidroperoksieikosatetraenoik asit) oluşturlar (88).

5-Lipoksijenaz araşidonik asiti 5-HPETE'ye dönüştürüp lökotrien sentezinin ilk basamağını katalizler. 5-HPETE daha sonra aynı enzim aracılığıyla dayanıklı olmayan epoksit LTA4'e dönüştürülür. LTA4' ün LTB4' e dönüşümü LTA4 hidrolaz enzimi tarafından gerçekleşir. LTC4 sentaz enzimi, LTA4 ve indirgenmiş glutatyonun konjugasyonunu sağlar ve LTC4 sentezlenir. γ -Glutamilttransferaz

enzimi tarafından ve konjuge tripeptit glutatyonun, konjuge dipeptit sisteinilglisine dönüştürülmesiyle LTC₄, LTD₄'e çevrilir. Dipeptidaz enzimi tarafından LTD₄, LTE₄'e dönüşür (89).

Güncel olarak lökotrienlerin çoğu inflamatuvar hücrelerde (PMNL, bazofil, mast hücreleri, eozinofil, makrofaj) 5- lipooksijenaz enzimi tarafından oluşturulmaktadır. Bu yolak astım ve anafilaksi ile bağlantılı olduğundan önem taşır. LTC₄ ve LTD₄ kuvvetli bronkokonstriktörlerdir ve “slow-reacting substance of anaphylaxis (SRS-A)”ın temel yapıları olarak bilinmektedirler. Bu hücrelerin uyarılması hücre içi kalsiyum seviyesini yükseltir ve önce araşidonik asid salımmına, daha sonra da 5-lipooksijenaz ile unstabil epoksid lökotrien A₁ (LTA₁) oluşumuna neden olur (24).

1.2.1.3. Eikozanoid Metabolizması

Prostaglandinler sentezlendikleri dokularda bulunan enzimlerce veya böbrek ve akciğer korteksindeki enzimler tarafından inaktive edilirler. Özellikle akciğer bu hususta oldukça etkindir ve bu organda %95' e ulaşan bir oranda inaktivasyon gerçekleşir. Prostaglandinlerin tamamının biyolojik aktivitesi için önemli olan C15-hidroksil grubu ilk olarak prostaglandin 15-hidroksidehidrojenaz enzimi aracılığıyla okside edilir. Ard arda gelen bir dizi olaydan sonra PGE ve PGF' ler inaktif tetranor (16 karbonlu) metabolitlerine, PGD₂ ise PGJ₂' ye dönüşür.

Prostaglandin-I₂ farklı olarak akciğerde parçalanmaz, karaciğer ve böbrekte inaktive edilir. 6-keto-prostagiandin F₁' ya yani ana metabolitine yıkılır. TXA₂' nin inaktive edilmesi ise karmaşıktır. Non-enzimatik bir hidrolizle TXB₂' ye dönüşür. LTC₄'ün inaktivasyonu ise böbrek, akciğerler ve karaciğerde gerçekleşir. İlk aşamada LTE₄'e dönüşür ve biyolojik aktivitesini kaybeder. LTB₄' ün metabolizması ise asıl olarak oksidasyonla oluşur (90).

1.2.1.4. Eikozanoidlerin Etki Mekanizması

Otokrin ve parakrin özellik gösteren eikozanoidler, hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanırlar. Prostanoidlerin farmakolojik özgüllüğü farklı hücrelerde yer alan reseptör tipi ve yoğunluğuyla belirlenir. Bütün bu reseptörler ve alt tipleri G-proteinine bağlı olarak etkinlik gösterirler. Sekonder haberciler olarak adenilil siklaz stimülasyonu (cAMP artışı) veya inhibisyonu (cAMP azalması) ya da fosfolipaz C stimülasyonu (diacilgliserol ve inozitol 1,4,5- trifosfat artışı sonucunda intraselüler

kalsiyum artar) meydana gelir. Eikozanoidlerin düz kaslar üzerindeki kasılma etkileri kalsiyum salınması aracılığıyla olurken, gevşeme üzerine olan etkileri cAMP üretimi ile olmaktadır. Eikozanoidlerin immün sistemi de içeren birçok target hücrede etkileri benzer şekilde açıklanabilir. Eikozanoidlerin birçoğunun kontraktıl etkileri hücre dışı kalsiyumun azaltılması veya kalsiyum kanal blokörü ilaç kullanımı ile inhibe edilebilir. Farklı hücre ve dokularda LTB₄, LTC₄ ve LTD₄ için lökotrien reseptörleri tanımlanmıştır (cysLT1 ve cysLT2). Lökotrien reseptörleri de G proteinine kenetlidir ve onların aktivasyonu hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artırır (90).

1.2.2. Fosfolipaz A2 ve Hipoksik İskemik Beyin Hasarı

Beyin dokusunda yer alan serebral fosfolipaz A₂, *sn*-2 pozisyonundaki membran fosfolipidlerindeki açıl esterlerini parçalayan bir esterase olarak serbest yağ asidi ve lizofosfolipid üretimine sebep olur. Araşidonik asit salınımı ve lizofosfolipid salınımı fosfolipaz A₂' nin katalizlediği en önemli reaksiyonlardır. Normal koşullarda bir kısım araşidonik asit prostaglandinlere, inflamatuvar mediyatörlere, lökotrienlere ve tromboksanlara dönüşürken, araşidonik asitin büyük bir bölümü tekrar beyin fosfolipidlerinin içerisine katılır (91). Fosfolipaz A₂ ailesinde yer alan sekretuar fosfolipaz A₂, sitozolik fosfolipaz A₂ ve kalsiyum bağımsız fosfolipaz A₂' den sentezlenir. Araşidonik asitin salınması genelde sitozolik fosfolipaz A₂ aracılığıyla meydana gelir.

Sekretuar fosfolipaz A₂, hücre içinde sentezlenir daha sonra ekstraselüler olarak salınır. Sekretuar fosfolipaz A₂ asıl olarak sinaptazomlarda ve sinaptik vesiküllerde depolanır (92, 93). Fosfolipaz A₂ N ve M tipi olmak üzere iki tip hücre yüzeyi reseptörüne bağlanır. N tipi reseptör nöronlarda, M tipi reseptör ise kaslar dokusunda bulunur (94). Serebral sekretuar fosfolipaz A₂, bir sekresyon molekülü ve enzim aktivasyonu için yeterli miktarda Ca²⁺ içeririr. Serebral sekretuar fosfolipaz A₂, fosfolipid yağ açıl zincirleri için seçici değildir. Bu enzim memeli beyinin tüm bölgelerinde bulunur. Ancak medulla oblongata, hipokampus ve ponsta daha yüksek aktivite gösterir (95).

Ratların beyin dokusu sinaptazomlarında ve nöron hücre kültürlerinde sekretuar fosfolipaz A₂ enziminin asetil kolin, glutamat reseptörleri veya voltaj bağımlı kalsiyum kanalları aracılığıyla depolarizasyona neden olduğu gösterilmiştir.

Bu bulgulara dayanarak sekretuvar fosfolipaz A2 nörol metabolizmasında önemli rol oynayabilir (93, 96). Glutamat ve glutamat analogları sekretuvar fosfolipaz A2' yi zamana ve doza bağlı olarak uyarır (97). Kortikal hücre kültürlerinde saptanan glutamat nörotoksitesinin artmış sekretuvar fosfolipaz A2 ile ilişkisi vardır. Bu sonuç glutamatın sinaptik aktivitesinin sekretuvar fosfolipaz A2 tarafından düzenlendiğini göstermede yardımcı olabilir (98).

Sitozolik fosfolipaz A2 ise beyin tüm dokularında bulunmasına karşın tam olarak pürifye edilememiştir. Rat beyinde bulunan sitozolik fosfolipaz A2' nin H ve L olarak iki formu bulunmuştur. Fosfolipaz A2-H kalsiyum aracılığıyla inhibe olurken, fosfolipaz A2-L' nin ise tam tersi aktivite göstermesi için mikromolar konsantrasyonda kalsiyuma gereksinim vardır (99). Sitozolik fosfolipaz A2 izoenzimlerinin araşidonik asit salınmasından ve eikozonoid formasyonundan sorumlu olduğu tahmin edilmektedir (100). Hücresel seviyede bakılacak olunursa, kalsiyum mobilizasyonu, sitoplazmik fosfolipaz A2 ve hücre dışı sitoplazmik fosfolipaz A2 arasındaki etkileşim eikozanoid artışından sorumlu olabilir. Ca^{+2} patolojik şartlar altında, fosfolipaz A2 ve hücre dışı sitoplazmik fosfolipaz A2 arasındaki etkileşim oksidatif stres ve inflamasyonun eşlik ettiği nörolojik hastalıkların patofizyolojisinde önemli rol oynayabilir. Kalsiyuma bağımlı olmayan fosfolipaz A2 nöronal hücre proliferasyonu, apoptozis ve diferensiyasyonunda görev alır (92).

1.3. İnflamatuvar Meridyatörler ve Neonatal Beyin Hasarı

Hipoksik iskemi ensefalopati, hipoksi-iskemi anından itibaren başlayıp resusitasyon ardından iyileşme döneminde devam eden bir süreçtir. Akut dönemde selektif nöronal nekroz veya infarkt şeklinde gözlenen doku zedelenmesi, glia, nöron ve endotel hücre yapısının bozulmasıyla devam eder. İnfarktın olduğu alana en yakın bölgede yer alan nöronlarda nekroz ya da apoptozis gelişir (101). Son yıllarda yapılan ve özellikle prematür bebekleri içeren epidemiyolojik ve deneysel çalışmalarda inflamasyon, periventriküler lökomalazi ve serebral palsi arasında yakın ilişki olduğu görülmüştür (2). Nekrozun geliştiği hücrelerde hasarın engellenmesi söz konusu değildir. Ancak infarkt bölgesinin etrafında devam eden hasar sürecinin önüne geçilmesi bu dönemde meydana gelen biyokimyasal olayların iyi bilinmesi ile mümkün olabilir.

Reperfüzyon-reoksijenasyon döneminde hasarın devam etmesiyle küçük damar endotel hücrelerinde serbest radikallerin üretimine neden olan siklooksijenaz ve ksantin oksidazın aktive olduğu iki önemli yol tetiklenir. Ortaya çıkan serbest radikaller lökosit, platelet ve endotel hücrelerindeki adezyon moleküllerini aktifleştirerek lökositlerin adezyonu ve ekstrasvazasyonunu sağlar. Kan beyin bariyerinin bozulması sonucu serbest radikaller parankim içine boşalarak hasarın yayılmasına neden olur (102).

Neonatal beyin hasarının erken döneminde gözlenen nötrofil miktarı ile hasarın derecesi arasında yakın ilişki olduğuna inanılmaktadır. Ek olarak serebral iskemide santral sinir sisteminde inflamatuvar mediyatörlerin ortaya çıktığı bilinmektedir. İmmatür ve erişkin kemirgen hayvanlarda oluşturulan hipoksi iskemisi sonrasında beyinde IL-1 ve TNF- α gibi sitokinlerin açığa çıktığı gösterilmiştir (103).

1.3.1. Prostaglandinler ve HİE

İskemik hasar sonrası beyin dokusunda fosfolipaz A2 uyarısı ortaya çıkar. Bu uyarılma sonucu beyinde büyük miktarda serbest yağ asidi salınımı oluşur (92). ATP'nin tükenmesi, serbest yağ asidi oluşumu ve iyon hemostazındaki değişiklikler membran fonksiyon bozukluğu ve hücre sel zedelenmeye neden olur (93). Ek olarak iskemik hasradan sonra sitoplazmik fosfolipaz A2 aracılığıyla mRNA gen ekspresyonunda artış meydana gelir (104). Yapılan çalışmalarda orta serebral arterin bağlanması sonrası sitoplazmik fosfolipaz A2 genetik olarak olmayan farelerde daha az nöronal hasar, daha az infarkt ve daha az beyin ödemi olduğu gösterilmiştir. Yine bu farelerde prostaglandin ve lökotrien sentezi önemli ölçüde azalmıştır (105).

