

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ADLİ TIP ANABİLİM DALI**

**HAYATTA KALAN MEKANİK ASFİKSİ OLGULARINDA  
HİPOKAMPAL NÖRON SAYISINDAKİ DEĞİŞİKLİĞİN  
STEREOLOJİK METODLA GÖSTERİLMESİ: DENEYSEL  
SIÇAN ÇALIŞMASI**

**UZMANLIK TEZİ  
DR. CÜNEYT DESTAN CENGER**

**TEZ DANIŞMANI  
YRD. DOÇ. DR. AYŞE KURTULUŞ**

**DENİZLİ - 2010**

Yrd.Doç.Dr.Ayşe KURTULUŞ danışmanlığında Dr. Cüneyt Destan CENGER tarafından yapılan "Hayatta Kalan Mekanik Askıfsi Olgularına Hipokampal Nöron Sayısındaki Değişikliğin Stereolojik Metodla Gösterilmesi: Deneysel Sıçan Çalışması" başlıklı çalışma jürimiz tarafından Adli Tıp Anabilim Dalı UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN   
Prof.Dr.Kemalettin ACAR

ÜYE   
Yrd.Doç.Dr.Bora BOZ

ÜYE   
Yrd.Doç.Dr.Ayşe KURTULUŞ

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

  
T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ DEKANI

## TEŐEKKÜR SAYFASI

Bana bu hayatı yaşama şansını veren anne ve babama teőekkür ederim.

Uzmanlık eğitimimin her aşamasında ve tezimin hazırlanmasında yardım ve desteklerini benden esirgemeyen Prof. Dr. Kemalettin Acar, Yrd. Doç. Dr. Ayşe Kurtuluş, Yrd. Doç. Dr. Bora Boz'a teőekkür ederim.

Laboratuvar ęalıřmalarında emeği geçen Deneş Hayvanları Araştırma Laboratuvarı ęalıřanlarına ve Patoloji Anabilim Dalı laboratuvar ęalıřanlarına teőekkür ederim.

Tezin yazım aşamasındaki destekleri için Doç. Dr. Ahmet Ergin ve Uzm. Dr. Demet Ökke' ye teőekkür ederim.

Tez aşamasında tüm sıkıntılarımı paylaőan ve tezimin yazımında desteğini esirgemeyen eőime teőekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
<b>GİRİŞ</b> .....	1
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	2
<b>ASFİKSİ</b> .....	2
Asfiksilerin Sınıflandırılması.....	2
Asfiksi Dönemleri.....	4
Asfiksi Belirtileri.....	4
<b>ASİ</b> .....	6
Asıya Bağlı Ölümlerde Postmortem İnceleme.....	8
<b>STRANGULASYON (BOĞMA-BOĞULMA)</b> .....	11
Bağla Boğma.....	11
Elle Boğma.....	12
Boyun Kilidi (Boyun Kıskaçı, Mugging).....	13
<b>HİPOKAMPUS (KORNU AMMONİS)</b> .....	13
Anatomisi.....	13
Hipokampusun İşlevleri.....	13
Hipokampus İskeminin Etkisi.....	14
<b>SIÇANLAR HAKKINDA GENEL BİLGİLER</b> .....	15
<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	16
<b>STRANGULASYON MODELİNİN OLUŞTURULMASI</b> .....	16
<b>KESİT ALINMASI VE BOYAMA</b> .....	18
<b>STEREOLOJİK YÖNTEMLER</b> .....	18
Sistemik Rastgele Örneklemeye Stratejisi.....	19
Tarafsız Sayım Çerçevesi.....	19
Optik Disektör.....	20
Optik Parçalama (Fraksiyonlama) Yöntemi.....	21
<b>OPTİK PARÇALAMA YÖNTEMİNE GÖRE HÜCRE</b>	
<b>SAYIMI</b> .....	22
Parçalayıcı Örneklemeye Stratejisine Uygun Kesit Alma ve Kesit	

Örnekleme Oranı (KeÖO) .....	22
Alan Örnekleme Oranı (AÖO).....	22
Kesit Kalınlığının Ölçümü .....	23
Kalınlık Örnekleme Oranı (KaÖO).....	24
Nükleus (Hücre) Sayımı .....	24
Toplam Nöron Sayısı.....	25
Hata Katsayısı .....	25
İSTATİSTİKSEL YÖNTEM.....	26
<b>BULGULAR.....</b>	<b>27</b>
<b>SİÇANLARIN HÜCRE SAYIMI SONUÇLARI VE</b>	
<b>HİPOKAMPUSTA GÖRÜLEN PATOLOJİK</b>	
<b>DEĞİŞİKLİKLER.....</b>	<b>27</b>
<b>Grupların Hipokampus CA1, CA2, CA3 Alanlarındaki Toplam</b>	
<b>Piramidal Nöron Ortalama Sayıları.....</b>	<b>28</b>
<b>Gruplarda Hipokampusta Gözlenen Patolojik Değişiklikler.....</b>	<b>29</b>
<b>TARTIŞMA.....</b>	<b>31</b>
<b>SONUÇLAR.....</b>	<b>40</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>41</b>
<b>YABANCI DİL ÖZETİ.....</b>	<b>42</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>43</b>

## TABLÖLAR ÇİZELGESİ

	Sayfa No
<b>Tablo-1</b> Kontrol-1 nolu sıçanın hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanlarındaki toplam nöron sayısının bulunması sırasında gözlenen Hata Katsayısı (HK) hesaplanması.....	26
<b>Tablo -2</b> Kontrol grubu sıçanların hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanlarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplamasında kullanılan parametreler.....	27
<b>Tablo -3</b> Asfiksiye maruz kalan deney grubu sıçanların hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanlarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplamasında kullanılan parametreler .....	28
<b>Tablo -4</b> Grupların hipokampus CA1, CA2, CA3 piramidal tabaka alanları ortalama nöron sayıları.....	28

## ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Şekil-1</b> Pulse oksimetre ile sıçanın kuyruğundan oksijen satürasyonunun ölçümü.....	17
<b>Şekil-2</b> Strangulasyon modelinin uygulanması.....	17
<b>Şekil-3</b> Strangulasyon modeli uygulaması sonrası.....	17
<b>Şekil-4</b> Çalışmamızda kullandığımız tarafsız sayım çerçevesi ve özellikleri.....	25
<b>Şekil-5</b> Kontrol ve deney grubunda yer alan sıçanların hipokampus CA1, CA2 ve CA3 bölgelerindeki ortalama toplam piramidal nöron sayılarının dağılımı.....	29
<b>Şekil-6</b> Kontrol ve deney grubundaki üçüncü sıçanlara ait dokuzuncu kesitlerden alınan x4, x10, x40 ve x100'lük büyütmelelerdeki hipokampus görünimleri.....	30

# **HAYATTA KALAN MEKANİK ASFİKSİ OLGULARINDA HİPOKAMPAL NÖRON SAYISINDAKİ DEĞİŞİKLİĞİN STEREOLOJİK METOTLA GÖSTERİLMESİ: DENEYSEL SIÇAN ÇALIŞMASI**

## **GİRİŞ**

Solunumun temel amacı atmosferdeki oksijeni periferdeki doku hücrelerine ulaştırmak, dokulardaki karbondioksiti uzaklaştırmaktır (1, 2). Oksijen transferini engelleyen herhangi bir şey asfiksi olarak değerlendirilir (1, 3). Adli tıp uygulamalarında ölüm nedeni olarak asfiksiye sıklıkla rastlanmaktadır. Orjin kaza, intihar, cinayet ya da doğal ölümdür. Asfiksiye bağlı ölümlerde strangulasyon (ası, elle boğma, bağla boğma), suda boğulma gibi farklı yöntemler karşımıza çıkmaktadır. Türkiye’de yapılan bir çalışmada adli otopsilerin %15.7’sinin asfiksiye bağlı ölüm olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada en yaygın yöntem ise ası olarak bildirilmiştir (4). Yurt dışında asfiksiye bağlı ölümlerin değerlendirildiği farklı bir çalışmada ası en sık kullanılan yöntem olarak saptanmıştır (5).

Strangulasyonların tümü ölümlerle sonuçlanmaz (6, 7). Örneğin; ası uygulayanların yaklaşık %30’u ası sonrası hayatta kalır (7). Asfikside kurtulan kişilerde en sık rastlanan bulgu amnezi iken psikişik bozukluklar da görülür (8). Oluşan asfiksi başta santral sinir sistemi olmak üzere birçok sistemi etkiler (4). Asfiksiye bağlı beyin hasarı, tipik olarak iskemiden fazla etkilenen bir bölge olan hipokampusta gösterilebilir. Yapılan çalışmalarda hipokampusun amnezi ile ilişkisi olduğu bildirilmiştir (9). Hipokampus’u etkileyen lezyonu olan hastalarda hafızanın etkilendiği belirtilmiştir (2, 10).

