



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

YENİDOĞAN RATLARDA HİPOKSİK İSKEMİK ENSEFALOPATİ MODELİNDE PENTOKSİFİLİN VE MELATONİN TEDAVİSİNİN ETKİNLİĞİ

UZMANLIK TEZİ

DR. ÖMER SÖZ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Münevver Kaynak Türkmen

AYDIN-2009

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

YENİDOĞAN RATLARDA HİPOKSİK İSKEMİK ENSEFALOPATİ MODELİNDE PENTOKSİFİLİN VE MELATONİN TEDAVİSİNİN ETKİNLİĞİ

UZMANLIK TEZİ

DR. ÖMER SÖZ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Münevver Kaynak Türkmen

AYDIN-2009

Bu araştırma ADÜ Araştırma Fon Saymanlığı tarafından TPF-08007 sayı
ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tezimin hazırlanması aşamasında her türlü desteği veren, değerli hocam Prof. Dr. Münevver Kaynak Türkmen'e minnet ve şükranlarımı sunarım.

Pediyatri uzmanlık eğitimim süresince katkı, destek ve anlayışlarından dolayı saygı değer hocalarım; Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ayşe Yenigün'e, Prof. Dr. Ferah Sönmez, Prof. Dr. Ali Rahmi Bakiler, Yrd. Doç. Dr. Ayvaz Aydoğdu, Yrd. Doç. Dr. Yusuf Ziya Aral, Yrd. Doç. Dr. Ayşe Tosun, Yrd. Doç. Dr. Emre Çeçen, Yrd. Doç. Dr. Tolga Ünüvar, Yrd. Doç. Dr. Bilin Çetinkaya Çakmak'a teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte çalışma fırsatı bulduğum uzman hekimlerimize, asistan arkadaşlarıma ve pediatri kliniğinin tüm personeline teşekkür ederim.

Tez aşamaları sırasında birikimlerinden faydalandığım Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD Yenidoğan Bölümü'nden Doç. Dr. Abdullah Kumral ve Araş. Gör. Uzm. Dr. Didem Cemile Yeşilirmak'a, Histoloji ve Embriyoloji AD'ndan Araş. Gör. Uzm. Dr. Başak Baykara'ya, Mikrobiyoloji AD'ndan Doç. Dr. Hüseyin Baskın'a ve Deney Hayvanları Birimi sorumlusu Prof. Dr. Osman Yılmaz'a desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin istatistiksel analizleri konusunda desteğinden dolayı Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Mevlüt Türe'ye teşekkür ederim.

Asistanlık ve tez dönemim boyunca sabır ve destekleri ile yanımda olan aileme ve eşime teşekkür ederim.

Kızıma ve Babama

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. HİPOKSİ, İSKEMİ ve ASFİKSİ	2
2.2. HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI VE NÖROPATOLOJİK ÖZELLİKLER	3
2.3. HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI GELİŞİMİNDE HÜCRESEL MEKANİZMALAR	4
a. Akut Hasarlanma	4
Enerji Yetmezliği ve Asidoz Gelişimi	4
Eksitator Aminoasitler ve Kalsiyum	5
b. Geç (İkincil) Beyin Hasarı	7
2.4. SERBEST RADİKALLER	8
2.5. NİTRİK OKSİT	10
2.6. İNFLAMATUVAR YANIT	12
2.7. NEKROZ VE APOPİTOZ	13
2.8. HİPOKSİK İSKEMİK HASARI ÖNLEMeye YÖNELİK KULLANILAN TEDAVİLER	18
a. Serbest Oksijen Radikal İnhibitörleri ve Bağlayıcıları	18
b. Eksitator Aminoasit Antagonistleri	19
c. Nitrik Oksit Üretiminin Önlenmesi	19
d. Kalsiyum Kanal Blokerleri	19
e. Enerji Kaybının Önlenmesi	20
f. Diğer Yaklaşımlar	20
2.9. PENTOKSİFİLİN	21
2.10. MELATONİN	22
a. Sentez ve Metabolizması	23
b. Melatonin Antioksidan Etkisi	25
2.11. HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI HAYVAN MODELİ	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. ÇALIŞMA GRUPLARI	27

	SAYFA
3.2. HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARININ OLUŞTURULMASI	28
a. Anestezi Başlangıcı	28
b. Anestezi İdamesi	28
c. Cerrahi İşlem	28
d. Beslenme	29
e. Hipoksi Düzenegi	29
3.3 İLAÇLARIN UYGULANMASI	29
3.4. NİTRİK OKSİT DEĞERLENDİRMESİ	31
a. Beyin Dokularının Hazırlanması	31
b. Nitrit Ölçümü	31
3.5. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME	32
a. Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü	32
b. Krezil Mavisı Boyama Yöntemi	32
c. Hipokampal Nöron Dansitesi Değerlendirme Yöntemi	32
d. Apoptoz Değerlendirmesi	33
3.6. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER	34
4. BULGULAR	35
4.1. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR	35
4.1.1. Melatonin Tedavisinin Nöron Dansitesine Olan Etkisi	35
4.1.2. Pentoksifilin Tedavisinin Nöron Dansitesine Olan Etkisi	35
4.1.3. Melatonin ve Pentoksifilin Kombine Tedavisinin Nöron Dansitesine Olan Etkisi	36
4.1.4. Grupların Apoptotik Hücre Sayılarına Etkileri	39
4.2. Nitrik Oksit Düzeyleri	42
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	53
7. ÖZET	54
8. İNGİLİZCE ÖZET	56
9. KAYNAKLAR	58
10. EKLER	68

TABLO DİZİNİ

SAYFA

Tablo I. Yenidoğan ratlarda hipoksik iskemik beyin hasarında melatonin tedavisinin hipokampus nöron dansitesine etkisi	35
Tablo II. Yenidoğan ratlarda hipoksik iskemik beyin hasarında pentoksifilin tedavisinin hipokampus nöron dansitesine etkisi	36
Tablo III. Yenidoğan ratlarda hipoksik iskemik beyin hasarında melatonin ve pentoksifilin kombine tedavisinin hipokampus nöron dansitesine etkisi	36
Tablo IV. Grupların TUNEL pozitif boyanan apoptotik hücre oranları	39
Tablo V. Grupların sağ ve sol serebral hemisferlerde ölçülen ortalama nitrit düzeyleri	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

	SAYFA
Şekil 1. Glutamat reseptörleri aracılığıyla sinaptik ileti	7
Şekil 2. Eikozanoid sentezi sırasında serbest radikal oluşumu	10
Şekil 3. Reperfüzyon fazında süperoksit ve hidroksil radikali oluşumu	10
Şekil 4. L-Arginin amino asidinden nitrik oksit sentezi	12
Şekil 5. İntrensek ve ekstrinsek apoptotik yollar	16
Şekil 6. Proapoptotik ve antiapoptotik Bcl-2 protein ailesi	16
Şekil 7. Hipoksik iskemik nöron ölümü mekanizmaları	17
Şekil 8. Melatonin sentez basamakları	24
Şekil 9. Melatonin metabolizması sırasında hidroksil radikali bağlanması	26
Şekil 10. Grupların hipokampus CA1 bölgesindeki ortalama nöron sayıları	37
Şekil 11. Grupların hipokampus CA2 bölgesindeki ortalama nöron sayıları	37
Şekil 12. Grupların hipokampus CA3 bölgesindeki ortalama nöron sayıları	38
Şekil 13. Grupların hipokampus GD bölgesindeki ortalama nöron sayıları	38
Şekil 14. Grupların TUNEL pozitif boyanan apoptotik hücre oranları	40
Şekil 15. Grupların sağ ve sol hemisferde ölçülen ortalama nitrit düzeyleri	43

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Adenozin reseptörü
AA-NAT	: Aril alkilamin N-asetil transferaz
ADP	: Adenozin difosfat
AFMK	: N1-asetil-N2- formil-5-metoksi kinuramin
AIF	: Apoptoz uyarıcı (induced) faktör
AMK	: N1-asetil-5-metoksi kinuramin
AMP	: Adenozin monofosfat
APAF-1	: Apoptoz proteaz aktive edici faktör-1
AMPA	: Amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoazopropionik asid
ATP	: Adenozin trifosfat
C3a	: Kompleman 3a
C5a	: Kompleman 5a
c-AMP	: Siklik adenozin monofosfat
c-GMP	: Siklik guanozin monofosfat
Ca⁺⁺	: Kalsiyum
CA	: Cornu Ammonis
DISC	: Ölüm başlatan sinyal kompleksi (Death inducing signal complex)
DNA	: Deoksiribonükleik asid
EDRF	: Endotel kökenli gevşetici faktör
EPO	: Eritropoietin
ER	: Endoplazmik retikulum
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
FADD	: Fas adaptör proteini (Fas adaptor protein with a death domain)
FADH	: Flavin-adenin-dinükleotid
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
GABA	: Gabba-amino bitürik asit
GD	: Girus Dentatus
H⁺	: Hidrojen
Hİ	: Hipoksik iskemi
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
IDO	: İndolamin 2, 3-dioksijenaz

IGF-I	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-I
İL	: İnterlökin
iNOS	: Uyarılabilir (inducible) nitrik oksit sentaz
i.p	: İnterperitoneal
Kaspaz	: Sistein aspartat spesifik proteaz
KAT	: Katalaz
LT	: Lökotrien
MEL	: Melatonin
Na⁺	: Sodyum
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
NGF	: Nöron büyüme faktörü
NMDA	: N-metil D-aspartat
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
OH⁻	: Hidroksil radikali
•O₂⁻	: Süperoksit radikali
ONOO⁻	: Peroksinitrit radikali
PAF	: Trombosit aktive edici faktör
PARP-1	: Poli (ADP-riboz) polimeraz-1
PDE	: Fosfodiesteraz
PFK	: Fosfofruktokinaz
PG	: Prostaglandin
PTX	: Pentoksifilin
SOD	: Süperoksit dismutaz
SSS	: Santral sinir sistemi
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör alfa
TNFR	: Tümör Nekroz Faktör reseptörü
TRADD	: TNFR adaptör protein (TNRF adaptor protein with death domain)
TUNEL	: Terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı dUTP uç işaretleme (Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling)

RESİMLER DİZİNİ

	SAYFA
Resim 1. Sol kommon karotid arterin bağlanması	28
Resim 2. Hipoksi düzeneği	29
Resim 3. Beyin kabuğunun soyulması	30
Resim 4. Beyin dokusunun çıkartılması	31
Resim 5. Gruplara göre TUNEL tekniği ile boyanmış olan hipokampus Kesitleri	41

EKLER DİZİNİ

SAYFA

1. Deney Hayvanları Etik Kurul Onayı

68

2. Deney Hayvanları Kullanım Kursu Katılım Belgesi

69

GİRİŞ VE AMAÇ

Fetüs ve yenidoğanda hipoksik iskemik ensefalopati, doğuma yakın dönemde, doğum sırasında ve doğumdan sonraki dönemde beynin hipoksi-iskemide kalması ile ortaya çıkan, birden fazla sistem tutulumu ile karakterize bir hastalıktır. Hipoksik iskemik ensefalopatili yenidoğanlarda mortalite %20-50 olarak belirtilmektedir (1).

Hipoksi-iskemiye bağlı akut beyin hasarında bozulmuş kan akımı ve oksijen sunumuna bağlı anaerobik metabolizmaya kayma ile enerji rezervleri tükenmektedir. Eksitatör aminoasit glutamat salınımı hücre içi kalsiyum artışı ile hücre içi enzimlerin aktivasyonuna, serbest oksijen radikalleri, inflamatuvar mediatörler ve nitrik oksit yapımına neden olmaktadır. Devam eden süreç lipid peroksidasyonu, mitokondriyal solunumun bozulması, apoptotik sürecin tetiklenmesi ve nöron ölümü ile sonlanmaktadır (2).

Hipoksi-iskemi başlangıcı ile hücre ölümü arasındaki dönem “terapötik pencere” olarak adlandırılmaktadır. Hücre ölümüne neden olan olayların engellenmesine yönelik girişimler bu dönemde uygulandığında fayda sağlamaktadır (2,3).

Ksantin türevi ve fosfodiesteraz inhibitörü olan pentoksifilin, kırmızı hücre deformabilitesini artırarak, trombosit ve eritrosit agregasyonunu azaltarak, fibrinojen düzeyleri ve plazma viskozitesini azaltarak mikrosirkülasyonu ve doku oksijenizasyonunu artıran bir ilaçtır (4). Mononükleer fagositler ve nötrofillerde TNF- α ve diğer sitokinlerin üretimini inhibe ederek anti inflamatuvar ve antiapoptotik etkinliğe yol açtığı bilinmektedir (5).

Melatonin ve metabolitlerinin serbest oksijen radikallerini endojen olarak bağlayarak güçlü antioksidan ve anti-inflamatuvar etkinliğine yol açtığı bilinmektedir (6). Lipid ve protein peroksidasyonunu ve nöron apoptozunu azaltarak hipoksik iskemik beyin hasarını önlemede etkili olduğuna yönelik çalışmalar mevcuttur (7).

Çalışmada 7 günlük ratlarda oluşturulan hipoksik-iskemik beyin hasarı modelinde pentoksifilin, melatonin ve kombine tedavinin nöron hasarına karşı koruyucu etkisinin beyin nitrik oksit üretimi, hipokampal hücre sayısı ve apoptotik hücre indeksi parametreleri kullanılarak araştırılması amaçlandı.

GENEL BİLGİLER

2.1. HIPOKSİ, İSKEMİ ve ASFİKSİ

Fetüs ve yenidoğanda perinatal dönemde gelişen beyin hipoksi-iskemisine bağlı beyin hasarı akut mortalitenin ve sağ kalanlarda ise kalıcı nörolojik problemlerin en önemli nedenidir. Zamanında doğan yenidoğanlarda 1000 canlı doğumda 2-4 sıklıkta görülmektedir. Çok düşük doğum ağırlıklı (prematüre) bebeklerde sıklık % 60'lara ulaşmaktadır (1). Hipoksik iskemik beyin hasarı gelişen olguların %20-50'si yenidoğan döneminde kaybedilmektedir. Sağ kalanların %25-30'unda kalıcı nörolojik sorunlar (serebral palsy, mental retardasyon, öğrenme güçlüğü, epilepsi) gözlenmektedir (8).

Hipoksi ya da anoksi terimi bir veya birden çok dokuda kısmi ya da tam oksijen yokluğu olarak tanımlanır. Hipoksemi ise kanda oksijen yoğunluğunun azalmasıdır. İskemi ise bir organın kan akımının azalması veya tamamen engellenmesi sonucu oksijen ve dokunun ihtiyacı olan diğer maddelerin dokuya ulaşamaması sonucu gelişen durumdur. Fetüs veya yenidoğanda iskemi, tipik olarak sistemik hipoksi-asidoza bağlı kardiyovasküler fonksiyonda bozulma ya da tıkalı damar hastalığına bağlı gelişir (2).

Perinatal asfiksi genel olarak plasental ya da pulmoner gaz değişimindeki probleme bağlı (ablasyo plasenta, uterus hipertansiyonu, uterus rüptürü, göbek kordonuna baskı vb.) dokuya sunulan oksijenin doku zedelenmesine yol açacak boyutta azalması sonucu hipoksemi ve hiperkapninin birlikte olduğu klinik durumu anlatır (1,3). Temel özellikleri ağır asidoz (kord kanında pH<7.00), 5. dakika düşük Apgar puanı (0-3), hipoksik iskemik ensefalopati bulguları (tonus bozukluğu, bilinç düzeyinin bozulması, nöbetler) ve çoklu organ, sistem bozukluğudur (8).

Plasental perfüzyon bozukluğu bir saat ve daha fazla sürdüğünde fetusta gelişen hipoksemi sempatik sistem aktivasyonuna yol açarak kan akımının beyin, kalp ve adrenal bezler gibi yaşamsal organlara yönlendirilmesine neden olur (3). Düşük oksijen ve yüksek karbondioksit parsiyel basıncında beyin damarlarında genişleme ile beyin hiperperfüzyonu sağlanır. İmmatür fetüslerde beyin kan akımı 10-20 mmHg gibi dar bir basınç aralığında sürdürülmektedir. Bu nedenle sistemik kan basıncı değişikliklerinde otopregülasyonu bozulmakta ve beyin kan akım basınçları sistemik basınca bağlı hale gelmektedir (9).

Hipoksik durum devam ederse kalbin anaerobik enerji rezervlerinin tükenmesine bağlı pompa işlevinde azalma ve ortalama arter basıçlarında düşmeye bağlı beyin kan akımında azalma görülür. Kortekse ulaşan kan miktarında azalma olurken, bazal metabolizmanın hızlı olduğu talamus, beyin sapı ve serebelluma daha fazla kan gönderilmeye çalışılır. Bu dolaşım düzenlenmesinden ilk olarak parasagittal korteks ve altındaki beyaz cevher etkilenir ve infarkt alanları oluşur (3). Olay ilerlerse serebral hemisferlerin bütününde hasarlanma gözlenir.

Perinatal dönemde gelişen hipoksi-iskemi çoğunlukla hipoksik iskemik ensefalopati şeklinde bulgu verir ve yenidoğanın yaşamını etkileyen önemli sorunlardan biridir.

2.2. HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI VE NÖROPATOLOJİK ÖZELLİKLER

Perinatal hipoksik iskemik beyin hasarının ana nöropatolojik göstergeleri seçici nöron hasarı ve infarkttır (2). Seçici nöron hasarında (nekroz ya da apopitoz) nöronlar ölürken, glia hücreleri (astrositler, oligodentrositler) ve kan damarları korunur. İnfarkt oluştuğunda ise tüm hücresel elemanlar (nöronlar, glia hücreleri, kan damarları) patolojik süreç boyunca hasarlanır (2).

Hipoksik iskemik beyin hasarında seçici nöron hasarı dışında beş hipoksik iskemik beyin lezyonu daha görülmektedir (3).

Bu lezyonlar:

- Selektif nöronal nekroz
- Status marmoratus
- Parasagittal beyin hasarı
- Periventriküler lökomalazi
- İntra-peri ventriküler kanama
- Fokal/multifokal iskemik beyin hasarı

Prematüre infantlarda hipoksik-iskemik patolojik değişiklikler daha çok serebral hemisferin beyaz cevher yapılarında, zamanında doğan bebeklerde ise beyinin gri cevher yapıları olan serebral korteks, hipokampus, bazal ganglionlar, talamus, beyin çekirdekleri ve serebral hemisferlerde gözlenir (2,3,10,11).

Hipokampus bu bölgeler içerisinde hipoksiye en duyarlı olanıdır. Serebral kortikal lezyonlarla birlikte hipokampusda seçici nöron hasarı ya da infarkt görülebilir (2).

Beyaz cevherin akut hasarlanmasında glial elemanların (özellikle astrositler) çoğalması ile reaktif gliozis gelişmektedir. Reaktif gliozis alanları sıklıkla sentrum semiovale ve korpus kallozum'un da içinde olduğu serebral hemisferlerin subkortikal ve periventriküler beyaz cevheridir (2).

Prematüre bebeklerde lezyonlar tipik olarak iki taraflı ve serebral hemisferde lateral ventriküle komşu olarak gözlenir, periventriküler lökomalazi olarak adlandırılır (3,12).

Fetus ya da yenidoğan beyinde akut asfiktik olay serebral hemisferlerde hasar yaratmadan belirgin diensefalik (bazal ganglion ve talamus) hasara yol açabilir.

Hipoksik-iskemik beyin hasarında görülen diğer bir patoloji de beyin ödemidir. Yaygın ve ağır beyin hasarında beyin ödemine serebral giruslarda düzleşme, sulkusların silinmesi, lateral ventriküllerde daralma ve hipokampal yapıların fıtıklaşması eşlik edebilir (2,3).

2.3. HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI GELİŞİMİNDE HÜCRESEL MEKANİZMALAR

a. Akut Hasarlanma

Enerji Yetmezliği ve asidoz gelişimi

Beynin normal fonksiyon görebilmesi için yeterli oksijen ve enerji desteğine ihtiyacı vardır. Hipoksi-iskemiye bağlı akut beyin hasarında hücresel düzeyde bozulmuş kan akımı ve oksijen sunumuna bağlı olarak çeşitli biyokimyasal ve moleküler süreçler tetiklenir (2,3).

Adenozin trifosfat (ATP) tüm hücrelerde olduğu gibi nöronlar için de en önemli enerji kaynağıdır. Aerobik koşullarda bir mol glukoz, glikoliz ile iki mol piruvata dönüşürken iki mol ATP elde edilmektedir. Oksijen varlığında iki mol piruvat, piruvat dehidrogenaz enzimi ile asetil-KoA'ya metabolize edildikten sonra, Krebs Döngüsü ve mitokondriyal elektron transport zincirinde, moleküler oksijenin suya indirgenmesi sırasında 36 mol ATP elde edilmektedir (2,13).

ATP üretimi en fazla mitokondrilerde nikotinamid adenin dinükleotit'in (NAD) oksidatif fosforilasyonu ile oluşur. Dokulardaki parsiyel oksijen basıncı

azaldığında (<0.1 mmHg) oksidatif fosforilasyonla oluşan ATP üretimi durur (2). Hücrel adenozin difosfat (ADP) ve adenozin monofosfat (AMP) seviyeleri artar. ADP ve AMP artışına bağı fosfofuruktokinaz (PFK) aktivasyonu ile glikoliz (anaerobik metabolizmaya kayma) gerçekleşir. Anaerobik glikoliz ile elde edilen ATP de tükenince hücrede tam bir enerji yokluğu ortaya çıkar. Enerji gerektiren hücrel fonksiyonlar yerine getirilemez (13).

Anaerobik glikolizin istenmeyen bir sonucu da laktik asit ve hidrojen iyonu (H^+) birikimi ile hücre içi ve dışı asidoz gelişimidir. Hücre membranı iyon pompa işlevinde aksama sonucu hücre içinde sodyum (Na^+), kalsiyum (Ca^{++}) ve su birikimi sonucu sitotoksik ödem gelişir (2,13).

Eksitator Aminoasitler ve Kalsiyum

Beyindeki temel eksitator aminoasit glutamattır. Glutamat reseptörlerinin nöron gelişimi, öğrenme, hafıza ve sinaptik bağlantıların organizasyonu gibi fizyolojik işlevlerin yerine getirilmesinde rolü vardır (14). Glutamat salınımının serebral iskemi sonrası nöron ölümü mekanizmasında önemli yeri olduğu kanıtlanmıştır (3,15-17).

Hipoksik iskemik süreç sırasında hücrenin temel enerji kaynağı ATP'nin tükenmesi sonucunda aktif sodyum transport pompaları (Na^+/K^+ ATPaz, $3Na^+/Ca^{2+}$ antiporter ve Na^+/H^+ antiporter) bozulmaktadır. Buna bağı olarak hücre içinde sodyum düzeyinin artması ile başlayan presinaptik depolarizasyon sinir ucuna ulaşır. Bu uyarı ile presinaptik uçta bulunan voltaja duyarlı kalsiyum kanalları açılarak hücre içine kalsiyum geçişine neden olur. Ardından da başta glutamat olmak üzere uyarıcı aminoasitlerin presinaptik uçtan sinaps aralığına salınması gerçekleşir (13).

Nöronda postsinaptik uçta glutamat tarafından uyarılan reseptörler aracılığı ile aktive olan iyon kanalları kalsiyum girişi için en önemli yoldur (Şekil 1).

Glutamat reseptörleri beş sınıfa ayrılmaktadır:

1. Yüksek afiniteli kainat reseptörü
2. Düşük afiniteli kainat reseptörü
3. Amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoazopropiyonik asid (AMPA) reseptörü
4. N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörü
5. Kuiskalat reseptörü

Bunlar içerisinde AMPA ve NMDA reseptörleri iyonların hücre içine geçişinde en önemli rolleri üstlenmektedir (10,13,14,18). NMDA reseptörleri; talamus, striatum, serebellum, korteksin 3. 5. ve 6. tabakaları ile hipokampusun CA1 bölgesinde, AMPA reseptörleri; korteksin derin tabakaları, striatum ve hipokampusun piramidal hücrelerinde yoğun olarak bulunmaktadır. Bu bölgeler hipoksik iskemik hasarlanmanın en fazla görüldüğü bölgelerdir (14,18).

Glutamat presinaptik uçtan salınınca postsinaptik uçta bulunan, hem AMPA hem de NMDA reseptörlerini aktive etmektedir. AMPA reseptörü Na^+ , K^+ ve H^+ gibi kationların taşınması ile ilişkilidir. AMPA reseptörü bulunan iyon kanallarından sodyum girişi ile depolarizasyon postsinaptik uca iletilir. NMDA tipi glutamat reseptörlü iyon kanalları hem Na^+ , K^+ , H^+ hem de kalsiyumun girişini sağlamaktadır (3,13,14).