Hipoksik-iskemiden sonra sitoplazmik Ca^{+2} konsantrasyonu artar. Artan kalsiyum sitozolik fosfolipaz A2'yi aktifleştirir ve serbest yağ asitleri ve araşidonik asit sentezine sebep olur. Araşidonik asitin metabolize olması sonrası serbest oksijen radikallerinin üretimi ile sonuçlanır. HİE ortaya çıkan infantlarda HİE'nin derecesi ile BOS'ta ölçülen prostaglandinlerin konsantrasyonu arasında ilişki olduğu bildirilmiştir (106, 107).

Bu bilgiler ışığında prostaglandin ve lökotrienlerin eş zamanlı inhibisyonunun daha güçlü antiinflamatuvar etkinlik oluşturacağı ayrıca lökotrienlerin gastrointestinal mukozadaki yan etkileri nedeniyle dual inhibisyonun gastrointestinal güvenilirliği

artıracağı düşünülmüştür. Bu yüzden COX ve 5-LOX yollarını eş zamanlı inhibe eden ilaçlar tasarlanmış ve dual etkili antiinflamatuvarlar olarak isimlendirilmiştir. Ek olarak dual inhibitörlerin trombozun engellenmesinde ve aterosklerozis tedavisinde de yararlı olacağı düşünülmektedir (108-111).

Dual etkili bu bileşiklerin hem inflamatuvar hastalıkların tedavisinde hem de COX ve 5-LOX enzimlerinin yer aldığı çeşitli kanser tiplerinin ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde umut vaat eder niteliktedir (76, 88, 112-114). Değişik yapıda dual inhibitör etkili bileşikler bugüne kadar tasarlanmış ve aktiviteleri araştırılmıştır. Fakat tedavide yer alan dual etkili antiinflamatuvar herhangi bir ilaç henüz bulunmamaktadır. Bu bileşiklerden en ileri seviyedeki aday olan likofelonun osteoartrit tedavisindeki etkinliğini ve gastrointestinal güvenilirliğini klinik denemelerde kanıtlamıştır (115-117).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Perinatal Hİ beyin hasarının patogenezinin anlaşılması ve yeni tedavi yöntemlerinin belirlenmesi amacıyla uzun yıllardan beri immatür rat modelleri kullanılmaktadır (117, 118). Yedi günlük ratların tercih edilmesindeki ana sebep bu rat beyinlerinin gelişim düzeyinin histolojik olarak 32-34 haftalık insan fetusları ile olan benzerliğidir. Bu ratlarda serebral kortikal nöron tabakası gelişimini tamamlamış, germinal matriks küçülmeye başlamış ve beyaz cevher ise yeni yeni miyelinize olmaya başlamıştır. Postnatal 12-13 günlük ratların beyinleri ise miadında olan yenidoğanların beynine benzemektedir. İmmatür ratlarda Hİ oluşturmak için tek taraflı karotis arter ligasyonu, sonrasında %8 oksijen, % 92 nitrojen karışımının inhalasyonu şeklinde uygulanan Levin' in rat modeli kullanılmaktadır (95).

Çalışmamıza, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan 09.05.2013 tarihinde 2013-60 sayılı karar ile onay alındı. Hİ modeli oluşturulan 7 günlük Wistar-albino ratlar üzerinde yapıldı. Çalışmaya alınan ratlar Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi' nde (FÜDAM) üretime alınan 5 ayrı rat çiftinin bulunduğu kafeslerden seçildi. Aynı merkeze bağlı oluşturulan etik kurul tarafından çalışmanın etik onayı alındı. Ratların bulunduğu ortamda 12 saat gündüz, 12 saat gece imkanı sağlandı. Oda sıcaklığı 21-23 derece ve nemi % 40-60 arasında tutuldu. Üretime alınan erişkin ratlar Elazığ Yem fabrikasından temin edilen standart rat yemi ile beslendi.

Çalışmaya ağırlıkları ve cinsiyetleri arasında fark olmayan üç tedavi, bir hipoksi iskemi grubu ve bir sham olmak üzere toplam 5 grup rat alındı. İlk doğdukları günden itibaren annelerinin yanında olan ve anne sütü ile beslenen rat yavruları 7 günlük olduklarında çalışmaya alındı. Her bir ratın hangi gruba alınacağı randomize seçimle belirlendi. Grup 1, hipoksi ve iskemi işlemi uygulanmayan ancak sadece cilt kesisi yapılan ve tek doz 2 ml /kg % 0,9 NaCl (serum fizyolojik=SF) verilen sham grubu (n=7). Grup 2, hipoksi iskemi işlemi yapılan kontrol grubu (n=7). Grup 3, hipoksi iskemi işlemi sonrası 30. dakikada, 24. saatte ve 48. saatte 40 mg/kg/doz (toplam doz 120 mg/kg/doz) likofelon (Licofelone, Katalog Numarası: 10007692, Cayman marka, USA) tedavisi verilen grup (n: 7). Grup 4, hipoksi iskemi işlemi sonrası 30. dakikada, 24. saatte ve 48. saatte 50 mg/kg/doz allopurinol (toplam 150 mg/kg/doz) (Allopurinol 25 gr Cayman marka, USA) ve 40 mg/kg/doz likofelon

(120 mg/kg/doz) tedavisi verilen grup (n: 7). İlaçlar ve SF; intraperitoneal yoldan 50µl içerisinde, insülin enjektörleri aracılığıyla uygulandı.

Çalışmaya dahil edilen rat yavrularının işlem öncesi ağırlıkları ve cinsiyetleri kaydedildi. Eter anestezisi altında boyun ortasından, trakeanın hemen solundan uygulanan 0,5 cm' lik kesi ile sol arteria karotis kommunis bulundu. 4/0 ipek sutur materyali ile arter iki tarafından bağlanılarak ortası kesildi. Cilt sütur materyali ile kapatıldıktan sonra 2 saat süreyle anestezi etkisi geçene kadar annelerinin yanına verilen ratlar dörderli gruplar halinde % 8 oksijen, % 92 nitrojen içeren transparan fiberglastan yapılmış, çevre ısısı ışık kaynağı yardımıyla 33 °C' ye ayarlanan bir kafeste 2 saat bekletildi. Ortamdaki oksijen konsantrasyonu oksijen monitörü (Envitec marka OxiQuant MC, Seri No: 1001206 Wismar, GERMANY) ile sürekli ölçülerek %8 oksijen içeren hipoksik ortam 2 saat süreyle korundu. Bu işlemten sonra yarım saat oda havasında iyileşmeye bırakılan ratlar deney sonuna kadar kalmak üzere annelerinin yanına verildi.

Üçüncü günün sonunda, ratlar 10 günlükken deney ve kontrol grubunda yer alan ratlar TUNEL metodu için derin anestezi altında intrakardiyak formaldehit perfüzyonu ardından dekapite edildi. Organ perfüzyonundan önce her bir deney hayvanına 50 mg/kg intraperitoneal yoldan pentotal verildi. Derin anesteziden sonra toraks açıldı, sol ventrikülden girilip sağ atriumdan drene olacak şekilde 1 dk süreyle SF perfüzyonunun ardından % 10 formaldehit içeren solüsyon ile 5 dk süreyle organ perfüzyonu sağlandı. Bu işlemlerin ardından kraniyum açılarak beyin dokusu çıkarıldı ve örneklerin bir kısmı TUNEL işlemi için % 10 formaldehit içinde patolojik inceleme yapılacağı güne kadar bekletildi. Kaspaz aktivitesi çalışılacak doku örnekleri ise beyin hızlıca çıkarılarak sağ serebral hemisfer, sol serebral hemisfer olarak ayrıldı, kuru buz içinde tutulan tüplere konuldu ve çalışma gününe kadar -20 °C' de kaspaz enzimatik aktivitesi çalışılncaya kadar saklandı.

2.1. Tunel Metodu

Beyinlerden, 10 günlük rat atlası kaynak alınarak hipokampal bölgeyi tam olarak temsil eden koronal kesitler örneklandı. Her bir kesitte iskemik hasar oluşması beklenen sol hemisferin yerini belirlemek için çentik ile işaret konuldu. % 10 Formaldehitte tespit edilen kesit örneklerinden parafin bloklar hazırlandı. Hazırlanan parafin bloklardan 5 µ kalınlığında kesitler alınarak, histokimyasal inceleme için

S7100 ApopTag® Peroxidase (Chemicon, cat no: S7101, USA) ile işleme alındı. Işık mikroskopunda (Olympus BH-2) değerlendirilerek, her bir grupta apoptotik hücreler sayılarak kaydedildi. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoxilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Kesitlerde 10'luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranlanması ile Apoptotik indeks (AI)'i hesaplandı. Skala bar: 50µm.

Tablo 9. TUNEL boyama prosedürü

	İşlem	Süre
1	60°C etüv	Bir gece
2	Xylol	3X15 dakika
3	%100, %96, %80, %70 etil alkol	3'er dakika
4	PBS	5 dakika
5	Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.	
6	1: 500 dilüsyondaki Protinaz K solüsyonu	20 dakika
7	PBS	3X5 dakika
8	Endojen peroksidaz blokajı (% 3 H ₂ O ₂)	3 dakika
9	PBS	3X5 dakika
10	Equilibration tampon solüsyonu	10 dakika
11	Çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme) 37°C'de	60 dakika
12	Stop/Wash Buffer (2ml) +Distile su (68ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
13	Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14	PBS	3X5 dakika
15	DAB Dilution Buffer + DAB Substrate	5-10 dakika
16	PBS	3X5 dakika
17	Distile su	5 dakika
18	Harris hematoxilen	1-5 dakika
19	Distile su	5 dakika
20	%80, %96 ve %100 etil alkol	1'er dakika
21	Xylol	2X5 dakika
22	Kapatma medyumunu kullanılarak lamel ile kapatma.	

2.2. Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 Ölçüm Yöntemleri

Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 enzimleri çalışma kitlerinde açıklandığı prosedüre uygun biçimde yapıldı. Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 enzimleri ölçümü için sırası ile Kaspaz 3 Colorimetric Assay Kit (Biovision/K106-100,USA), Kaspaz 8 Colorimetric Assay Kit (Biovision/K113-100, USA) ve Kaspaz 9 Colorimetric Assay Kit (Biovision/K119-100,USA) kullanıldı. Protein spesifik antikorların bağlanması ve bu proteinlerin tespiti için sırasıyla Kaspaz 3 inhibitör (Q-DEVd-Oph, 1 mg Biovision/1175-1, USA), Kaspaz 8 inhibitör (Q-IETD-Oph, 1 mg Biovision/1176-1, USA) ve Kaspaz 9 inhibitör (Q-IETD-Oph, 1 mg Biovision/1177-1, USA) kullanıldı. Yöntemlerin prensibi kromofor *p*-nitroanilitin (*p*NA), işaretlenmiş IETD (Ile-Glu-Thr-Asp)-*p*NA substratından kırılması ile spektrofotometrik olarak ölçüm esasına dayanmaktadır. *p*-nitroanilid miktarı spektrofotometrede 405 nm’ deki absorbans değeri ölçülerek (ELX 800, Biotek, Türkiye) tayin edildi.

2.3. İstatistiksel Değerlendirme

Tedavi ve kontrol grubunda yer alan ratların özellikleri ve sonuçlar hazır istatistik programı SPSS version 22.0 ile değerlendirildi. Sonuçların değerlendirilmesinde Mann Whitney U testi ve ki-kare analiz yöntemleri kullanıldı. Kontrol ile tedavi grupları arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda; genel hata oranı $\alpha = 0,05$ ’ te tutulabilmesi için her bir karşılaştırmada önemlilik seviyesi α/k olarak alındı (k=karşılaştırma sayısı). P değeri 0.05’ den küçük olarak saptandığında anlamlı farklılık olduğu kabul edildi.

3. BULGULAR

Yenidoğan ratların ortalama ağırlıkları 10.3 ± 2.3 (7.2-15) gr olup gruplar arasında cinsiyet ve ağırlık açısından istatistiksel farklılık yoktu ($p>0.05$). Grup 4' te bir rat işlemler tamamlanmadan eksitus oldu. Bundan dolayı Allopürinol+Likofelon grubu 6 adet rattan oluştu. Diğer gruplar 7' şer adet rattan oluşmaktaydı. Çalışma grubundaki ratlardan alınan sağ ve sol serebral hemisferlerde kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz 9 enzimatik aktivitelerine ek olarak TUNEL metodu ile apoptotik indeks çalışıldı.