Çalışmamızda sıçanlarda strangulasyon sonucu oluşturulan asfiksi sonrasında stereolojik yöntemler kullanılarak hipokampusta CA1, CA2 ve CA3 alanlarındaki piramidal nöron sayılarının ortalamasının bulunması ve asfiksi sonrası hipokampal hasarın hipokampusun CA1, CA2 ve CA3 alanlarındaki piramidal nöron sayıları üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.



## GENEL BİLGİLER

### ASFİKSİ

Solunumun temel amacı atmosferdeki oksijeni periferdeki doku hücrelerine ulaştırmak, dokulardaki karbondioksiti uzaklaştırmaktır (1, 2). Bunlar;

Fizyolojik olarak solunum süreci dört mekanizma ile açıklanır;

- 1) Havanın atmosferle akciğer alveolleri arasında girip çıkması sonucu meydana gelen pulmoner ventilasyon,
- 2) Alveollerle kan arasındaki oksijen ve karbondioksit difüzyonu,
- 3) Kan ve vücut sıvıları aracılığı ile hücrelere oksijenin ulaştırılması ve hücrelerde meydana gelen karbondioksitin uzaklaştırılması,
- 4) Solunum regülasyonu ve solunumun diğer yönleri (2, 11).

Yetişkin bir insanda arter kanında  $PO_2$  ortalama 80-98 mmHg,  $PCO_2$  40 mmHg'dır. Altmış yaş üstü kişilerde ise  $PO_2$  60-85 mmHg'dır. Genel olarak  $PO_2$ 'nin 60 mmHg'den düşük,  $PCO_2$ 'nin ise 50 mmHg'den fazla değerinde olması "hipoksi" olarak kabul edilir ve solunum yetmezliğine yol açar (8, 11).  $PO_2$  20-40 mmHg'ye düştüğünde ise fatal hipoksi görülür (1). Oksijen transferini engelleyen herhangi bir şey asfiksi olarak değerlendirilir. Kısaca asfiksi dokulardaki oksijen yetersizliğidir ve etimolojik olarak nabız yokluğu anlamına da gelir (1, 3).

### Asfiksilerin Sınıflaması

Shapiro sınıflandırmasına göre asfiksiye bağlı ölüm nedenleri değerlendirildiğinde;

1. Kanın akciğerlerde yeterince oksijenlenemediği (hipoksik hipoksi) ya da total oksijensizlik (anoksik anoksi) sonucu meydana gelen ölümler:

A.Ortamda bulunan havanın bileşiminin bozukluğu;

- a. Oksijenin azaldığı, yerine diğer gazların arttığı durumlar (yangın, duman, kuyu ve sarnıç gibi ortamlarda bulunma, havada ya da denizde ani yer değiştirme)
- b. Havanın normal bileşiminde olmasına rağmen diğer gazların arttığı durumlar (bütan gazı, hava gazı vb. gazlara maruz kalma)

- B. Solunum yollarının mekanik olarak kapandığı durumlar;
- Dış solunum deliklerinin kapatılması (ağız ve burun tıkanması)
  - Hava yollarının tıkanması (yabancı cisim aspirasyonu, ası, elle veya bağla boğma, suda boğulma)
- C. Toraks ve karın duvarının solunum hareketlerine izin vermeyecek şekilde sıkıştırılması (karın-göğüs basısı, diri gömülme)
- D. Solunum hareketlerinin felç nedeni ile durması (elektrik çarpması, suksinil kolin, kürar, organik fosfat, botulismus gibi zehirlenmeler, yüksek oranda metan, propan, karbondioksit, barbütirat, opium alımı)
2. Kanın oksijen taşıma kapasitesinin azalmasına (anemik hipoksi) bağlı ölümler: akut masif kanamalar, karbon monoksit, hidrojen sülfid, nitrit zehirlenmeleri vb.
3. Dokulara birim zamanda ulaşan oksijen miktarının akut olarak azalmasına bağlı ölümler: stagnant, staz tipi hipoksi (şok)
4. Dokuların oksijeni alamaması ya da oksidatif olayların deprese edilmesi sonucu ölümler ( histotoksik hipoksi ve histotoksik anoksi)

Camps ise, histotoksik hipoksi ve histotoksik anoksileri 4 grupta incelemiştir. Bunlar;

- Ekstrasellüler tip: Vücuttaki doku redoks enzim sistemleri inhibe olmuştur. Siyanür zehirlenmesinde sitokrom oksidaz enzimi inhibe olur. Çok sayıda hipnotik, anestezik ilaç, opium bileşiği enzim sistemlerini inhibe eder.
- Perisellüler tip: Hücrenin membran permeabilitesindeki azalma nedeni ile oksijen hücreye geçemez. Kloroform, halotan gibi halojenli hidrokarbon içeren, lipitlerde eriyen anestezik maddeler perisellüler tip hipoksiye neden olur.
- Substrat madde eksikliğine bağlı tip: Hücrelerde etkili ve metabolizma için gerekli maddelerde eksiklik vardır. İnsülin alan hastalarda oluşan hipoksiler ve serebral iskemi vb.
- Metabolik maddelerin birikmesinin etkili olduğu tip: Hücre solunumundan açığa çıkan metabolik ürünlerin atılmaması sonucu metabolizmanın engellenmesidir. Üremi, CO<sub>2</sub> zehirlenmesi ve serebral iskemi vb. (8, 11-13).

Asfiksini etyolojik sınıflandırılmasına bakıldığında;

1. Ası
2. Boğma: Elle boğma, bağla boğma, boyun kilidi, otoerotik asfiksiler
3. Tıkama–tıkanma: Ağız ve burun kapanması, ağız ve solunum yollarının yabancı cisim ile tıkanması, karın- göğüs basısı, diri gömülme, havasız yerde kapalı kalma (çevresel hipoksi), pozisyonel (postüral asfiksiler), boğucu gazlarla tıkanma
4. Kimyasal asfiksiler: Karbon monoksit zehirlenmesi, siyanür zehirlenmesi, hidrojen sülfür zehirlenmesi
5. Suda boğulma şeklindeki sınıflama karşımıza çıkar (11).

### **Asfiksi Dönemleri**

Asfiksiler genel olarak başlangıçtan ölüme kadar 3 dönemde incelenir.

1. Dönem: Bilinci açık olup, kanda oksijen azalmasına bağlı olarak beyindeki solunum merkezi uyarılır. Solunum çabası artar, nefes darlığı gelişir. Kan basıncı ve nabız hızlanır. Bu dönem 0,5-1,5 dakika kadar sürer, bu dönemin sonunda bilinç kapanır.
2. Dönem: Bilinç kaybı ya da konvülsiyon dönemi de denir. Beynin oksijensiz kalmasını takiben bilinç kaybı gelişir. Duysal fonksiyonlar ve refleksler bozulur. Düz kasların gevşemesine bağlı olarak bazen idrar, gaita atımı ve ejakülasyon olur.
3. Dönem: Solunum depresyonu ya da ölüm devresidir (8, 12).

### **Asfiksi Belirtileri**

1. Genel Belirtiler
  - a) Dış Bulgular

Siyanoz: Kanın rengini oksihemoglobin ve eritrositlerin içindeki hemoglobin miktarı belirler. Oksijenlenmenin azalması ile derinin rengi mor ya da maviye döner. Kanda 5 gram/100ml indirgenmiş hemoglobin bulunur ise siyanoz belirdir. İndirgenmiş hemoglobin miktarındaki artışa bağlı olarak önce dudaklar, kulaklar ve çene takiben yüz, boyun ve omuz siyanotik görünüm alır. Siyanoz birçok ölümün terminal döneminde meydana gelir. Siyanoz tek başına solunum yollarında obstrüksiyonu göstermez (1, 8, 11).

Konjesyon ve ödem: Venöz kanın dokulardan uzaklaştırılmasında yetersizlik sonucu ortaya çıkan pasif bir durumdur (1). Asfiksili ölümlerde boyun ve göğüse bası uygulandığında, kanın kalbe dönüşünün engellenmesi sonucu konjesyon ve artmış venöz basıncın sonucunda plazma transüstasyonuna bağlı yüzde ödem meydana gelir. Asfiksini etkili olmadığı birçok ölüm türünde bu bulgular görülebilir (8, 11).