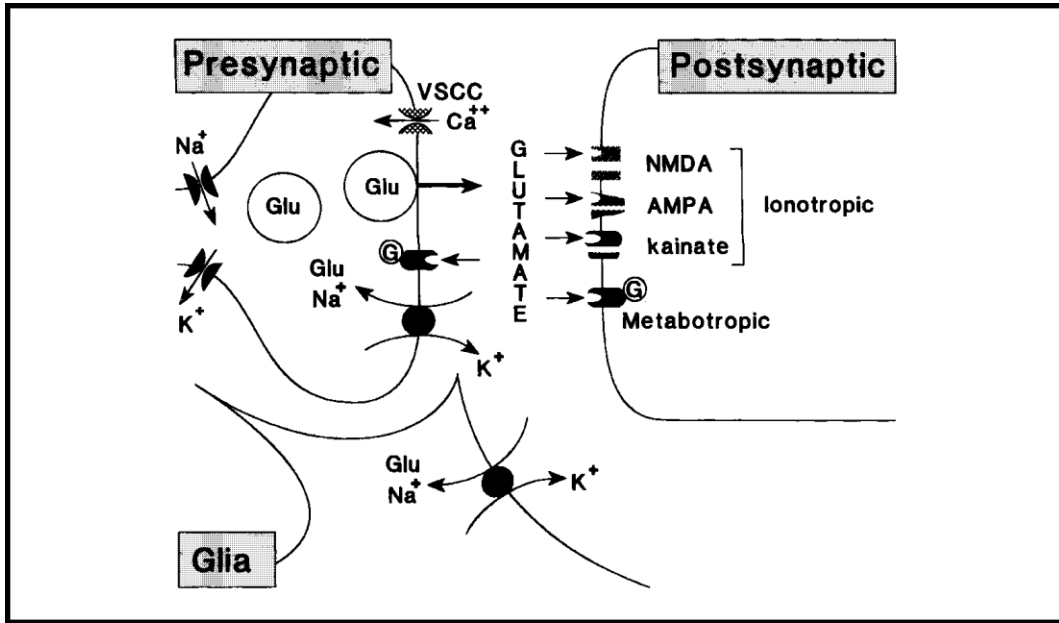
Normal şartlar altında hücre içi Ca^{++} yoğunluğu sıkı bir şekilde düzenlenir. Kalsiyumun tamamına yakını mitokondri, endoplazmik retikulum, nöron plazma membranı ve nukleusta enerji gerektiren mekanizmalarla tutulmaktadır.

Hipoksi iskemi sırasında glutamat, NMDA reseptörlerine bağlanıp hücre içine Ca^{++} geçişini artırmakta, enerji yetersizliği nedeni ile hücre dışına Ca^{++} atılımı azalmakta ve hücre içi depolardan salınması ile hücre içi Ca^{++} miktarı artmaktadır (2,18). Hücre içi kalsiyum tamponlayıcı sistemlerden biri olan kalmodülinin Ca^{++} bağlayıcı bölgesine hücre içi asidoza bağlı olarak artmış H^+ iyonunun bağlanması da hücre içi Ca^{++} artışına katkıda bulunmaktadır. Enerji yetmezliği durumunda, kalsiyum tamponlayıcı organeller olan mitokondriden Na^+ - H^+ antiport taşıyıcısı ve endoplazmik retikulundan inositol trifosfat aracılığı ile sitoplazmaya Ca^{++} taşınır (19).

Hücre içinde artmış Ca^{++} ikincil mesajcı olarak görev yapar. Lipazlar, proteazlar, endonükleazlar ve fosfolipazlar gibi hücre içi enzimlerin aktivasyonuna neden olur (2,10,16,19).

Hipoksi iskeminin hücre membranında yaptığı hasar sonrasında hücre içinde serbest yağ asitleri birikmektedir. Kalsiyum ile aktive olan fosfolipaz A_2 enzimi, fosfolipidlerden araşidonik asit üretimine neden olmaktadır. Reperfüzyon döneminde araşidonik asit, prostoglandin ve lökotrienlere metabolize olurken ortaya çıkan serbest radikaller iskemik hasarın ilerlemesine neden olmaktadır (2).

Mitokondride gerçekleşen indirgeyici reaksiyonlar sırasında oluşan serbest radikaller ve prostoglandin sentezi sırasında oluşan ksantin ve ürik asit gibi yan ürünlerle yağ asitleri peroksidasyona uğrar. Hücre içi kalsiyum artışı nitrik oksit (NO) üretimini artırır. Hücre enerji yetersizliği, asidoz, glutamat salınımı, hücre içi kalsiyum birikimi, lipid peroksidasyonu ve NO nörotoksitesi hücre yapıtaşlarının hasarlanmasına ve sonuçta hücre ölümüne neden olur. Hipoksik-iskemik sürecin süresi ve şiddeti gibi birçok faktör hücre hasarlanmasının ilerleyişini etkiler (19)



Şekil 1. Glutamat reseptörleri aracılığıyla sinaptik ileti (3).

b. Geç (İkincil) Beyin Hasarı

Yeniden canlandırma sonrası beyin kan akımı ve oksijenasyon düzeltildiğinde fosfor metabolitleri ve hücre içi pH normal düzeyine dönmeye başlar. Ancak ilk hasarlanmadan 6-48 saat sonra hücre içi Ca^{++} , eksitotoksite, serbest oksijen radikalleri ve NO'in yol açtığı mitokondri fonksiyon bozukluğuna bağlı ikincil enerji yetmezliği olarak belirtilen ve beyin hasarını artıran dönem ortaya çıkmaktadır (19).

Bu dönemde dolaşımdaki ve dokulardaki inflamatuvar hücreler ve inflamatuvar mediatörler (Tümör Nekroz Faktör- α , İnterlökin-1 beta, trombosit aktive edici faktör) gelişen beyin hasarına katkıda bulunmaktadır. Hipoksik iskemik beyin

hasarından altı saat sonra beyinde nötrofil, aktive makrofaj ve mikroglia birikimi ile TNF- α ve IL-1 beta gen ekspresyonu ve sentezi artar (19,20).

Mitokondriyal solunum hızındaki düşüş 24 saat sonra en alt düzeye iner ve bu mitokondri disfonksiyonu ve kaspaz-3 aktivasyonuna neden olur. Aktif kaspaz-3 nöron apoptozunu başlatır (21). Hipoksik iskemik olay sonrası devam eden nöron apoptozu gecikmiş hasara neden olmaktadır (22).

2.4. SERBEST RADİKALLER

Hipoksik iskemik ensefalopatinin ana hasarlayıcı bileşenlerinden olan serbest radikaller dış yörüngelerinde eşleşmemiş tek bir elektron içeren ileri derecede reaktif moleküllerdir (23). Proteinler, membran lipidleri ve DNA gibi hedef moleküllere bağlanıp kimyasal yapılarını değiştirme yeteneğine sahiptirler. Aerobik solunum yapan hücrelerde serbest oksijen radikalleri sitoplazmada oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları sırasında ve mitokondride elektron transportu sırasında üretilir. Bir kez oluştuktan sonra süperoksit dismutaz enzimi (SOD) varlığında hızla H⁺ iyonu ile birleşerek hidrojen peroksit oluşur (24).

Hidrojen peroksidin ve metabolitlerinin oksidan aktivitesini önleyen hücre içi diğer enzimler endoperoksidaz ve katalaz (KAT) hidrojen peroksiti su ve oksijene dönüştürür. Serbest radikal hasarına karşı hücre içi diğer savunma mekanizmaları arasında kolesterol, α -tokoferol (E vitamini), askorbik asit (C vitamini), β -karoten, bilirubin ve glutatyon sayılabilir. Serbest radikaller ve reaktif oksijen ürünleri hücrenin savunma mekanizmalarını aştığında hasar yaratabilir (16).

Yenidoğan beyni çoklu doymamış yağ asitleri ve serbest demir düzeyi yönünden zengindir. Diğer dokularla karşılaştırıldığında antioksidan enzim düzeyleri (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz) düşüktür. Enerjisinin büyük çoğunluğunu oksijen bağımlı olarak mitokondriyal oksidatif fosforilasyondan sağlamaktadır. Tüm bu nedenlerden dolayı daha fazla oksidatif risk altındadır (2,9,16).

Hipoksik iskemik hasarda serbest oksijen radikallerinin iki ana kaynağı prostaglandin sentezi ve hipoksantin oksidasyonudur. Serebral iskemi sürecinde Ca⁺⁺ tarafından fosfolipaz A₂ aktivasyonu ile serbest yağ asitlerinden araşidonik asit oluşumu gerçekleşir. Araşidonik asitten siklooksijenaz aktivasyonu ile Prostaglandin G₂ (PGG₂) oluşumu oksijen gerektiren bir reaksiyondur. PGG₂ den PGH₂ oluşumu

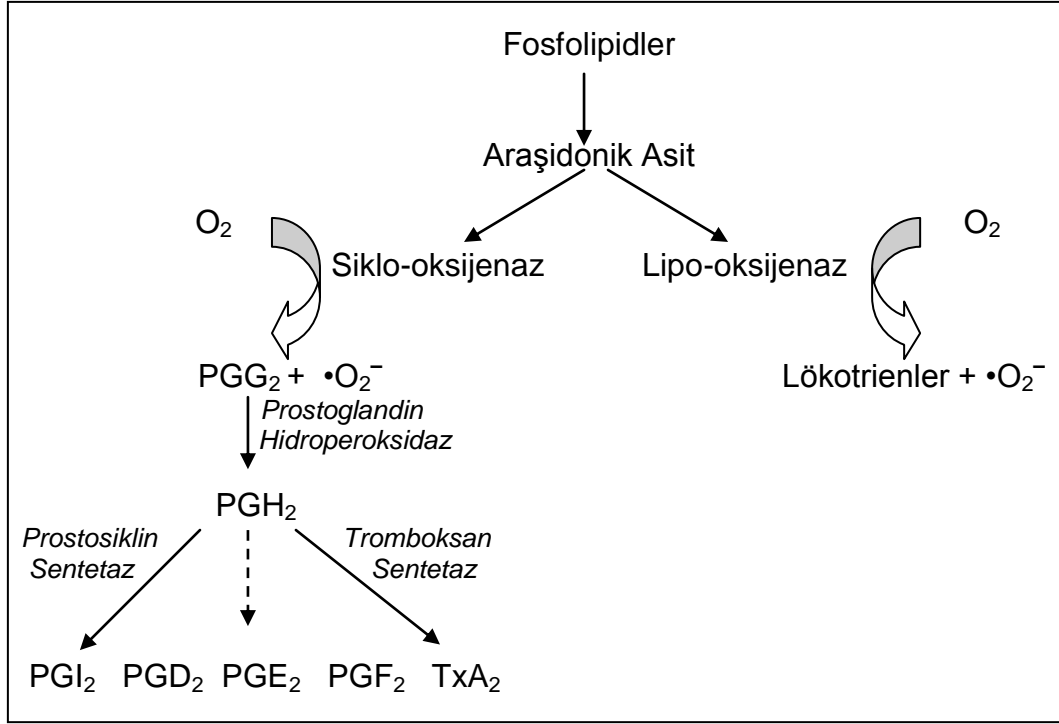
sırasında serbest oksijen radikali, süperoksit ($\bullet\text{O}_2^-$) oluşur. Prostosiklin ve tromboksan A_2 ve lökotrienlerin oluşum basamaklarında da serbest radikaller ortaya çıkmaktadır (2) (Şekil 2).

Hipoksik iskemik süreçte oksidatif fosforilasyonun kesilmesi ile yüksek enerjili fosfat rezervleri hızla azalır. ATP'ye dönüşemeyen ADP ve AMP hücre içinde birikir ve kısa süre içerisinde adenosin ve hipoksantine dönüştürülür. Normal koşullarda hipoksantin, ksantin dehidrojenaz enzimi tarafından önce ksantine sonra da ürik asite dönüşür. Hipoksik iskemik durumda ksantin dehidrojenaz, Ca^{++} ile aktive edilmiş özgül proteaz ile ksantin oksidaza çevirilir. Hipoksantin reoksijenizasyon fazında ksantin oksidaz tarafından süperoksit radikali ($\bullet\text{O}_2^-$) dönüşür (2). Ksantin oksidaz beyin kapiller endotel hücrelerinde yüksek düzeyde bulunur ve kan beyin bariyerini oksidatif hasarın hedefi haline getirir (2,7). Prostaglandin sentezi ve hipoksantin oksidasyonu ile ortaya çıkan süperoksit radikali süperoksit dismutaz aracılığıyla hidrojen peroksite (H_2O_2) dönüşür. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları ile hidrojen peroksit doku demiri ile birleşip hidroksil radikalinin ($\bullet\text{OH}$) oluşmasına neden olur (2,9,19) (Şekil 3).

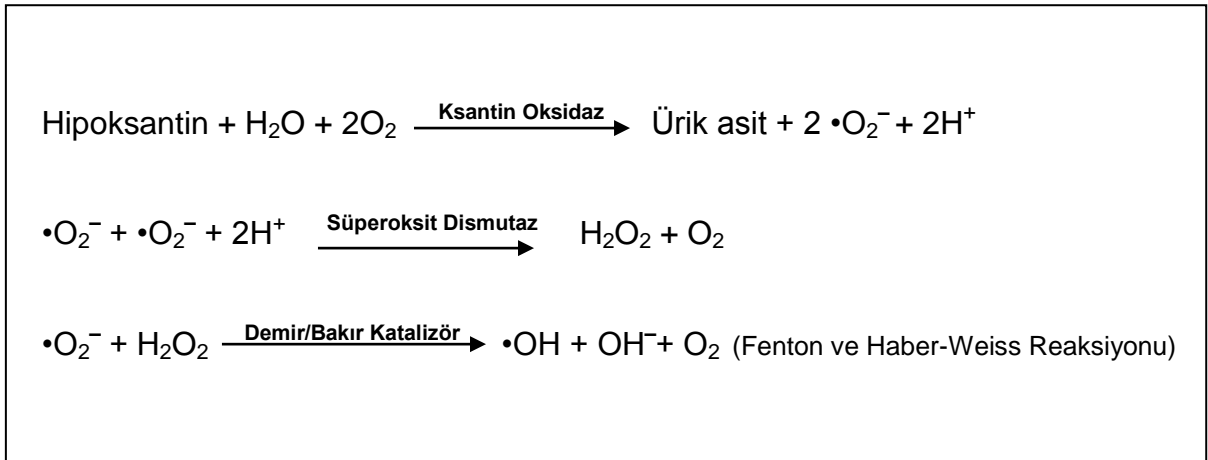
Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ile kan beyin bariyeri geçirgenliği artar. Kapiller endotele nötrofil ve trombosit adezyonu olur. Fosfolipaz A_2 aktivasyonu ile trombosit aktive edici faktör düzeylerinde artış sonuçta hipoksi iskemi sonrası serebral hipoperfüzyonu artırır (23).

Serbest oksijen radikalleri özellikle de hidroksil radikali yüksek reaktivitesi ile lipidler, proteinler ve nükleik asitlerle birleşerek yapısal ve fonksiyonel değişikliklere yol açmaktadır. Lipid peroksidasyonu ile hücre membran bütünlüğünün bozulması, protein hasarı ile enzimlerin aktivasyonu, mitokondri ve hücre DNA'sında hasarlanma, hücre iskeletinde bozulma ile hücre ölümüne neden olur (7,23) .

Toksik etkilerinin yanı sıra bu moleküller düşük düzeylerde sinyal molekülü işlevi görürler (23). Hipoksik iskemik hasar patogeneğinde yer alan adezyon molekülleri, siklooksijenaz, iNOS gibi enzimler, interlökin- 1β , interlökin-6 ve tümör nekroz faktör- α gibi sitokinlerin transkripsiyonunda görev alan nükleer faktör kapp B (NF- κB) hedeflerinden biridir.



Şekil 2. Eikozanoid sentezi sırasında serbest radikal oluşumu (2).



Şekil 3. Reperfüzyon fazında süperoksit ve hidroksil radikali oluşumu (7).

2.5. NİTRİK OKSİT

SSS'de nöronlar, endotel hücreleri, mikroglia ve astroglia hücreleri NO üretir. Beyinde NO üretildiği hücre tipi, üretim yeri ve miktarına göre serebral kan akımının düzenlenmesi, nörotransmitter ve nörotoksik etkinlik göstermektedir (7,25).

İlk kez arterlerde vazodilatasyona yol açtığı saptandıktan sonra endotel kökenli gevşetici faktör (EDRF) olarak adlandırılan NO serbest radikal bir gazdır. Farklı dokularda nitrik oksit sentaz (NOS) adı verilen enzimle L-arginin amino asidinin L-sitrullin'e dönüşümü sırasında oluşur. Üç farklı NOS enzim izoformu farklı genlerce kodlanmaktadır (27,28).

Endotelyal NOS (eNOS) kalsiyuma bağımlı olarak endotel hücrelerinde sentezlenir ve oluşan NO, cGMP oluşumuna ve vazodilatasyona neden olur. Beyinde eNOS kökenli NO serebrovasküler kan akımını düzenler (7).

Nöronal NOS (nNOS) astroglia ve nöronlarda, kalsiyuma bağımlı olarak eksprese edilir. Düşük düzeylerde üretilen NO nörotransmitter olarak işlev görür. Hedef hücreye girerek guanilat siklaz aktivasyonu ile cGMP düzeylerinde artışa yol açar. Hafıza ve öğrenme ile ilişkili rolü olduğu düşünülmektedir. Serebral korteks, hipokampus, serebellum ve korpus striatumdaki nöronların %1-2'si nNOS eksprese eden nöronlardır (7,28).

İndüklenebilir (inducible) NOS (iNOS) immünolojik olaylarda ve nöron hasarında mikrogliya hücreleri ve makrofajlarda sitokinlere yanıt olarak eksprese edilir. İndüksiyonu için mRNA transkripsiyonu gerekir, iNOS tarafından NO yavaş üretilir ve etkisi uzun sürer (7).

NO aracılı nöronal hücre ölümü aşırı eksprese edilen nNOS ve iNOS aracılığıyla gerçekleşir. SSS nöronlarında NMDA reseptörleri ile nNOS yapısal ve fonksiyonel birliktelik gösterir (15,16,29,30). Hipoksik iskemik hasarda glutamat NMDA reseptörüne bağlandıktan sonra kalsiyum artışı ile nNOS'u aktive ederek NO üretimine neden olmaktadır (31).

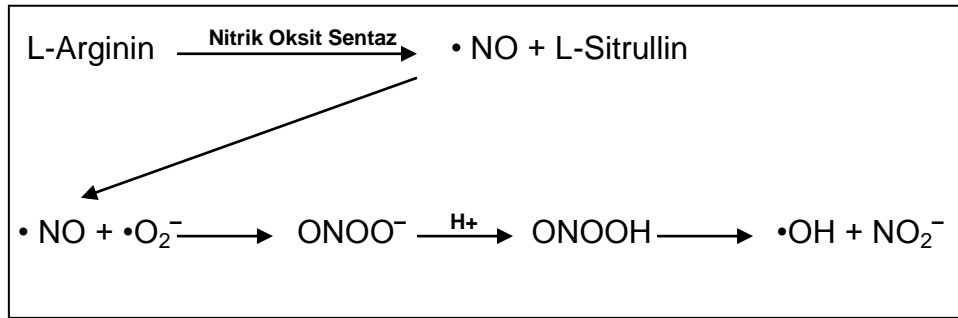
SSS'de akut inflamatuvar ve iskemik durumlarda astrositler ve mikrogliya hücreleri iNOS eksprese ederler ve glial hücrelerde oluşan aşırı NO beyindeki ana toksik serbest radikaldır. Oluşan NO süperoksit anyonu ile birleşerek peroksinitrit oluşumu ile DNA kırıklarına, lipid peroksidasyonuna yol açar (7) (Şekil 4).

Mitokondride NO elektron transport zincirinde sitokrom oksidaz'a (kompleks IV) oksijenin bağlanmasını engelleyerek mitokondriyal solunumu bloke eder (31). Elektron transport zincirinde kompleks I ve III de süperoksit radikali oluşumu artar (31). NO ve süperoksit radikallerinin birlikte artışı peroksinitrit oluşumuna neden olur. Peroksinitrit mitokondriyal proteinlere toksik etki ile

mitokondriyal solunumu bozar, serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesini zorlaştırır. Mitokondri membran geçirgenliğini artırarak sitokrom c gibi proapoptotik proteinlerin salınımı ile kaspaz ve apoptoz uyarıcı faktör (apoptosis induced factor-AIF) bağımlı hücre ölümüne yol açar (25).

NMDA reseptörlerinin uyarılması ile oluşan NO, mitokondride yarattığı hasar dışında iskemi sırasında DNA kırıklarının onarma görevi olan “poli (ADP-riboz) polimeraz-1” (PARP-1) nükleer enzimini aktive eder. PARP-1 enzimi hipoksi iskemi sırasında mitokondrinin ADP üretmek için kullandığı nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD) tüketerek enerji açığı yaratıp mitokondi hasarını artırır (9,26,32).

SSS’de nöron hasarında önemli yeri olan NO aynı zamanda vazodilatör, anjiogenezi uyarıcı, trombosit agregasyonunu ve lökosit aktivasyonunu baskılayıcı etkileri ile nöron koruyucu etkinlik de göstermektedir (16,31).



Şekil 4. L-Arginin amino asidinden nitrik oksit sentezi. NOS enzimi ile sentezlenen nitrik oksit ($\bullet\text{NO}$) hızla süperoksit ($\bullet\text{O}_2^-$) radikali ile birleşip peroksinitrit (ONOO^-) ve hidroksil ($\bullet\text{OH}$) radikali oluşumuna neden olur (25).

2.6. İNFLAMATUVAR YANIT

Beyinde iskemik hücrelerin, nötrofil ve trombositlerin vasküler endotele adezyonuna dolayısıyla yangısal yanıtı yol açan, kemoatraktan maddeleri ve adezyon molekül aktivatörlerini salgıladıkları gösterilmiştir. Kemoatksise neden olan en önemli etken süperoksit radikalidir. Lökosit kemoatksisine neden olan diğer ajanlar kompleman 5a (C5a), kompleman 3a (C3a), araşidonik asit metabolitleri, özellikle lökotrien B4 (LB4), nitrik oksit (NO), trombosit aktive edici faktör (PAF), interlökin-1, 6, 8 (IL-1, 6, 8), interferon gama ve TNF- α gibi sitokinlerdir (3,20,29,33).

Kemotaktik faktörlerin sentezi ve salınması ile birlikte, hem nötrofil hem de endotel hücresinde lokalize olan adezyon moleküllerinin artmış üretimi de başlamaktadır. Nötrofiller adezyon molekülleri aracılığı ile etkileşime girdikleri endotel hücreleri arasında ilerleyerek ekstrasvasküler dokuya doğru göç ederler. Aktive olmuş nötrofiller NADPH oksidaz enzimi aktivasyonu ile reperfüzyonda süperoksit radikali ($\bullet\text{O}_2^-$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($\bullet\text{OH}$) oluşturarak ileri doku hasarına neden olurlar (3,13).

2.7. NEKROZ VE APOPİTOZ

Yaşamakta olan hücreler nekroz ve apopitoz olarak adlandırılan iki farklı mekanizma ile ölürler. Nekroz; hipoksi, aşırı ısı değişiklikleri, toksinler gibi hücre dışından gelen çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenler sonucunda gelişen travmatik hücre ölümüdür. Hücre şişmesinin, organel hasarının, hücre membranı bütünlük kaybının, nöron hücre hasarlanmasının ve inflamatuvar süreçlerin aktive olduğu pasif bir olaydır (9,34,35).

Apopitoz ise yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin, organizma için güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Apopitozda aktif bir süreç gözlenir, hücre büzülür, çekirdek belirginleşir, kromatin yoğunlaşır ve genom parçalanması gerçekleşir ve bunlara inflamatuvar süreç eşlik etmez. Nekroz patolojik bir olaydır. Apopitoz ise fizyolojik veya patolojik uyarılarla oluşabilir (19,34,39).

Embriyogenez ve fütogenez sırasında normal gelişimin sağlanabilmesi amacıyla, oluşmuş olan hücrelerin bir kısmı apopitoza gitmektedir. Özellikle sinir sisteminin gelişiminde apopitoz önemli rol oynamaktadır. Sinir sistemi gelişirken çok fazla sayıda nöron ve sinaps oluşur. Apopitoz ile nöronal havuz hedef olan miktara indirilmekte, aksonları hedeflerine ulaşmayan nöronlar ortadan kaldırılarak nöronlarla hedef organlar arasında oluşan bağlantı hataları onarılmaktadır (16,32,39).