Elde edilen değerlerin hem grup içinde, hem de gruplar arasında farkı olup olmadığı istatistiksel olarak değerlendirildi.

Grupların 405nm optik dansitede ölçülen sol ve sağ hemisfer kaspaz-8 aktiviteleri Tablo 10' da verildi.

Grupların kendi içinde sol ve sağ hemisfer kaspaz-8 aktiviteleri arasında istatistiksel farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

Sham grubundaki ratların sol ve sağ hemisfer kaspaz-8 aktiviteleri, kontrol grubundaki ratların kaspaz-8 aktivitelerine göre belirgin düşük bulundu ($p < 0,05$).

Sham grubundaki ratların sol ve sağ hemisfer kaspaz-8 aktiviteleri ile likofelon grubu ve allopürinol+likofelon grubu ratların sağ ve sol serebral hemisfer kaspaz-8 aktiviteleri arasında farklılık saptanmadı ($p > 0,05$).

Kontrol grubundaki ratların sağ ve sol serebral hemisfer kaspaz-8 aktivitesi, likofelon grubu ve allopürinol+likofelon grubu ratların sağ ve sol serebral hemisfer kaspaz-8 aktivitesine göre belirgin yüksek bulundu ($p < 0,05$).

Likofelon grubunun sol hemisfer kaspaz-8 aktivitesi, allopürinol+likofelon grubu sol hemisfer kaspaz-8 aktivitesine göre belirgin düşük bulundu ($p < 0,05$). Likofelon grubu sağ hemisfer kaspaz-8 aktivitesi ile allopürinol+likofelon grubu sağ hemisfer kaspaz-8 aktivitesi arasında farklılık yoktu ($p > 0,05$).

Tablo 10. Çalışma grubundaki ratların sol ve sağ serebral kaspaz-8 aktiviteleri (405nm optik dansite)

ÇALIŞMA GRUPLARI	Kaspaz-8 Sağ Serebral Hemisfer Ort± SS	Kaspaz-8 Sol Serebral Hemisfer Ort± SS	P DEĞERLERİ
Kontrol	0,35±0,1 # μ	0,36±0,08 # μ	0,89
Sham	0,19±0,04 μ	0,18±0,07 μ	0,68
Likofelon	0,08±0,02 α μ#	0,09±0,03 α μ#	0,89
Allopürinol+Likofelon	0,13±0,04 μ# α	0,22±0,05 μ# α	0,06

#: Kontrol grubu ile likofelon grubu ve allopürinol+likofelon grubu sağ ve sol serebral hemisfer kaspaz-8 aktiviteleri arasında istatistiksel farklılık saptandı ($p < 0,05$).

μ: Sham grubu ile kontrol grubu sağ ve sol hemisferler kaspaz-8 aktiviteleri arasında istatistiksel farklılık saptandı ($p < 0,05$). Sham grubu ile likofelon grubu ve allopürinol+likofelon grubu ratların sağ ve sol serebral hemisfer kaspaz-8 aktiviteleri arasında farklılık saptanmadı ($p > 0,05$).

α: Likofelon grubu sol hemisfer kaspaz-8 aktivitesi, allopürinol+likofelon grubu sol hemisfer kaspaz-8 aktivitesi arasında istatistiksel farklılık bulundu ($p < 0,05$). Likofelon grubu sağ hemisfer kaspaz-8 aktivitesi ile allopürinol+likofelon grubu sağ hemisfer kaspaz-8 aktivitesi arasında farklılık yoktu ($p > 0,05$).

Grupların 405nm optik dansitede ölçülen sol ve sağ serebral hemisfer kaspaz-9 aktiviteleri Tablo 11’ de verildi.

Grupların kendi içinde sol ve sağ serebral hemisfer kaspaz-9 aktiviteleri arasında istatistiksel farklılık saptanmadı ($p > 0,05$).

Sham grubundaki ratların sol ve sağ hemisfer kaspaz-9 aktiviteleri, kontrol grubundaki ratların kaspaz-9 aktivitelerine göre belirgin düşük bulundu ($p < 0,05$).

Sham grubundaki ratların sol ve sağ hemisfer kaspaz-9 aktiviteleri ile likofelon grubu ve allopürinol+likofelon grubu ratların sağ ve sol serebral hemisfer kaspaz-9 aktiviteleri arasında istatistiksel farklılık saptanmadı ($p > 0,05$).

Likofelon grubu ratların sol ve sağ serebral hemisfer kaspaz-9 aktivitesi kontrol grubu ratların sol hemisfer kaspaz-9 aktivitesine göre düşük bulundu ($p < 0,05$).

Allopürinol+likofelon grubu ratların sol serebral hemisfer kaspaz-9 aktivitesi ile kontrol grubu ratların sol serebral hemisfer kaspaz-9 aktivitesi arasında istatistiksel farklılık saptanmadı ($p > 0,05$). Allopürinol+likofelon grubu ratların sağ serebral hemisfer kaspaz-9 aktivitesi, kontrol grubu ratların sağ serebral hemisfer kaspaz-9 aktivitesine göre düşük bulundu ($p < 0,05$).

Likofelon grubu ratların sol serebral hemisfer ve sağ serebral hemisfer kaspaz-9 aktivitesi Allopürinol+Likofelon grubu ratların sol ve sağ serebral hemisfer kaspaz-9 aktivitesine göre düşük bulundu ($p < 0,05$).

Tablo 11. Çalışma grubundaki ratların sol ve sağ serebral kaspaz-9 aktiviteleri (405nm optik dansite)

ÇALIŞMA GRUPLARI	Kaspaz-9 Sağ Serebral Hemisfer Ort± SS	Kaspaz-9 Sol Serebral Hemisfer Ort± SS	P DEĞERLERİ
Kontrol	0,40±0,13# μ	0,34±0,06# μ	0,5
Sham	0,22±0,05 μ	0,19±0,08 μ	0,5
Likofelon	0,09±0,007 α # μ	0,10±0,05 α # μ	0,71
Allopürinol+Likofelon	0,21±0,07 α # μ	0,27±0,12 α # μ	0,46

#: Kontrol grubu ile likofelon grubunun sağ ve sol hemisfer; allopürinol+likofelon grubunun ise sağ serebral hemisfer kaspaz-9 aktiviteleri arasında istatistiksel farklılık saptandı ($p < 0,05$). Kontrol grubu sol hemisfer kaspaz-9 aktivitesi ile allopürinol+likofelon grubu sol hemisferleri arasında fark yoktu ($p > 0,05$).

μ : Sham grubu ile kontrol grubu sağ ve sol hemisferler kaspaz-9 aktiviteleri arasında istatistiksel farklılık saptandı ($p < 0,05$). Sham grubu ile likofelon grubu ve allopürinol+likofelon grubu ratların sağ ve sol serebral hemisfer kaspaz-9 aktiviteleri arasında farklılık saptanmadı ($p > 0,05$).

α : Likofelon grubu ratların sol ve sağ serebral hemisfer kaspaz-9 aktivitesi allopürinol+likofelon grubu ratların sağ ve sol serebral hemisfer kaspaz-9 aktivitesine göre farklılık bulundu ($p < 0,05$).

Grupların 405nm optik dansitede ölçülen sol ve sağ serebral hemisfer kaspaz-3 aktiviteleri Tablo 11' de verildi.

Grupların kendi içinde sol ve sağ serebral hemisfer kaspaz-3 aktiviteleri arasında istatistiksel farklılık saptanmadı ($p > 0,05$).

Sham grubundaki ratların sol ve sağ hemisfer kaspaz-3 aktiviteleri, kontrol grubundaki ratların kaspaz-3 aktivitelerine göre belirgin düşük bulundu ($p < 0,05$).

Sham grubundaki ratların sol ve sağ hemisfer kaspaz-3 aktiviteleri ile likofelon grubu ve allopürinol+likofelon grubu ratların sağ ve sol serebral hemisfer kaspaz-3 aktiviteleri arasında istatistiksel farklılık saptanmadı ($p > 0,05$).

Likofelon grubu ratların sol ve sağ serebral hemisfer kaspaz-3 aktivitesi kontrol grubu ratların sol hemisfer kaspaz-3 aktivitesine göre düşük bulundu ($p < 0,05$).

Allopürinol+likofelon grubu ratların sol serebral hemisfer kaspaz-3 aktivitesi ile kontrol grubu ratların sol serebral hemisfer kaspaz-3 aktivitesi arasında istatistiksel farklılık saptanmadı ($p > 0,05$). Allopürinol+likofelon grubu ratların sağ serebral hemisfer kaspaz-3 aktivitesi, kontrol grubu ratların sağ serebral hemisfer kaspaz-3 aktivitesine göre düşük bulundu ($p < 0,05$).

Likofelon grubu ratların sol serebral hemisfer ve sağ serebral hemisfer kaspaz-3 aktivitesi Allopürinol+Likofelon grubu ratların sol ve sağ serebral hemisfer kaspaz-3 aktivitesine göre düşük bulundu ($p < 0,05$).

Tablo 12. Çalışma grubundaki ratların sol ve sağ serebral kaspaz-3 aktiviteleri (405nm optik dansite)

ÇALIŞMA GRUPLARI	Kaspaz-3 Sağ Serebral Hemisfer Ort± SS	Kaspaz-3 Sol Serebral Hemisfer Ort±SS	P DEĞERLERİ
Kontrol	0,34±0,11# μ	0,35±0,09# μ	0,68
Sham	0,18±0,05 μ	0,17±0,06 μ	0,34
Likofelon	0,08±0,02 μ # α	0,09±0,03 μ # α	0,5
Allopürinol+Likofelon	0,17±0,03 μ # α	0,24±0,08 μ # α	0,14

#: Kontrol grubu ile likofelon grubunun sağ ve sol hemisfer; allopürinol+likofelon grubunun ise sağ serebral hemisfer kaspaz-3 aktiviteleri arasında istatistiksel farklılık saptandı ($p < 0,05$). Kontrol grubu sol hemisfer kaspaz-3 aktivitesi ile allopürinol+likofelon grubu sol hemisferleri arasında fark yoktu ($p > 0,05$).

μ : Sham grubu ile kontrol grubu sağ ve sol hemisferler kaspaz-3 aktiviteleri arasında istatistiksel farklılık saptandı ($p < 0,05$). Sham grubu ile likofelon grubu ve allopürinol+likofelon grubu ratların sağ ve sol serebral hemisfer kaspaz-3 aktiviteleri arasında farklılık saptanmadı ($p > 0,05$).

α : Likofelon grubu ratların sol ve sağ serebral hemisfer kaspaz-3 aktivitesi allopürinol+likofelon grubu ratların sağ ve sol serebral hemisfer kaspaz-3 aktivitesine göre düşük bulundu ($p < 0,05$).

10x40 güçteki ışık mikroskobunda bakılarak hesaplanan sol ve sağ serebral hemisfer apoptotik indeksleri Tablo 13' te verildi.

Grupların kendi içinde sol ve sağ serebral hemisfer apoptotik indeksleri arasında istatistiksel farklılık saptanmadı ($p > 0,05$).

Sham grubundaki sağ ve sol serebral hemisfer apoptotik indeks yüzdesi kontrol grubu sağ ve sol serebral apoptotik indekslerine göre belirgin düşüktü ($p < 0,05$).

Sham grubu sağ hemisfer apoptotik indeksi ile likofelon grubu sağ hemisfer ve allopürinol+likofelon grubu sağ hemisfer apoptotik indeksleri arasında istatistiksel farklılık saptanmadı ($p > 0,05$). Sham grubu sol hemisfer apoptotik indeksi, likofelon grubu sol hemisfer apoptotik indeksine göre anlamlı düşüktü ($p < 0,05$). Sham grubu sol serebral hemisfer apoptotik indeksi ile allopürinol+likofelon grubu sol serebral hemisfer apoptotik indeksleri arasında istatistiksel farklılık yoktu.