Peteşi: Kalbe venöz dönüşün engellenmesi nedeniyle venöz basınç artar ve venüller yırtılır. Cilt ve özellikle ince duvarlı venülleri olan yapılarda (plevra, epikard, göz kapağı) görülen 2 mm'nin altındaki kanamalarıdır. Hemorajik hastalıklar hariç periton ve pariyetal plevrada peteşiler nadirdir (1, 8, 11).

#### b) İç Bulgular

İç organlarda ödem: Özellikle akciğer ve beyin ödemi asfiksilerde sık rastlanan bir bulgu olmakla birlikte kesin bir bulgu değeri taşımaz. Asfiksi dışı pek çok nedene bağlı olarak meydana gelebilir.

Hiperemi: Tüm organlarda venöz staza bağlı olarak hiperemi meydana gelir.

Peteşiler: Plevra, perikard gibi göğüs boşluğundaki seröz zarlarda özellikle plevra ve epikard gibi desteksiz bölgelerde sıklıkla görülür. Peteşiler, asfiksiye spesifik bulgu değildir.

Kanın akıcılığı: Asfiksili ölümlerde sık rastlanan bir bulgudur. Kanın ölümden sonra pıhtılaşmadan akıcı bir nitelik kazanması fibrinolizin varlığına bağlıdır.

Seröz boşluklarda sıvı birikimi: Asfiksik ölümlerde kapiller endotelinde hasar meydana gelir. Buna bağlı olarak kapillerlerde dilatasyon, kapiller permeabilitesinde artış, kan stazı ve seröz boşluklarda sıvı birikmesi meydana gelir.

Biyokimyasal ve yapısal değişiklikler: Hipoksik ve anoksik ölümlerde özellikle parenkimatöz organlarda değişiklikler oluşur. Ancak, bu değişikliklerin postmortem otolitik değişikliklerden ayırt edilmesi çok zordur. Elektron mikroskobu ile en fazla

ölümden sonraki 60 dakika içinde değerlendirilebilirse fikir verebilir. Kandaki PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub>, PH ve diğer biyokimyasal değerler postmortem dönemde hızla değişmesi nedeni ile anlamsızdır (8, 11).

## 2. Özel belirtiler

Asfiksini türüne bağlı olarak meydana gelen asfiksini etyolojisini gösteren belirtilerdir. Örneğin asıda altı ekimozlu ip izi, elle boğmalarda boyunda yarım ay tarzındaki şekilli sıyrık ve ekimozlar (tırnak izleri) bu olgu türlerine ait spesifik bulgulardır (8).

## ASI

Ası bir bağla boğulma olup, bir ucu yukarıya tutturulmuş, diğer ucuilmek şeklinde boyuna geçirilmiş ya da birden fazla kez boyuna sarılmış bir bağın, vücudun tam ya da tam olmayan ağırlığı ile boynun sıkıştırılması sonucunda solunum yolu, damar ve sinirlere bası ile yaşamsal fonksiyonların engellenmesi neticesi ölümün meydana geldiği olaydır (8, 14).

Asıların orjininde büyük bir kısmında intihar görülürken, nadir olarak cinayet ve kazada görülür. Seksüel, mazoşistik amaçlarla yapılan asılar kazaen ölümle sonuçlanabilir. Çocuklar oyun oynarken kendilerini asabilirler. Trapez oyuncularında da kazai ası görülmektedir (8, 15-18).

Tam asıda vücut genellikle tam olarak asılmıştır, yani ayaklar dahil vücudun hiçbir bölümü yer ile temas etmemektedir. Tam olmayan asıda ise vücudun bir bölümü yer ile veya başka bir cisim ile temas halindedir (14). Kişinin alçakta bulunan bir noktadan oturur, çömelir ya da yarı yatar pozisyona geçerek kendini astığı birçok durumda ölüm meydana gelir (11).

Düğümün boyundaki konumuna göre asılar ikiye ayrılır. Düğümün ensede olduğu asılara tipik ası, boynun yanlarında ya da ön tarafında olduğu asılara ise atipik ası denir. Yüzün rengine göre ası beyaz ve mor ası olarak ikiye ayrılır. Tipik asıda boyundaki damarların iki taraflı olarak tamamen kapanması sonucu yüzün rengi soluk kalır. Ayrıca beyaz ası, ölümün vagal inhibisyona bağlı olarak aniden

meydana geldiği ve klasik asfiksi bulgularının oluşması için yeterli sürenin geçmediği olgular için de geçerlidir. Atipik ası, boyundaki damarların iki taraflı olarak tamamen kapanmaması, arteriyel dolaşım devam ederken venöz dolaşımın durması ve venöz staza bağlı olarak yüzün koyu morumsu renk almasına neden olur (8).

Ası vasıtası: Her türlü ip, urgan, halat, kemer tülbent, çarşaf, kablo teli, kravat, gazlı bez, bornoz/pijama kuşağı vb, gereçlerdir (19, 20).

Ası telemi (ası çizgisi): Asıda boyunda meydana gelen ip izidir (8).

Ası noktası (sabit nokta): Ası vasıtasının bağlı olduğu noktadır. Tam asılarda tavandaki, duvardaki bir çivi, çengel, kiriş ya da ağaç dalı gibi yerler kullanılırken, tam olmayan asılarda pencere, kapı, dolap kolları, kalorifer, su boruları gibi yerler kullanılır (8, 20).

Düğüm (ilmik): Boyna geçirilen ip genellikle düğüm yapılarak sabitleştirilir. Bazen ip herhangi bir düğüm yapılmaksızın kement ya da herhangi bir şekilde boyuna geçirilebilir böylece ası ipinin boynu saran halka kısmı meydana gelir (8).

Düğüm izi: Telemine düğüme rastlayan kısmı, düğümün ciltte oluşturduğu izdir (8).

Dıştan boyuna bası ile solunum yollarının kapatılması için 10-15 kg, v.jugularis'in kapatılması için 2-2,5 kg, a.carotis'in kapanması için 3,5 kg, a.vertebralis'in kapanması için eğik olarak 8-17 kg, yatay olarak 30-40 kg ve trakeanın kapanması için 15 kg'lık basınç uygulanmalıdır (7, 8, 21).

Solunum yollarının kapanması, boyun damarlarının sıkışması, boyundaki glomus caroticus ve baroreseptörlerin uyarılması ile gelişen refleks kardiak arrest (vagal inhibisyon, nörojenik mekanizma), medulla spinalis lezyonları asıda ölüme neden olan başlıca mekanizmalardır (7, 8). Asıda ölüm genellikle beyin iskemisi ve vagal inhibisyon sonucunda kalbin durması şeklinde gelişir. Tam ası şeklindeki

ölümlerin çoğunun vagal inhibisyon sonucu meydana geldiği, aynı mekanizmanın daha düşük oranlarda elle boğma ve bağla boğmalarda da meydana gelebildiği bildirilmiştir (7, 8).

Kişinin yüksek bir yerden boşluğa bırakılması sonucu gelişen asılarda ve hükmi asılarda ise boyuna ani yoğun bir güç uygulanması nedeni ile servikal vertebraların özellikle orta bölümünde fraktür, atlanto-oksipital eklemden dislokasyon ve bazen fraktür ile medulla spinalis lezyonları meydana gelebilir. Bu bulgular diğer ası şekillerinde rastlanmaz (7, 8).

Ası sırasında; Şuur kaybı evresi: Ası ipinin boyuna geçirildiği andan şuur kaybına kadar geçen süredir. Tam ve tipik asıda 15-20 saniye (beyin iskemisi nedeniyle), atipik ve yarı asıda ise 3-5 saniyedir (beyne kan hücumu “konjesyon” nedeniyle). Bu zaman aralığında kulak çınlaması, kulaklarda uğultu, baş dönmesi, gözlerde kıvılcımlanma, vücutta sıcaklık hissi ve ipin sıktığı yerde şiddetli bir ağrı duyulur. Erkeklerde ereksiyon hatta ejakülasyon olabilir (16).

Çırpınma (konvülziyon) evresi: Şuur kaybolduktan sonra konvülziyonlar başlar. Gözler dışarı fırlar, yüz kasları gerilir, kollar bacaklar yakında bulunan duvara ve eşyalara çarpar. Bu yüzden vücutta yaralar meydana gelir. Bu devre 1-2 dakika sürer (16).