İnsan ve hayvanlarda hipoksik-iskemik olay sonrasında iskemi merkezini oluşturan santral bölgede nekrotik hücreler görülür. Santral bölge çevresinde “penumbra” olarak adlandırılan alanda reperfüzyon döneminde hasarlanan, apopitotik hücrelere rastlanmaktadır (35). Ciddi hipoksi-iskemi nekroz ile

sonuçlanırken daha hafif olayda ise apopitoz daha baskındır. Hipoksik-iskemik olay sonucu bu iki süreç de nöron ölümünde gözlenebilir (19,36,37).

Apoptotik hücre ölümü hücre içinden (intrinsek) ve hücre dışından (ekstresek) kaynaklanan uyarılarca başlatılmaktadır. Bu uyarılar normal şartlarda hücre içinde inaktif polipeptidler halinde bulunan, kaspaz (caspase, cysteine containing **aspartate** specific proteases) olarak adlandırılan proteazları aktive eder. Hem intrinsek hem de ekstresek yol kaspaz-3 üzerinde birleşir. Bu proteaz hem beyin gelişimi hem de akut hasarlanma sonrası nöron apopitozunda etkin rol oynamaktadır (16,31,32,38) (Şekil 5).

Intrinsek mekanizmada mitokondri önemli rol oynamaktadır. Mitokondri dış zarının geçirgenliğini düzenleyen bir grup protein bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi Bcl-2 protein ailesidir. Bcl-2 ailesi proapoptotik ve antiapoptotik etkinlik gösteren 2 grup proteinden oluşur. Antiapoptotik etki gösteren Bcl-2 proteinleri (Bcl-2, Bcl-X_L) ve proapoptotik proteinler (Bax, Bad, Bak, Bid, Puma) arasında denge mevcuttur. Dengenin proapoptotik yönde bozulması intrinsek mekanizmayı başlatır (9,32,38).

Bax ve Bak proteinleri mitokondri membranında sitokrom c geçişine izin veren kompleks şeklinde apopitoz proteaz aktive edici faktör-1'e (APAF-1) bağlı olarak bulunur. Bcl-2 ve Bcl-X_L antiapoptotik proteinleri Bax/Bak fonksiyonunu bloke eder (9,32). Hücre içinden kaynaklanan sinyallerle (çevresel ya da hücre içi stres, büyüme faktörü yokluğu, DNA hasarı) APAF-1 mitokondriden ayrıldığında membran geçirgenliği artar ve sitokrom c salınımı gerçekleşir (35). Sitokrom c hücre dışında kaspaz-9, APAF-1 ve ATP ile birleşerek, apopitozom adı verilen kompleks aracılığıyla kaspaz-3 aktivasyonunu gerçekleştirir (32,38) (Şekil 6).

Ekstresek yolakta apopitoz sitokinlerce uyarılmış membran reseptörleri aracılığı ile başlatılır. Membran reseptörleri içerisinde en önemli grup Tümör Nekroz Faktör Reseptör (TNFR) ailesidir. Bu aile içinde Fas ve TNFR1 en önemli reseptörlerdir. Membrana bağlı ya da serbest halde bulunan Fas Ligandı (immün sistem hücrelerince üretilir) Fas reseptörüyle birleşir. Reseptörün hücre içi parçaları ile adaptör protein (FADD-Fas adaptor protein with a death domain) bağlanarak ölüm başlatan sinyal kompleksini (DISC-Death inducing signal complex) oluşturur. Bu kompleks üzerinden kaspaz-8 aktivasyonuna yol açar. TNF- α da TNFR1 üzerinden

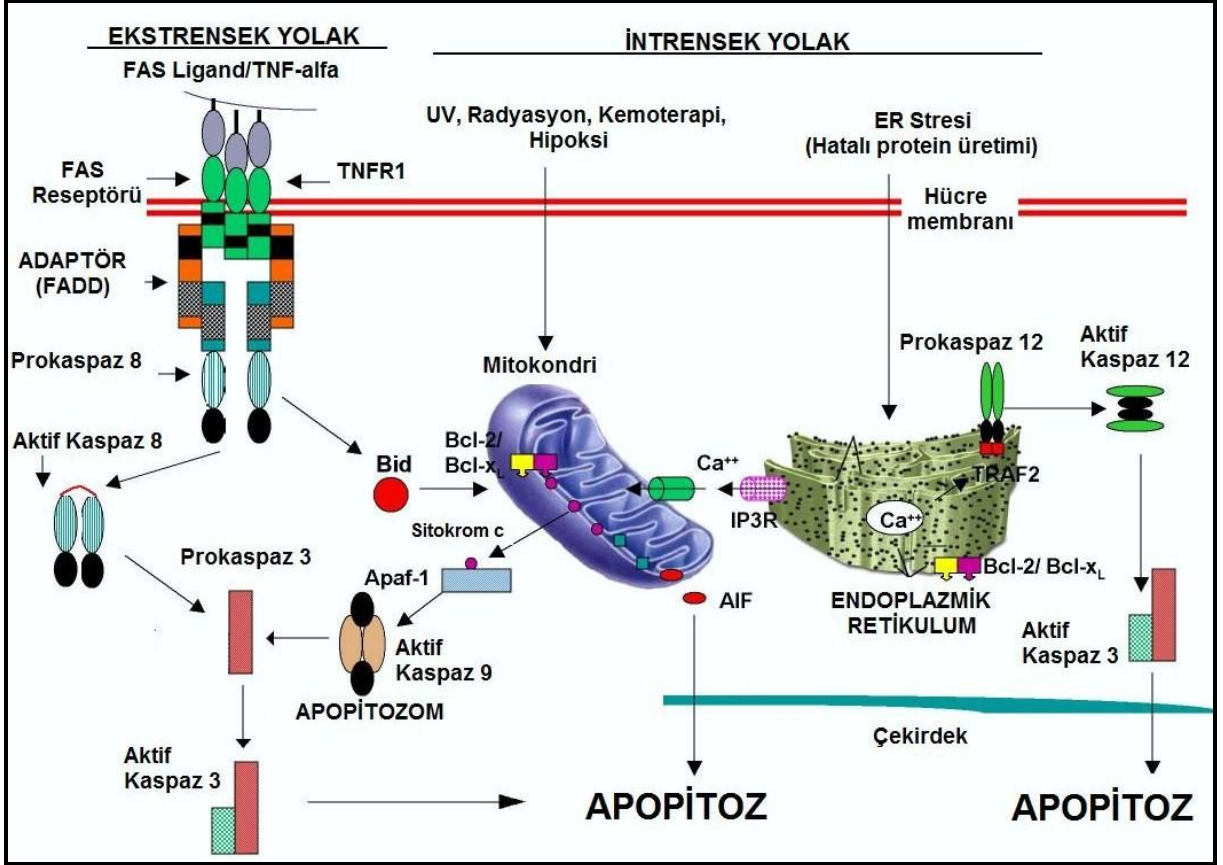
hücre içinde TNF reseptör adaptör proteini (TRADD-TNFR adaptor protein with death domain) üzerinden kaspaz-8 ve kaspaz-3 aktivasyonuna yol açar (9,32,38,39) (Şekil 5).

Aktive olan kaspaz-3 inaktif haldeki DNA endonükleazı aktive ederek ve PARP-1 enziminde bölünmeye (cleavage) neden olarak DNA kırıklarına yol açar (9,40). Hücre içinde proteazların aktive edilmesi ile aktin yıkımı, hücre iskeletinin bozulmasına, hücre membran asimetrisine, membran lipid ve protein yapısının değişimi ile fagositer sistem tarafından hücrenin yok edilmesine neden olur (34,39).

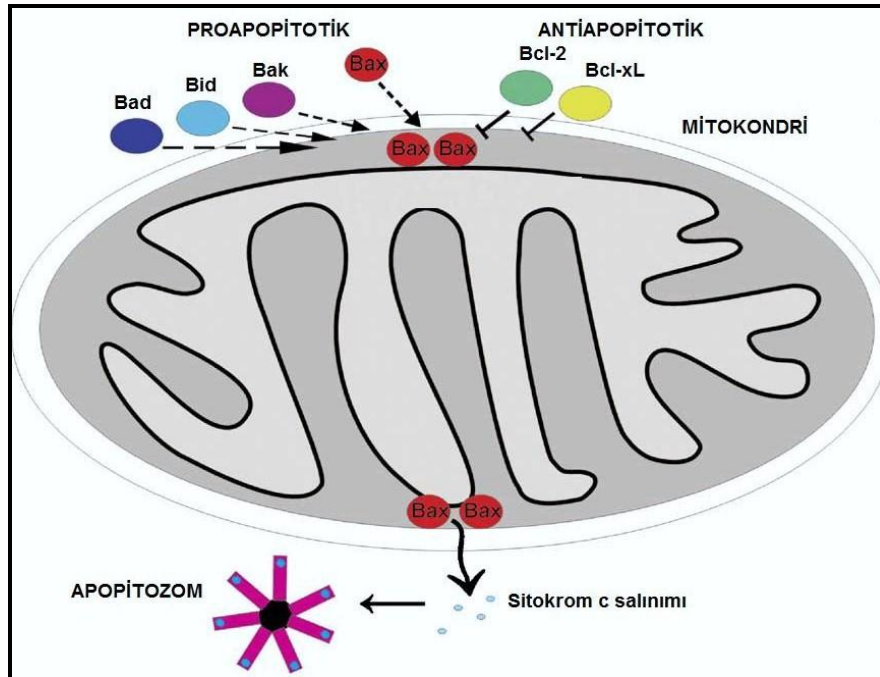
Mitokondriden salınan apoptoz uyarıcı faktör (apoptosis induced factor, AIF) adlı proteinin kromatin yoğunlaşmasına ve DNA parçalanmasına kaspaz dışı mekanizma ile neden olduğu bildirilmektedir. Hipoksi iskemi sonrası, reperfüzyonun erken fazında, immatür beyinde nöronların çekirdek ve mitokondrilerinde AIF translokasyonunun arttığı bildirilmektedir (9,34).

Hipoksi ve hipoglisemi gibi stres faktörleri varlığında endoplazmik retikulum (ER) da hatalı üretilen proteinlerin birikimi de apoptotik mekanizmanın başlamasına neden olur (9). ER membranındaki Bax ve Bak proteinlerinde yapısal değişiklikler membran geçirgenliğini artırarak ER'un Ca^{++} içeriğinin sitozole geçişine neden olur. Sitozolde artmış Ca^{++} kalpainleri (calcium activated neutral cystein endopeptidases) aktive eder. Kalpain, ER'da bulunan kaspaz-12 üzerinden, kaspaz-9 ve kaspaz-3'ü aktive ederek apoptozu tetikler (16,32). ER membranındaki Bcl-2 ve Bcl- X_L proteinleri ER kalsiyum içeriğinin sitozole salınımını engelleyerek antiapoptotik etkinlik gösterir (32).

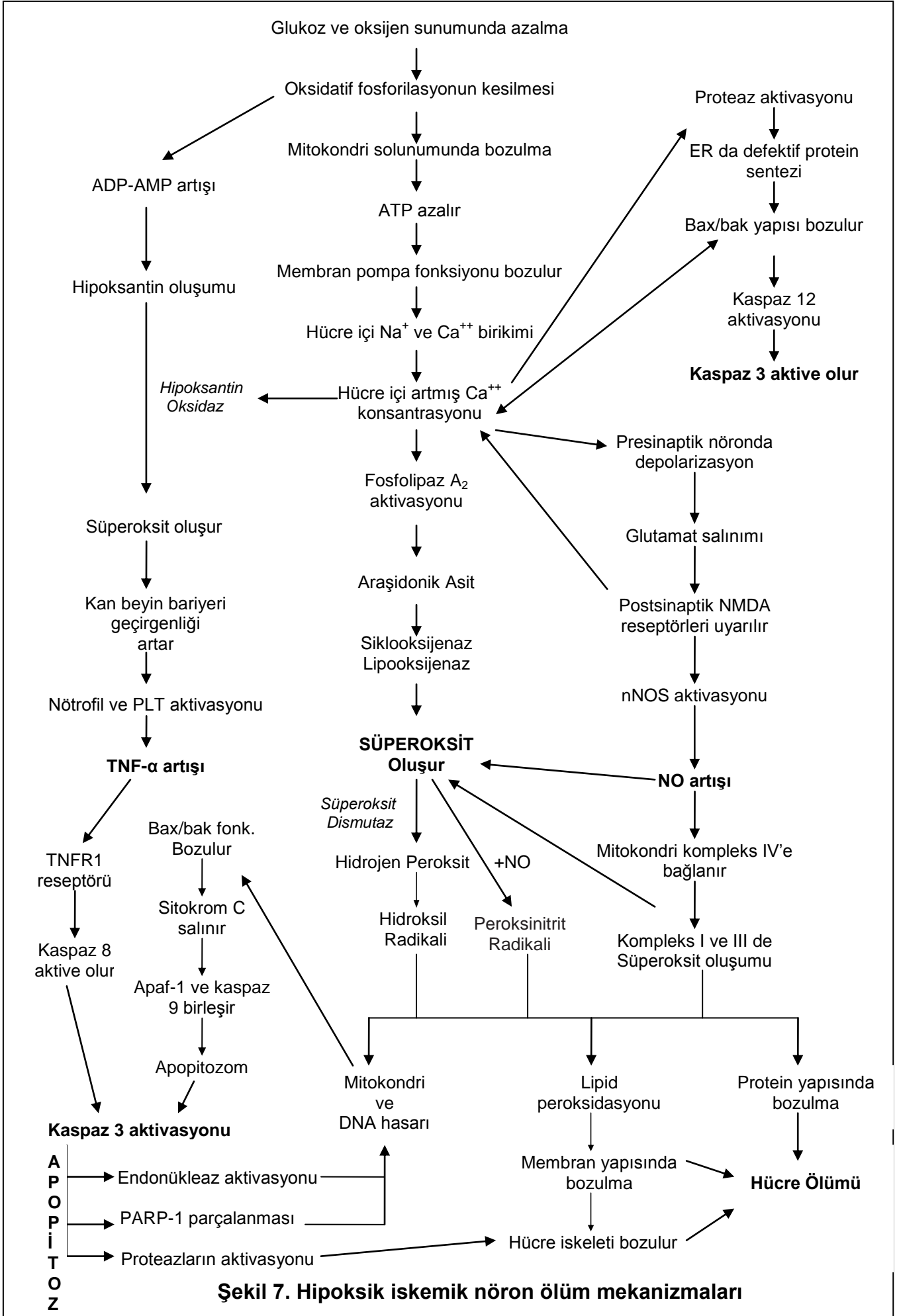
Gelişmekte olan beyin yüksek lipid ve serbest demir içeriği, antioksidan enzimlerin düşük düzeyi nedeni ile oksidatif strese çok duyarlıdır ve mitokondri oksidatif stresin ana hedefidir (9,18,31). İmmatür beyin artmış NMDA reseptörü ve nNOS aktivitesi, hücre içi artmış Ca^{++} düzeyi, apoptoz ile ilişkili faktörlerin (kaspaz-3, Apaf-1, sitokrom c, Bcl-2 ve Bax) fazla sentezlenmesi nedeniyle hipoksik-iskemik olay sonrası mitokondri ve apoptotik nöron hasarına karşı artmış duyarlılık göstermektedir (16,31,32,34).



Şekil 5. İntrensek ve ekstrinsek apoptotik yollar (112).



Şekil 6. Proapoptotik ve antiapoptotik Bcl-2 protein ailesi (32).



2.8. HİPOKSİK İSKEMİK HASARI ÖNLEMeye YÖNELİK KULLANILAN TEDAVİLER

Hipoksik-iskemik olay ile hücre ölümü arasındaki süre “terapötik pencere” olarak adlandırılır. Bu dönemde uygulanan tedavi yaklaşımları beyin hasarının ciddiyetini azaltmaktadır. Erişkinlerde nöronal nekroz ve apoptozun rölatif olarak daha yavaş ilerlemesine bağlı olarak terapötik pencere saatler ve günlerle ifade edilebilir. Term infantlarda bu sürenin 4-8 saati geçmediği, immatür hayvanlarda yapılan çalışmalarda ise Hİ olaydan 2 saat sonra verilen tedavi yaklaşımlarının hasarı azaltmada etkili olamadığı belirtilmiştir (2).

Hipoksik iskemik beyin hasarı riski yüksek olguların erken tanımlanması, uygun destek tedavinin sağlanması (uygun ventilasyon, hidrasyonun sağlanması, glukoz düzeyinin kontrol altında tutulması ve konvülsiyonların önlenmesi) tedavinin ana basamaklarını oluşturmaktadır (19).

Ciddi beyin hasarını önlediği düşünülen ve halen araştırılmakta olan serbest radikal bağlayıcılar, eksitatör amino asit antagonistleri, kalsiyum kanal blokerleri, nitrik oksit sentaz inhibitörleri gibi farmakolojik ajanlar ve hiperglisemi, hafif hiperkapni, lokal beyin hipotermisi gibi farmakolojik olmayan yöntemler bulunmaktadır (2,29,41).

Farmakolojik tedavi stratejileri daha sıklıkla hipoksik iskemik olayın reperfüzyon fazında oluşan serbest oksijen radikallerine bağlı hasarı önlemeye yöneliktir.

a. Serbest Oksijen Radikal İnhibitörleri ve Bağlayıcıları

Hipoksantin yapısal analogu olan **allopürinol** yarışmalı olarak ksantin oksidazı inhibe ederek serbest oksijen radikali oluşumunu önler. İmmatür ratlarda hipoksik iskemik olay sonrasında uygulandığında beyin hasarını azalttığını belirten yayınlar mevcuttur (19,42).

Yine başka bir tedavi yaklaşımında antioksidan enzimler olan **süperoksit dismutaz** ve **katalaz**'ın erken dönemde serbest oksijen radikallerini yok edici özelliğinden faydalanılarak hipoksi öncesi koruyucu ve hipoksi sonrası hasarı azaltıcı etkileri hayvan çalışmaları ile kanıtlanmıştır (2).

Reperfüzyon fazında serbest demir varlığında gelişen hidroksil radikali oluşumunu hedef alan demir şelatörü **deferoksamin**, serbest radikal oluşumu, lipid

peroksidasyonu ve beyin ödemi azaltarak perinatal asfiksik hasardan koruyucu etkinlik göstermiştir (19).

Siklooksijenaz inhibitörü **indometazin**'in prostoglandin sentezini engelleyip, süperoksit anyonu oluşumunu önleyerek, hipoksik-iskemik hasarı azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir (12,43).

Antioksidan etkinliği olan **askorbik asit** ve **N-asetilsistein** uygulaması ile de hipoksik iskemik beyin hasarının azaltıldığına yönelik çalışmalar mevcut (44,45).

b. Eksitatör Aminoasit Antagonistleri

Glutamat'ın hipoksik-iskemik beyin hasarındaki rolü düşünüldüğünde glutamat salınımının azaltıcı ve postsinaptik etkisini engelleyici farmakolojik ajanlar çalışılmıştır. NMDA reseptör antagonisti **dizocilpine (MK-801)**, **magnezyum**, **dekstrometorfan**, **ketamin**'in hipoksik iskemik beyin hasarını azalttığı belirtilmiştir. AMPA/Kainat reseptör antagonistleri de (**NBQX**, **CNQX**) benzer şekilde hipoksik-iskemik hasarı azaltmaktadır (10,12,19,26,42).

Böbrek ve karaciğerden salınan sitokin yapıdaki hormon **Eritropoietin (EPO)** hematopoetik özelliğinin yanı sıra NMDA reseptör aracılı glutamat toksisitesini önleyerek beyinde hipoksik iskemik hasarı azaltmaktadır (19,46).

c. Nitrik Oksit Üretiminin Önlenmesi

NOS inhibitörleri ile yapılan çalışmalarda hayvan türüne, kullanılan farmakolojik ajana, uygulama dozuna ve tedavi zamanlamasına bağlı olarak çeşitli etkiler elde edilmiştir. Hayvan çalışmalarında **7-nitroindazol** ve **aminoguanidin** gibi NOS inhibitörlerinin nöron kaybını azalttığı belirtilmiştir (16,19,26,43,47).

d. Kalsiyum Kanal Blokerleri

Hücre içinde metabolik yolların başlangıcında rol alan kalsiyumun hücre içine girişine engel olan yeni kalsiyum kanal blokerlerinden **flunarizin**, **nikardipin** ve **nimodipin**'in deneysel çalışmalarda etkili olduğu gösterilmiştir. Sistemik kan basıncını azaltıcı yan etkileri nedeni ile klinik kullanımları önerilmemektedir (10,19,42).

e. Enerji Kaybının Önlenmesi

Hipoksik iskemik olay sonrası enerji azalması biyokimyasal hasarlayıcı mekanizmaların başlangıç noktasıdır. Glukoz düzeylerinin fizyolojik düzeylerde tutulması önemlidir. Hipoglisemi kadar hipergliseminin de hasarlanmayı artırdığı bilinmektedir. Hafif **hiperkapni** enerji koruyucu etki ile hasarlanmayı azaltırken hafif **hipotermi** metabolizma hızını azaltmakta, azalmış beyin perfüzyonu ile birlikte oksijen ve enerji tüketiminde azalmaya yol açmakta, sitotoksik ödemi azaltarak beyin hasarının genişlemesini engellemektedir (2). Yüksek doz **barbiturat** kullanımı da beyin metabolizmasını yavaşlatarak nöron koruyucu etkinlik göstermektedir (10,42).

f. Diğer Yaklaşımlar

Hipoksi iskemisi sırasında düzeyi artan ve adezyon moleküllerinin oluşumunu tetikleyen Trombosit aktive edici faktör (PAF) etkisini bloke eden antagonistler ile beyinde infarkt alanlarında küçülme saptanmıştır (19).

Mikroglia ve makrofajlardan salınan IL-1 β , TNF- α gibi sitokin düzeylerinin artışında etkilidir. **IL reseptör antagonistleri**'nin kullanımı ile yenidoğan ratlarda hipoksik beyin hasarında azalma saptanmıştır. Fosfodiesteraz inhibitörü **pentoksifilin**'in hipoksik iskemik beyin hasarı öncesi uygulandığında TNF- α düzeyini azaltarak koruyucu etkinlik gösterdiği belirtilmektedir (10,48).

Polipeptid yapıdaki büyüme faktörlerinden; fibroblast büyüme faktörü (FGF), insülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I) ve nöron büyüme faktörünün (NGF) hipoksik iskemik hasar sonrasında beyin yenilenmesinde etkili oldukları belirtilmiştir (18,19,26).

Apopitoz oluşumunda görevli kaspaz enzimlerinin inhibitörlerinin kullanılması da hipoksik hasarı azaltmaktadır (26,49). Hipoksik olay öncesinde uygulanan **glukokortikoidler**'in, beyin oksijen tüketimini azaltarak etkinlik gösteren **fenobarbital** kullanımının hipoksik-iskemik beyin hasarının şiddetini azalttığına yönelik çalışmalar da bulunmaktadır (42).

Hayvan çalışmaları perinatal hipoksik iskemik beyin hasarının altında yatan mekanizmaları saptamak ve oluşacak doku hasarını önleme ya da en aza indirmek için gerekli tedavi yaklaşımlarının uygulanması açısından önem arz etmektedir.

2.9. PENTOKSİFİLİN

Kimyasal olarak [3,7-dimethyl-1-(5-oxohexyl)-xanthine] şeklinde adlandırılan pentoksifilin bir ksantin türevidir ve spesifik olmayan tip 4 fosfodiesteraz (PDE4) inhibitörüdür (5,50). Periferik arter hastalığı ve intermittan kladikasyonun tedavisi için uzun zamandır kullanılmaktadır. Kırmızı hücre deformabilitesini artıran, trombosit ve eritrosit agregasyonunu azaltan bir ilaçtır. Fibrinojen düzeyleri ve plazma viskozitesini azaltarak mikrosirkülasyonu ve doku oksijenizasyonunu artırmaktadır (5,51,52).

Pentoksifilin mononükleer fagositler, nötrofil ve endotel aktivasyonu ile inflamatuvar ve trombojenik mediatörlerin üretim ve aktivasyonu ile ilişkili rolü üzerinde durulmaktadır. Temel olarak nötrofillerde İnterlökin-1(IL-1), İnterlökin-10 (IL-10) ve TNF- α 'nın proinflamatuvar etkinliğini ve monositik hücrelerde sitokin üretimini inhibe eder (5,50,53,54).