Kontrol grubundaki ratların sağ ve sol serebral hemisfer apoptotik indeksi, likofelon grubu ve allopürinol+likofelon grubu ratların sağ ve sol serebral hemisfer apoptotik indeksine göre anlamlı artmış bulundu ($p < 0,05$).

Likofelon grubu sağ hemisfer apoptotik indeks ile allopürinol+likofelon grubu sağ hemisfer apoptotik indeksleri arasında farklılık yoktu ($p < 0,05$). Likofelon grubu sol hemisfer apoptotik indeksi, allopürinol+likofelon grubu sol hemisfer apoptotik indeksine göre anlamlı artmıştı ($p < 0,05$).

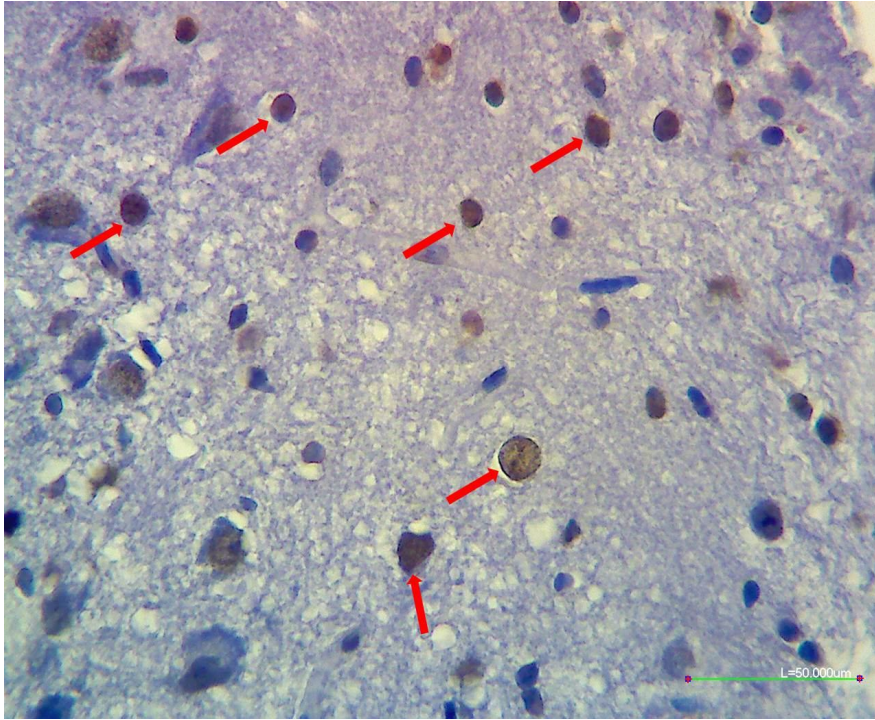
Tablo 13. Çalışma grubundaki ratların sol ve sağ serebral apoptotik indeksleri

Çalışma grupları	Apoptotik indeks Sağ Serebral Hemisfer Ort± SS	Apoptotik indeks Sol Serebral Hemisfer Ort± SS	P Değerleri
Kontrol	24,25±4,5# μ	12,75±1,7# μ	0,68
Sham	2,25±0,95 α	2,75±1,7 α	0,65
Likofelon	6,75±1,70# μ	1,75±0,95# μ	0,05
Allopürinol+Likofelon	3,25±1,25# μ α	2,75±0,95# μ α	0,15

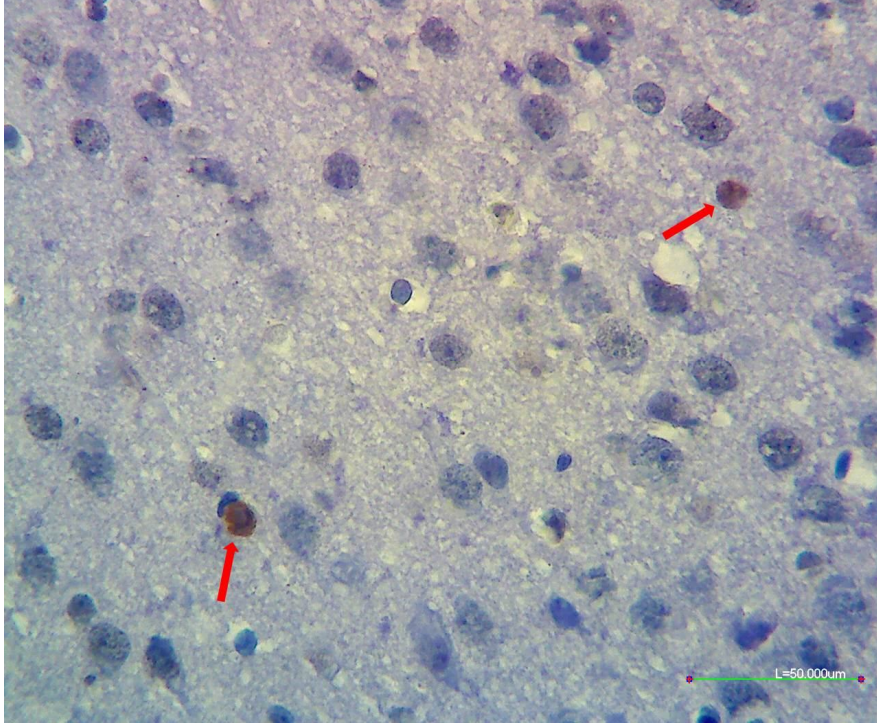
#: Kontrol grubu ile likofelon grubu ve allopürinol+likofelon grubu sağ ve sol serebral hemisfer apoptotik indeksleri arasında istatistiksel farklılık saptandı ($p < 0,05$).

μ: Sham grubu ile kontrol grubu sağ ve sol hemisferler apoptotik indeksleri arasında istatistiksel farklılık saptandı ($p < 0,05$). Sham grubu sol hemisferler ile likofelon grubu sol hemisferlerin apoptotik indeksleri farklı bulundu ($p < 0,05$). Sham grubu ile allopürinol+likofelon grubu ratların sağ ve sol serebral hemisfer apoptotik indeksleri arasında farklılık saptanmadı ($p > 0,05$). Sham grubu ile likofelon grubu ratların sağ serebral hemisfer apoptotik indeksleri arasında farklılık saptanmadı ($p > 0,05$).

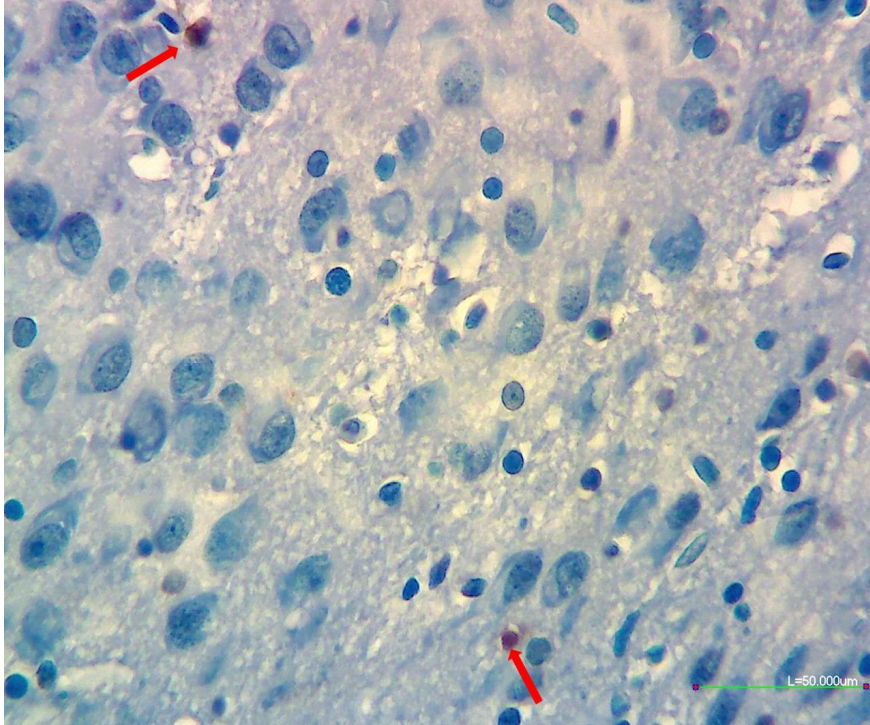
α: Likofelon grubu sol hemisfer apoptotik indeks, allopürinol+likofelon grubu sol hemisfer apoptotik indeks arasında istatistiksel farklılık bulundu ($p < 0,05$). Likofelon grubu sağ hemisfer apoptotik indeks ile allopürinol+likofelon grubu sağ hemisfer apoptotik indeks arasında farklılık yoktu ($p > 0,05$).



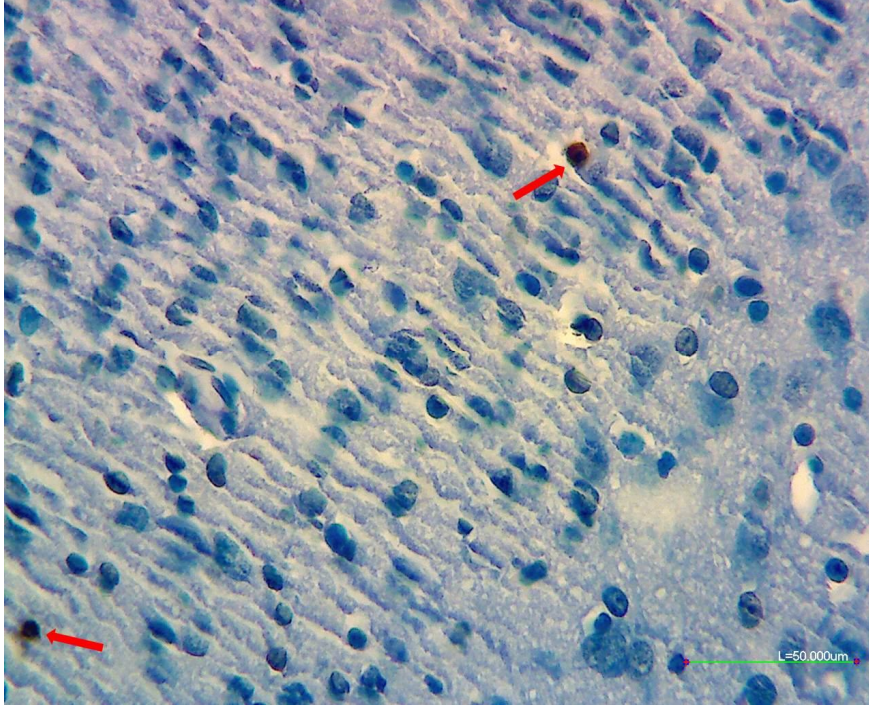
Şekil 5. Kontrol grubunda çok sayıda görülen TUNEL pozitif boyanan apoptotik hücreler (10x40).



Şekil 6. Allopürinol+ Likofelon grubunda azalmış sayıdaki apoptotik hücreler(10x40).



Şekil 7. Likofelon grubunda belirgin sayıda azalmış apoptotik hücreler(10x40).



Şekil 8. Sham grubunda az sayıda TUNEL pozitif boyanan apoptotik hücreler (10x40).

4. TARTIŞMA

Perinatal ve neonatal bakımda mevcut ilerlemelere rağmen kalıcı nörolojik sekellerin en sık nedeni olarak gösterilen hipoksik-iskemik beyin hasarı, kadın doğum hekimleri ve yenidoğan uzmanlarını uğraştıran yenidoğanın önemli sorunlarından biridir (24). HİE, hipoksi-iskemi anından itibaren başlayan resusitasyon ve ardından gelişen iyileşme döneminde de devam eden bir süreçtir. Akut fazda selektif nöronal nekroz veya infarkt şeklinde gözlenen doku zedelenmesi, nöron, glia ve endotel hücre yapısının bozulmasıyla devam eder. İnfarkt alanına en yakın lokasyonda bulunan nöronlarda nekroz ya da programlanmış hücre ölümü (apoptozis) gelişir (29).