Yalancı ölüm evresi: Konvülziyonlar durur, solunum ve dolaşım yavaşlar, kaslar ve sfinkterler gevşer, idrar, gaita ve sperm çıkışı olur. Bu evre bitmeden yetişilirse şahıs canlı olarak kurtulabilir. Solunum gittikçe yüzeyelleşir ve durur. Bunu dolaşımın durması takip eder. İpe takıldıktan sonra şahıs yaklaşık 5-10 dakika arasında ölür (16).

### **Asıya Bağlı Ölümlerde Postmortem İnceleme**

1) Olay yeri incelemesi: Asının olduğu çevre incelenerek cesedin bulunduğu pozisyonda kendini asıp asamayacağına (eşyalar ve bunların ası ile ilişkisi) karar verilmelidir. Olay yerinde cesedin muayenesine başlamadan önce ası ortamını gösteren ayrıntılı krokiler çizilmeli, fotoğraflar ve video çekimi yapılmalıdır. Cesedin

bulunduğu ortamın tavan-taban yüksekliği, düğüm ile ası noktası arası mesafe, cesedin boyu, taban-ayak arası mesafe gibi ölçümler yapılmalıdır. Cesedin ayaklarının yere değip değmediği, ası ipinin özelliği, kaç kat uygulandığı, düğümün türü, ipin halka kısmının boyundaki görünümü tanımlanmalıdır. Ası olgularında ipin sabitlendiği ası noktası, olay yerinde kişinin çıkmak için kullandığı tabure ya da sandalye, vücudunda başka travmatik lezyonların bulunup bulunmadığına dikkat edilmelidir (8, 20). Ölenin akrabalarından ve tanıdıklarından alınan ifadeye göre olayın orjini hakkında önemli ipuçları elde edilebilir. Olay yerinde ya da ölen kişinin daha önce bulunduğu çevrede intihar notu araştırılmalıdır. İntihar notu incelendiğinde yazının ölen kişiye ait olması önemlidir. Ceset ipten indirilirken düğüm kesilmez ya da çözülmez. Bunun için bir sicimin iki ucu ası ipinin halka kısmının ortasından düğüme uzak olarak en az 3-4 cm'lik bir ara ile bağlanır ve bunun ortasından kesilir. Böylece genişletilen ası ipinin halka kısmı, düğüm bozulmadan boyundan çıkarılmış olur. Ceset indirildikten sonra olay yerinde dış muayenesi yapılmalıdır. Çünkü cesedin otopsi salonuna taşınması sırasında artefaktlar oluşabilir. Olay yerinde ası telemi incelenmeli, boyundan çıkartılan ası vasıtası ile ilişkisi değerlendirilmelidir (8, 14, 22).

2) Dış Muayene: Tüm asfiksilerde olduğu gibi asıda venöz staz sonucunda konjesyon, ödem, siyanoz ve peteşiler gibi nonspesifik belirtiler görülür. Ölüm mekanizmasına göre yüzün rengi değişir. Dolaşım arresti ya da inhibisyon nedeniyle ölenlerde ve tipik asıda yüzün rengi soluk ve beyazdır. Atipik asıda ve tam olmayan asıda ise yüz siyanoze ve mordur. Gözler dışarı fırlamıştır. Konjunktivada, yüzde peteşial kanamalar bulunur. Genelde dil dişler arasına sıkışmış ve şiştir. Ağız ve burun deliklerinden salgılar gelir. Bunun nedeni asıda ipin tükruk bezlerini sıkıştırmasıdır. Ölü lekeleri, cesedin ipte belli bir süre bekleyince yer çekimine uygun olarak vücut alt kısımlarda, el ve ayaklarda eldiven çorap şeklindedir. Boyunda ası vasıtasının oluşturduğu telem kişinin asılı kaldığı süreye ve ası vasıtasına göre değişiklik gösterir. Kullanılan ası vasıtası kalın ve yumuşak bir cisim ise (atkı vs.) oluşan telem soluk ve yüzeyeldir. İp kullanılırsa daha derin telem meydana gelir. Telem, tam asıda genellikle alt çene ve larenks arasındadır. Telem %80 oranında tiroid kıkırdağın üst tarafında, %15 oranında tiroid kıkırdağın üzerinde, %5 oranında tiroid kıkırdağın altında yer alır. En geniş ve derin yeri halka



tarafının orta kısmıdır. Asıda kullanılan ipin düğümü sabit ise telem düğümü doğru yükselici ve yüzeyleşici bir özellik gösterir. Kement (kayan) düğümlü asılarda telem vücut eksenine diktir, boynu çepeçevre sarar ve derinliği her yerde aynıdır (8). Azmak ve arkadaşlarının (23) çalışmasında 33 ası olgusunun tamamında ip izi tarif edildiği, 28 olguda (%84,4) ip izinin larinksin üstünde ve çene altında bulunduğu, hyoid kemik boynuzlarına ait kırık ve etrafında kanamanın 11 olguda (%33,3), troid kırık ve boynuzlarına ait kırığın beş olguda (%15,1) ve diğer boyun yumuşak dokularına ait kanamaların 18 olguda (%54,5) tespit edildiği belirtilmiştir. Ölen kişinin can çekişme sırasında el ve ayaklarının etraftaki duvar, kapı, kolon gibi yerlere çarpmasına bağlı sıyrık ve ufak ekimozlar olabilir. Bu bulgular canlı asıyı destekleyici kanıt olarak kabul edilir. Ayrıca kişi can çekişme sırasında kendini ipten kurtarabilmek için boyun bölgesinde tırnak izleri oluşturabilir. Telem kenarında ya da birkaç sıralı telem arasında hiperemik bir çizginin kesin olmamakla birlikte özellikle canlı asıyı düşündüren (vital) önemli bir bulgudur. Telem çürümeye dirençlidir. Penis ve skrotum konjesyonlu ve şiş görünümündedir. Ayrıca asılarda daha sık gaita, idrar ve sperm atımı meydana geldiğinden, hekim dışındaki kişiler tarafından cinsel suçlar ile ilgili kuşku ve iddialar ortaya atılabilir (8, 15, 16).

3) İç Muayene: Otopsi sırasında boyun yumuşak dokuları ve retrofarinkste artefakt kanamasını engellemek için boyun organları baş ve göğüs açıldıktan sonra çıkartılıp incelenmelidir. Boyun omurları ve medulla spinalise ait lezyonların araştırılması için ense de diseke edilmelidir. Telem bulunması tek başına canlı ası kanıtı değildir. Asıda cilt altı yumuşak dokularda, farinks arka duvarında ve kaslarda kanama ve ekimoz, hyoid kemik ve tiroid kırıkta ekimozlu kırık araştırılır. Telem uyan bölgelerde ekimozun bulunması canlı asının kesin ve spesifik bulgusudur. Farinksteki ekimozun nedeni larinksin arkaya hızla gidip vurmasıdır (8, 16). Asıda hyoid kemik boynuzu ve tiroid kırıkta ucunda kırık saptanması değerli bir bulgu olmakla birlikte olguların çoğunda rastlanılmamaktadır (20). Bazı yazarlar, asıda kırıkların kanamasız olmasını ya da çok az kanamanın görülmesini ası ipinin bası etkisi ile kafaya giren kan dolaşımını kesmesine bağlamışlardır. Asıda diseke edilen cilt ışığa tutulup incelendiğinde telem iç yüzünün parlak ve şeffaf olduğu görülür. Buna gümüşlü hat denir. Ancak vital bir bulgu değildir. A. carotis'in intimasında yırtılma, adventisyasında hematoma görülebilir. Amussat işareti olarak

tanımlanan bu bulgu canlı asının kanıtı olarak kabul edilmektedir. Asırlarla ilgili olarak yapılan araştırmalarda bu bulguya nadiren rastlandığı, hatta hiç rastlanmadığı bildirilmiştir. Ası açısından fazla bir önemi yoktur. Nadir de olsa yüksekten kendini bırakma olgularında intimada yırtık meydana gelebilir. Asfiksi bulguları tam olmayan ve atipik asırlarda daha belirginken, tam asırlarda özellikle ölümün çok kısa süre içinde gerçekleştiği nörojenik mekanizmanın ön planda olduğu asırlarda çok hafif olur ya da olmaz (8).