Pentoksifilin, uygulanması sonrası mononükleer fagositler, nötrofil, damar düz kas, endotel ve mikroglia hücrelerinde hücre içi cAMP artışına yol açarak etkinlik gösterir. Nötrofillerde cAMP artışı fagositik aktivitede, süperoksit anyonu oluşumunda ve lizozomal enzim salınımında azalmaya neden olur (4,5,55,56).

Pentoksifilin üç ana mekanizma ile cAMP artışı sağlar:

- Prostosiklin yapımını artırıp adenilat siklaz aktivasyonu ile ATP'den cAMP oluşumuna neden olur,
- Fosfodiesteraz inhibisyonu ile cAMP yıkımını azaltır,
- Adenozin reseptörleri üzerinden adenilat siklazı aktive eder (4).

Adenozin SSS'de nöromodülatör ve serebral dolaşımı düzenleyici etkisi olan endojen nükleozittir. Normal şartlar altında SSS'de ekstrasellüler sıvıda düşük düzeylerde bulunurken hipoksi-iskemiye takiben yoğunluğu artar. Adenozin, eksitatör amino asit salınımını ve kalsiyumun hücre içine girişini engeller. İskemiye takip eden saatlerde adenozin reseptör düzeyi azalır. Vazodilatasyon ile oksijen tüketimini artırır, PLT agregasyonu, nötrofil adezyonu ve serbest radikal oluşumunu azaltarak nöron koruyucu etki gösterir (57-59).

En az dört çeşit adenozin reseptör alt tipi mevcuttur.

A₁ reseptörleri kortikal nöronlar, glia hücreleri, serebellum, hipokampusda; A_{2A} striatal nöronlarda, A_{2B} astrositlerde ve A₃ beyinde az miktarda bulunur. A₁ ve A₃

aktivasyonu adenilat siklaz inhibisyonu ile cAMP'yi azaltır. A₂ reseptörleri ise ters mekanizma ile cAMP artışı sağlar (57).

Fosfodiesteraz inhibisyonu ve eNOS aktivasyonunda artış ile hücre içi cGMP düzeylerini ve NO düzeylerini artırdığı bilinmektedir (55,60,61).

Pentoksifilin sistemik uygulama sonrası hızla kan beyin bariyerini geçerek adenosin reseptör antagonist etkisi ile (A₁ reseptörleri üzerinden) cAMP düzeylerini artırır. Protein kinaz C tarafından nükleer faktör κB aktivasyonunu engelleyerek TNF-α üretimini azaltır (62). Artmış hücre içi cAMP nötrofil ve makrofaj aktivasyonunun inhibisyonu, inflamatuvar sitokin üretimini azaltma ve endotel-lökosit adezyonuna engel olma gibi birbirini tamamlayan anti inflamatuvar ve antiapoptotik etki ile nöron hasarını azaltır (5,51,59).

Serebrovasküler hastalığı olan bireylerde beyin kan akımını artırdığı bilinen pentoksifilin bu özelliği ile de nöron koruyucu etkinliğine katkıda bulunur (4,63).

Daha önce pentoksifilinin akciğer, kalp, barsak, karaciğer, böbrek, spinal kord ve beyinde iskemi-reperfüzyon hasarını azalttığına yönelik rat, fare, tavşan ve köpek gibi çeşitli hayvan türlerinde yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (55,64-68).

Yenidoğan ratlarda yapılan çalışmada hipoksik iskemik beyin hasarı öncesi pentoksifilin uygulamasının serebral infarkt alanını azalttığı, hipoksi sonrası pentoksifilin uygulamasının kortikal hasarı azaltırken striyatal ve hipokampal hasara etkili olmadığı gösterilmiştir (63).

2.10. MELATONİN

İlk kez Aaron B Lerner tarafından 1958 yılında tanımlanan melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) büyük çoğunluğu pineal bezde tripofandan sentezlenip salgılanan bir nörohormondur. Retina, gastrointestinal sistem, deri, kemik iliği, trombositler ve lenfositler gibi doku ve organlar melatoninin diğer kaynaklarıdır (69,70).

Aydınlık/karanlık döngüsü içerisinde karanlık fazda salınan melatoninin uyku, üreme, davranış, sirkadiyen ritm ve immünmodülasyon gibi birçok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rolü bulunmaktadır (6). Biyolojik fonksiyonları

düzenleme dışında melatonin serbest radikal bağlayıcı ve antioksidan enzim düzeylerini artırıcı etki ile güçlü bir antioksidandır (7,71,72).

Melatoninin eksojen uygulamasının sirkadyen ritim uyku bozuklukları, insomnia (uykusuzluk), kanser, nörodejeneratif hastalıklar, immün fonksiyon bozuklukları ve oksidatif hasarı azaltmada etkin olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (7,69,73-75).

a. Sentez ve metabolizması

Melatonin öncül molekülü olan triptofan kan dolaşımından alınır ve triptofan hidroksilaz enzimi ile 5-hidroksi triptofana dönüştürülür. Aromatik amino asit dekarboksilazın katalizlediği dekarboksilasyon ile 5-hidroksitriptofan seratonine dönüşür. Daha sonra seratonin aril alkilamin N-asetil transferaz (AA-NAT) enzimi ile asetillenerek N-asetil seratonin'e bu da hidroksi-indol O-metiltransferaz etkisi ile melatonine dönüşür (6,69) (Şekil 8).

Pineal bezde melatonin sentezi sirkadiyen ritm gösterir. Gün boyunca düşük olan melatonin düzeyi gece yükselir (69). Suprakiazmatik nukleuslar tarafından algılanan ışık-karanlık döngüsü ile sinir uçlarından gece boyunca noradrenalin salgılanır. Pinealositlerin β -adrenerjik reseptörlerinin uyarılması ile adenilat siklaz aktivitesi ve cAMP düzeyi artar. Aril alkilamin N-asetil transferaz enzimi uyarılması sonucu seratonin, N-asetil seratonin ve melatonine dönüşür (6).

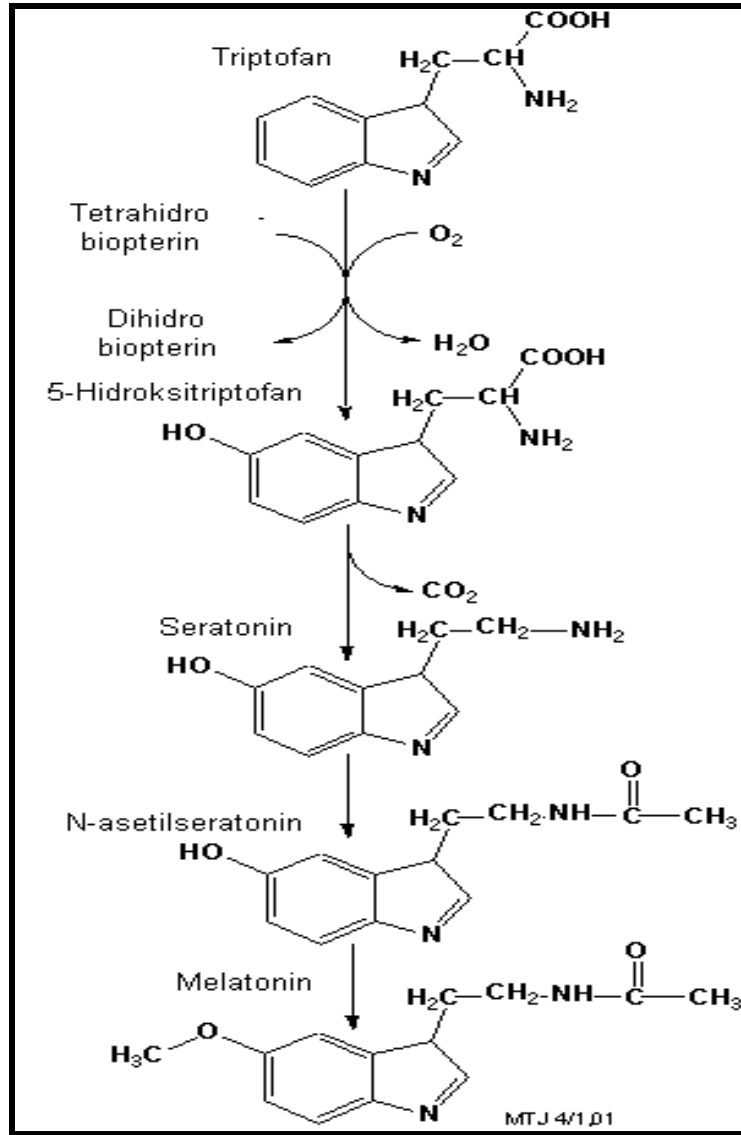
Melatonin sentez edildikten sonra pineal bezde depolanmaz, hızla kapiller dolaşıma ve serebrospinal sıvıya geçer. Serebrospinal sıvıdaki miktarı kan dolaşımından yaklaşık 20-30 kat daha fazladır (6). Plazmada büyük çoğunluğu albümine bağlanarak taşınır (69,71).

Dolaşımdaki melatonin temel olarak karaciğerde sitokrom P₄₅₀ enzimi aracılığı ile metabolize edilir. Karaciğer dışı dokularda metabolizasyonu farklılıklar gösterir. Pineal bez ve retina gibi nöral kökenden gelen hücreler melatonin deasetile edici enzimlere sahiptir. Bu dokularda melatonin deasetile edilerek 5-metoksi triptamine çevrilir (69).

Melatonin enzimatik olmayan yol ile tüm hücrelerde veya hücre dışında metabolize edilebilir. Siklik 3-hidroksi melatonine dönüşümü sırasında direkt olarak 2 hidroksil radikalini bağlar.

Beyinde melatonin kinuramin'e metabolize edilir. N1-asetil-N2- formil-5- metoksi kinuramin (AFMK) ve N1-asetil-5-metoksi kinuramin (AMK) metabolitleri melatoninin antioksidan ve anti-inflamatuvar etkinliğine yol açmaktadır (69,76). AFMK çeşitli enzimatik ya da enzimatik olmayan yollar ile oluşabilir; miyeloperoksidaz aracılığı ile oluşan kısmı önemlidir.

Melatonin hem suda hem de lipide çözünebildiğinden sistemik uygulamalar sonrasında biyolojik membranlardan kolayca geçip vücuttaki hemen her hücrede etkinlik gösterebilmektedir (77). Reseptör bağımsız etkileri yanı sıra melatonin membran reseptörleri (MT1, MT2, MT3) aracılığıyla cAMP üretiminin inhibisyonuna yol açar (69).



Şekil 8. Melatonin sentez basamakları (69).

b. Melatonin Antioksidan Etkisi

Melatoninin antioksidan özelliği yapısında bulunan pirol halkasından kaynaklanmaktadır. Melatoninin pirol halkasının indolamin 2, 3-dioksijenaz (İDO) ile enzimatik ya da enzimatik olmayan yıkımında, yüksek reaktiviteye sahip, AFMK metaboliti oluşmaktadır (6).

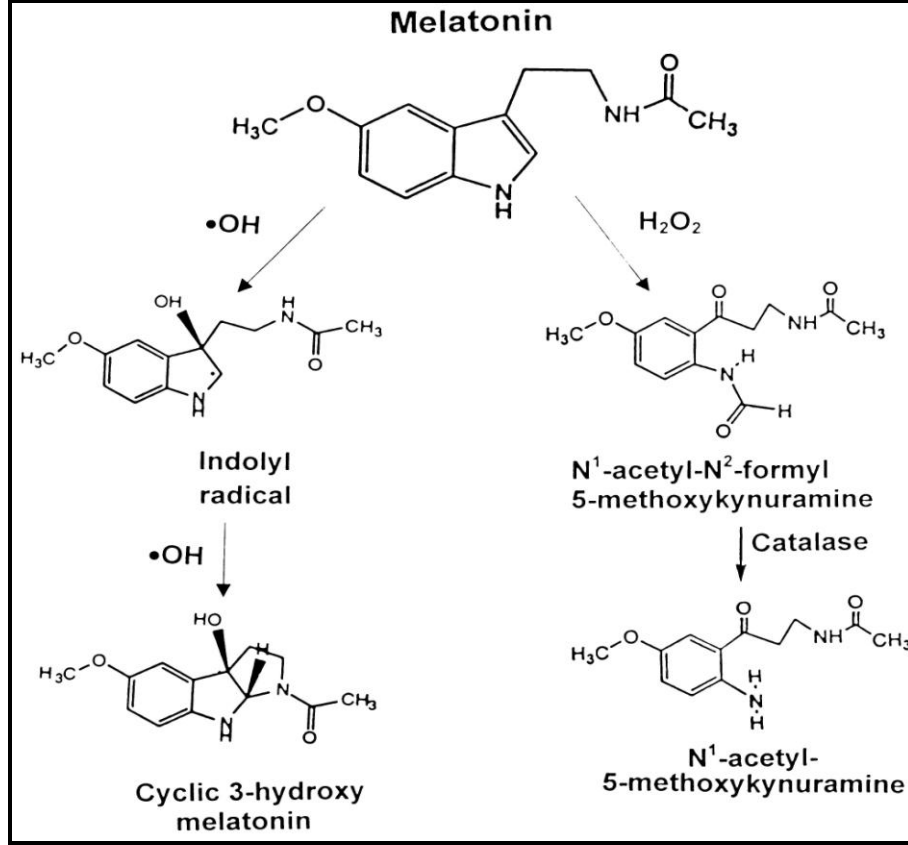
Karaciğer dışı dokularda AFMK melatonin oksidasyonunun ana ürünüdür. Melatoninin AFKM'ye dönüşümü sırasında hidroksil radikali bağlanmaktadır (Şekil 9). AMK'ye dönüşüm enzimatik olarak katalize edilirken potansiyel olarak daha fazla serbest radikal yok edilir. AMK sadece reaktif oksijen ürünlerini (hidroksil radikali, hidrojen peroksit, singlet oksijen) değil reaktif nitrojen ürünlerini de (nitrik oksit, peroksinitrit, peroksinitroz asit) bağlayarak antioksidan etkinlik sağlar (6,7,78).

Melatonin ayrıca indirekt etki ile çeşitli antioksidan enzimlerin etkinliğini artırırken (*glutasyon peroksidaz, glutasyon redüktaz, glukoz 6-fosfat dehidrojenaz, hemoperoksidaz/katalaz, süperoksit dismutazlar*), prooksidan enzimlerin (5-12 lipooksijenaz ve NOS) etkinliğini azaltmaktadır (6,7,72,77).

Melatonin iNOS inhibisyonu ile NO üretimini azaltarak belirgin prooksidan etkili peroksinitrit ve onun serbest radikal diğer ürünlerinin oluşumunu engeller (79). Adezyon molekülleri ve proinflamatuvar sitokinlerin (IL-6, IL-8, TNF- α) sentezinde azalmaya da neden olduğundan geniş spektrumlu antioksidan ve anti-inflamatuvar etkinlik gösterir (76,77).

Melatonin mitokondri elektron transport zincirinde kompleks I ve IV aktivitesini artırarak mitokondri membran potansiyelinin ve ATP sentezinin idamesini sağlar (80). Süperoksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen ürünleri mitokondri membran potansiyelini ve ATP sentezini etkileyerek membran geçirgenlik artışına ve proapoptotik sinyallere yol açmaktadır.

Melatonin hem direkt antioksidan etki gösterir hem de süperoksit dismutaz ve glutasyon redüktaz gibi antioksidanların düzeylerini artırarak antiapoptotik etkinliğe katkıda bulunur (7). Melatonin apoptozda görevli olan antiapoptotik protein Bcl-2 düzeyinde artış, Bax düzeyinde azalma ve kaspaz-3 enzim aktivitelerinde azalmaya neden olarak nöron apoptozunu engeller (78). Lipid ve protein peroksidasyonunu azaltarak hipoksik iskemik beyin hasarını önlemede etkili olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (81,82).



Şekil 9. Melatonin metabolizması sırasında hidrosil radikali bağlanması (6).

2.11. HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI HAYVAN MODELİ

Yedi günlük ratların beyni histolojik olarak gelişiminin 34-37. gestasyon haftasındaki insan fetüsü ya da yenidoğan beynine benzer. Serebral kortekste nöron tabakaları oluşmuş, germinal matrisks involüsyona uğramaya başlamış ve beyaz cevherde az miktarda miyelinizasyon tamamlanmıştır (83).

Rice ve ark. (84) immatür ratlarda hipoksik iskemik beyin hasarı modelini, erişkin ratlarda uygulanmış olan Levin yöntemini modifiye ederek oluşturmuşlardır. En sık kullanılan neonatal inme ve hipoksi-iskemi modelidir (32,85,86). Tek taraflı ana karotis arter bağlanmasını takiben nitrojen ile dengelenmiş %8 oranında oksijen solutulması ile ratlar sistemik hipoksiye maruz bırakılmaktadır. Rat yavruları üç saat ve daha fazla süre ile uygulanan hipoksiye rağmen hayatta kalabilmektedirler. Ana karotis arter bağlanmasına bağlı olarak **ipsilateral beyin hemisferinde, serebral korteks, subkortikal ve periventriküler beyaz cevher, striatum, talamus (bazal ganglionlar) ve hipokampus** da selektif nöron hasarından infarkta kadar ilerleyen lezyonlar gözlenmektedir (83).

GEREÇ VE YÖNTEM

Deneysel çalışmaya başlanmadan önce Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanı Araştırmaları Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı alındı. Deneysel aşamaları 26.12.2008-27.07.2009 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Mikrobiyolojik ve Histopatolojik çalışmalar Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin Tıbbi Mikrobiyoloji ve Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda tamamlandı.

Çalışmada doğdukları gün postnatal birinci gün kabul edilen ve postnatal 7. günde olan, ağırlıkları 9-11 gram arasında değişen, Wistar suşu her iki cinsten 60 adet yavru rat kullanıldı. Çalışma öncesinde deneklerin barındırılması ve bakımı Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları biriminde yapıldı. Denekler çalışma öncesinde ve sonrasında 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık, 20-22°C oda sıcaklığında barındırıldı. Deneysel Hayvanları birimi yardımı ile seçilen ve rastgele altı gruba ayrılan yavru ratlara annelerinin emzirdikleri göz önüne alınarak, anneleri tarafından öldürülmelerini (kanibalizm) önlemek amacıyla el ve eldivenle yapılacak işlemlerde mümkün olduğu kadar pamukla dokunuldu.

3.1. Çalışma Grupları

- **SHAM (n=10):** Hipoksi-iskemi uygulanmayıp, oda havası soluyan sadece boynun sol tarafına insizyon açılıp kapatılan grup
- **Hİ (n=10):** Hipoksi-iskemi uygulanıp intraperitoneal (i.p.) salin (%0.9 NaCl) uygulanan grup
- **PTX (n=10):** Hipoksi-iskemi uygulanıp pentoksifilin i.p. uygulanan grup
- **MEL (n=10):** Hipoksi-iskemi uygulanıp melatonin i.p. uygulanan grup
- **MEL+PTX (n=10):** Hipoksi-iskemi uygulanıp melatonin ve pentoksifilin i.p. uygulanan grup
- **ETANOL (n=10):** Hipoksi-iskemi uygulanıp %5 yoğunlukta etanol içeren salin uygulanan grup (melatonin çözücüsü)

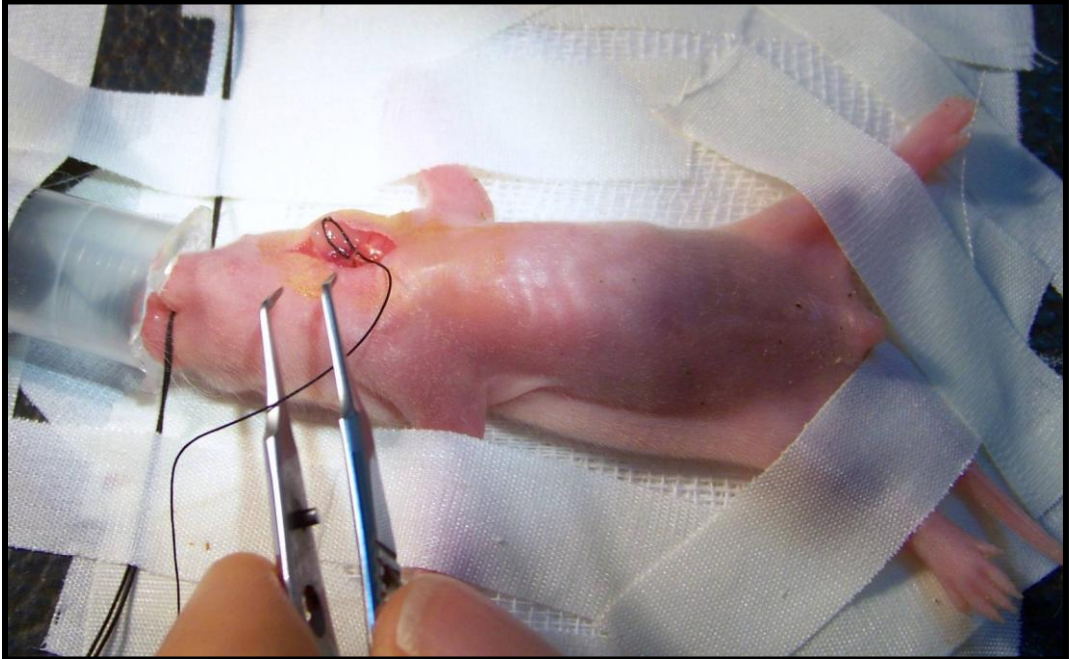
NO ölçümü ve histolojik çalışma için ayrı örnekler gerektiğinden gruplar eşit sayıda iki alt gruba ayrılarak değerlendirildi.

3.2. Hipoksik-İskemik Beyin Hasarının Oluşturulması

a. **Anestezi Başlangıcı:** Anestezi uygulaması için denekler, anestezi gazının giriş ve çıkış yapabileceği bölümleri bulunan cam fanusa yerleştirildi. Sisteme %100 O₂ içinde halotan %2,5 yoğunlukta verilerek anestezi uygulaması gerçekleştirildi. Halotan vaporizatöründen gelen gaz karışımı, anestezi gaz monitöründen (Anesthesia Gas Monitor, Type 1304, Brüel&Kjær, Denmark) izlenerek sabit tutuldu.

b. **Anestezi İdamesi:** Cerrahi işlem için deney hayvanı cam fanustan çıkarıldıktan sonra anestezi idamesi, deneğin ağız ve burnuna adapte olan bir maske ve ara bağlantı yardımıyla sağlandı. Oksijen ve halotan düzeyleri anestezi gaz monitöründen izlenerek sabit tutuldu.

c. **Cerrahi İşlem:** Deney hayvanlarının boyunları hiperekstansiyona getirilerek orta hattan vertikal olarak 0.5-1 cm'lik cilt, ciltaltı insizyonu yapıldı. Trakea bulunarak sol kommon karotid arter mikroskop altında 4/0 ipek ile askıya alındı, aynı ipek ile sol kommon karotid arter kalıcı olarak bağlandı (Resim 1). Mikroskop altında karotid arterde pulsasyon olmadığı doğrulandıktan sonra, insizyon yeri dikildi. Anestezi gaz girişi durdurulup deney hayvanının uyanması sağlandı.



Resim 1. Sol kommon karotid arterin bağlanması.

d. **Beslenme:** Deney hayvanı derlenmesi ve beslenmesi için annesinin yanına iki saat süreyle bırakıldı.

e. **Hipoksi düzeneği:** Her deney hayvanı için ayrı olmak üzere 450 ml hacimli gaz giriş ve çıkış sistemi bulunan cam kavanozlar kullanıldı. Cam kavanozlara nemlendirilmiş %92 saf nitrojen ve %8 oksijen girişi sağlandı. Hipoksik karışımın monitorizasyonu ortak giriş hattına bağlanan anestezik gaz monitörü ile izlenerek sabit tutuldu (Resim 2). Kavanoz çıkışlarında gaz çıkış basıncı 3-4 cmH₂O olacak şekilde sabit tutuldu. Tüm kavanozlar 37°C sabit sıcaklıkta su banyosuna yerleştirildi. Deney hayvanları 2.5 saat süre ile bu kavanozlarda hipoksik karışımı soludular. Hipoksik ortamda 2.5 saatlik süre tamamlanmadan solunumu duran deney hayvanlarına resüsitasyon uygulanmayıp çalışmadan çıkarıldılar.



Resim 2. Hipoksi düzeneği.