Nekrozun gerçekleştiği hücrede hasarın önüne geçmek mümkün değilken infarkt çevresinde devam eden hasar sürecini engellemek bu dönemde meydana gelen biyokimyasal olayları bilmekle mümkündür. Son çalışmalarda ‘‘Terapötik Pencere’’ sürecine vurgu yapılmıştır. Bu dönem Hİ olay ile hücre ölümü arasındaki latent dönemi ifade eder. Yenidoğan bir bebekte bu süre 6 ile 12 saat arasında değişmektedir (24). Bu dönemde gerçekleşen ve hücre ölümüne sebep olan moleküler olaylar zincirinin sonlandırılması klinikte oldukça yararlıdır (62).

Eksitator aminoasit antagonistleri, serbest radikal bağlayıcı ajanlar, kalsiyum kanal blokerleri, nitrik oksit sentaz inhibitörleri gibi tam olarak etkinliği kanıtlanmamış farmakolojik yöntemler ve hafif hiperkapni, hipotermi gibi farmakolojik olmayan yöntemlerin ciddi beyin hasarını önlediğine yönelik güçlü veriler olmasına rağmen temel tedavi basamağı olarak kullanımları tartışmalıdır (24).

Serbest radikaller biyokimyasal olarak yüksek düzeyde reaktif moleküllerdir. Buna ek olarak yenidoğan beyni yüksek lipid içeriği, düşük antioksidan enzim kapasitesi ve yoğun mitokondriyal oksidatif fosforilasyon kullanımı nedeniyle oksidatif hasar karşısında daha duyarlıdır (119). Bundan dolayı oksidatif stres ve ortaya çıkan serbest radikallere bağlı beyin hasarının engellenmesine yönelik çalışmalar çok daha büyük önem arz etmektedir.

Bu sebeple çalışmamızda daha önce antiinflamatuvar etkisi kanıtlanmış, oksidatif stres ve buna bağlı ortaya çıkan serbest radikal etkisini minimuma indirebilecek bir ajan olan likofelon kullanıldı. Böylelikle kaspaz aktivitesinin azalacağı ve apoptotik sürecin engellenebileceği öngörüldü. Yine serbest radikaller

için önemli bir kaynak olan hipoksantin metabolizmasında ksantin oksidaz inhibitörü olan allopürinol çalışmamıza dahil edildi.

Mevcut çalışmalar kombine COX/LOX inhibitörlerinin prostoglandin, lökotrien ve tromboksan sentezini inhibe ettiğini buna bağlı güçlü antiinflamatuvar etkisini göstermektedir. Dual inhibisyon sonucu kuvvetli antiinflamatuvar etki görülmüştür. 5-LOX ve COX inhibitorlerinin kombinasyonu hem iki sınıf ilacın tek başına kullanılışlarından daha efektif olacak, ayrıca her iki enzimin tek bir ilaçla inhibisyonu ile yüksek doz maruziyetinden ve ilaç etkileşimlerinden kaçınılmış olunacaktır. Bu konuda Faz 3 aşamada bulunan Likofelon umut kaynağı olmuştur.

Hipoksik-iskemik beyin hasarı, hücresel seviyede oksidatif metabolizmanın anaerobik metabolizmaya kaymasının sonucu olarak başlar. Glikozun anaerobik yoldan yıkımına bağlı olarak hücrede NADH, FADH gibi redükte ajanlar ile laktik asit ve hidrojen iyonları birikmeye başlar. Hücrenin enerji gereksinimini karşılayamayan anaerobik glikoliz, ATP gibi yüksek enerjili fosfat rezervlerini tüketmeye başlar. Buna bağlı olarak hücreler arasında iyon geçişini sağlayan ATP bağımlı pompa fonksiyonları bozulur. Hücre içerisinde Na^{+2} , Ca^{+2} , Cl^{-} ve su birikir. Bunun sonucu sitotoksik ödem oluşur. Hipoksi-iskemi ayrıca glutamat gibi eksitotoksik aminoasitlerin akson terminallerinden salınımını sağlar. Glutamat salınımı sonucu glutamat hücre reseptörleri aktifleşerek Na^{+2} ve Ca^{+2} iyonlarının hücre içine girmesine neden olur. Hücre membranı fosfolipitlerinin turnoverinin artmasına bağlı olarak araşidonik asit metabolizmasının da etkisiyle sitozol içerisinde serbest yağ asitleri birikir. Sonrasında mitokondri içerisinde devam eden indirgenme reaksiyonlarının sonucunda meydana gelen serbest oksijen radikalleri, membran fosfolipitlerinin peroksidasyonuna yol açar. Bunların yanında hücre içi şişme hidrotoksik süreç gelişir. Açığa çıkan serbest radikallerin etkisiyle instrinsik apopitotik yol (kaspaz-9), ekstrinsik apopitotik yol (kaspaz-8) ve ortak yol (kaspaz-3) aktifleşerek hücre ölümünü gerçekleştirirler.

Hipoksik-iskemi sonrası hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artmasıyla fosfolipaz A' nın aktive olduğu, membran fosfolipidlerinin yıkılmasıyla hücrede araşidonik asid biriktiği, siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimlerinin aktivasyonu ile prostoglandinler, lökotrienler, tromboksan A2 ve beraberinde serbest oksijen radikallerinin açığa çıktığı bilinmektedir. Hİ aşamasında anaerobik

metabolizma sırasında üretilen hipoksantin yıkımı esnasında oluşan serbest radikaller hipoksik-iskemik olayın ana hasarlayıcı bileşenlerindendir. Buna ek olarak araşidonik asitten prostoglandin ve lökotrien sentezi sırasında ortaya çıkan süperoksit radikali de reperfüzyon fazında yüksek düzeyde reaktif hidroksil radikaline dönüşüp hücre hasarına neden olmaktadır (118-121).

Son yıllarda yapılan epidemiyolojik ve deneysel çalışmalarda, özellikle prematüre bebeklerde inflamasyon, periventriküler lökomalazi ve serebral palsy arasındaki yakın ilişki ortaya konmuştur (2). Erişkin ve immatür kemirgen hayvanlarda HI sonrasında beyinde IL-1 ve TNF- α gibi sitokinlerin ortaya çıktığı gösterilmiştir (79). Bu sitokinlerin NOS-2 (iNOS) enzimini uyarmalarının yanı sıra siklooksijenaz-2 (COX-2) enziminin de uyarılmasını sağlayarak NO ve prostaglandin sentezine neden oldukları bilinmektedir. COX-2 ve iNOS enzimleri işlevleri bakımından birbirine oldukça benzemektedir. Hipoksi-iskeminin sebep olduğu inflamatuvar sitokinlerin açığa çıkması ile iNOS ile aynı dönemde COX-2 kaskadı aktive olur (69).

Kalsiyumdan bağımsız hücre içi sistein proteaz sınıfının en önemli bölümünü kaspazlar oluştururlar. Bu endojen proteazlar inaktif olarak hücre sitoplazmasında yer alırlar ve birçoğu proapoptotiktir. Kaspaz-9 aktivitesi bcl-2 ailesince düzenlenir. Kaspaz-2 ve kaspaz-8 ise TNF- α gibi inflamatuvar sitokinler tarafından aktive edilir. Kaspaz-8 ve kaspaz-9 apoptozisi başlatan kaspazlardır. Kaspaz-3 ise apoptozisi yürüten kaspazlardan biridir. Ek olarak kaspaz-3 DNA hasarlanmasında DNA fragmentasyonuna sebep olur.

Mitokondri normal şartlarda ATP oluşturmak üzere sitokrom-c içerir. Hipoksi gibi mitokondrial stres durumlarında serbest kalan sitokrom-c apoptotik hücre ölümüne sebep olan kaspaz-3 aktivasyonu için önemli rol teşkil eder. Bu yolda mitokondri aracılığıyla kontrol edilen apoptotik proteaz aktive edici faktör ve kaspaz-9 bulunmaktadır. Kofaktör nükleotid trifosfat (d-ATP ve ATP) ile aktifleşen sitokrom-c ve apoptotik proteaz aktive edici faktör birleşerek prokaspaz-9' u aktive eder. Aktive kaspaz-9 da kaspaz-3' ü aktive ederek diğer kaspaz yolağının uyarılmasına sebep olur.

Kaspazlar iskemiden sonra aktifleşirler. Chen ve ark. (122) kaspaz-3' ün gecikmiş nöronal ölüme aracılık ettiğini bildirmişler ve kaspaz-3 inhibitörlerinin

hücre ölümü üzerine etkilerinin kaspaz-1 inhibitörlerine göre daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Apoptozisin efektör aşamasında önemli rol oynayan kaspaz-3' ün nöronal gelişim ve hasarlanmada oldukça önemli olduğu gösterilmiştir. Bu proteazın bozulması nörolojik defektlere sebep olur. Deneysel iskemi ve travmatik beyin hasarlanması sonucunda nöronal hücre ölümüne kaspaz-3 aktivitesi destek olur. Bu her iki hasarlanmada da kaspaz inhibitörleri sadece apoptozisi azaltmakla kalmaz. Ek olarak hayvanlarda fonksiyonel iyileşmeye sebep olur (123, 124).

Zhu ve ark. (125) terapötik pencere döneminde hiperbarik oksijen tedavisinin etkisini araştırdılar. Hİ modeli oluşturulmuş ratlara 6, 24, 48, 72 saat ve 1 hafta sonra hiperbarik oksijen tedavisi uyguladılar. 14 gün sonra apoptotik indeks, kaspaz-3, kaspaz 8, malondialdehit, NO ve Hİ sonrası 28. günde Morris water maze test yaptılar. Hİ' nin 72. saatiyle karşılaştırıldığında hiperbarik oksijen tedavisi alan grupta anlamlı iyileşme gördüler. Oksidatif stresin inhibisyonuyla beyin dokusunun Hİ hasara karşı korunabileceğini gösterdiler. Çalışmamızda Hİ' nin 72. saatinde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında her 2 hemisferde kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivitesinde anlamlı düşüş gördük. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında her 2 hemisferde apoptotik hücre yüzdesi anlamlı azalmıştı. Bunun sebebi olarak antiinflamatuvar etkiyle azalan sitokin etkisinin apoptozisi yeteri kadar uyaramamasını düşündük. Ayrıca burada konu olan beyin dokusunun korunması o kadar güçlüydü ki kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktiviteleri sham grubu ve likofelon grubu karşılaştırıldığında aralarında fark görülmedi. Ek olarak oksijen tedavisi gibi yöntemlerin prematür infantlarda oksijene bağlı sık görülen prematür retinopatisi gibi komplikasyonlara sebep olabileceği akılda tutulmalıdır.

Fischer ve Hornig. (126) likofelonun COX ve LOX inhibisyonundaki bir diğer etki mekanizması olarak 5-lipoksijenaz aktive edici protein inhibisyonunu araştırdılar. Likofelonun Ca^{+2} iyon kanallarıyla aktive olan lökositlerden üretilen 5-LOX ürünlerinin sentezini inhibe ettiğini böylelikle gentoksik, oksidatif veya hiperosmolar stresi engellediğini saptamışlardır.

Siklooksijenaz-2 inhibisyonu ve etkileri üzerine yapılan Tutak ve ark. ile Buccellati ve ark.' nın yaptığı çalışmalarda indometazinin serebral infarkt alanını küçülttüğünü saptamışlardır (127, 128).

Liu ve ark. (129) siklooksijenaz ve bunun HİE üzerine etkilerini araştırdılar. COX-2'nin, COX enzim türleri arasında baskın olduğundan yola çıkarak iskemi modeli oluşturdular. İskemi sonrası hipokampusta COX-2 ve derivelerinin arttığını gördüler. Selektif COX-2 inhibitörü olan SC58125 uygulaması sonrası prostoglandinler ve prostoglandinlerin potansiyel nörotoksik deriveleri olan siklopentenonların azaldığını gördüler.