## **STRANGULASYON (BOĞMA-BOĞULMA)**

Strangulasyon, asfiksi yöntemlerinden biridir. Bir kişinin boyun bölgesine ip, bağ, el, ön kol veya herhangi bir sert cismin dıştan aktif bir kuvvet uygulanması sonucu, hava yolları ve/veya damarların tam veya kısmen kapatılması ile oluşturulan eyleme boğma denir (22). Ölüm solunum yollarının kapanması, boyun damarların sıkışması, boyundaki glomus caroticus ve baroreseptörlerin uyarılması ile gelişen refleks kardiak arrest sonucu meydana gelir (8, 14).

### **Bağla Boğma**

Bağla boğma aktif bir kuvvet kullanılarak ip ya da benzeri bir cisimle bir kişinin boynunun sıkılması olayıdır. Bağla boğmaların orjininin çoğunu cinayet oluşturur. Nadiren kaza ve intihar olguları da görülür (3, 22, 24). Bir çalışmada strangulasyon olgularının %94.89'unu cinayet, %5.11'ini kaza oluşturduğu belirtilmiştir (5).

Boyunda oluşan ize bağla boğma telemi adı verilir. Bağla boğma teleminin özellikleri:

1. Genellikle larinks üst kısmı ve çene alt kısmındadır.
2. Genellikle vücut eksenine dik iken, inici ya da çıkıcı görünümde olabilir.
3. Bağla boğma telemi genellikle boynu çepeçevre sarar, derinliği her yerde aynıdır. Bağla boyun arasına el, sakal, yaka gibi cisim girmişse kesintiler gösterir.

4. Bağla boğma telemi çevresinde sıyrık ve ekimozlara sıklıkla rastlanır. Bunlar genellikle ölen kişinin bağı çıkarmak için abalamasına bağlı olarak tırnaklarını kullanması ile bazen de saldırganın kişiyi elle boğmaya çabalaması sonucu oluşur (8, 11).

İ muayene: Boyunda cilt altı ve kas dokularında çeşitli derecelerde ekimozlar bulunur. Bazen özellikle yumuşak bağlar uygulandığında ekimoz oluşmayabilir. Larinks kırıkdağlarında asıdan daha fazla oranda kırıklara rastlanır. İç organlarda oluşun konjestif değişiklikler belirgindir. Bağla boğmada hyoid kemik kırığı seyrek görülür. Larinks kırıkdağ ve hyoid kemik kırıkları etrafında kanamaların bulunması anlamlı olmakla birlikte her zaman rastlanmayabilir (8). Bağla boğma olgularının %80'ininde boyun kemikleri ve kartilaj kırıkları görülürken, olguların % 44.9'unda troid ve diğer larinks kartilajında, %25.5'inde hyoid kemikte kırık görülür. Bağla boğma olgularının %90'ında vücudun göğüs, kafa, sırt, ekstremiteler gibi bölgelerinde travmaya yönelik bulgular bulunur (5).

### **Elle Boğma**

Boynun nden ya da yanlardan arkaya doğru bir ya da iki elle bastırılmasıdır. Elle boğma olgularının orjini cinayettir. Çok nadir olarak kazaen boyna yönelik girişimler sırasında (Örneğin: Çocuklarda şaka yaparken boyna ani güçlü basınç uygulanması ya da intihar amaçlı kendi boynunu elleri ile sıkıştırma sonucu kazaen) ölüm meydana gelebilir. Elle boğmada ölüm mekanizması; 1) Solunum yollarının kapanması hipoksi sonucu ani ölüm 2) Damarların sıkıştırılması ile serebral hipoksi gelişir ve yeterli süre geçer ise ölüm ile sonuçlanabilir 3) Bir ya da her iki karotis sinüse basıya bağlı olarak refleks kardiyak durma sonucu ani ölüm gelişebilir (8, 11).

Boyunda, ensede ve yüzde saptanan sıyrık ve ekimozların niteliği araştırılmalıdır. Bu lezyonlar yarımday tarzında esmer ve kuru görünümde tırnak yaraları şeklinde ise elle boğma açısından spesifik bir bulgu olarak kabul edilir. Aynı tip lezyonlar elle boğma sırasında ağız ve burun deliklerinin kapatılmasına yönelik

olarak ağız burun etrafında da bulunabilir. Hyoid kemik kırıklarına elle boğmada sıkça rastlanır ve genellikle kırık çevresinde ekimoz da vardır (8, 11).

### **Boyun Kilidi (Boyun Kısıkaçı, Mugging)**

Elle boğmanın özel bir şekli olarak ele alınabilir. Boyna kol ya da uzun sert bir cismin bastırılması şeklinde yapılır. Sıklıkla trakea basısı sonucu asfiksiye bağı olarak ya da bazen karotis basısı sonucu nörojenik yolla ani ölüm meydana gelir (8, 11).

### **HİPOKAMPUS (KORNU AMMONİS)**

#### **Anatomisi**

Hipokampus temporal lop korteksinin medial kısmında yan ventriküllerin kornu temporalis (inferius)'in tabanı boyunca uzanır. Hipokampus insanda yaklaşık 5 cm uzunluğundadır. Pes hipokampi denilen ön ucu geniştir ve burada 3-4 yuvarlak çıkıntı bulunur. Hipokampusun kesiti C harfi şeklindedir. Ventrikül boşluğuna bakan yüzü konveks, hemisferin alt yüzüne doğru yönelmiş yüzü konkavdır. Ventrikül boşluğuna bakan konveks yüzü alveus denilen ince beyaz cevher tabakası ile kaplıdır. Bununda üzeri ependim hücreleri ile kaplıdır. Hipokampusta bulunan sinir hücrelerinin aksonları myelin liflerdir ve bu lifler alveusu oluşturur. Bu lifler hipokampusun medial kenarına doğru uzanarak fimbria hipokampiyi oluştururlar. Gyrus dentatus ve hipokampus arasında bulunan fimbria hipokampi, arkada krus fornix olarak uzanır (2, 25, 26).

#### **Hipokampusun İşlevleri**

Hipokampus ve ona bağı temporal lob yapıları; serebral korteks, amigdala, hipotalamus, septum, mamiller cisimler gibi temel limbik sistem bölgeleriyle sayısız indirekt bağlantılar gösterir ve hipokampal formasyon adını alır. Hemen her tip duysal deneyim hipokampusun çeşitli bölümlerini aktive eder. Hipokampustan çıkan sinyaller ön talamusa, hipotalamusa ve limbik sistemin diğere bölgelerine giderler. Hipokampusun ve diğere limbik yapıların değışik alanlarının uyarılması da öfke, edilgenlik, aşırı seks güdüsü gibi davranışların görülmesine neden olur.

Hipokampusun diğer bir özelliği aşırı uyarılması olup, bunun nedeni hipokampus korteksinin bazı alanlarının beynin diğer bölgeleri gibi altı tabaka değil üç sinir hücresi tabakasından oluşmasıdır. Hipokampusu çift taraflı çıkarılan insanlar önceden öğrenilmiş anıları tatminkar bir şekilde hatırlayabilmektedir. Ancak sözel simgelere dayanan yeni bilgi edinmemektedir. Hipokampusu etkileyen lezyonu olan hastada kısa süreli hafızanın uzun süreli hafızaya dönüştürülmediği görülmüştür. Buna anterograd amnezi denir. Lezyonun sol hipokampusta olduğu durumlarda daha çok sözel hafıza etkilenirken, sağda olduğu durumlarda görsel hafıza etkilenir (2, 9, 10).

### **Hipokampus İskeminin Etkisi**

Beyinde yer alan nöronların ölümünde caspase bağımlı apoptoz temel ölüm nedenidir. Ek olarak otofaji, morfolojik ve mekanizmal değişimlere bağlı ölüm görülebilir. Eksitotoksik nöron ölümüne yol açan serebral iskemide farklı hücre ölüm programları aktive olabilir ve farklı görünümler ortaya çıkarabilir. Etkilenen subjentin yaşına ve etkilenen beyin bölgesine bağlı olarak nekrotik, apoptotik kaskad ya da apoptotik-nekrotik kaskad görülebilmektedir. İskemik alanda, ATP azalması, hücre içi iyon dağılımının yapılması, nitrik oksit veya süperoksit radikallerinin artmış üretimine bağlı kaplain aktivasyonu sonucu caspase inaktive olur. Kaplain aktivasyonu ile katepsin B, L ve DNaz II gibi farklı hidrolitik enzimlerin salınımı ile sonuçlanan lizozomal membran değişimine neden olur. Bu süreç iskemi sonrası hemen başlar ve beşinci günde sonlanır (27).