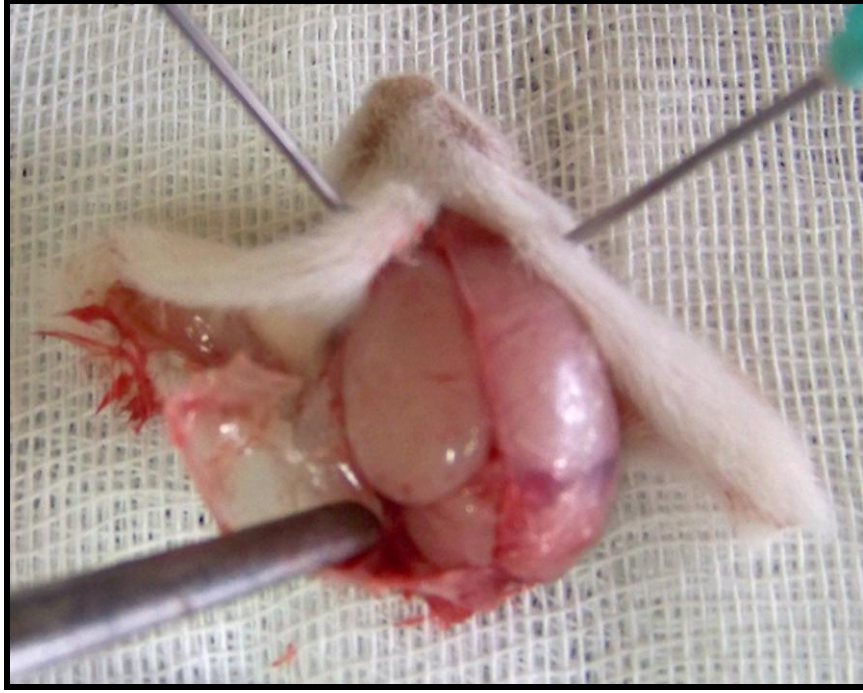
3.3. İlaçların Uygulanması:

Her ilaç için uygun intraperitoneal dozlar daha önceden yapılmış hayvan çalışmalarında belirtilen ve toksisitesi tolere edilebilen düzeydeki dozlara göre belirlendi (63,81,82). Plasebo olarak intraperitoneal yolla tek dozda %0.9'luk salin 0.1 cc porsiyonda hipoksi iskemisi sonrası uygulandı.

Hipoksik iskemik uygulama sonrası tedavi gruplarına pentoksifilin (Trental ampul, Hoechst Marion Roussel, Türkiye) 40 mg/kg/doz, intraperitoneal olarak tek doz ve melatonin (Sigma-Aldrich, ABD) 10 mg/kg/doz intraperitoneal olarak tek doz verildi.

Melatoninin Hazırlanması: Melatonin saf etanolde çözüldükten sonra %0.9'luk salin ile %5'lik etanol yoğunluğu elde edilinceye kadar dilüe edildi ve 0.1 cc porsiyonda i.p. uygulandı.

Denekler, hipoksi iske mi uygulamasından 72 saat sonra halotan anestezisi altında sakrifiye edildi. Beyin dokuları çıkarıldı (Resim 3 ve 4).



Resim 3. Beyin kabuğunun soyulması.



Resim 4. Beyin dokusunun çıkartılması.

3.4. Nitrik Oksit Değerlendirilmesi

a. **Beyin dokularının hazırlanması:** Sakrifikasyon sonrası beyin dokuları çıkarılarak sağ ve sol hemisferler birbirinden ayrıldı. Beyin dokuları buz soğukluğundaki cam pleytlere alındı ve ölçüm yapılana kadar -70°C 'de bekletildi. Beyin dokusu (sağ ve sol hemisferler ayrı ayrı değerlendirildi) örnekleri tampon solüsyon (0.1 M; pH 7.4 potasyum fosfat tampon, 20 mM EDTA (1:10; w/v)) eklendikten sonra ultrason homojenizatör (Bandelin Electronics, Berlin, Almanya) ile homojenize edildi. Daha sonra beş dakika 8000xdevirde santrifüj edilip supernatandan nitrik oksitin hızlı oksidasyonu sonucu oluşan nitrit ölçümü yapıldı.

b. **Nitrit ölçümü:** Ölçümlerin değerlendirilmesinde NaNO_2 standard olarak kullanıldı (128-64-32-16-8-4-2-1 μM). Supernatatlardan alınan 100 μL örnek, 50 μL Griess reagent I (naphtyletylenediamine dihydrochloride) ve 50 μL Griess II (o-phosphoric asitte sulfanilamid) mikrotitrasyon pleytinde (Maxisorb Immunoplate,

NUNC) karıştırılıp, 10 dakika oda ısısında bekletildi ve süre sonunda 540 nm dalga boyunda asorbans değerleri mikroyet okuyucu (Model 230S, Organon Technica, Hollanda) ile saptandı. Örneklerin ölçümleri standartların asorbans değerlerine göre hazırlanan standard eğrilere göre değerlendirildi (86,87).

3.5. Histopatolojik Değerlendirme

a. Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü

Tüm histopatolojik değerlendirmeler deney gruplarından habersiz araştırmacı tarafından yapıldı. Hipoksi-iskemi uygulamasından 72 saat sonra histopatolojik inceleme için ayrılan gruplara %10 formaldehit ile perfüzyon uygulandı. Beyin dokuları çıkarıldıktan sonra %10 formaldehit ve fosfat tampon içinde 3 gün bekletilerek fikse edildi. Beyin dokularından doku tükeninceye kadar 6 µm kalınlığında koronal kesitler alındı. Hipokampus CA1, CA2, CA3 ve Girus Dentatus (GD) bölgelerinin değerlendirilebilmesi amacıyla Rat Beyin atlası (The Rat Brain in stereotaxic Coordinates George Paxinos and Charles Watson) kullanılarak her beyin için bregmadan -2.2 mm, -2.84 mm ve -3.43 mm uzaklıktaki alanlardan alınan kesitler krezil mavisi boyası ile boyandı (88).

b. Krezil Mavisi Boyama Yöntemi

Kesitler 24 saat 60°C etüvde bekletildikten sonra 30 dakika sürelerle dört değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından %95'ten %60'a azalan derecelerde alkol serileri ile rehidrasyon sağlanarak distile suda beş dakika bekletildi. Krezil mavisi asetat solüsyonunda 20 dk tutuldu. Sorasında %96 alkolde yıkandıktan sonra ksilolde şeffaflaştırma yapıldı ve entellan ile kapatıldı.

c. Hipokampal Nöron Dansitesi Değerlendirme Yöntemi

Elde edilen preparatlar ışık mikroskopunda incelendi. Hipokampus CA1, CA2, CA3 ve Girus Dentatus (GD) bölgelerinin değerlendirilebilmesi amacıyla bregmadan -2.2 mm, -2.84 mm ve -3.43 mm uzaklıktaki alanlardan alınan kesitlerin görüntüleri ışık mikroskopundan (Olimpus BH-2, Japonya) JVC kamera (JVC TK-890E, Japonya) aracılığı ile bilgisayara aktarıldı. Elde edilen görüntüler İmaj Analiz programı (UTHSCA Image Tool for Windows Version 3.0) ile 15.000 µm² sayım çerçevesi ve monitörden 20xNikon lens yardımıyla değerlendirildi. Sayım çerçevesi 5 kez rastgele imaj analiz sistem monitörüne yerleştirildi ve hipokampus CA1, CA2,

CA3, Girus Dentatus bölgelerindeki nöron sayımı yapıp ortalaması alınarak hipokampal nöron dansitesi hesaplandı (87).

d. Apoptoz Değerlendirilmesi

Terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı dUTP nick end-labeling (TUNEL) yöntemi: Apoptotik hücrelere ait DNA hızla parçalanmakta olduğundan hücre içinde kromatin ağ bütünlüğü kaybolur ve 3'-OH içeren DNA parçacıklarının sayısı artar. Hücrede terminal deoksinükleotidil transferaz enzimi (TdT) ortama eklenen biotin-dUTP'yi parçalanmış DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına taşır. Biotin ile işaretlenmiş DNA parçacıkları FITC gibi floresans veren bir madde ile bağlanmış avidin eklendiğinde görünür hale gelir. Tek tek hücrelerde apoptozu gösterdiğinden hücre kültürlerinde ve doku kesitlerinde duyarlı bir testtir (89).

Apoptoz giden hücre çekirdeklerinde DNA fragmentasyonunu saptamak amacıyla doku kesitlerine TUNEL yöntemi ile boyama yapıldı. Bu yöntem için "in situ cell death detection TUNEL system, POD" ticari kiti (Roche, Almanya) kullanıldı. Kesitler boyama için bir gece etüvde 60°C de bekletildikten sonra üç değişim ksilen ile deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi. Ardından azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak kesitler distile suda beş dakika bekletildi. Daha sonra kesitler 15 dk 20 µg/ml proteinaz K ile işleme sokulup, distile su ile beş dakika yıkandı. Doku endojen peroksidazı inhibe etmek amacıyla metanol içinde %0.3 H₂O₂ (Merck, Almanya) ile beş dakika ve %0.1 sodyum sitrat içinde %0.1 Triton X-100 ile buz içinde iki dakika tutulduktan sonra kesitler üç defa beşer dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra kesitler TdT-enzimi ile 37°C de 60 dakika enkübe edildi. Tampon solüsyon ile oda sıcaklığında 10 dk yıkanan kesitler anti streptavidin-peroksidaz ile 37°C de 30 dakika enkübe edildi. Tampon solüsyon ile yıkama sonrası kesitler TUNEL reaksiyonunun görünürlüğünü sağlamak amacıyla diaminobenzidin (DAB, Roche Diagnostics, Almanya) solüsyonuyla oda sıcaklığında on dakika bekletilerek boyandı. Distile su ile yıkandıktan sonra Harris hemotoksilen ile zemin boyaması yapılan kesitler %80 ve %95'lik alkollerle dehidratasyon ve 30'ar dakika üç değişim ksilen ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı. Kantitatif analiz için hipokampus CA1, CA2, CA3 ve Girus Dentatus bölgelerinde TUNEL pozitif hücreler 14 inç monitöre bağlı Olympos (BH-2, Japonya) mikroskopla x200 büyütmede sayıldı. Apoptotik indeksi saptayabilmek amacı ile hipokampus CA1,

CA2, CA3 ve Girus Dentatus bölgelerinde 1000 hücre sayıldı. Apopitotik morfolojideki (yoğunlaşmış kromatin ve sitoplazma, pozitif TUNEL reaksiyonu) hücreler yüzde ile ifade edildi (87,90).

3.6. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

Bu çalışmanın tüm istatistiksel analizleri “SPSS 14.0” (Statistical Package for Social Science, version 14.0) bilgisayar programı kullanılarak yapıldı.

Ölçümler sonunda elde edilen verilerin normal dağılıma uygunluğu “Kolmogorov-Smirnov” testi ile incelendi. Her bir grup için değişkenler normal dağılım gösterdiğinden değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri aritmetik ortalama (\pm) ve standart sapma (S.D.) olarak ifade edildi.

Grupların hipokampal nöron dansitesi, apopitotik indeks ve ortalama NO düzeyleri parametreleri arasındaki istatistiksel karşılaştırmada “tek yönlü ANOVA testi” kullanıldı.

Sağ ve sol hemisferlerin NO düzeyleri yönünden karşılaştırılmasında “eşleştirilmiş t testi” kullanıldı.

Hipokampal nöron dansitesi değişkenlerinin varyansları homojen olduğu için çoklu karşılaştırma testi olarak “Tukey HSD testi” kullanıldı.

Apopitotik indeks ve sağ ve sol hemisfer NO değişkenlerinin varyansları homojen olmadığından bu değişkenler için çoklu karşılaştırma testi olarak “Tamhane testi” kullanıldı, $p < 0.05$ 'i sağlayan sonuçlar anlamlı olarak ifade edildi.

BULGULAR

4.1. Histopatolojik Bulgular

Sham grubu ile karşılaştırıldığında Hİ grubunda hipokampus CA1, CA2, CA3 ve GD bölgesindeki nöron sayılarında anlamlı azalma olduğu saptandı ($p<0.001$) (Tablo I).

4.1.1 Melatonin tedavisinin nöron dansitesine olan etkisi

Hipoksik iskemik beyin hasarı sonrası melatonin uygulaması ile hipokampus CA2 bölgesindeki nöron sayılarının hipoksi iskemi uygulanan grup ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde korunduğu saptandı ($p<0.05$). Hipokampal CA1, CA3 ve GD bölgelerindeki nöron sayıları arasında istatistiksel anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).

Melatonin çözücüsü etanolün uygulandığı ETANOL grubu, Hİ grubu ile karşılaştırıldığında hipokampus hücre sayılarında istatistiksel anlamlı farklılık yoktu ($p>0.05$) (Tablo I).

Tablo I. Yenidoğan ratlarda hipoksik iskemik beyin hasarında melatonin tedavisinin hipokampus nöron dansitesine etkisi				
	Hipokampus Nöron Dansitesi (Ortalama \pm standart sapma)			
	CA1	CA2	CA3	GD
1. SHAM (n=5)	35.50 \pm 0.98	34.82 \pm 1.48	26.78 \pm 0.86	65.32 \pm 1.41
2. Hİ (n=5)	23.92 \pm 1.27	25.24 \pm 1.05	20.82 \pm 0.63	53.70 \pm 1.30
3. MEL (n=5)	26.18 \pm 0.93	28.18 \pm 0.87	21.50 \pm 0.70	56.04 \pm 1.45
4. ETANOL (n=5)	24.52 \pm 1.36	25.24 \pm 0.77	20.44 \pm 0.82	53.24 \pm 1.87
<i>P değerleri</i>				
1 ve 2	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
2 ve 3	a.d.	0.003	a.d.	a.d.
2 ve 4	a.d.	a.d.	a.d.	a.d.
3 ve 4	0.015	0.003	a.d.	0.022
a.d. = Anlamlı değil ($p>0.05$)				

4.1.2 Pentoksifilin tedavisinin nöron dansitesine olan etkisi

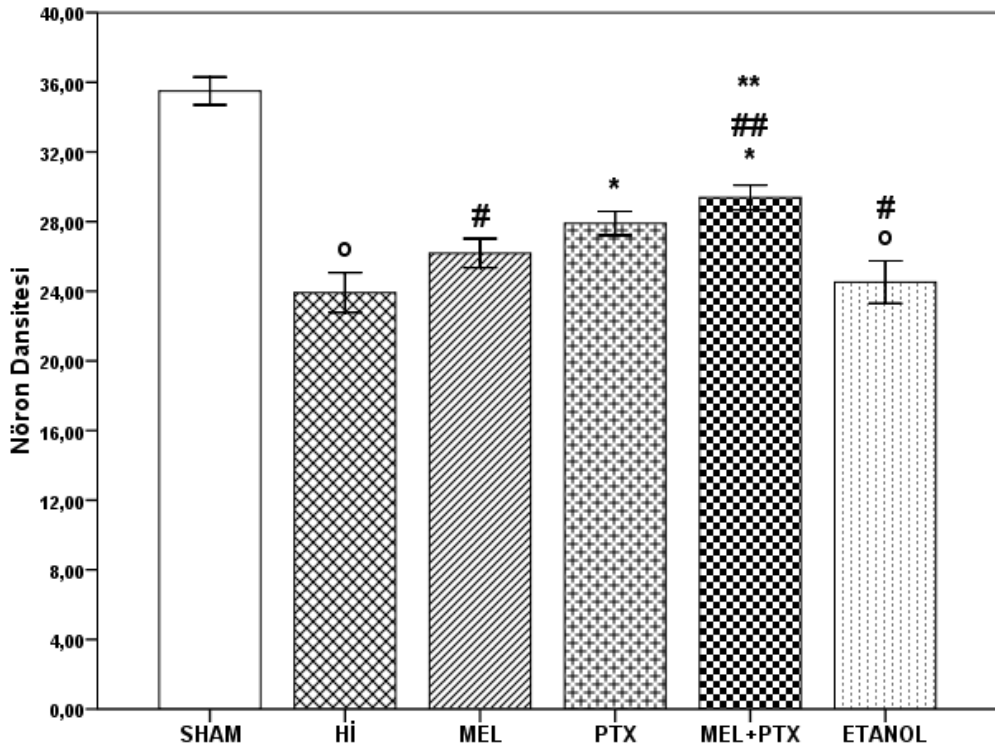
Pentoksifilin uygulaması ile hipokampus CA1, CA2, CA3 ve GD bölgesindeki nöron sayılarının Hİ grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde korunduğu saptandı ($p<0.001$) (Tablo II).

Tablo II. Yenidoğan ratlarda hipoksik iskemik beyin hasarında pentoksifilin tedavisinin hipokampus nöron dansitesine etkisi				
	Hipokampus Nöron Dansitesi (Ortalama ± standart sapma)			
	CA1	CA2	CA3	GD
1. SHAM (n=5)	35.50±0.98	34.82±1.48	26.78±0.86	65.32±1.41
2. Hİ (n=5)	23.92±1.27	25.24±1.05	20.82±0.63	53.70±1.30
3. PTX (n=5)	27.90±0.76	30.02±0.99	22.90±0.62	57.64±0.40
<i>P değerleri</i>				
1 ve 3	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
2 ve 3	<0.001	<0.001	0.002	0.001

4.1.3 Melatonin ve pentoksifilin kombine tedavisinin nöron dansitesine olan etkisi

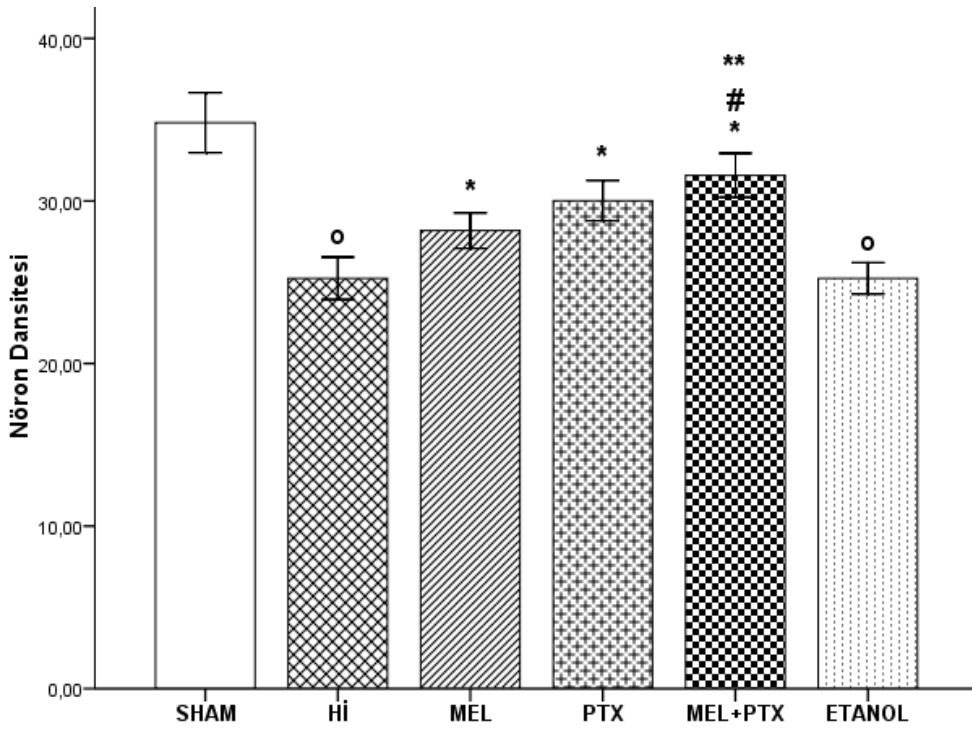
MEL+PTX grubu, Hİ grubu ile karşılaştırıldığında hipokampal hücre sayılarında istatistiksel anlamlı korunma saptandı ($p<0.001$). Kombine tedavi grubu nöron sayıları MEL grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanırken ($p<0.05$), PTX grubu ile GD hücre sayıları dışında farklılık yoktu ($p>0.05$) (Tablo III).

Tablo III. Yenidoğan ratlarda hipoksik iskemik beyin hasarında melatonin ve pentoksifilin kombine tedavisinin hipokampus nöron dansitesine etkisi				
	Hipokampus Nöron Dansitesi (Ortalama ± standart sapma)			
	CA1	CA2	CA3	GD
1. SHAM (n=5)	35.50±0.98	34.82±1.48	26.78±0.86	65.32±1.41
2. Hİ (n=5)	23.92±1.27	25.24±1.05	20.82±0.63	53.70±1.30
3. MEL+PTX (n=5)	29.38±0.79	31.58±1.09	23.84±0.67	60.36±0.55
4. MEL (n=5)	26.18±0.93	28.18±0.87	21.50±0.70	56.04±1.45
5. PTX (n=5)	27.90±0.76	30.02±0.99	22.90±0.62	57.64±0.40
<i>P değerleri</i>				
1 ve 3	<0.001	0.001	<0.001	<0.001
2 ve 3	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
3 ve 4	0.001	0.001	<0.001	<0.001
3 ve 5	a.d.	a.d.	a.d.	0.028
4 ve 5	a.d.	a.d.	a.d.	a.d.
a.d.= Anlamlı değil ($p>0.05$)				



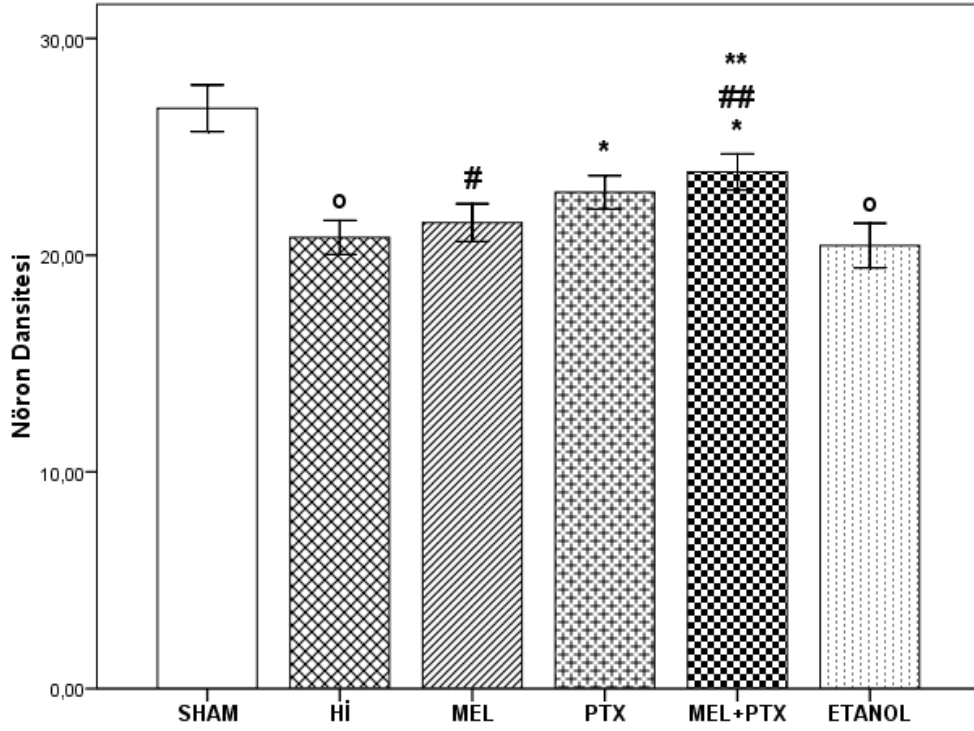
Şekil 10. Grupların Hipokampus CA1 Bölgesindeki Ortalama Nöron Sayıları

o SHAM grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$ # MEL grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$
 # HI grubu ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$ ** PTX grubu ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$
 * HI grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$



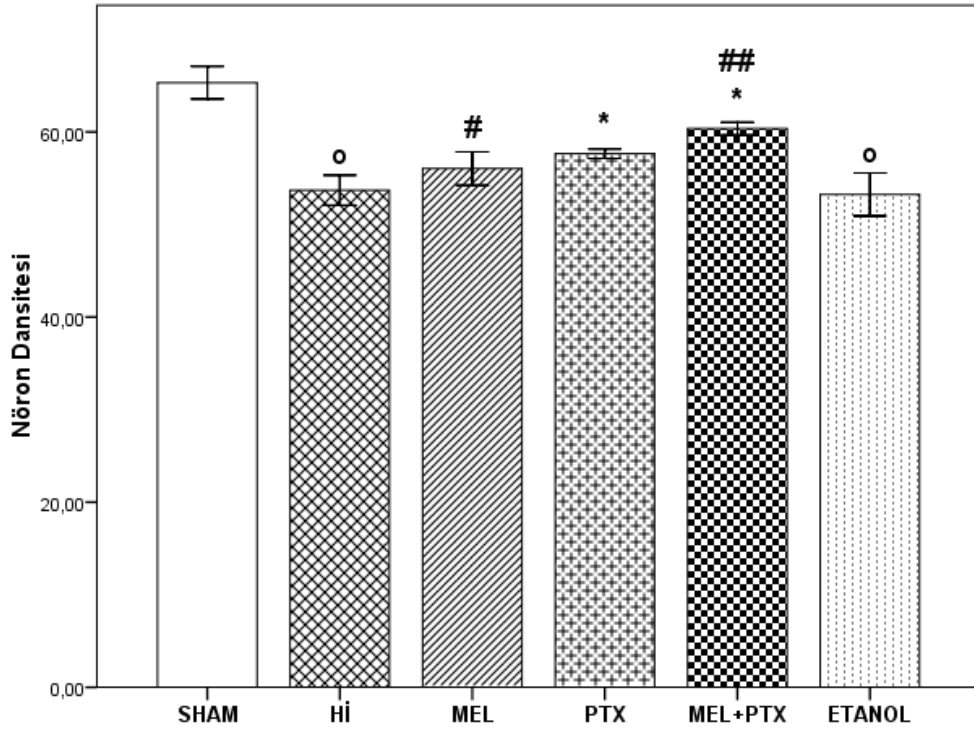
Şekil 11. Grupların Hipokampus CA2 Bölgesindeki Ortalama Nöron Sayıları

o SHAM grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$ # MEL grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$
 * HI grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$ ** PTX grubu ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$