Taşkın ve ark. (130) nonselektif siklooksijenaz inhibitörü olan indometazinin Kaspaz-3, Kaspaz-8, glutatyon ve lipit peroksidasyonunu tespit etmek için önemli bir belirteç olan malondialdehit seviyeleri üzerine olan etkisini araştırdılar. Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve glutatyon seviyelerinde indometazin tedavisi sonrası hipoksi grubuna göre belirgin düzelme gördüler. Buna karşın lipit peroksidasyon belirteci olan malondialdehitte belirgin artış saptadılar. Bu da indometazinin lipoksijenaz yoluna etki edememesi, bununla birlikte siklooksijenaz yolunun inhibisyonuyla artan substratın lipoksijenaz yoluna girmesi ve lipit peroksidasyonunu arttırması düşüncesini öne sürdüler. Çalışmamızda likofelon grubunda yer alan ratların hem Hİ' ye uğrayan sol serebral hemisferlerinde hem de sadece hipoksiye uğrayan sağ serebral hemisferlerinde kaspaz-8 ve kaspaz-3 enzimatik aktivitelerinde kontrol grubu ratların serebral hemisferlerindeki kaspaz aktivitesine kıyasla azalma görüldü. Ek olarak dual inhibitör olan likofelonun hem COX hem de LOX yolağını inhibe ederek apoptozisin yanısıra lipit peroksidasyonunu ilk aşamadan itibaren engelleyebileceğini de göstermektedir.

Zuo ve ark. (131) başka bir çalışmada hücre içi reaktif oksijen ürünleri üzerinde durdular. Bu ürünlerin apoptozisi regüle ettikleri bilinmektedir. Kaspaz-9 mitokondriyal apoptotik kaskadın başlangıç elemanıdır. Reaktif oksijen ürünleriyle yakın ilişkilidir. Çalışmamızda uygulanan likofelonun Hİ grubundaki ratların hem sağ hem de sol serebral hemisferleri karşılaştırıldığında kaspaz-9 aktivitesini düşürmesi, diğer bir açıdan bakıldığında mitokondriyal apoptotik yolun inhibisyonu anlamına gelir. Böylece hücre içi Ca^{+2} seviyesinin yükselmesi önlenerek oksidatif stres ve hiperosmolar stresin engellemesi kuvvetle muhtemeldir.

Kumar ve ark. (132) likofelonu 14 gün boyunca oral yoldan günlük 10 mg/kg/g (total 140 mg/kg) şeklindeki dozlarda uyguladılar. Huntington hastalığı modeli oluşturulmuş ratlarda likofelon tedavisi sonrası oksidatif stres parametreleri

ve Kaspaz-3 aktivitesinde azalma olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda likofelon uygulanan gruplarda kaspaz-3 aktivitesinin Hİ uygulanan kontrol grubuna göre düştüğü tespit edildi.

Serbest radikaller için ksantin oksidaz önemli bir kaynaktır. Allopürinol, ksantin oksidaz enzimlerinin önemli bir inhibitörü olup, hipoksantinden ksantin sentezini inhibe eder ve serbest radikal süper oksidinin oluşumundan korur.

Palmer ve ark. (133) serebral hipoksi-iskemiden 15 dakika sonra allopürinol uygulanan genç farelerin beyin hasarlarının azaldığını saptamışlardır. Soloniuk ve ark. (134) allopürinol ve deforaksaminin iskemi boyunca hücre hasarını engellediğini belirtmiştir. Çalışmamızda Allopürinol+Likofelon uygulanan sol serebral hemisferlerin yer aldığı grupta hem kaspaz-8 enzimatik aktivitesi hem de apoptotik indeks yönünden hipoksi-iskemi uygulanan gruba göre farklılık tespit edildi. Allopürinol+likofelon uygulanan ratlarda hem sol hem de sağ serebral hemisferlerde kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktiviteleri yönünden sham grubunun sağ ve sol serebral hemisferlerine göre farklılık olmaması allopürinol+likofelonun iskemi boyunca koruyucu etkisi olduğunu desteklemektedir.

Özcan ve ark. (135) ksantin oksidaz inhibitörü olan allopürinol ile yaptığı bir başka çalışmada 72 mg/kg/doz allopürinol uygulanan yenidoğan ratlarda Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 düzeylerinin hem Hİ grubuna hem de 48 mg/kg/doz allopürinol uygulanan gruba göre belirgin azaldığını saptamışlardır.

Güneş ve ark. (136) asfiktik infantlarda yaptıkları bir çalışmada serum NO düzeyinin afiktik bebeklerde kontrol grubuna göre önemli seviyede yüksek olduğu ve beyin omurilik sıvısı NO düzeyinin ensefalopatinin derecesi ile uyumlu olduğunu bildirmişler. Ayrıca allopürinol ile tedavi edilen asfiktik yenidoğanların serum NO düzeylerinin düştüğünü ve daha iyi nörolojik sonuçların olduğunu bulmuşlardır.

Biz ise çalışmamızda Hİ uygulanan ratların sol serebral hemisferlerinde kontrol grubuyla allopürinol+likofelon grubu karşılaştırıldığında kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktiviteleri arasında farklılık saptanmadı. Sadece hipoksi uygulanan sağ serebral hemisferler karşılaştırıldığında ise allopürinol+likofelon uygulanan grupta kontrol grubuna göre kaspaz-8, kaspaz-9 ve kaspaz-3 enzimatik aktiviteleri belirgin düşüş gösterdi. Apoptotik indeksler karşılaştırıldığında ise hem sağ hem de sol hemisferlerde allopürinol+likofelon tedavisi sonrası apoptik hücre sayılarında belirgin

azalma görüldü. Allopürinole ek olarak likofelon uygulanan grup sadece likofelon uygulanan grupla karşılaştırıldığında apoptotik hücreler yönünden sağ serebral hemisferler arasında fark yokken sol serebral hemisferlere bakıldığında allopürinol+likofelon uygulanan grupta apoptotik hücre yüzdesinde anlamlı düşüş vardı.

Çalışmamızda likofelon ile allopürinol+likofelon uygulanan gruplar karşılaştırıldığında hipoksi-iskemi uygulanan sol serebral dokularda kaspaz-8, kaspaz-9 ve kaspaz-3 enzimatif aktivitesinin daha düşük olduğu saptandı. Sadece hipoksi uygulanan sağ serebral hemisferlerde ise kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivitesinin daha düşük olduğu saptandı. Apoptotik indeksler karşılaştırıldığında ise tam tersi bir sonuç ortaya çıktı.

Yenidoğan infantlarda hipoksik iskemik hasar riski yüksek olan olguları önceden tanımlayıp profilaktik tedavi uygulamak her zaman mümkün olmamaktadır. Hipoksik-İskemik olay sonrası saatlerle ifade edilen terapötik pencere döneminde yapılan müdahalelerin klinik olarak daha kolay uygulanabileceğinden hareketle çalışmamızda likofelon ve allopürinolu olaydan hemen sonra uygulandı.

Çalışmamızda likofelonun dual inhibisyon mekanizması ile prostoglandin ve lökotrienleri azaltarak serbest radikal oranını minimuma indirebileceğini öngörüldü. Aldığımız sonuçlarda ise sham grubu sağ ve sol serebral hemisfer kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktivitesi ile likofelon grubu sağ ve sol serebral hemisfer kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktivitesi arasında farklılık görülmedi. Bu da antiinflamatuvar bir ajan olan bu dual etkili inhibitör ajanın inflamatuvar stokinleri azaltarak apoptozisi azaltabileceği gösterildi. Çalışmamızda hem apoptozisi başlatan kaspazlar olan kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktivitesinin azalması hem de apoptozisin ilerlemesinde kilit rol oynayan kaspaz-3 aktivitesinin azalması öncül kaspaz moleküllerinin inhibisyonuyla apoptozis yolağının ilerleyememesi bunun sonucunda da azalmış apoptotik hücre yüzdesini açıklar nitelikteydi.

Çalışmamızda elde edilen verilere baktığımızda likofelonun mitokondriyal apoptozisin öncülü olan Kaspaz-9' a ek olarak Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 enzimatif aktivitesini hem sağ serebral hemisfer hem de sol serebral hemisferlerde Hİ oluşturulan grubun sağ ve sol serebral hemisferlerine göre anlamlı düşürdüğü tespit edildi. Apoptotik indekslere bakıldığında Hİ uygulanan sol serebral hemisferlerde

sham grubundaki apopitotik hücre yüzdesi likofelon uygulanan gruba göre anlamlı oranda düşüktü. Bununla beraber likofelon grubundaki ratların sol serebral hemisfer apopitotik hücre yüzdeleri kontrol grubuna göre önemli düşüş gösterdi.

Allopürinol+likofelon uygulanan grupta kaspaz-3 ve kaspaz-9 serebral aktivitelerinin likofelon uygulanan ratların hem sağ hem de sol serebral hemisferlerine göre yüksek bulunması ve kaspaz-8 aktivitesinin sol serebral hemisferlerde tek başına likofelon grubuyla karşılaştırıldığında allopürinol+likofelon grubunda daha yüksek olmasının olası sebepleri arasında çoklu ilaç kullanımının sistemik yan etkilerinin olabileceği ve her 2 ilacın sistemik düzeyde birbirlerinin etkilerini azaltabileceğidir.

Kontrol grubu ratların Hİ uygulanan sol serebral hemisferlerine göre likofelon grubu ratların sol hemisferlerinde anlamlı sayıda azalmış apopitotik hücre yüzdesi göze çarptı. Bütün bu bilgiler bize likofelonun inflamatuvar süreçler sonucu aktifleşen kaspazları antiinflamatuvar etkisi ile inhibe ettiği ve ek olarak hücre içi stresi engelleyerek Hİ hasarını azaltabileceğini gösterdi.

Allopürinolün kombine edildiği gruba baktığımızda apopitotik hücre yüzdelерinin belirgin oranda hem kontrol grubuna göre hem de likofelon grubuna göre azaldığı saptandı. Bu veri ksantin oksidaz inhibitörü olan bu ajanın serbest radikal etkisi üzerinden apopitozisi azaltabileceğini gösterdi.

Sonuç olarak yaptığımız bu çalışma; likofelonun hipoksik iskemik hasar sonrası gecikmiş nöronal hasarı azaltabileceğini gösterdi. Özellikle tek başına likofelonun kombine tedaviye göre üstünlük sağlaması, kombine ilaç kullanımına bağlı sistemik yan etkilerde azalmaya sebep olabileceğini de gösterdi. Ancak likofelonun HİE tedavisinde geç nöronal hasarı önleme ve optimal tedavi dozu ile ilgili daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

5. KAYNAKLAR

1. Volpe JJ. Hypoxic-ischemic encephalopathy: clinical aspects. Volpe JJ (ed). Neurology of the Newborn. Philadelphia: WB Saunders, 2001: 331-394.
2. du Plessis AJ, Volpe J. Perinatal brain injury in the preterm and term newborn. Current Opinion in Neurology 2002; 15: 151-157.
3. Aracio A, Terencio MC, Alcaraz MJ, Dominguez JN, Leon C. Evaluation of the anti-inflammatory and analgesic activity of Me-UCH9, a dual cyclooxygenase-2/5-lipoxygenase inhibitor. Life Sci 2007; 80: 2018-2017.
4. Knight KR, Mellow CG, Abbey PA, Angel MF, Lepore DA, Arnold LI, et al. Interaction between thromboxane and free radical mechanisms in experimental ischaemic rabbit skin flaps. Res Exp Med (Berl) 1990; 190: 423-433.
5. Funk CD, Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. Science 2001; 294: 1871-1875.
6. Pacher P, Nivorozhkin A, Szabó C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. Pharmacol Rev 2006; 58: 87 – 114.
7. Reddy NP1, Aparoy P, Reddy TC, Achari C, Sridhar PR, Reddanna P. Design, synthesis, and biological evaluation of prenylated chalcones as 5-LOX inhibitors Bioorg Med Chem Lett 2014; 24: 317-324.
8. Pasternak JF. Hypoxic-ischemic brain damage in the term infant: Lessons form laboratory. Ped Clin N A 1993; 40: 61-72.
9. Carter BS, Haverkamp AD, Merenstein GB. The definition of acute perinatal asphyxia. Clin Perinatol 1993; 20: 287-304.
10. Erdem G. Turkish Neonatal Society Multicentre Study Group. Perinatal mortality in Turkey. Peadiatri Perinatal Epidemiology 2003; 17: 17-21.
11. Kliegman MR. Hypoxia-ischemia. Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB (eds). Nelson Textbook of Pediatrics. 16th ed, Philadelphia: WB Saunders, 2000; 493-495.