İskemi hipokampusun CA1 bölgesi gibi özellikli beyin alanlarında nöronların ölümü ile sonuçlanan hasara yol açmaktadır. İskemi sonrası nöron ölümünde apoptozun histolojik ve biyokimyasal özellikleri ortaya çıkmaktadır. Geçici iskemi sonrası hipokampusun CA1 bölgesinde gecikmiş nöron hasarının ortaya çıktığı bilinmektedir. CA1 bölgesindeki piramidal hücrelerde iskemi sonrası 2-3 günde histolojik değişiklikler ilk kez ortaya çıkarken beşinci ve yedinci günlerde belirgin hale gelir (27, 28).

## **SİÇANLAR HAKKINDA GENEL BİLGİLER**

Erkek ratların vücut ağırlıkları 450-520 gram iken dişilerin ise 250-300 gramdır. Kalbin dakikadaki atım sayısı 250-450, pO<sub>2</sub>: 93.2 mm Hg, pCO<sub>2</sub>: 39.9 mm Hg, sistolik arterial basıncı 88-184 mm Hg, diastolik arterial basıncı: 58-145 mm Hg'dir. Sıçanların akciğeri sağda dört loptan, solda bir loptan meydana gelmektedir. Sıçan santral sinir sistemi beyin ve spinal korddan oluşur. Beyin ise serebrum ve serebellumdan oluşmuştur. Santral sinir sistemleri dura, arachnoid ve pia mater olmak üzere üç katlı zarla çevrilidir (29).

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan 10.06.2009 tarihinde 06 sayılı toplantıda etik kurul onayı alındıktan sonra başlatılmıştır. Çalışma süresince, deney hayvanları çalışma etiğine uyulmuştur.

Çalışmanın deneysel kısmı Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarı'nda, histolojik çalışmalar ise Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı'nda ve Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Ana Bilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda 4-5 aylık, 165-290 gram ağırlığında olan 10 Winstar Albino dişi sıçan (Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarı) kullanılmıştır. Sıçanlar altları plastik, üstü tel olan özel kafeslere yerleştirilmiştir. Sıçanların tamamı çalışma boyunca oda ısısında ( $22 \pm 2$  °C),  $\%50 \pm 5$  nem ortamında, 12 saatlik aydınlık-karanlık siklusu bulunan ve sıçanların yiyecek ve suya kolaylıkla ulaşabileceği bir ortamda takip edilmiştir.

Sıçanlar rastgele örnekleme yöntemi ile seçilerek iki gruba ayrılmıştır.

1. grup: Kontrol grubu (n=5)
2. grup: Deney grubu; Strangulasyon uygulanarak asfiksiye maruz kalan (n=5)

### STRANGULASYON MODELİNİN OLUŞTURULMASI

Deney grubundaki beş sıçan 5 mg/kg ksilazin hidroklorür ve 90 mg/kg ketamin hidroklorür kombinasyonu intramuskular (i.m) uygulanarak derin anestezi altına alındı. Sıçanlar derin anesteziye girdikten sonra işlem tahtasına alındı. İşlem boyunca pulse oksimetre ile sıçanların kan oksijen düzeyleri monitörize edildi (Şekil-1). İnce sicim boyun bölgesini bir kez dolanacak şekilde yerleştirilip serbest uçlar işlem tahtasının deliklerinden geçirildi. Sicimin her iki serbest ucuna 125'şer gram (1,226 Newton) ağırlık bağlandı (Şekil-2). Strangulasyon beş dakika süre ile uygulanarak global iskemi oluşturuldu (30). Kan oksijen düzeyi  $\%40-50$  olan sıçanlarda strangulasyon kaldırılarak reperfüzyon sağlandı (Şekil-3). Derin anestezinin hipokampus üzerine etkisinin dışlanması için kontrol grubundaki sıçanlara da 5

mg/kg ksilazin hidroklorür ve 90 mg/kg ketamin hidroklorür kombinasyonu intramuskuler olarak uygulandı. Deney ve kontrol gruplarındaki sıçanlar yedi gün boyunca aynı ortam koşullarında farklı kafeste izlendi.



**Şekil-1:** Pulse oksimetre ile sıçanın kuyruğundan oksijen satürasyonunun ölçümü



**Şekil-2:** Strangulasyon modelinin uygulanması



**Şekil- 3:** Strangulasyon modeli uygulaması sonrası



## **KESİT ALINMASI VE BOYAMA**

Yedinci günün sonunda kontrol grubu da dahil on sıçan, 5 mg/kg ksilazin hidroklorür ve 90 mg/kg ketamin hidroklorür kombinasyonu intramuskuler (i.m.) uygulanarak derin anestezi altına alındı ve servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Kafatası ince uçlu bir pens yardımı ile hızlı bir şekilde foramen magnumdan başlayarak önce orta hatta, sonra yanlara doğru açıldı. Duramater kaldırıldı ve beyin ortaya çıkarıldı. Beyin tabanında bulunan sinirler, önden arkaya doğru kesildikten sonra beyin jel damlatılmış bir taşıma tablasına alındı ve -50 °C’de hazır bulunan kriyostat (Leica CM3050) cihazına konuldu. Hızlı dondurma işlemi ile doku fiksasyonu sağlandı. Taşıma tablası, kesitlerin transvers olarak alınabilmesine olanak verecek şekilde yerleştirildi. Kesitler parçalayıcı örnekleme stratejisine uygun olarak lamaların üzerine alındı. Hematoksilin Eosin (H&E) boyama işlemine geçildi. Bunun için taşıyıcılara yerleştirilen kesitler sırasıyla %96, %90, %80 ve %70’lik alkol içeren kaplarda 5’er dakika bekletildi. Kesitler suda yıkandı ve hematoksilinde 2,5-3 dakika bekletildi ve tekrar suda yıkandı. Asit-alkol solüsyonuna daldırılıp çıkartılan kesitler suda yıkandıktan sonra amonyak solüsyonuna daldırılıp çıkartıldı ve tekrar yıkandı. Eosin solüsyonunda 3-5 saniye bekletildikten sonra tekrar yıkama işlemi uygulanan kesitler sırası ile %70, %80, %90 ve %96’lık alkol içeren kaplardan her birinde 5’er dakika bekletilerek geçirildi. Bu işlemleri takiben kesitler 30 dakika ksilen içinde bekletildikten sonra üzerlerine entellan dökülerek lam ile kapatıldı, kurumaya bırakıldı.

Kurutma işleminden sonra mikroskop altında 4, 10, 40 ve 100’lük büyütmelemler ile incelenen kesitlerde tüm beyin dokusu görülerek sağ ve sol hemisfer ayırımı yapıldı.

## **STEREOLOJİK YÖNTEMLER**

Stereoloji iki boyutlu kesit düzlemlerini kullanarak, üç boyutlu bir cismin hacim, yüzey alanı, sayı ve uzunluk gibi geometrik özellikleri hakkında sayısal verileri elde etmeye çalışan bir bilim dalıdır. Sterio tarafından 1984 yılında stereolojik yöntemlerden disektör yönteminin bulunmasıyla mikroskobik

çalışmalarda yeni bir dönem başlamış ve önceki yöntemlere ek olarak daha tarafsız ve etkin sayım yöntemleri tanımlanmıştır (31, 32).

Stereolojik yöntemlerin en önemli özellikleri etkin, tarafsız ve kesin olmalarıdır. Etkin olma özellikleri en az zamanda en güvenilir sonuca götürmesidir. Tarafsızlık hiçbir ön şarta bağlı kalmadan gerçek değerden sistematik sapma göstermemesidir. Verilen güvenlik sınırları içerisinde istatistiksel olarak gerçek değere en yakın sonuç vermesi ise kesin olma özelliğidir. Stereolojik yöntemlerle beyindeki toplam nöron sayısı, sinaps yoğunluğu veya toplam beyin hacmi, böbrekte korteks-medulla oranı, toplam glomerül sayısı, vücuttaki damarların toplam uzunlukları, ince bağırsakların toplam yüzey alanları vb. gibi hesaplamalar yapılabilir (32, 33).

### **Sistematik Rastgele Örneklem Stratejisi**

Sistematik rastgele örneklem stratejisi stereolojik yöntemlerin temel ilkelerindedir. Belli bir örneklem aralığı ile ilk aralık içinden rasgele bir noktadan başlanmak şartıyla ilgilenilen yapının tamamının örneklenmesidir. Sistematik olması örneklemin önceden belirlenmiş aralıklarla yapılmasını ifade eder. Rastgele olması ise bu sistematik örneklemin belirlenen örneklem aralığı içindeki rastgele bir sayı ile başlanmasıdır. Bu örneklem biçiminin temel özelliği ilgilenilen yapının her noktasına eşit örneklem şansı tanınmasıdır. Stereolojik bir çalışmanın tarafsız olması için sistematik rastgele örneklemin gerekli tüm seviyelerde (organlardan alınacak dilimlerde alınacak bloklarda, bloklardan alınacak kesitlerde ve kesitlerde inceleme yapılacak alanlarda) uygulanması gerekir. Herhangi bir aşamada bu kurala uyulmayacak olursa yapılan çalışma taraflı olur (33-35).