Şekil 12. Grupların Hipokampus CA3 Bölgesindeki Ortalama Nöron Sayıları

o SHAM grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$ ## MEL grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$
 # Hİ grubu ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$ * PTX grubu ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$
 * Hİ grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$



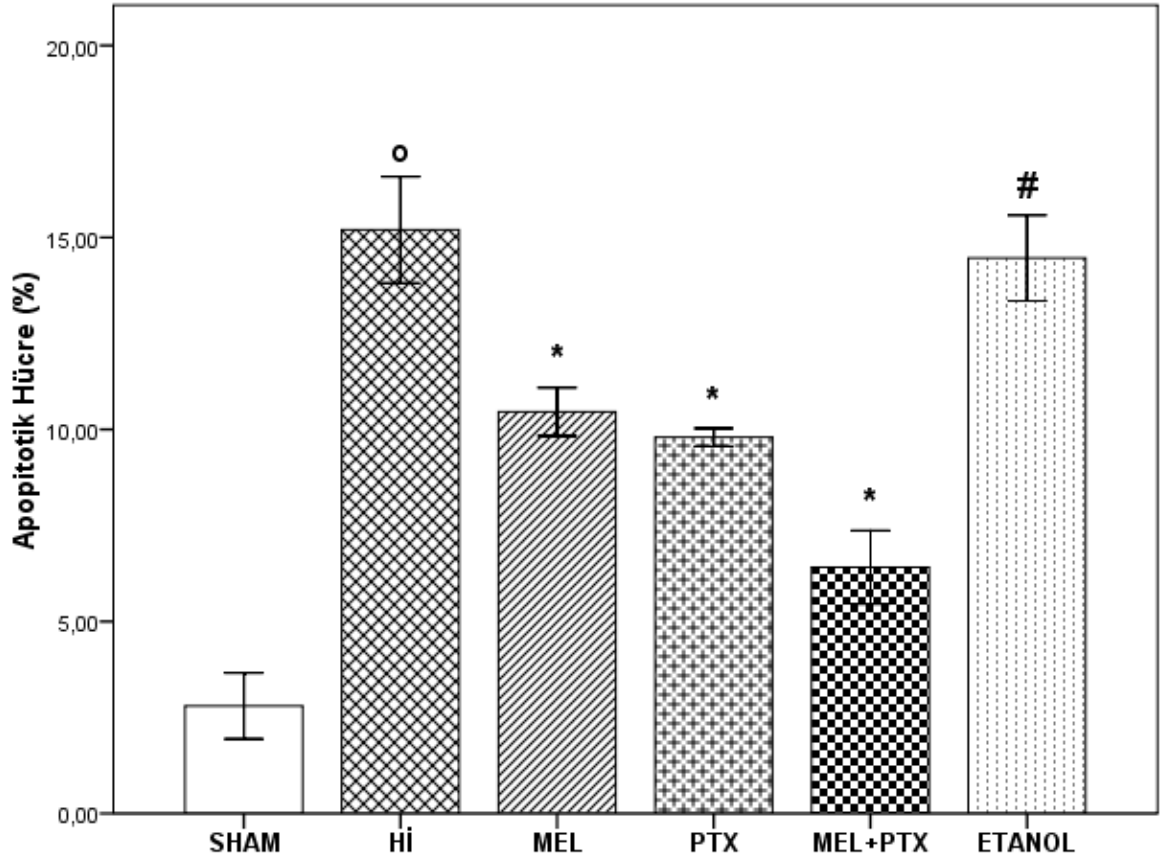
Şekil 13. Grupların Hipokampus GD Bölgesindeki Ortalama Nöron Sayıları

o SHAM grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$ * Hİ grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$
 # Hİ grubu ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$ ## MEL ve PTX grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$

4.1.4 Grupların Apoptotik Hücre Sayılarına etkileri

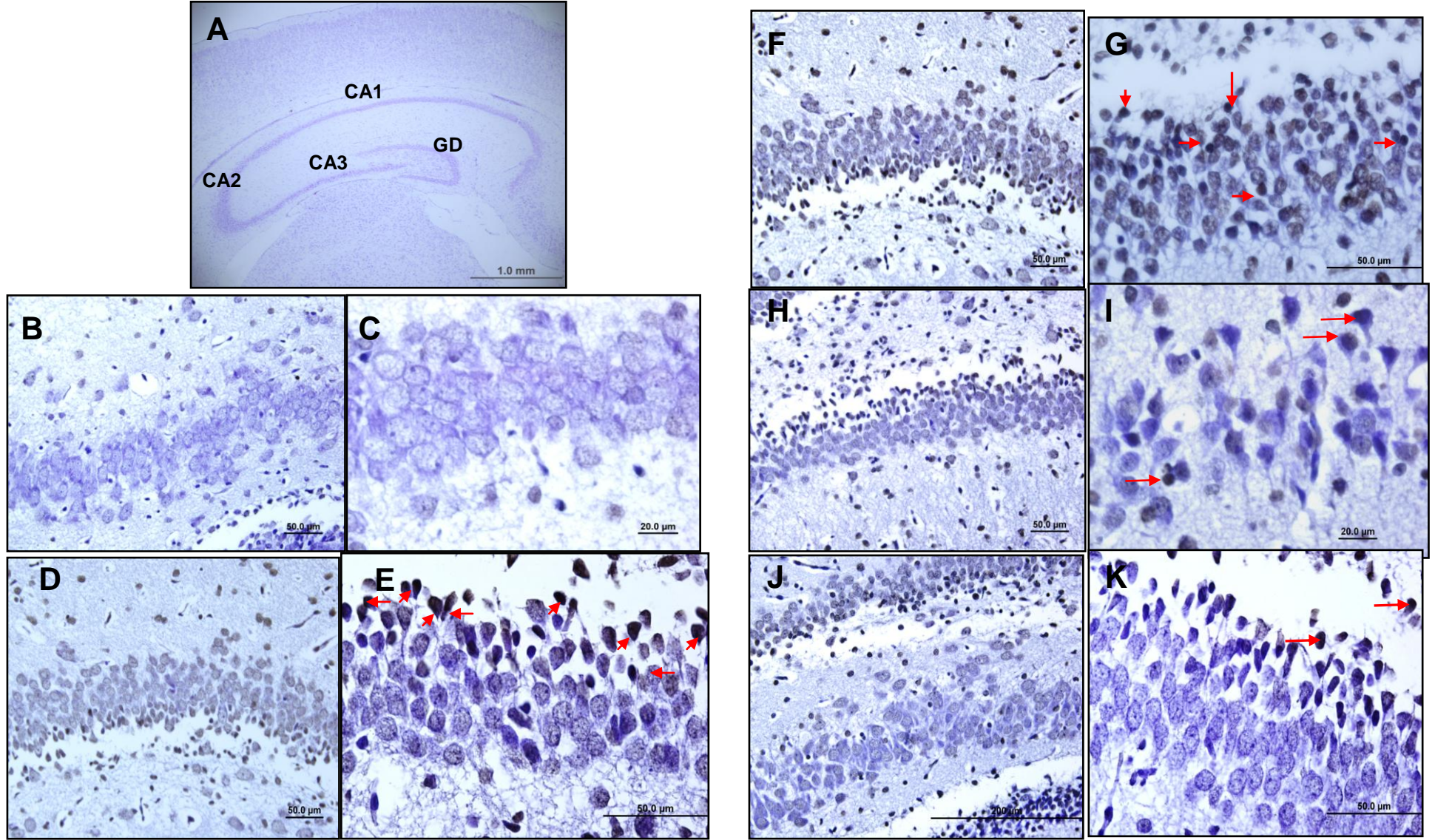
Hİ grubunda apoptotik hücre yüzdesi 15.19 ± 1.11 saptandı. SHAM grubu apoptotik hücre yüzdesi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı artmıştı ($p < 0.001$) (Tablo IV). ETANOL ve Hİ grupları arasında apoptotik hücre oranları yönünden farklılık saptanmadı ($p > 0.05$). MEL+PTX grubunda apoptotik hücre oranları hem Hİ hem de MEL ve PTX grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde azalmış olarak bulundu ($p < 0.05$) (Şekil 14) (Resim 5).

Tablo IV. Grupların TUNEL pozitif boyanan apoptotik hücre oranları	
	Apoptotik Hücre Yüzdesi (Ortalama \pm standart sapma)
1. SHAM (n=5)	02.80 \pm 0.69
2. Hİ (n=5)	15.19 \pm 1.11
3. MEL (n=5)	10.46 \pm 0.50
4. PTX (n=5)	09.79 \pm 0.18
5. MEL+ PTX (n=5)	06.41 \pm 0.76
6. ETANOL (n=5)	14.46 \pm 0.89
<i>P değerleri</i>	
1 ve 2	<0.001
2 ve 3	0.003
2 ve 4	0.005
2 ve 5	<0.001
2 ve 6	a.d.
3 ve 4	a.d.
3 ve 5	<0.001
3 ve 6	0.001
4 ve 5	0.006
a.d.= Anlamlı değil ($p > 0.05$)	



Şekil 14. Grupların TUNEL Pozitif Boyanan Apopitotik Hücre Oranları

- o SHAM grubu ile Hİ grubunun karşılaştırılması ($p=0.0001$)
- # Hİ grubu ile ETANOL grubunun karşılaştırılması ($p>0.05$)
- * Hİ grubu ile MEL, PTX ve MEL+PTX gruplarının karşılaştırılması ($p<0.05$)



Resim 5. Gruplara göre TUNEL tekniği ile boyanmış olan Hipokampus kesitleri (TUNEL pozitif hücreler ok ile gösterilmiştir). (A) Krezil mavisi ile boyanmış beyin kesitinde hipokampus CA1, CA2, CA3 ve GD bölgeleri gösterilmiştir. (B-C) SHAM grubunda TUNEL pozitif hücre izlenmedi (40x ve 100x büyütme). (D-E) H1 grubunda TUNEL pozitif hücreler (40x ve 100x büyütme). MEL grubu (F-G), PTX grubu (H-I) ve MEL+PTX grubuna (J-K) ait görüntülerde TUNEL pozitif hücre yoğunluğunda azalma görülmekte (40x ve 100x büyütme).

4.2. Nitrik Oksit Düzeyleri

SHAM grubu deneklerin sağ ve sol hemisfer ortalama nitrit düzeyleri arasında farklılık yoktu ($p>0.05$). Hİ ve ETANOL grubu deneklerin sol (bağlı) hemisfer nitrit düzeyi, sağ hemisfer ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmıştı (Tablo V).

Hİ grubu deneklerin sağ ve sol serebral hemisferlerinin ortalama nitrit düzeyleri SHAM grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmış saptandı ($p<0.05$).

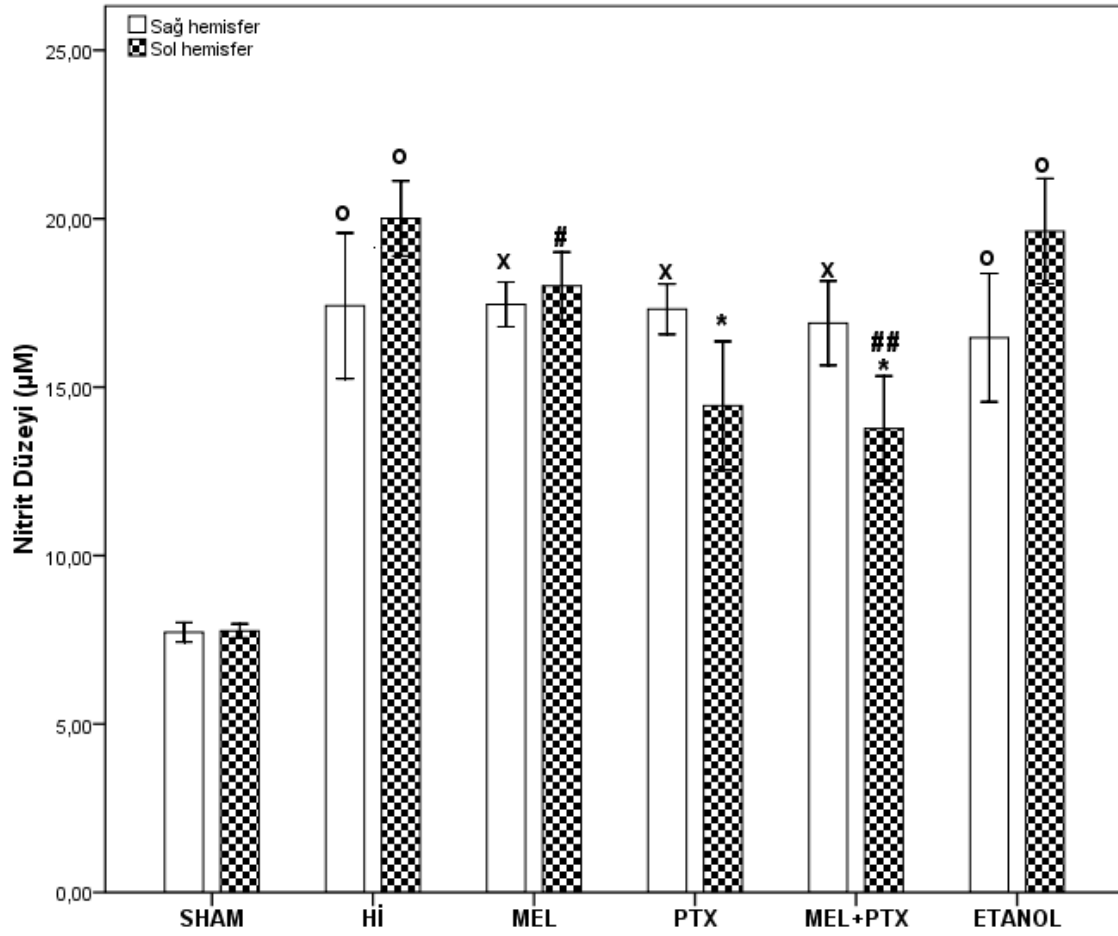
MEL, PTX ve MEL+PTX grubu olguların sağ hemisfer ortalama nitrit düzeyleri, Hİ grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık yoktu ($p>0.05$).

PTX ve MEL+PTX grubu sol hemisfer ortalama nitrit düzeyleri, sağ hemisferleri ve Hİ grubu sol hemisferi ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalmış saptandı ($p<0.05$).

MEL grubunda sol hemisfer nitrit düzeyleri Hİ grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık izlenmedi ($p>0.05$).

MEL+PTX grubu deneklerin sol hemisfer nitrit düzeyleri PTX grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$) (Şekil 15).

Tablo V. Grupların sağ ve sol serebral hemisferlerde ölçülen ortalama nitrit düzeyleri		
	Nitrit Düzeyleri (μM) (Ortalama \pm standart sapma)	
	Sağ Hemisfer	Sol Hemisfer
1. SHAM (n=5)	07.71 \pm 0.23	07.76 \pm 0.16
2. Hİ (n=5)	17.41 \pm 1.74	20.00 \pm 0.89*
3. MEL (n=5)	17.45 \pm 0.53	18.00 \pm 0.80
4. PTX (n=5)	17.31 \pm 0.60	14.44 \pm 1.53*
5. MEL+ PTX (n=5)	16.90 \pm 1.00	13.77 \pm 1.25*
6. ETANOL (n=5)	16.46 \pm 1.53	19.63 \pm 1.25*
<i>P değerleri</i>		
1 ve 2	0.003	<0.001
2 ve 3	a.d.	a.d.
2 ve 4	a.d.	0.005
2 ve 5	a.d.	0.001
2 ve 6	a.d.	a.d.
3 ve 5	a.d.	0.006
3 ve 6	a.d.	a.d.
4 ve 5	a.d.	a.d.
a.d.= Anlamlı değil ($p>0.05$)		
* Sağ ve sol hemisferlerin karşılaştırılması, $p<0.05$		



Şekil 15. Grupların sağ ve sol serebral hemisferlerde ölçülen ortalama nitrit düzeyleri

- o SHAM grubu ile HI ve ETANOL grubunun karşılaştırılması ($p < 0.05$)
- x HI grubu ile MEL, PTX ve MEL+PTX gruplarının karşılaştırılması ($p > 0.05$)
- # HI grubu ile MEL grubunun karşılaştırılması ($p > 0.05$)
- * HI grubu ile PTX ve MEL+PTX grubunun karşılaştırılması ($p = 0.005$, $p = 0.001$)
- ## PTX grubu ile MEL+PTX grubunun karşılaştırılması ($p > 0.05$)

HI uygulaması sonrası HI, PTX ve ETANOL gruplarından birer deney hayvanı üç günlük deney süresini tamamlayamadan eksitus kabul edildi. Bu olgular histopatolojik ve mikrobiyolojik çalışmaya dahil edilmediler.

TARTIŞMA

Hipoksik iskemik beyin hasarı neonatolojide meydana gelen gelişmelere rağmen halen kalıcı nörolojik sekellere yol açan önemli sorunlardan biridir. Hipoksik iskemik olay ile başlayan süreç yeniden canlandırma sonrası reperfüzyon hasarı ile ilerleyerek hücre ölümüne yol açmaktadır (8,19).

Hipoksik iskemik ensefalopati tedavisinde genel yaklaşım yeterli ventilasyonun sağlanması ve serebrovasküler perfüzyonun sürdürülmesidir. Buna yönelik olarak hastaların asit-baz, sıvı-elektrolit dengesinin korunması, kan basıncı ve kan glukoz düzeylerinin normal sınırlarda tutulması, nöbet ve beyin ödemi gibi komplikasyonların tedavisine yönelik girişimler uygulanmaktadır (2,19). Ancak hipoksik iskemik olay başlangıcı ile hücre ölümü arasındaki “terapötik pencere” olarak adlandırılan dönemde hasarlayıcı mekanizmaları engelleyerek nöron koruyucu etkinlik gösterecek tedavi basamağı halen netlik kazanmamıştır. Serbest radikal bağlayıcılar, eksitatör aminoasit antagonistleri, kalsiyum kanal blokerleri, nitrik oksit sentaz inhibitörleri gibi farmakolojik yöntemler ve hafif hiperkapni, lokal beyin hipotermisi gibi farmakolojik olmayan yöntemlerin ciddi beyin hasarını önlediğine yönelik güçlü veriler olmasına rağmen temel tedavi basamağı olarak kullanımları tartışılmaktadır (29,41).

Hipoksik iskemik olayı takiben hücreye oksijen ve glukoz sunumunun azalması ile bir dizi biyokimyasal olay tetiklenir. Hücrede enerji yokluğu sonucunda hücre içi Ca^{++} yoğunluğunu düzenleyen mekanizmalar aksar. Glutamat salınımı ile uyarılan NMDA reseptörleri hücre içi Ca^{++} düzeylerini daha da artırarak lipaz, proteaz ve endonükleaz gibi enzimlerin aktive olmasına neden olur (2). Bu süreçte anaerobik metabolizma sırasında üretilen hipoksantin yıkımı sırasında oluşan serbest radikaller hipoksik iskemik olayın ana hasarlayıcı bileşenlerindedir. Araşidonik asitten prostoglandin ve lökotrien sentezi sırasında oluşan süperoksit radikali de reperfüzyon fazında yüksek düzeyde reaktif hidroksil radikale dönüşerek hücre hasarına neden olmaktadır (23). Serbest radikallerin biyokimyasal olarak yüksek düzeyde reaktif moleküller olmasının yanında yenidoğan beyni yüksek lipid içeriği, düşük antioksidan enzim kapasitesi ve yoğun mitokondriyal oksidatif fosforilasyon kullanımı nedeni ile oksidatif hasara karşı daha duyarlıdır (9). Tüm bu nedenlerle

serbest radikallere bağlı gelişen beyin hasarını önlemeye yönelik çalışmalar daha yoğunluktadır.

Çalışmada gcl antioksidan etkinliği olan melatonin ve süperoksit oluşumunu azaltan pentoksifilininin nöron koruyucu etkisi araştırıldı.

Pentoksifilin bir ksantin türevi ve spesifik olmayan tip 4 fosfodiesteraz inhibitörüdür. Kırmızı hücre deformabilitesini artıran, trombosit ve eritrosit agregasyonunu azaltan bir ilaçtır. Periferik arter hastalığı ve intermittan kladikasyo tedavisi için uzun zamandır kullanılmaktadır. Fibrinojen düzeyleri ve plazma viskozitesini azaltarak mikrosirkülasyonu ve doku oksijenizasyonunu artırdığı bilinmektedir (5,51).

Pentoksifilin mononükleer fagositler, nötrofil, damar düz kası, endotel ve mikroglia hücrelerinde hücre içi cAMP artışına yol açarak etkinlik gösterir. Nötrofillerde cAMP artışı fagositik aktivitede, süperoksit anyonu oluşumunda ve lizozomal enzim salınımında azalmaya neden olur. IL-1, IL-10 ve TNF-'nın proinflamatuvar etkinliğini inhibe eder (50-54). Kan beyin bariyerini hızla geçen pentoksifilin beyinde adenzin reseptör antagonist etkisi ile cAMP düzeylerini artırır. Protein kinaz C tarafından nükleer faktör kB aktivasyonunu engelleyerek TNF- üretimini azaltır (62). Makrofaj aktivasyonunun inhibisyonu, inflamatuvar sitokin üretimini azaltma ve endotel-lökosit adezyonuna engel olma gibi birbirini tamamlayan antiinflamatuvar ve antiapoptotik etki ile pentoksifilinin nöron hasarını azalttığı düşünülmektedir (51,59).

Erişkin ratlarda kafa travması modelinde hasarlı beyin doku hücrelerinden salınan sitokinlerin ve özellikle artmış TNF- düzeyinin serebral dem, nörolojik fonksiyon bozukluğu ve hipokampal hücre kaybına yol açmasından hareketle Shohami ve ark. (48) kafa travmasından hemen sonra uyguladıkları pentoksifilinin etkisini değerlendirmişler, TNF- seviyesinin azaldığını ve hipokampal CA2 ve CA3 bölgelerinde hücre sayılarının (istatistiksel anlamlı olmasa da) korunduğunu saptamışlardır. Bu alışma, erişkin ratlarda ve kafa travması modelinde yapılmış olması nedeni ile yenidoğan dönemini ve hipoksik iskemik süreci yansıtmamaktadır. Hİ süreçte hücre ölümünde apoptoz önemli bir mekanizmadır. TNF- tarafından uyarılan TNFR1 ekstrensek apoptotik yolağı başlatmaktadır (38). Lavine ve ark. (91) erişkin rat beyin Hİ modelinde anti TNF- antikoru kullanarak kortikal ve subkortikal

hasarlanmada azalma olduğunu göstermişlerdir. Apoptoz tetikleyicisi TNF- α üretimini azaltan pentoksifilin nöron koruyucu etkinlik sağlamaktadır. Tavşanlarda spinal kord iskemi reperfüzyon modelinde Savaş ve ark. (66) pentoksifilin uygulamasının TNF- α ve lipid peroksidasyon ürünlerinin düzeyini azalttığını göstermişlerdir. Benzer şekilde Zhu ve ark. (92) da aynı model üzerinde uygulanan pentoksifilin spinal kord TNF- α üretimini ve TUNEL pozitif boyanmış apoptotik nöron sayılarını anlamlı düzeyde azalttığını vurgulamışlar.