12. Wu YW, Backstrand KH, Zhao S, Fullerton HJ, Jonston SC. Declining diagnosis of birth asphyxia in California: 1991-2000. *Pediatrics* 2004; 114: 1584-1590.
13. Ian M, Lars L, Klara T, Aimon N, Anders O, Eva T. Influence of maternal, obstetric and fetal risk factors on the prevalence of birth asphyxia at term in a Swedish urban population. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002; 81: 909.
14. Satar M, Narlı N, Kırımı E, Atıcı A, Türkmen M, Yapıcıoğlu H. Hipoksik iskemik ensefalopatili 205 olgunun değerlendirilmesi. *Türkiye Klinikleri Pediatri Dergisi* 2001; 10: 36-41.
15. Öztürk MA, Güneş T, Çetin N. Perinatal Asfiksili 270 Bebeğin Değerlendirilmesi. IX. Ulusal Neonatoloji Kongresi, Özet Kitabı 25-28 Ekim 1998: 64.
16. Gül NA, Cömert S, Ağzıkuru T, Vitrinel A, Akın Y, Telatar B, Girit N. Perinatal Asfiksi Olgularının Yedi Yıllık Değerlendirilmesi. *Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi* 2010; 21: 77-83.
17. Acunaş B, Çeltik C, Garipardıç M, Karasalihoğlu S. Perinatal asfiksili yenidoğanların etyoloji, klinik ve prognoz açısından değerlendirilmesi. *T Klinik Pediatri* 1999; 8: 21-26.
18. Hill A, Volpe JJ. Neurological and neuromuscular disorders. Avery GB, Fletcher MA, MacDonald MG (eds). *Neonatology Pathophysiology & Management of the Newborn*. 5th ed, Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 1999: 1231-52.
19. Volpe JJ. Hypoxic-Ischemic encephalopathy: neuropathology and pathogenesis. Volpe J (ed). *Neurology of the Newborn*. 4rd ed. Philadelphia, PA: WB Saunders; 2000; 217-394.
20. Martin-Ancel A, Garcia-Alix A, Gaya F, Cabanas F, Burgueros M, Quero J. Multiple organ involvement in perinatal asphyxia. *J Pediatr* 1995; 127: 786-793.
21. Greijer AE, van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol* 2004; 57: 1009-1014.
22. Chen J, Jin K, Chen M, Pei W, Kawaguchi K, Greenberg DA, et al. Early detection of DNA strand breaks in the brain after transient focal ischemia: implications for the

- role of DNA damage in apoptosis and neuronal cell death. *J Neurochem* 1997; 69: 232-245.
23. Feet BA, Gilland E, Groenedaal F, Brun NC, Hagberg H, Saugstad OD. Cerebral excitatory aminoacids and Na, K-ATP ase activity during resuscitation of severely hypoxic newborn piglets. *Acta Pediatr* 1998; 87: 889-95.
 24. Volpe JJ. Perinatal Brain Injury: from pathogenesis to neuroprotection. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2001; 7: 56-64.
 25. Evans DJ, Levene MI. Hypoxic-ischaemic injury. Rennie JM, Robertson NRC (editors). *Textbook of Neonatology*, 3rd ed, Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999: 1235–1251.
 26. Fitzhardinge PM, Flodmark O, Fitz CR, Ashby S. The prognostic value of computed tonography as an adjunct assesment of the term infant with postasphyxial encephalopathy. *J Pediatr* 1981; 99: 777-781.
 27. Vannucci RC, Yager JY, Vannucci SJ. Cerebral glucose and energy utilization during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994; 143: 279-288.
 28. Harkness RA. Is post-hypoxic-ischemic cell damage associated with excessive ATP consumption rather than a failure of ATP production? *Acta Paediatr* 1997; 86: 1-5.
 29. Vannucci RC. Hypoxia-ischemia: clinical aspects. Fanaroff AA, Martin RJ (eds). *Neonatal-Perinatal Medicine, Disease of the Fetus and Infant*. 6th ed, St Louis: Mosby 1997: 812-951.
 30. Plum F. What causes infarction in ischemic brain? The Robert Wartenberg Lecture, *Neurology* 1983; 33: 222-233.
 31. Vannucci RC, Palmer C. Hypoxic-ischemic encephalopathy: pathogenesis and neuropathology. Fanaroff AA, Martin RJ (eds), *Neonatal-Perinatal Medicine*. Philadelphia, PA: Mosby-Yearbook, 1997: 856–877.
 32. Yager JY, Brucklacher RM, Vannucci RC. Cerebral energy metabolism during hypoxia-ischemia and early recovery in the immature rats. *Am J Physiol* 1992; 262: 672-677.

33. Rehncroná S, Rosen I, Siesjo BK. Brain lactic acidosis and ischemic cell damage: I. biochemistry and neurophysiology. *J Cereb Blood Flow Metabol* 1981; 1: 297-311.
34. McDonald JW, Johnston MV. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Rev* 1990; 15: 41-70.
35. Jensen FE, Blume H, Alvarado S, Firkunsky I, Geary C. NBQX blocks acute and late epileptogenic effects of perinatal hypoxia. *Epilepsia* 1995; 36: 966-972.
36. Nelson KB, Grether JK. Can magnesium sulfate reduce the risk of cerebral palsy in very low birth weight infants? *Pediatrics* 1995; 95: 263-269.
37. Paneth N, Jetton J, Pinto-Martin J, Susser M, The Neonatal Brain Hemorrhage Study Analysis Group. Magnesium sulfate in labor and risk of neonatal brain lesions and cerebral palsy in low birth weight infants. *Pediatrics* 1988; 82: 533-542.
38. Lai MC, Yang SN. Perinatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *J Biomed Biotech* 2011;
39. D'Souza SW, Slater P. Excitatory amino acids in neonatal brain: contributions to pathology and their therapeutic strategies. *Arch Dis Child* 1994; 70: 147-50.
40. Schleien CL, Kuluz JW. The role of leukocytes in global and focal brain ischemia. TibboelD, van der Voort E (eds). *Intensive Care in Childhood: a challenge to the future*. Berlin: Springer-Verlag, 1996: 175-86.
41. Bulkley GB. Reactive oxygen metabolites and reperfusion injury: aberrant triggering of reticuloendothelial function. *Lancet* 1994; 344: 934-936.
42. Cammer W, Zhang H. Maturation of oligodendrocytes is more sensitive to TNF alpha than is survival of precursors and immature oligodendrocytes. *J Neuroimmunol* 1999; 97: 37-42.
43. Selmaj K, Walczak A, Mycko M. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis with a TNF binding protein (TNF bp) correlates with down-regulation of VCAM-1/VLA-4. *Eur J Immunol* 1998; 28: 2035-2044.

44. Louis JC, Magal E, Takayama S, Varon S. CNTF protection of oligodendrocytes against natural and tumor necrosis factor-induced death. *Science* 1993; 259: 689-692.
45. Taupin V, Renno T, Bourbonniere L. Increased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis, chronic macrophage/microglial reactivity, and demyelination in transgenic mice producing tumor necrosis factor-alpha in the central nervous system. *Eur J Immunol* 1997; 27: 905-913.
46. Brian J, Faraci F. Tumor necrosis factor- α -induced dilatation of cerebral arterioles. *Stroke* 1998; 29: 509-515
47. Brian J, Heistad D, Faraci F. Mechanism of endotoxin-induced dilatation of cerebral arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Phys* 1995; 38: 783-788.
48. Liao SL, Chen CJ. Differential effects of cytokines and redox potential on glutamate uptake in rat cortical glial cultures. *Neurosci Lett* 2001; 299: 113-116.
49. Northington FJ, Traystman RJ, Koehler RC, Martin LJ. GLT1, glial glutamate transporter, is transiently expressed in neurons and develops astrocyte specificity only after midgestation in the ovine fetal brain. *J Neurobiol* 1999; 39: 515-526.
50. Kopp EB, Medzhitov R. The toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 13-18.
51. Martin LJ. Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury. *Int J Mol Med* 2001; 7: 455-478.
52. Brambrink AM, Price AC, Kaiser A, Agnew DM, Ichord RN, Traystman RJ. Neuronal death in newborn striatum after hypoxia-ischemia is necrosis and evolves with oxidative stress. *Neurobiol Dis* 2000; 7: 169-191.
53. Martin LJ, Brambrink AM, Lehmann C, Portera-Cailliau C, Koehler R, Rothstein J, Traystman RJ. Hypoxia-ischemia causes abnormalities in glutamate transporters and death of astroglia and neurons in newborn striatum. *Ann Neurol* 1997; 42: 335-348.
54. Martin LJ, Brambrink AM, Price AC, Kaiser A, Agnew DM, Ichord RN, Traystman RJ. Neuronal death in newborn striatum after hypoxia-ischemia is necrosis and evolves with oxidative stress. *Neurobiol Dis* 2000; 7: 169-191.

55. Golden WC, Brambrink AM, Traystman RJ, Martin LJ. Failure to sustain recovery of Na, K-ATPase function is a possible mechanism for striatal neurodegeneration in hypoxic-ischemic newborn piglets. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; 88: 94-102.
56. Northington FJ, Ferriero DM, Graham EM, Traystman RJ, Martin LJ. Early neurodegeneration after hypoxia-ischemia in neonatal rat is necrosis while delayed neuronal death is apoptosis. *Neurobiol Dis* 2001; 8: 207-219.
57. Nakajima W, Ishida A, Lange MS, Gabrielson KL, Wilson MA, Martin LJ, et al. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. *J Neurosci* 2000; 20: 7994-8004.
58. Northington FJ, Ferriero DM, Flock DL, Martin LJ. Delayed neurodegeneration in neonatal rat thalamus after hypoxia-ischemia is apoptosis. *J Neurosci* 2001; 21: 1931-1938.
59. Schulz JB, Weller M, Moskowitz MA. Caspases as treatment targets in stroke and neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 1999; 45: 421-429.
60. Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull* 1998; 46: 281-309.
61. Martin LJ, Sieber FE, Traystman RJ. Apoptosis and necrosis occur in separate neuronal populations in hippocampus and cerebellum after ischemia and are associated with differential alterations in metabotropic glutamate receptor signaling pathways. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20: 153-67.
62. Northington FJ, Ferriero DM, Flock DL, Martin LJ. Delayed neurodegeneration in neonatal rat thalamus after hypoxia-ischemia is apoptosis. *J Neurosci* 2001; 21: 1931-8.
63. Cheng Y, Deshmukh M, D'Costa A, Demaro JA, Gidday JM, Shah A, et al. Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *J Clin Invest* 1998; 101: 1992-1999.

64. Ishimaru MJ, Ikonomidou C, Tenkova TI, Der TC, Dikranian K, Sesma MA, Olney JW. Distinguishing excitotoxic from apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *J Comp Neur* 1999; 408: 461-476.
65. Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ. Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum. *J Comp Neurol* 1997; 378: 70-87.
66. Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ. Non-NMDA and NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal deaths in adult brain are morphologically distinct: further evidence for an apoptosis-necrosis continuum. *J Comp Neurol* 1997; 378: 88-104.
67. Sastry PS, Rao KS. Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* 2000; 74: 1-20.
68. Fiskum G, Murphy AN, Beal MF. Mitochondria in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurologic diseases. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 351-369.
69. Murphy AN, Fiskum G, Beal MF. Mitochondria in neurodegeneration: bioenergetic function in cell life and death. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 231-245.
70. Nicotera P, Lipton SA. Excitotoxins in neuronal apoptosis and necrosis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 583-591.
71. Iijima T. Mitochondrial membrane potential and ischemic neuronal death. *Neurosci Res* 2006; 55: 234-243.
72. Lopez-Neblina F, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH. Molecular Biology of Apoptosis in Ischemia and Reperfusion. *J Invest Surg* 2005; 18: 335-350.
73. De Giorgi F, Lartigue L, Bauer MK, Schubert A, Grimm S, Hanson GT, et al. The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *FASEB J* 2002; 16: 607-609.
74. Gunn AJ, Gunn TR, Gunning MI. Neuroprotection with prolonged heat cooling started before postischemic seizures in fetal sheep. *Pediatrics* 1999; 102: 1098-106.