### **Tarafsız Sayım Çerçevesi**

Gundersen tarafından stereolojik yöntemlerin tarafsızlık ve doğruluk ilkelerine uyan, bir tarafsızlık çerçevesi ve sayım kuralı geliştirilmiştir. Kesitler mikroskopta incelenirken örneklenen alanda görüntü alanına bütün halde giren yapılarla birlikte kısmen giren yapıların da değerlendirilip değerlendirilemeyeceği sorunu ortadan kalkmıştır. Böylece objelerin olduğundan daha fazla sayılmasının önüne geçilmiştir. Çerçeve sol kenarının üst kenara temasından itibaren yukarı doğru ve alt kenarının

sağ kenara temasından itibaren aşağı yöne doğru sonsuza devam eden uzantılar içerir. Sayım sırasında çerçevenin sol alt kenarları ile bunların uzantılarına değen yapılar dikkate alınmazlar (yasak kenarlar). Çerçevenin tamamen içinde olan yapılar ile serbest kenarlar olarak tanımlanan sağ ve üst kenara değerek kısmen çerçeve içerisinde yer alan yapılar sayılır. Sayım yapılırken bu kuralın uyulması için çerçevenin görüntü alanından küçük olması gerekir. Çerçeve dikdörtgen ya da kare şeklinde olabilir (32).

### **Optik Disektör**

Disektör prensibi ilk defa 1984 yılında Sterio tarafından, optik disektör ise 1986'da Gundersen tarafından tanımlanmıştır (31).

Yöntemin temeli şeffaf, kalın histolojik kesitlerden sanal olarak optik kesitler elde etmek ve bu kesitlerde partikül sayımı yapmaya dayanır. Stereolojik sayım yöntemi uygulamalarını kolaylaştıran özelliklere sahiptir. Tek kesitte çalışmaya ve daha az kesit alınmasına olanak sağladığı için işlem hızını artırır. Ayrıca partiküllerin daha detaylı görülmesini çok yoğun yerleşimli partiküllerin kolaylıkla sayılmasını sağlar. Optik disektör yönteminde alınacak kesit kalınlığı, sayılan en uzun partikülden daha büyük olmalıdır. Genellikle 20 µm ve üstündeki değerler kesit kalınlığı olarak alınır. Sayısal açıklığı 1,35-1,40 olan büyük objektifler kullanıldığında, kesitin üst yüzeyinden alt yüzeyine doğru birbirini takip eden optik kesitler olduğu görülür. Bu kesitlerde iki boyutlu sayım çerçevesinin sanal olarak üç boyuta aktarılmasıyla mikroskop ya da monitör görüntüsü kullanarak partikül sayımı yapılabilir. Sayım yapılırken mikrovida hareket ettirilerek görüntünün ilk netleştiği yüzey (alt veya üst yüzey) belirlenir. Daha sonra mikrovida ile kesitin içinde ilerlenir ve görüntü netliğinin kaybolmasıyla kesitin diğer yüzeyine ulaşıldığı anlaşılır. Bu sırada görüntü alanına giren partiküller sayım kuralları doğrultusunda sayılırlar. Kesit kalınlığını ölçmek için mikrokator gibi aletler geliştirilmiştir. Mikrokator mikroskop tablasının hareketlerini ölçerek z eksenindeki derinlik boyutunu belirler, böylece optik olarak düzlemler boyunca kesitin içinde ne kadar ilerleme yapıldığını tespit eder. Kesit kalınlığının hesaplanmasında kullanılan diğer bir yöntem ise mikrovidanın kalibre edilmesi yöntemidir (36). Kesitin kesilme yüzeyindeki fiziksel bozukluk nedeniyle oluşabilecek artefaktlardan etkilenmemek ve sayılan bir nöronun

tekrardan sayılmasını engellemek için kesitin alt ve üst yüzeyinden belli bir mesafe (3-5  $\mu\text{m}$ ) belirlenmesi ve bu yüzeylerde partikül sayımı yapılmaması gerekir. Bu mesafelere alt ve üst güvenlik kuşağı denir. Güvenlik kuşağı ardışık kesitlerde sayılan bir nöronun tekrardan sayılmasını engellemek amacıyla da bırakılır. Partikül sayımı sadece bu iki güvenlik kuşağı arasındaki h yüksekliğinde yapılır. Bu şekilde gerçekleştirilen bir sayım o disektör hacmi içerisinde bulunan partikül sayısını verecektir. Sonuç olarak toplam disektör partikül sayısı, toplam disektör hacmine bölündüğünde, birim hacimde bulunan partikül sayısı (sayısal yoğunluk; N) elde edilir. Toplam partikül sayısını hesaplamak için sayısal yoğunluk değeri ile yapının toplam hacmi çarpılır (33, 35, 37, 38).

### **Optik Parçalama (Fraksiyonlama) Yöntemi**

Sistematik rastgele örneklemenin bir başka şekli referans hacmini kısımlara ayırarak örneklemedir. İlgilenilen hacimde sistematik rastgele örneklemeyle örneklenmiş belli bir parçada (fraksiyonda), disektörlerle sayım yapılır. Optik fraksiyonlama toplam obje sayısının hesaplanmasında yeni bir yöntemdir. Bu uygulamada üç boyutlu bir sayım yöntemi olan optik disektör ve fraksiyonlamayla örnekleme stratejisi birlikte kullanılmaktadır. Partikül sayımında kullanılan disektör tipi optik disektör olduğu için bu adla anılır. Uygulama kolaylığı nedeniyle en çok tercih edilen partikül örnekleme yöntemlerindedir. Yalnızca partikül sayımında değil, partikül çapı, yüzey alanı ve hacim hesaplamaları için de kullanılmaktadır. Dondurma yöntemi, parafin ve plastik gömme yöntemleri için uygundur. Önemli özelliği dokudaki şekil değişikliklerinden, fiksasyon, takip, gömme, kesit alma, boyama gibi histolojik işlemler nedeniyle oluşabilecek büzüşme veya şişme gibi etkilerden bağımsız olarak kullanılabilmesidir. Ayrıca yapıdaki partiküllerin şekli, büyüklüğü ve yöneliminden (çapraz, oblik vb.) de etkilenmez (33, 35, 37, 38). Bu yöntemde de, diğer parçalama yöntemlerinde olduğu gibi doku, kesit ve kesit alanı seviyelerinde örnekleme yapılır. Böylece sayım için yapının küçük bir parçası örneklenmiş olur. Önemli olan bu örneklenen bölgelerin ilgilenilen yapıdaki oranının bilinmesidir. Örneklenen kısımdan elde edilen partikül sayısı, bu parçanın ana yapıya oranı ile çarpılırsa toplam partikül sayısına ulaşılmış olur (35, 38).

## **OPTİK PARÇALAMA YÖNTEMİNE GÖRE HÜCRE SAYIMI**

### **Parçalayıcı Örnekleme Stratejisine Uygun Kesit Alma ve Kesit Örnekleme Oranı (KeÖO)**

Dekapitasyondan hemen sonra çıkartılan beyinler -50 °C’de hızlı dondurma işlemi ile doku fiksasyonu sağlandıktan sonra kesitlerin daha iyi kesilmesi için kriyostat -15 °C’ye ayarlandı. Her sıçan beyninden 150 µm kalınlıkta ve sistematik rastgele örnekleme yöntemine uygun olarak 1/3 aralı kesitler alındı. Bu işlem alınan ilk kesitten itibaren sırasıyla iki kesit atılıp üçüncü kesitin alınması ile gerçekleştirildi. Kesit alma işlemi beyin dokusunun sonuna kadar devam ettirildi. Her sıçan beyninden en az 15-16 kesit alındı. Böylece optik parçalama yöntemine göre toplam hücre sayısını hesaplamada gerekli parametrelerden biri olan kesit örnekleme oranı belirlendi (KeÖO=1/3) (34, 35, 37). Boyanan kesitlerdeki hipokampusu ait yapılar ayrılmış ve kesitlerdeki hipokampusun CA1, CA2 ve CA3 alanlarındaki piramidal nöron sayıları sayıldı.