Çalışmada pentoksifilin tedavisi ile Hİ beyinde apoptotik hücre sayılarında anlamlı düzeyde azalma saptamamız pentoksifilin TNF- α inhibisyonu üzerinden antiapoptotik etkinliği ile açıklanabilir. Hipokampus nöron sayılarının Hİ grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde yüksek olması nöronların hasarlanmadan korunduğunu göstermektedir. Pentoksifilin nöron koruyucu özelliği proinflamuar sitokin üretimini, lipid peroksidasyonunu ve serbest radikal oluşumunu azaltıcı etkileri ile açıklanabilir.

Pentoksifilin ile yapılmış iskemi çalışmaları bulunmakla beraber yenidoğanlarda yapılmış hipoksi iskemi çalışmaları çok az sayıdadır. Erişkin ratlarda yapılmış olan iskemi çalışmalarında pentoksifilin hem iskemi öncesi hem de iskemi sonrasında uygulandığında nöron koruyucu etkinliğinden bahsedilmektedir. Şirin ve ark. (65) ratlarda geçici global beyin iskemi modelinde pentoksifilini hipoksi öncesinde uygulamışlar ve histopatolojik beyin hasarında azalma, nörolojik fonksiyonlarda korunma olduğunu göstermişlerdir. Evans ve ark. (93) erişkin ratlarda tek taraflı serebral iskemi modelinde iskemi öncesinde kortikal olarak uyguladıkları pentoksifilin ve kafeinin iskemiye yanıt olarak azalan somato sensoryal uyarılmış potansiyel amplitüdlere olan etkisini değerlendirmişlerdir. Proflaktik uygulama ile amplitüdlere düşüşün daha az ve normale dönüşün daha hızlı olduğunu göstererek pentoksifilin nöron koruyucu etkisine dikkat çekmişlerdir. Pentoksifilini ratlarda geçici fokal beyin iskemi modelinde iskemiden hemen sonra uygulayan Vakili ve ark. (94) kortikal infarkt alanlarında azalma olduğunu saptamışlar ve iskemiden bir ve üç saat sonra uygulanan pentoksifilin de infarkt alanlarını azalttığını belirtmişlerdir.

Yenidoğanlarda hipoksik iskemik hasar riski yüksek olguları önceden tanımlayıp proflaktik tedavi uygulamak her zaman mümkün olmamaktadır. Hİ olay sonrası saatlerle ifade edilen terapötik pencere döneminde yapılan girişimlerin klinik

olarak daha kolay uygulanabileceğinden hareketle Çalışmada pentoksifilin ve melatoninin Hİ olaydan hemen sonra kurtarma tedavisi olarak uyguladık.

Yenidoğan ratlarda Hİ beyin hasarı modelinde pentoksifilin etkinliğini araştıran az sayıda çalışma mevcut. Bu çalışmalardan birinde Eun ve ark. (63) yedi günlük ratlarda HİE modelinde pentoksifilini 25-75-150 mg/kg/doz aralıklarında Hİ öncesi ve hemen sonrasında uygulamışlar. Yüksek doz (150 mg/kg/doz) uygulamada mortalite %100 olarak belirtilmiş, düşük doz (25 mg/kg/doz) uygulamada ise histopatolojik olarak nöron koruyucu etkinlik sağlanamamıştır. Ara doz (75 mg/kg/doz) uygulaması ile mortalite oranlarında düşme ve infarkt alanında azalma izlenmiştir. Bu verilerden hareketle çalışmalarının diğer ayağında pentoksifilini 40 mg/kg/doz olarak Hİ sonrası kurtarma tedavisi olarak uygulamışlardır. Bu dozun yüksek doz pentoksifilin rejimleri ile karşılaştırıldığında mortaliteye etkisinin daha az olduğu, kortikal infarkt alanını azalttığı ancak hipokampal ve striatum hasarına etkin olmadığını belirtmişlerdir. Çalışmada pentoksifilini kurtarma tedavisi olarak Hİ sonrası yan etkilerin az görüldüğü 40 mg/kg dozda uyguladık. Eun ve ark.'nın çalışmasından farklı olarak çalışmamızda pentoksifilinin tek doz uygulama ile hipokampus apoptotik hücre sayısını azaltıp, CA1, CA2, CA3 ve GD bölgelerinde nöron sayılarını koruyarak hipokampus hasarını azalttığı sonucuna vardık.

Hipoksik iskemik beyin hasarında NO aracılı nöronal hücre ölümü aşırı eksprese edilen nNOS ve iNOS aracılığıyla gerçekleşmektedir. SSS nöronlarında NMDA reseptörleri ile nNOS yapısal ve fonksiyonel birliktelik göstermektedir (15,16). Hipoksik iskemik hasarda glutamat NMDA reseptörüne bağlandıktan sonra kalsiyum artışı ile nNOS'u aktive ederek NO üretimine neden olmaktadır (31). Demir ve ark. (95) ratlarda retinal iskemi reperfüzyon modelinde pentoksifilini kurtarma tedavisi olarak uyguladıklarında, doku NO düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde korunduğunu belirtmişlerdir. Pentoksifilinin serbest oksijen radikallerini ve NO bağlayan süperoksit anyonunu azaltıcı etkisi ile NO düzeylerinde korunmaya neden olduğu yorumunda bulunmuşlardır.

Trajkoviç ve ark. (96) rat astrosit ve makrofaj hücre kültürlerinde sitokinlerce uyarılmış NO düzeylerine pentoksifilinin etkilerini araştırmışlardır. Pentoksifilinin makrofaj hücrelerinde NO üretimini azaltırken, astrositlerde artırdığı sonucuna varmışlardır. Astrositlerde pentoksifilin iNOS enziminin mRNA

düzelelerinde artışa yol açarak, iNOS aktivasyonuna ve artmış NO düzeylerine neden olduğunu belirtmişlerdir.

Çalışmada pentoksifilin tek başına ve melatoninle birlikte, kurtarma tedavisi olarak uygulandığında hipoksik iskemik hasar oluşturulmuş hemisferde NO düzeylerini azalttığı gösterilmiştir. Bu sonuç pentoksifilin NO'in yol açtığı nöron hasarını azaltarak koruyucu etkinliğe katkıda bulunduğunu düşündürmektedir.

Melatonin, pineal bezden salgılanan, uyku, üreme, sirkadiyen ritm ve immünite gibi pek çok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynayan bir hormondur. Sentezini takiben pineal bezden dolaşıma verilen melatonin hızla serebrospinal sıvıya geçer (6). Lipofilik özelliği sayesinde tüm hücresele bileşenlere rahatlıkla ulaşarak organelleri ve çekirdeği etkin bir şekilde serbest radikal hasarından koruyabilmektedir (69).

Melatonin karaciğer dışı dokularda enzimatik olmayan yol ile metabolize edilirken doğrudan hidroksil radikali bağlamaktadır. Beyin dokusunda melatonin kinuramin'e metabolize edilirken oluşan AFMK ve AMK metabolitleri de serbest radikal tutmaktadır. AMK sadece reaktif oksijen ürünlerini (hidroksil radikali, hidrojen peroksit, singlet oksijen) değil reaktif nitrojen ürünlerini (nitrik oksit, peroksinitrit) de bağlayarak antioksidan etki göstermektedir (7).

Melatonin, metabolitlerinin serbest radikal bağlayıcı etkinliğinin yanında, antioksidan enzimlerin (SOD, KAT) etkinliğini artırıp, prooksidan enzimlerin (lipooksijenaz ve NOS) etkinliğini azaltarak antioksidan etkinliğe katkı sağlamaktadır (77). NOS inhibisyonu ile NO ve peroksinitrit oluşumunu engellemekte, mitokondri elektron transport zincirinde kompleks I ve IV aktivitesini artırarak mitokondri membran potansiyelinin korunmasına neden olmaktadır (80).

Melatonin lipofilik özelliği ile plasentadan kolayca fetüse geçebilmektedir. Bu bilgiden hareketle intrauterin hipoksi iskemi modeli oluşturulmuş çeşitli memeli türlerinde anneye uygulanan melatoninin etkinliği araştırılmıştır. Welin ve ark. (97) koyunlarda intrauterin Hİ modelinde melatoninin lipid peroksidasyonu göstergesi olan 8-izoprostan düzeyinde ve TUNEL pozitif apoptotik hücre sayılarında azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir.

Wakatsuki ve ark. (98) gebe ratlarda bilateral utero-ovaryan arterleri tıkayarak oluşturdukları fetal Hİ modelinde 10 mg/kg/doz melatonin uygulamasının

fötal rat mitokondrisinde tiobarbitürik asit ile reaksiyona giren lipid peroksidasyon ürünlerinin (TRABS) düzeyini azalttığını, mitokondriyal ATP üretimi ve solunum fonksiyonlarını koruduğunu belirtmişlerdir. Aynı modelde Okatani ve ark. (99) fötal beyinde süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz düzeylerinin arttığını göstererek melatoninin serbest radikal hasarına karşı indirekt yolla etkili olduğunu saptamışlardır.

Yenidoğan ratlarda Hİ modelinde melatoninin Hİ öncesi ve sonrasında uygulandığı çalışmalar mevcut. Tütüncüler ve ark. (81) yedi günlük ratlarda Hİ modelinde melatoninini iki farklı dozda (10 ve 20 mg/kg/doz) hipoksiden 30 dk önce uygulayarak lipid peroksidasyon ürünleri ve antioksidan enzim aktivitelerine etkilerini değerlendirdikleri çalışmayla proflaktik tedavinin etkinliğine dikkat çekmişlerdir. Eskiocak ve ark. (82) aynı modelde melatoninini hipoksi öncesi ve sonrasında 10 mg/kg/doz, toplam üç dozda (24 saat ara ile) uygulamışlardır. Beyin dokusunda protein oksidasyon göstergeleri olan ileri okside protein ürünleri (advanced oxidation protein products-AOPP) ve protein-thiol (P-SH) ile NO düzeylerine etkilerini değerlendirdikleri çalışmada melatoninin AOPP ve NO düzeyini azalttığını saptamışlardır.

Özdemir ve ark. (100) yedi günlük ratlarda travmatik beyin hasar modelinde hasarlanma sonrası 5 mg/kg/doz melatonin uygulaması ile TRABS düzeylerindeki azalmanın antioksidan etkinlikten kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Carlone ve ark. (101) yenidoğan rat hipoksi iskemide melatoninini 15 mg/kg/doz da iskemiden 30 dk önce, hipoksiden sonra 24 saat ara ile toplam üç kez uygulamışlar. Hipoksik iskemik hasardan en çok etkilenen bölgelerden olan hipokampusun CA1 bölgesinde melatonin ile tedavi edilen grupta hücre kaybının daha az olduğunu saptamışlardır. Bu sonuçlarla melatoninin doza bağımlı olarak iskemide öncesi ve sonrası uygulamada nöron koruyucu etkinliği olduğunu belirtmişlerdir.

Çalışmada melatoninini hipoksi iskemide sonrasında 10 mg/kg tek dozda kurtarma tedavisi olarak uyguladığımızda, melatonin tedavisi alan grupta hipoksi grubu ile karşılaştırıldığında hipokampus CA2 bölgesindeki nöron sayılarında anlamlı düzeyde korunma olduğunu saptadık. Hipokampus CA1, CA3 ve GD bölgelerindeki nöron sayıları hipoksi grubu ile karşılaştırıldığında daha fazla sayıda olmasına

rağmen istatistiksel anlamlı farklılık yoktu. Hİ hasarlanmada hipokamus CA1 bölgesi hücre hasarının en yoğun görüldüğü bölge olarak bilinmektedir (102). Çalışmada CA1 bölgesindeki nöron sayılarının yeterince korunmamış olması, Hİ sonrası tek doz melatonin uygulamasının nöron kaybını azaltmada yeterli olmadığını düşündürmektedir.

Apopitotik hücre ölümünün intrensek yolağında mitkondri hasarının rolü önemlidir. Melatonin mitokondri membran potansiyelini koruyarak sitokrom c salınımına ve apopitotik yolağın tetiklenmesine engel olmaktadır (80). Antiapopitotik bcl-2 proteininde artış, bax düzeyinde ve kaspaz-3 aktivitesinde azalmaya yol açarak da antiapopitotik etkinlik göstermektedir (78,103,104).

Yon ve ark. (105) yaygın kullanılan genel anesteziklerin yenidoğan rat beyinde apopitotik mekanizmalarla nöron ölümüne yol açmasından hareketle 17 günlük ratlarda anestezi uygulaması öncesi ve üç saat sonrasında melatonin tedavisinin etkinliğini araştırmışlar. Melatonin tedavisi alan grupta antiapopitotik bcl-X_L proteini down regülasyonunda azalma, korteks ve talamusta stabil sitokrom c düzeyleri ve kaspaz-3 pozitif boyanan nöron sayılarında anlamlı azalma saptamışlardır. Bu çalışma yenidoğan Hİ beyin hasarlanmasını yansıtmamakta, ancak melatoninin antiapopitotik etkinliğini desteklemektedir.

Koh çalışmasında (106) erişkin ratlarda iskemik inme modelinde iskemi öncesinde 5 mg/kg/doz melatonin uygulayarak tedavi grubunda infarkt alanı, TUNEL pozitif apopitotik hücre sayısı, kaspaz-3 düzeylerinde anlamlı azalma olduğunu belirtmiştir.

Shen ve ark. (107) rat hipokampal hücre kültürlerinde amiloid beta peptid 25-35 kullanarak oluşturdukları apopitotik nöronlarda melatoninin hipokampus apopitotik hücre sayısında ve elektroforezle DNA fragmentasyonunda azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir. Duan ve ark. (108) fare nöron kültüründe iskemi reperfüzyon hasarına uğrattıkları hücrelerde melatoninin mitokondriyal membran potansiyelinin koruduğunu, kaspaz-3 ve sitokrom c salınımını azalttığını ve DNA fragmentasyonunda azalmaya neden olduğunu saptamışlar.

Çalışmada melatonin tedavisi ile TUNEL pozitif boyanmış DNA fragmentasyonuna giden apopitotik hücre sayılarının Hİ grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı gösterildi (p=0.003). Tek doz uygulanan melatonin kurtarma

tedavisinin antiapoptotik etkinlik ile nöron hasarını azaltmada yeterli olabileceği sonucuna vardık.

Çalışmada melatonin çözücüsü olarak kullandığımız etanolün uygulandığı ETANOL grubu Hİ grubu ile karşılaştırıldığında hipokampus hücre sayıları, beyin NO düzeyleri ve TUNEL pozitif boyanmış hücre oranları yönünden farklılık saptanmamış olması hipoksi modelimizin başarılı olduğunu destekleyen bir bulgudur ($p>0.05$). Melatonin tedavi grubu ile ETANOL karşılaştırıldığında hipokampal hücre sayıları, TUNEL pozitif apoptotik hücre oranları ve NO düzeyleri yönünden farkın anlamlı olması etanolün deney sonuçlarına yansıyan etkisi olmadığını göstermektedir ($p<0.05$).

Cuzzocrea ve ark. (109) melatoninin serbest radikal süpürücü etkisinden hareketle erişkin gerbillerde bilateral karotis arter oklüzyonu ile sağladıkları iskemi reperfüzyon hasarında melatoninini 10 mg/kg reperfüzyon öncesi ve sonrasında uygulamışlar. Melatoninin nitrit düzeylerinde ve hipokampal CA1 de nöron kaybında anlamlı azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmada farklı olarak melatoninini Hİ sonrası tek doz kurtarma tedavisi olarak uyguladığımızda, Hİ oluşturulmuş yenidoğan rat beyinde NO düzeylerini anlamlı olarak azaltmadığı sonucuna vardık.

Literatürde melatonin ve pentoksifilin kombine tedavisinin yenidoğan ratlarda Hİ beyin hasarına etkisine yönelik başka bir çalışma bulamadık. Bülbüller ve ark. (110) tavşanda akut pankreatit modelinde, melatonin ve pentoksifilin tek ve kombine tedavisinin etkinliğini araştırmışlardır. Melatonin tedavisinin lipid peroksidasyon ürünleri ve sitokin oluşumunu azalttığı, pentoksifilin ise melatonin ile karşılaştırıldığında pankreas hasarını önlemede etkinliğinin daha az olduğunu belirtmişlerdir. Kombine tedavi ile elde edilen sonuç da melatoninin tek başına kullanımı ile elde edilenden farklı bulunmamıştır. Bu nedenle pankreas hasarlanmasında melatonin ve pentoksifilin birbirlerinin etkilerini potansiyelize edemedikleri sonucuna varmışlardır.

Noyan ve ark. (111) farede karbon tetra klorür ile oluşturulan karaciğer hasarı modelinde pentoksifilin ve melatonin tedavilerinin tek başına ve kombine kullanımda karaciğerdeki oksidatif hasarı ve apoptozu azalttığı ve antioksidan enzim aktivitelerinde artışa neden olduğunu belirtmişlerdir.

Çalışmada yenidoğan rat Hİ modelinde Hİ olay sonrası tek doz olarak uygulanan melatonin ve pentoksifilin tedavisi ile hipokampus CA1, CA2, CA3 ve GD bölgelerinde hücre sayısının Hİ grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde korunduğunu gösterdik. MEL+PTX tedavisi MEL tedavisinden daha fazla hücre koruyucu etkinlik gösterirken PTX grubu ile arasında anlamlı bir farklılık saptamadık (Tablo III). TUNEL pozitif apoptotik hücre oranları da MEL+PTX grubunda hem Hİ grubu hem de MEL ve PTX grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalmış bulundu. Bu veriler MEL ve PTX kombine tedavisinin birbirinin antiapoptotik etkilerini potansiyalize ederek yenidoğan Hİ beyin hasarında apoptotik hücre ölümünü önlemede tek tek kullanımlarından daha etkili olduğunu göstermektedir. MEL+PTX tedavisi ile Hİ oluşturulmuş hemisferde NO düzeylerindeki azalma da kombine tedavinin etkinliğini desteklemektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Zamanında doğmuş yenidoğan ratlarda deneysel hipoksi iskemik modelinde Hİ olayın hipokampus da hücre kaybına ve apoptotik hücre ölümüne yol açtığı histopatolojik olarak doğrulandı.

Hİ modelinde, hipoksik iskemik olayın beyin nitrit düzeylerini artırdığı gösterildi.

Hİ modelinde, Hİ olaydan hemen sonra 10 mg/kg i.p. olarak uygulanan melatonin hipokampus CA2 bölgesinde nöron kaybını önledi. Apoptotik hücre sayısını azalttı.

Hİ olaydan hemen sonra 40 mg/kg i.p. uygulanan pentoksifilin hipokampus CA1, CA2, CA3 ve GD bölgelerinde nöron sayılarını koruyarak apoptotik hücre sayılarını azalttı. Hİ hemisferde NO düzeylerinde azalmaya neden oldu.

Hİ olaydan hemen sonra uygulanan pentoksifilin ve melatonin tedavisi ile hipokampus CA1, CA2, CA3 ve GD bölgelerinde nöron sayılarının korunduğu ve apoptotik hücre sayılarının azaldığı gösterildi.

Kombine tedavi ile hipokampus nöron sayısındaki korunma ve NO düzeylerindeki azalma tek başına MEL uygulamasından daha fazla iken tek başına PTX uygulamasından farklı değildi.

Kombine tedavi ile elde edilen apoptotik hücre oranlarındaki azalma MEL ve PTX'in tek başına kullanımından daha fazla saptandı.

Yenidoğan ratlarda hipoksik iskemik ensefalopati modelinde melatonin ve pentoksifilin kombine tedavisi nöron kaybını, NO düzeylerini ve apoptotik hücre indeksini azaltarak nöron koruyucu etkinlik göstermiştir. Kombine tedavinin klinik kullanıma girebilmesi için ileri prelinik çalışmalara ihtiyaç olduğu kanısındayız.

ÖZET

YENİDOĞAN RATLARDA HİPOKSİK İSKEMİK ENSEFALOPATİ MODELİNDE PENTOKSİFİLİN VE MELATONİN TEDAVİSİNİN ETKİNLİĞİ

Perinatal asfiksi yenidoğan döneminde mortaliteye, motor-bilişsel kayıplar ve epilepsi gibi ciddi komplikasyonlara neden olan önemli bir sorundur. Hipoksi-iskemi sonrası nöron ölümü ile sonlanan süreç enerji yokluğu ile başlamakta, hücre içi kalsiyum birikimi, glutamat salınımı ve NMDA reseptörleri uyarılması ile devam etmektedir. Hücre içinde kalsiyum artışı ile kalsiyum bağımlı lipaz, proteaz ve fosfolipazlar aktive olmakta, ksantin ve prostaglandin sentezi sırasında oluşan serbest oksijen radikalleri hücre hasarına yol açmaktadır. Hücrede enerji yetmezliği, asidoz, glutamat salınımı, hücre içi kalsiyum artışı, lipid peroksidasyonu ve nitrik oksit oluşumu sonucunda ana hücrel bileşenler hasar görmekte; nekroz ve apoptoz ile hücre ölümü gerçekleşmektedir. Pineal bezde sentezlenen melatonin serbest radikal bağlayıcı ve antioksidan enzim aktivitelerini artıran güçlü bir antioksidandır. Apoptoz önleyici etkinliği olduğu bilinmektedir. Pentoksifilin bir ksantin türevidir. TNF- α üretimini ve apoptozu engellemektedir.

Çalışmada melatonin ve pentoksifilin tedavisinin yenidoğan rat hipoksik iskemik beyin hasarı modelinde nöron hasarı ve beyin nitrik oksit üretimi üzerine olan etkilerini araştırmayı amaçladık.

Çalışmada yedi günlük Wistar Albino suşu yavru ratlar kullanıldı (n=60). Denekler; kontrol grubu, melatonin ile tedavi edilen hipoksi-iskemi grubu, pentoksifilinle tedavi edilen hipoksi-iskemi grubu, melatonin+pentoksifilinle tedavi edilen hipoksi-iskemi grubu, etanol (melatonin çözücüsü) verilen hipoksi-iskemi grubu ve salin verilen hipoksi-iskemi grubu olarak ayrıldı. Hipoksi iskemik uygulanan gruplardaki hayvanların, doğum sonrası yedinci günde sol ana karotis arterleri kalıcı olarak bağlandı. Cerrahi işlemden iki saat sonra 2.5 saat süre ile hipoksik gaz karışımı (%92 azot ve %8 oksijen) solutularak hipoksi oluşturuldu. Melatonin (10 mg/kg), pentoksifilin (40 mg/kg) ve pentoksifilin+melatonin hipoksiden hemen sonra tek doz olarak periton içine (i.p.) uygulandı. Hipoksik iskemik uygulamadan 72 saat sonra deneklerin beyin nitrit düzeyleri, hipokamus nöron sayısı ve apoptotik hücre oranları değerlendirildi.

Histopatolojik değerlendirmede melatonin ve pentoksifilin tedavisi almış gruplarda hipokampus da apoptotik hfre sayılarında anlamlı azalma saptandı. Melatoninin tek başına uygulandığı grupta hipokampusun sadece CA2 bflgesindeki nron sayılarında anlamlı dfezede korunma mevcuttu. Melatonin ve pentoksifilin kombine tedavisinin, hipoksi iskemi grubu ile karşılaştırıldığında, hipokampus CA1, CA2, CA3 ve GD bflgelerindeki nron sayılarını anlamlı dfezede koruduğu ve apoptotik hfre oranlarını azalttığı saptandı. Hipoksik iskemik olay sonrası nitrik oksit dfezelerinde belirgin artış olduğu Griess reaktifi ile olfçflen beyin nitrit dfezeyi ile gflsterildi. Melatonin+pentoksifilin tedavisi ile hipoksi-iskemiye maruz kalan hemisferde nitrik oksit üretiminin belirgin azaldığı izlendi. Hipoksi iskemi grubu ile kontrol gruplarında bflyle bir farklılık gflzlenmedi.

Bu sonuqlar yenidoğan rat hipoksik iskemik beyin hasarında melatonin ve pentoksifilin kombine tedavisinin nron koruyucu etkinliği olduğunu gflstermektedir. Bilgilerimize gflre bu alışma, melatonin ve pentoksifilin kombine tedavisinin gelişmekte olan beyinde hipoksi iskeminin oluşturduğu hasardan koruyucu etkinliğini gflsteren ilk alışmadır.

Anahtar Kelimeler: Hipoksi, iskemi, beyin, yenidoğan, melatonin, pentoksifilin, apoptoz, nitrik oksit.