75. Akisü M, Kültürsay N, Coker I, Hüseyinov A. Platelet-activating factor is an important mediator in hypoxic ischemic brain injury in the newborn rat. *Biol Neonate* 1998; 74: 439-444.
76. Claria J, Romano M. Pharmacological intervention of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways. Impact on inflammation and cancer. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 3431-3447.
77. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Onuncu Basım, Cilt 2, Ankara: Hacettepe TAŞ, 2006: 1502-1525.
78. Goodman & Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. Joel G Hardman, Lee E (eds). Limbird. Tenth Edition 2001; 26: 669-685.
79. Bertram GK. Basic and clinical pharmacology. Eighth Edition. A lange Medical Book, 2001: 311-325.
80. FitzGerald GA, COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 879-890.
81. Gonzalez-Periz A, Claria J, New approaches to the modulation of the cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways. *Curr Top Med Chem* 2007; 7: 297-309.
82. Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakami M, Kudo I, Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biol Chem* 2000. 275: 32775-32782.
83. Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R, Samuelsson B, Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 7220-7225.
84. Tanikawa N, Ohmiya Y, Ohkubo H, Hashimoto K, Kangawa K. Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 884-889.
85. Perlman JM. Intrapartum hypoxic-ischemic cerebral injury and subsequent cerebral palsy. *Pediatrics* 1997; 99: 851-858.

86. Brash AR, Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem*, 1999; 274: 23679-23682.
87. Kuhn H, Structural basis for the positional specificity of lipoxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2000; 62: 255-270.
88. Leone S, Ottani A, Bertolini A, Dual acting anti-inflammatory drugs. *Curr Top Med Chem*, 2007; 7: 265-275.
89. Werz O, Steinhilber D, Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. *Pharmacol Ther* 2006; 112: 701-718.
90. Uozumi N, Shimizu T. Roles for cytosolic phospholipase A2 α as revealed by gene-targeted mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; 68-69: 59-69.
91. Leslie CC. Regulation of the specific release of arachidonic acid by cytosolic phospholipase A2. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004; 70: 373-376.
92. Farooqui AA, Ong WY, Horrocks LA. Biochemical aspects of neurodegeneration in human brain: involvement of neural membrane phospholipids and phospholipases A2. *Neurochem Res* 2004; 29: 1961-1977.
93. Ross BM, Kim DK, Bonventre JV, Kish SJ. Characterization of a novel phospholipase A2 activity in human brain. *J Neurochem* 1995; 64: 2213-2221.
94. Hanasaki K, Arita H. Phospholipase A2 receptor: a regulator of biological functions of secretory phospholipase A2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; 68-69: 71-82.
95. Thwin MM, Ong WY, Fong CW, Sato K, Kodama K, Farooqui AA, Gopalakrishnakone P. Secretory phospholipase A2 activity in the normal and kainate injected rat brain, and inhibition by a peptide derived from python serum. *Exp Brain Res* 2003; 150: 427-433.
96. Matsuzawa A, Murakami M, Atsumi G, Imai K, Prados P, Inoue K, Kudo I. Release of secretory phospholipase A2 from rat neuronal cells and its possible function in the regulation of catecholamine secretion. *Biochem J* 1996; 318: 701-709.

97. Xu NJ, Bao L, Fan HP, Bao GB, Pu L, Lu YJ, et al. Morphine withdrawal increases glutamate uptake and surface expression of glutamate transporter GLT1 at hippocampal synapses. *J Neurosci* 2003; 23: 4775–4784.
98. DeCoster MA, Lambeau G, Lazdunski M, Bazan NG. Secreted phospholipase A2 potentiates glutamate-induced calcium increase and cell death in primary neuronal cultures. *J Neurosci Res* 2002; 67: 634-645.
99. Yoshihara Y, Yamaji M, Kawasaki M, Watanabe Y. Ontogeny of cytosolic phospholipase A2 activity in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 185: 350-355.
100. Hernández M, Nieto ML, Sánchez Crespo M. Cytosolic phospholipase A2 and the distinct transcriptional programs of astrocytoma cells. *Trends Neurosci* 2000; 23: 259-264.
101. Vannucci RC, Perlman JM. Interventions for Perinatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Pediatrics* 1997; 100: 1004–1114.
102. du Plessis A, Johnston MV. Hypoxic-ischemic brain injury in the newborn: Cellular mechanisms and potential strategies for neuroprotection. *Clinics in Perinatology* 1997; 24: 627-654.
103. Saliba E, Henrot A. Inflammatory mediators and neonatal brain damage. *Biol Neonate* 2001; 79: 224-227.
104. Lin TN, Wang Q, Simonyi A, Chen JJ, Cheung WM, He YY, et al. Induction of secretory phospholipase A2 in reactive astrocytes in response to transient focal cerebral ischemia in the rat brain. *J Neurochem* 2004; 90: 637-645.
105. Uozumi N, Shimizu T. Roles for cytosolic phospholipase A2alpha as revealed by gene-targeted mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; 68-69: 59-69.
106. Westcott JY, Murphy RC, Stenmark K. Eicosanoids in human ventricular cerebrospinal fluid following severe brain injury. *Prostaglandins* 1987; 34: 877-887.
107. Vilanova JM, Figueras JA, Rosello J, Gomez G, Gelpi E, Jimenez R. Arachidonic acid metabolites in CSF in hypoxic-ischaemic encephalopathy of newborn infants. *Acta Paediatrica* 1998; 87: 588-592.

108. Bertolini A, Ottani A, Sandrini M, Dual acting anti-inflammatory drugs: a reappraisal. *Pharmacol Res* 2001; 44: 437-450.
109. Celotti F, Laufer S, Anti-inflammatory drugs: new multitarget compounds to face an old problem. The dual inhibition concept. *Pharmacol Res* 2001; 43: 429-436.
110. Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Reboul P, Pelletier JP, Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 501-509.
111. de Gaetano G, Donati MB, Cerletti C, Prevention of thrombosis and vascular inflammation: benefits and limitations of selective or combined COX-1, COX-2 and 5-LOX inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24: 245-252.
112. Klegeris A, McGeer PL, Cyclooxygenase and 5-lipoxygenase inhibitors protect against mononuclear phagocyte neurotoxicity. *Neurobiol Aging* 2002; 23: 787-794.
113. Ye YN, Wu WK, Shin VY, Bruce IC, Wong BC, et al. Dual inhibition of 5-LOX and COX-2 suppresses colon cancer formation promoted by cigarette smoke. *Carcinogenesis* 2005. 26: 827-34.
114. Pommery N, Taverne T, Telliez A, Goossens L, Charlier C. New COX-2/5-LOX inhibitors: apoptosis-inducing agents potentially useful in prostate cancer chemotherapy. *J Med Chem* 2004; 47: 6195-206.
115. Kulkarni SK, Singh VP. Licofelone-a novel analgesic and antiinflammatory agent. *Curr Top Med Chem* 2007; 7: 251-63.
116. Albrecht W, Unger A, Nuessler AK, Laufer S, In vitro metabolism of Licofelone (ML3000), an Inhibitor of Cyclooxygenases-1 and -2 and 5-Lipoxygenase. *Drug Metab Dispos* 2008; 36: 894-903.
117. Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT, Palmer C, Smith MB, Towfighi J, Vannucci SJ. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Neuro Res* 1999; 55: 158-163.
118. Levine S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* 1960; 36: 1-17.

119. Fern R, Moller T. Rapid ischemic cell death in immature oligodendrocytes: a fatal glutamate release feedback loop. *J Neurosci* 2000; 20: 34-42..
120. Tries S, Laufer S, Radziwon P, Breddin HK. Antithrombotic and platelet function inhibiting effects of ML3000, a new antiinflammatory drug with Cox/5-LOX inhibitory activity. *Inflamm Res* 2002; 51: 129-134.
121. Cicero AF, Derosa G, Gaddi A. Combined lipoxygenase/cyclo-oxygenase inhibition in the elderly: the example of licofelone. *Drugs Aging* 2005; 225: 393–403.
122. Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, Simon RP. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neuro* 1998: 4914-4928.
123. Scheepens A, Williams CE, Breier BH, Guan J, Gluckman PD. A role for the somatotrophic axis in neural development, injury and disease. *J Ped Endoc Metabol* 2000; 13: 1483-1491.
124. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15: 725-731.
125. Zhu M, Lu M, Li QJ, Zhang Z, Wu ZZ, Li J, et al. Hyperbaric Oxygen Suppresses Hypoxic-Ischemic Brain Damage in Newborn Rats. *J Child Neurology* 2014. [Epub ahead of print]
126. Fisher L, Hornig M. The molecular mechanism of the inhibition by licofelone of the biosynthesis of 5-lipoxygenase products. *Br J Pharma* 2007; 152: 471–480.
127. Tutak E, Satar M, Zorludemir S, Erdoğan S, Yapicioğlu H, Narli N. Neuroprotective effects of indomethacin and aminoguanidine in the newborn rats with hypoxic-ischemic cerebral injury. *Neurochem Res* 2005; 30: 937–942.
128. Buccellati C, Folco GC, Sala A, Scelsi R, Masoero E, Poggi P, et al. Inhibition of prostanoid synthesis protects against neuronal damage induced by focal ischemia in rat brain. *Neurosci Lett* 1998; 257: 123-126.
129. Liu H, Rose ME, Miller TM, Li W, Shinde SN, Pickrell AM, et al. COX2-derived primary and cyclopentenone prostaglandins are increased after asphyxial cardiac arrest. *Brain Res* 2013; 1519: 71-77.

130. Taskin E, Ozcan K, Canacankatan N, Satar M, Yapicioglu HY, Erdogan S. The effects of indomethacin on caspases, glutathione level and lipid peroxidation in the newborn rats with hypoxic-ischemic cerebral injury. *Brain Res* 2009; 1289: 118-23.
131. Zuo Y, Xiang B, Yang J, Sun X, Wang Y. Oxidative modification of caspase-9 facilitates its activation via disulfide-mediated interaction with Apaf-1. *Cell Research* 2009; 19: 449-457.
132. Kumar P, Kalonia H, Kumar A. Role of LOX/COX pathways in 3-nitropropionic acid-induced huntington's disease-like symptoms in rats: Protective Effect of Licofelone. *Br J Pharm* 2011; 164: 644–654.
133. Palmer C, Towfighi J, Roberts RL, Heitjan DF. Allopurinol administrated after inducing hypoxia-ischemia reduces brain injury in 7 day-old rats. *Pediatr Res* 1993; 33: 405-11.
134. Soloniuk DS, Perkins E, Wilson JR. Use of allopurinol and deferoxamine in cellular protection during ischemia. *Surg Neurol* 1992; 38: 110–113.
135. Özcan K, Satar M, Canacankatan N, Taşkın E, Dağlıoğlu K. Allopürinolün hipoksik-iskemik beyin hasarı oluşturulan yenidoğan sıçanlarda kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivitesi üzerine etkisi. *Türk Ped Arşivi* 2013; 48: 48-52.
136. Gunes T, Ozturk MA, Koklu E, Kose K, Gunes I. Effect of allopurinol supplementation on nitric oxide levels in asphyxiated newborns. *Pediatr Neurol* 2007; 36: 17-24.

6. ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Malatya’da doğdum. İlkokulu Malatya Atatürk İlkokulu’nda tamamladıktan sonra 1995 yılında Malatya Anadolu Lisesi’ne başladım. 1996-1999 yılları arasında Yalova Şehit Osman Altunkuyu Anadolu Lisesinde ortaokulu tamamladım. 1999-2002 yılları arasında Malatya Anadolu Lisesi’nden mezun olarak 2003 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde Tıp Fakültesi eğitime başladım. 2009 yılında mezun olup 2010 yılında Tıpta Uzmanlık Sınavı ile Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak göreve başladım. Yabancı dilim İngilizce. Evli ve 1 çocuk babasıyım.