SUMMARY

EFFICIENCY OF PENTOXYPHILLINE AND MELATONIN TREATMENT ON NEWBORN RAT MODEL OF HYPOXIC ISCHEMIC ENCEPHALOPATHY

Perinatal asphyxia is an important cause of neonatal mortality and subsequent serious sequelae such as motor and cognitive deficits and seizures. The principal mechanisms leading to neuronal death after hypoxia-ischemia are initiated by energy depletion, accumulation of extracellular glutamate, and activation of glutamate receptors. The cascade of events that follows involves accumulation of cytosolic calcium and activation of a variety of calcium-mediated deleterious events, such as activation of lipases, proteases and phospholipases, and formation of oxygen free radicals as by-products of xantine and prostaglandin synthesis. The intracellular calcium induces the production of nitric oxide. The combined effects of cellular energy failure, acidosis, glutamate release, intracellular calcium accumulation, lipid peroxidation, and NO neurotoxicity disrupt essential components of the cell, resulting in death by mechanisms of necrosis and apoptosis. Melatonin, the chief secretory product of the pineal gland, is an effective antioxidant which scavenges free radicals and up-regulates several antioxidant enzymes. It also has a strong anti-apoptotic signaling function. Pentoxifylline is a xanthine derivative, potent inhibitor of TNF- α production and apoptosis.

The aim of this study is to investigate the effects of the melatonin and pentoxifylline on neurodegeneration and cerebral nitric oxide production in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain injury.

Seven-day-old Wistar Albino rat pups have been used in the study (n=60). Experimental groups in the study were; sham operated group, melatonin treated hypoxia-ischemia group, pentoxifylline treated hypoxia-ischemia group, melatonin+pentoxifylline treated hypoxia-ischemia group, etanole (melatonin's dissolver) treated hypoxia-ischemia group and vehicle-treated hypoxia-ischemia group. In hypoxia-ischemia groups, left common carotid artery was ligated permanently on the seventh postnatal day. Two hours after the procedure, hypoxia (%92 nitrogen and %8 oxygen) was applied for 2.5 hour. Melatonin (10 mg/kg), pentoxifylline (40 mg/kg) and melatonin+pentoxifylline were injected

(intraperitoneally; ip) as a single dose immediately after the hypoxia period. Brain nitrite levels, neuronal cell death, and apoptosis were evaluated 72 hours after the hypoxic-ischemic insult.

Histopathological evaluation demonstrated that melatonin and pentoxyphilline significantly diminished number of “apoptotic cells” in the hippocampus. Melatonin, when administered separately, significantly preserved the number of neurons only in the CA2 regions of hippocampus. When compared with vehicle-treated group, combination treatment with melatonin and pentoxyphilline significantly reduced “apoptotic cell death” and preserved the number of neurons CA1, CA2, CA3, and dentate gyrus regions of hippocampus. Brain nitrite levels were evaluated by Griess reagent and showed that hypoxic-ischemic injury caused a significant increase in NO production. Melatonin+pentoxyphilline treatment significantly decreased NO overproduction in the hypoxic-ischemic hemisphere, whereas no significant change appeared in hypoxia alone and also in the sham-operated group.

These results suggest the beneficial neuroprotective effect of melatonin and pentoxyphilline combination treatment in this model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. To our knowledge, this is the first study that demonstrates a protective effect of melatonin and pentoxyphilline combination treatment against hypoxia-ischemia in the developing brain.

Key Words: Hypoxia, ischemia, brain, newborn, melatonin, pentoxyphilline, apoptosis, nitric oxide.

KAYNAKLAR

1. Vanucci RC. Hypoxia-ischemia: Clinical aspects. In: Fanaroff AA, Martin RJ (eds). Neonatal perinatal medicine, 7th ed. Philadelphia: Mosby Publ. 2002: 867-79.
2. Vanucci RC, Palmer C. Hypoxia-ischemia neuropathology, pathogenesis and management. In: Fanaroff AA, Martin RJ (eds). Neonatal perinatal medicine, 7th ed. Philadelphia: Mosby Publ. 2002: 847-67.
3. Berger R, Garnier Y. Perinatal brain injury. J Perinat Med. 2000; 28: 261-85.
4. Bath PMW, Bath-Hextall FJ. Pentoxifylline, propentofylline and pentifylline for acute ischaemic stroke (review). Cochrane Database Syst Rev. 2004; 3: 1-14.
5. Windmeier C, Gressner AM. Pharmacological aspects of pentoxifylline with emphasis on its inhibitory actions on hepatic fibrogenesis (review). Gen Pharmac. 1997; 29: 181-96.
6. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? FEBS J. 2006; 273: 2813-38.
7. Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. Prog Neurobiol. 1998; 56: 359-84.
8. Stoll BJ, Kliegman RM. Hypoxia- ischemia. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB (eds). Nelson textbook of pediatrics, 18th ed. Philadelphia: Saunders Company. 2007: 566-67.
9. Gill MB, Perez-Polo JR. Hypoxia ischemia-mediated cell death in neonatal rat brain. Neurochem Res. 2008; 33: 2379-89.
10. Volpe JJ. Perinatal brain injury: from pathogenesis to neuroprotection. Ment Retard Dev Disabil Res Rev. 2001; 7: 56-64.
11. Roland EH, Hill A. How important is perinatal asphyxia in the causation of brain injury? Ment Retard Dev Disabil Res Rev. 1997; 3: 22-7.
12. Amato M, Donati F. Update on perinatal hypoxic insult: mechanism, diagnosis and interventions. Eur J Paediatr Neurol. 2000; 4: 203-9.
13. İşlekel H, İşlekel S, Güner G. Biochemical mechanism and tissue injury of cerebral ischemia and reperfusion. <http://www.med.ege.edu.tr/norolbil/2000.23.05.2009>.

14. Jensen FE. Perinatal hypoxic-ischemic brain injury: Maturation-dependent relation to epilepsy. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 1997; 3: 85-95.
15. Mishra OP, Fritz KI, Delivoria-Papadopoulos M. NMDA receptor and neonatal hypoxic brain injury. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2001; 7: 249–53.
16. Vexler ZS, Ferriero DM. Molecular and biochemical mechanisms of perinatal brain injury. *Semin Neonatol.* 2001; 6: 99–108.
17. Kırış T, Görgülü A. Eksitör aminoasitler ve eksitotoksisite. *Türk Nöroşirürji Dergisi.* 2005; 15: 39-44.
18. Hossain MA. Molecular mediators of hypoxic-ischemic injury and implications for epilepsy in the developing brain. *Epilepsy Behav.* 2005: 204-13.
19. Perlman JM. Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury. *Clin Ther.* 2006; 28: 1353-65.
20. Feuerstein GZ, Liu T, Barone FC. Cytokines, inflammation, and brain injury: role of tumor necrosis factor-alpha. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1994; 6: 341-60.
21. Puka-Sundvall M, Valin C, Gilland E. Impairment of mitochondrial respiration after cerebral hypoxia-ischemia in immature rats: relationship to activation of caspase-3 and neuronal injury. *Brain Res Dev Brain Res.* 2000; 125: 43-50.
22. Kabakuş N, Özcan A, Aysun S, Yılmaz B. Evaluation of neuronal damage following hypoxic-ischaemic brain injury in acute and early chronic periods in neonatal rats. *Cell Biochem Funct.* 2006; 24: 257-60.
23. Kontos HA. Oxygen radicals in cerebral ischemia: the 2001 Willis Lecture. *Stroke.* 2001; 32: 2712-16.
24. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science,* 1978; 201: 875-80.
25. Vincent VA, Tilders FJ, Van Dam AM. Production, regulation and role of nitric oxide in glial cells. *Mediators Inflamm.* 1998; 7: 239-55.
26. Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, Nakajima W. Novel treatments after experimental brain injury. *Semin Neonatol.* 2000; 5: 75-86.
27. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem.* 1993; 268: 12231-34.

28. Förstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, Murad F. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol.* 1991; 42: 1849–57.
29. Hamrick SE, Ferriero DM. The injury response in the term newborn brain: can we neuroprotect? *Curr Opin Neurol.* 2003; 16: 147-54.
30. Iadecola C, Zhang F, Xu S, Casey R, Ross ME. Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1995; 15: 378-84.
31. Blomgren K, Hagberg H. Free radicals, mitochondria and hypoxia-ischemia in the developing brain. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40: 388-97.
32. Northington FJ, Graham EM, Martin LJ. Apoptosis in perinatal hypoxic-ischemic brain injury: how important is it and should it be inhibited? *Brain Res Brain Res Rev.* 2005; 50: 244-57.
33. Kültürsay N. Fetal ve neonatal proenflamatuvar sitokin yanıtı-perinatal beyin ve akciğer zedelenmesi ile ilişkisi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi.* 2003; 46: 299-307.
34. Vannucci SJ, Hagberg H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J Exp Biol.* 2004; 207: 3149-54.
35. Saikumar P, Dong Z, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. *Oncogene.* 1998; 17: 3341-49.
36. Perlman JM. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics.* 1997; 100: 1004-14.
37. Pulera MR, Adams LM, Liu H, Santos DG, Nishimura RN, Yang F, Cole GM, Wasterlain CG. Apoptosis in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia. *Stroke.* 1998; 29: 2622-30.
38. Bredesen DE, Rao RV, Mehlen P. Cell death in the nervous system. *Nature.* 2006; 443: 796-802.
39. Öztürk F. Apoptoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.* 2002; 9: 143-48.
40. Calvert JW, Zhou C, Nanda A, Zhang JH. Effect of hyperbaric oxygen on apoptosis in the neonatal hypoxia-ischemia rat model. *J Appl Physiol.* 2003; 95: 2072-80.

41. Hashimoto T, Yonetani M, Nakamura H. Selective brain hypothermia protects against hypoxic-ischemic brain injury in newborn rats by reducing hydroxyl radical production. *Kobe J Med Sci.* 2003; 49: 83-91.
42. Whitelaw A. Systematic review of therapy after hypoxic-ischaemic brain injury in the perinatal period. *Semin Neonatol.* 2000; 5: 33–40.
43. Tutak E, Satar M, Zorludemir S, Erdoğan Ş, Yapıcıoğlu H, Narlı N. Neuroprotective effects of indomethacin and aminoguanidine in the newborn rats with hypoxic-ischemic cerebral injury. *Neurochem Res.* 2005; 30: 937-42.
44. Miura S, Ishida A, Nakajima W, Akiko O, Kawamura M, Takada G. Intraventricular ascorbic acid administration decreases hypoxic-ischemic brain injury in newborn rats. *Brain Res.* 2006; 1095: 166-169.
45. Jatana M, Singh I, Singh AK, Jenkins D. Combination of systemic hypothermia and N-acetylcysteine attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Pediatr Res.* 2006; 59: 684-89.
46. Kumral A, Baskın H, Yeşilirmak DC, Ergür BU, Aykan S, Genç S, Genç K, Yılmaz O, Tuğyan K, Giray Ö, Duman N, Özkan H. Erythropoietin attenuates lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain. *Neonatology.* 2007; 92: 269-78.
47. Willmot M, Gibson C, Gray L, Murphy S, Bath P. Nitric oxide synthase inhibitors in experimental ischemic stroke and their effects on infarct size and cerebral blood flow: a systematic review. *Free Radic Biol Med.* 2005; 39: 412-25.
48. Shohami E, Bass R, Wallach D, Yamin A, Gallily R. Inhibition of tumor necrosis factor alpha (TNF α) activity in rat brain is associated with cerebroprotection after closed head injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996; 16: 378-84.
49. Han BH, Xu D, Choi J, Han Y, Xanthoudakis S, Roy S, Tam J, Vaillancourt J, Colucci J, Siman R, Giroux A, Robertson GS, Zamboni R, Nicholson DW, Holtzman DM. Selective, reversible caspase-3 inhibitor is neuroprotective and reveals distinct pathways of cell death after neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *J Biol Chem.* 2002; 277: 30128-36.

50. Haque K, Mohan P. Pentoxifylline for neonatal sepsis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003; 2: 1-13.
51. Fink MP. Whither pentoxifylline? *Crit Care Med.* 1999; 27:19-20.
52. Boswell-Smith V, Spina D, Page CP. Phosphodiesterase inhibitors. *Br J Pharmacol.* 2006; 147: 252-7.
53. Abdel-Salam OM, Baiuomy AR, El-Shenawy SM, Arbid MS. The anti-inflammatory effects of the phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline in the rat. *Pharmacol Res.* 2003; 47: 331-40.
54. Neuner P, Klosner G, Schauer E, Pourmojib M, Macheiner W, Grünwald C, Knobler R, Schwarz A, Luger TA, Schwarz T. Pentoxifylline in vivo down-regulates the release of IL-1 beta, IL-6, IL-8 and tumor necrosis factor-alpha by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology.* 1994; 83: 262-7.
55. Ebrahimi F, Hajrasouliha AR, Tavakoli S, Sadeghipour H, Ghasmi M, Rofouei BR, Ahmadi SH, Dehpour AR. Pentoxifylline improves reoxygenation-induced contractile recovery through a nitric oxide-dependent mechanism in rat papillary muscles. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006; 47: 571-7.
56. Marques LJ, Zheng L, Poulkalis N, Guzman J, Costabel U. Pentoxifylline inhibits TNF- alpha production from human alveolar macrophages. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 159: 508-11.
57. Bona E, Aden U, Gilland E, Fredholm BB, Hagberg H. Neonatal cerebral hypoxia-ischemia: the effect of adenosine receptor antagonists. *Neuropharmacology.* 1999; 36: 1327-38.
58. Millar D, Schmidt B. Controversies surrounding xanthine therapy. *Semin Neonatol.* 2004; 9: 239-44.
59. Cunha GM, Bezerra PJ, Saldanha MD, Cavalcante MC, De Brun VM, Viana GS. Pentoxifylline improves learning and memory in glutamate-lesioned rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000; 66: 687-94.
60. Travadi JN, Patole SK. Phosphodiesterase inhibitors for persistent pulmonary hypertension of the newborn: a review. *Pediatr Pulmonol.* 2003; 36: 529-35.
61. Kim NY, Pae HO, Kim YC, Choi CK, Rim JS, Lee HS, Kim YM, Chung HT. Pentoxifylline potentiates nitric oxide production in interleukin-1beta-stimulated

- vascular smooth muscle cells through cyclic AMP-dependent protein kinase A pathway. *Gen Pharmacol.* 2002; 35: 205-11.
62. Hasebe Y, Thomson LR, Dorey CK. Pentoxifylline inhibition of vasculogenesis in the neonatal rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41: 2774-8.
63. Eun BL, Liu XH, Barks JD. Pentoxifylline attenuates hypoxic-ischemic brain injury in immature rats. *Pediatr Res.* 2000; 47: 73-87.
64. Banfi C, Sironi L, De Simoni G, Gelosa P, Barcella S, Perego C, Gianazza E, Guerrini U, Tremoli E, Mussoni L. Pentoxifylline prevents spontaneous brain ischemia in stroke-prone rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 310: 890-5.
65. Şirin BH, Yılık L, Coşkun E, Ortaç R, Şirin H. Pentoxifylline reduces injury of the brain in transient ischaemia. *Acta Cardiol.* 1998; 53: 89-95.
66. Savaş S, Delibaş N, Savaş Ç, Sütçü R, Cindaş A. Pentoxifylline reduces biochemical markers of ischemia-reperfusion induced spinal cord injury in rabbits. *Spinal Cord.* 2000; 40: 224-9.
67. Simone AJH, Gerry TM. Pentoxifylline reduces fibrin deposition and prolongs survival in neonatal hyperoxic lung injury. *J Appl Physiol.* 2004; 97: 2014-9.
68. Travadi J, Patole S. Pentoxifylline reduces the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Pediatr Res.* 2006; 60: 185-9.
69. Zawilska JB, Skene DJ, Arendt J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacol Rep.* 2009; 61: 383-410.
70. Çam A, Erdoğan MF. Melatonin. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası.* 2003; 56: 103-12.
71. Parlakpınar H, Koç M, Acet A. Yaşlanmada apoptozis ve melatoninin etkisi. *T Klin Tıp Bilimleri.* 2004; 24: 62-7.
72. Teixeira A, Morfim MP. Melatonin protects against pro-oxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in distinct membranes induced by the hydroxyl and ascorbyl radicals and peroxyxynitrite. *J. Pineal Res.* 2003; 35: 262-8.
73. De La Lastra C, Cabeza J. Melatonin protects against gastric ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pineal Res.* 1997; 23: 47-52.

74. Kaçmaz A, User EY, Şehirli AO, Tilki M, Özkan S, Şener G. Protective effect of melatonin against ischemia/reperfusion-induced oxidative remote organ injury in the rat. *Surg Today*. 2005; 35: 744-50.
75. Kazez A, Demirbağ M. The role of melatonin in prevention of intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg*. 2000; 35: 1444-48.
76. Gitto E, Pellegrino S. Oxidative stress of the newborn in the pre-and postnatal period and the clinical utility of melatonin. *J Pineal Res*. 2009; 46: 128-39.
77. Şahna E, Deniz E, Aksulu HE. Miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarı ve melatonin. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi*. 2006; 6: 163-8.
78. Reiter RJ, Sainz RM, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Manchester LC, Tan DX. Melatonin ameliorates neurologic damage and neurophysiologic deficits in experimental models of stroke. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 993: 35-47.
79. Koh PO. Melatonin regulates nitric oxide synthase expression in ischemic brain injury. *J Vet Med Sci*. 2008; 70: 747-50.
80. Martin M, Macias M. Melatonin induced increased activity of respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *J Pineal Res*. 2000; 28: 242-8.
81. Tütüncüler F, Eskiocak S, Başaran ÜN, Ekuklu G, Ayvaz S, Vatansever Ü. The protective role of melatonin in experimental hypoxic brain damage. *Pediatr Int*. 2005; 47: 434-9.
82. Eskiocak S, Tütüncüler F, Başaran ÜN, Taşkiran A, Çakır E. The effect of melatonin on protein oxidation and nitric oxide in brain tissue of hypoxic neonatal rats. *Brain Dev*. 2007; 29: 19-24.
83. Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT, Palmer C, Smith MB, Towfighi J, Vannucci SJ. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Neurosci Res*. 1999; 55: 158-63.
84. Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in rat. *Ann Neurol*. 1981; 9: 131-41.
85. Johnston MV, Ferriero DM, Vannucci SJ, Hagberg H. Models of cerebral palsy: which ones are best? *J Child Neurol*. 2005; 20: 984-7.

86. Hagberg H, Peebles D, Mallard C. Models of white matter injury: comparison of infectious, hypoxic-ischemic, and excitotoxic insults. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2002; 8: 30-8.
87. Yeşilirmak DC, Kumral A, Tuğyan K, Çilaker S, Baskın H, Yılmaz O, Duman N, Özkan H. Effects of activated protein C on neonatal hypoxic ischemic brain injury. *Brain Res.* 2008; 1210: 56-62.
88. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 4th ed. Academic press: New York, USA. 2002.
89. Hekim N. Apoptosis. *Kalıtsal Hastalıklara Moleküler Tıp Açısından Bakış Sempozyumu.* 2003: 115-40.
90. Köroğlu TF, Yılmaz O. Erythropoietin attenuates lipopolysaccharide-induced splenic and thymic apoptosis in rats. *Physiol Res.* 2006; 55: 309-16.
91. Lavine SD, Hofman FM, Lokovic BV. Circulating antibody against tumor necrosis factor-alpha protects rat brain from reperfusion injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998; 18: 52-8.
92. Zhu DJ, Xia B, Bi Q, Zhang S, Qiu B, Zhao C. Functional protection of pentoxifylline against spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits: necrosis and apoptosis effects. *Chin Med J.* 2008; 121: 2444-9.
93. Evans SM, Pinto Pereira LM, Addae JI. Neuroprotection by caffeine and pentoxifylline during experimental cerebral ischaemia. *West Indian Med J.* 1999; 48: 23-5.
94. Vakili A, Zahedi Khorasani M. Post-ischemic treatment of pentoxifylline reduces cortical not striatal infarct volume in transient model of focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res.* 2007; 1144: 186-91.
95. Demir T, Turgut B, İlhan N, Ulaş F. İskemi reperfüzyon modelinde pentoksifilinin retina nitrik oksit düzeyine etkisi. *T Klin Ophtalmol.* 2004; 13: 31-5.
96. Trajković V, Badovinac V, Popadic D, Hadzic O, Stojkovic MM. Cell-specific effects of pentoxifylline on nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase mRNA expression. *Immunology.* 1997; 92: 402-6.
97. Welin AK, Svedin P, Lapatto R, Sultan B, Hagberk H, Grassens P, Kjellmer I, Mallard C. Melatonin reduces inflammation and cell death in white matter in

- the mid-gestation fetal sheep following umbilical cord occlusion. *Pediatr Res.* 2007; 61: 153-8.
98. Wakatsuki A, Okatani Y, Shinohara K, Ikenoue N, Fukaya T. Melatonin protects against ischemia/reperfusion-induced oxidative damage to mitochondria in fetal rat brain. *J Pineal Res.* 2001; 31: 167-72
99. Okatani Y, Wakatsuki A, Kaneda C, Melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain. *J Pineal Res.* 2000; 28: 89-96.
100. Özdemir D, Uysal N. Effect of melatonin on brain oxidative damage induced by traumatic brain injury in immature rats. *Physiol Res.* 2004; 54: 631-7.
101. Carloni S, Perrone S, Buonocore G, Longini M, Proietti F, Balduini W. Melatonin protects from the long-term consequences of a neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *J Pineal Res.* 2008; 44: 157-64.
102. Kumral A, Baskin H, Gökmen N, Yılmaz O, Genç K, Genç S, Tatlı MM, Duman N, Özer E, Özkan H. Selective inhibition of nitric oxide in hypoxic-ischemic brain model in newborn rats: is it an explanation for the protective role of erythropoietin? *Biol Neonate.* 2004; 85: 51-4.
103. Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for bcl-X_L and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell.* 1995; 80: 285-91.
104. Zha J, Harada H, Yang E. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X_L. *Cell.* 1996; 87: 619-28.
105. Yon JH, Carter LB, Reiter RJ, Jetovic-Todorovic V. Melatonin reduces the severity of anesthesia induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *Neurobiol Dis.* 2006; 21: 522-30
106. Koh PO. Melatonin attenuates the focal cerebral ischemic injury by inhibiting the dissociation of pBad from 14-3-3. *J Pineal Res.* 2008; 44: 101-6.
107. Shen YX, Xu SY, Wei W, Wang XL, Wang H, Sun X. Melatonin blocks rat hippocampal neuronal apoptosis induced by amyloid beta-peptide 25-35. *J Pineal Res.* 2002; 32: 163-7.

108. Duan Q, Wang Z, Lu T, Chen J, Wang X. Comparison of 6-hydroxymelatonin or melatonin in protecting neurons against ischemia/reperfusion-mediated injury. *J Pineal Res.* 2006; 41: 351-7.
109. Cuzzocrea S, Costantino G, Gitto E, Mazzon E, Furla F, Serraino I, Cordaro S, Barberi I, De Sarro A, Caputi AP. Protective effects of melatonin in ischemic brain injury. *J Pineal Res.* 2000; 29: 217-27.
110. Bülbüller N, Doğru O, Umaç H, Gürsu F, Akpolat N. L-arginin ile oluşturulan akut pankreatit üzerine melatonin ve pentoksifilin etkileri. *Ulus Travma Dergisi.* 2005: 108-115
111. Noyan T, Kömüroğlu U, Bayram İ, Şekeroğlu MR. Comparison of the effects of melatonin and pentoxifylline on carbon tetrachloride-induced liver toxicity in mice. *Cell Biol Toxicol.* 2006; 22: 381–91.
112. Gupta S, Agrawal A, Agrawal S, Su H, Gollapudi S. A paradox of immunodeficiency and inflammation in human aging: lessons learned from apoptosis. *Immun Ageing.* 2006; 3: 5-13.

EKLER

1. Deney Hayvanları Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DENEY HAYVANI ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

35340, İnciraltı, İzmir-232 4122254
<http://deu.edu.tr/tip/fakultesi/etik/deneyetik/>

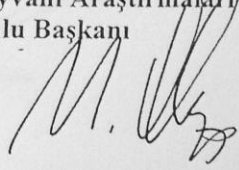
Sayı : 89
Tarih : 04/07/2008
Toplantı No : 03/14/2008
Toplantı Tarihi : 04/07/2008

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

24/2008 Protokol No'lu; Çocuk Sağlığı ve Hast. Anabilim Dalı Araştırma Görevlilerinden Dr.Ömer SÖZ ve Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hast. Anabilim Dalı doktorlarından Dr.Münevver TÜRKMEN'in sorumlusu olduğu, "Yenidoğan ratlarda hipoksik iskemik ensefalopati modelinde pentoksifilin ve melatonin etkinliğinin araştırılması" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Prof. Dr. Mustafa OLGUNER
Deney Hayvanı Araştırmaları
Etik Kurulu Başkanı



2. Denev Hayvanları Kullanım Kursu Katılım Belgesi