### **Alan Örnekleme Oranı (AÖO)**

Stereolojik çalışmalar yapılırken sistematik rastgele örnekleme göre seçilen kesitlerde, ilgilenilen bölgenin alanı mikroskopta belli aralıklarla x ve y eksenleri boyunca taranır. Böylece “x, y adımlama alanı” tanımlanmış olur. Hücre sayımı ise her adımlama alanının daha önceden belirlenen bir bölümde, yani yalnızca tarafsız sayım çerçevesi içerisinde yapılır. Buna göre toplam hücre sayısını hesaplamak için gerekli bir başka parametre olan AÖO, tarafsız sayım çerçevesi alanının x, y adımlama alanına oranlanmasıyla belirlenir (35).

Çalışmamızda monitör üzerinde x, y adımlama alanını belirlemek için Adıgüzel ve arkadaşlarının Thoma lamı kalibrasyon yöntemiyle oluşturdukları üzerinde tarafsız sayım çerçevesi de çizili olan asetat kullanıldı (39).

Adıgüzel ve arkadaşları mikroskopta bir Thoma lamının çizgileri arasını x100 büyütmede belirlemişler (Thoma lamının çizgileri arasındaki mesafe 0.05 mm) ve görüntüyü mikroskoba monte edilmiş video kamera ile bir monitöre aktarmışlardır.

Monitör üzerine yerleştirilen bir asetata bu çizgileri çizmişlerdir. Böylece asetat üzerine çizilen çizgiler arası 50 µm (0.05mm) olan bir kare elde etmişlerdir (40). Bu kare şeklindeki alanın ortasına gerekli kalibrasyonu yapılarak kenarları 10 µm olacak şekilde tarafsız sayım çerçevesini çizmişlerdir. Çerçevenin birbirine dik, sol ve alt kenarlarını yasak kenarlar, diğer iki kenarı ise serbest kenar olarak belirlemişlerdir (39).

Çalışmamızda tarafsız sayım çerçevesinin kenar uzunlukları eşit ve 12 µm olup tarafsız sayım çerçevesinin alanı 144 µm<sup>2</sup> dir. Çalışmamızda bu asetatın hazırlandığı mikroskop ve mikroskoba monte edilmiş video kamera ile monitör kullanıldı. Üzerinde tarafsız sayım çerçevesi çizili asetat monitör üzerine yapıştırıldı. Kesitler mikroskoba yerleştirilip hipokampus bölgesi x4 büyütmede bulunduktan sonra mikroskop objektifi x100 büyütme getirdi. Görüntü kalibrasyonu sağlandıktan sonra mikroskoptaki kesit görüntüsünde x ekseninde 36 µm ve y ekseninde 36 µm aralıklarla 18 adımlama yapıldı. İki eksendeki adımlama alanı aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Alan (x,y adımlama)} = 36 \mu\text{m} \times 36 \mu\text{m} \times 18 = 23328 \mu\text{m}^2$$

Böylece sol hipokampus CA1, CA2, CA3 alanların piramidal tabakası x, y ekseninde yukarıda tanımlanan şekilde tarandı. Her adımlama sonucu monitöre gelen görüntünün tamamında sayım yapılmadı. Sadece ölçüleri önceden tespit edilen tarafsız sayım çerçevesinde sayım yapıldı. Daha sonra tarafsız sayım çerçevesinin alanı; x, y adımlama alanına oranlanarak alan örnekleme oranı hesaplandı. Buna göre  $A\ddot{O}O = 144 \mu\text{m}^2 / 23328 \mu\text{m}^2 = 1/162$  olarak hesaplanmıştır.

### **Kesit Kalınlığının Ölçümü**

Çalışmamızda kesit kalınlığının ölçülmesi için Korkmaz ve Tümkaya tarafından gerçekleştirilen, mikrovida kalibrasyon yöntemi kullanıldı (36). Bu yöntem ile ışık mikroskobunda mikroskobun mikrovidası döndürülerek kesit içinde optik düzlemler boyunca ilerlerken ilk netleşen görüntü ile son netleşen görüntü arasında kalan mesafenin mikrovidadan okunması ile kesit kalınlığı ölçülebildi. Çalışmamızda z ekseninde mikrovidadaki 1 derecelik hareket 1,5 µm'ye karşılık

gelmektedir. Mikroskobun mikrovidası döndürülerek kesit içerisinde optik olarak iletlenmiş ve ilk netleşen görüntü ile en son netleşen görüntü arasında kalan mesafe kesit kalınlığı (t) belirlendi. Tüm kesitlerin kesit kalınlıkları bu şekilde bulundu. Her sıçan için ortalama kesit kalınlığı ( $t_{ort}$ ) hesaplandı. Disektör yükseklik kalınlığı 25  $\mu\text{m}$  olarak bulundu.

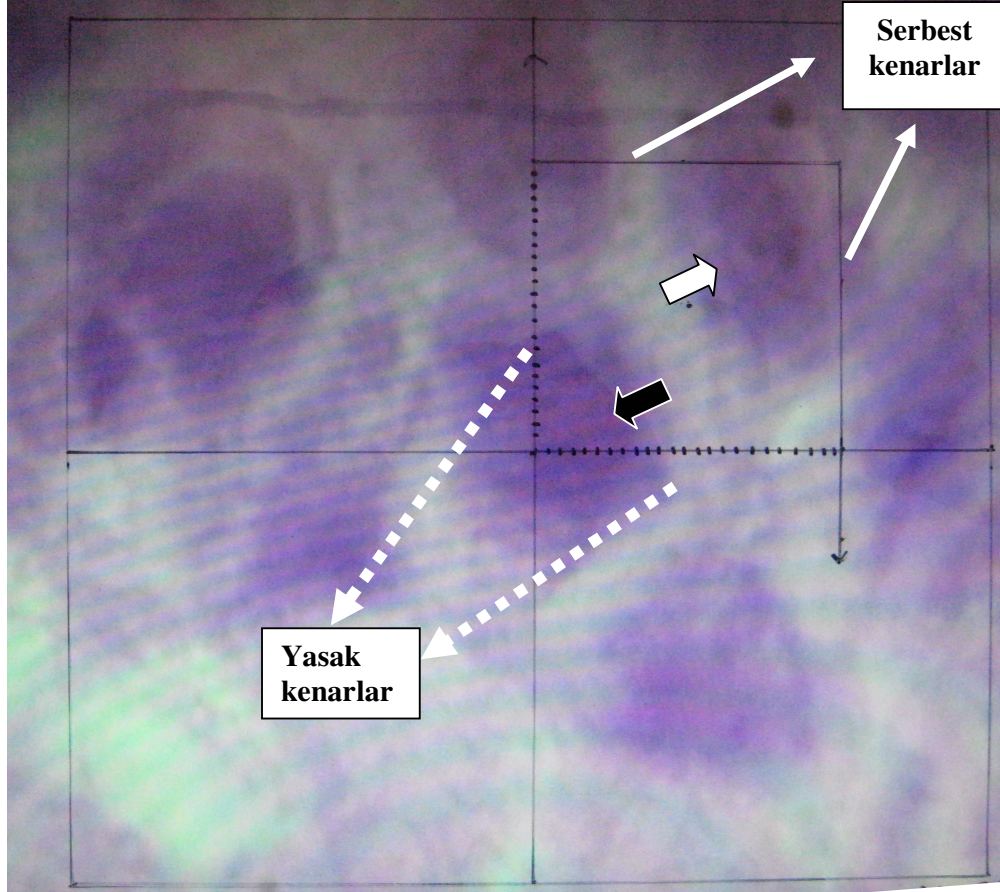
### **Kalınlık Örnekleme Oranı (KaÖO)**

Kalınlık örnekleme oranı her sıçan için ayrı olmak üzere ortalama disektör yüksekliği ( $h_{ort}$ ), ortalama kesit kalınlığına ( $t_{ort}$ ) bölünerek hesaplandı (41).

$$\text{KaÖO} = h_{ort} / t_{ort}$$

### **Nükleus (Hücre) Sayımı**

Çalışmamızda hipokampus CA1, CA2 ve CA3 alanları piramidal tabakasında bulunan piramidal hücrelerin nükleusu sayıldı. Her piramidal hücrenin tek nükleusu olduğu için hesaplamalarda nükleus sayıları hücre sayısı olarak alındı. Piramidal tabakada piramidal hücreler ile birlikte yaklaşık %1 gibi düşük bir oranda sepet hücreleri de bulunmaktadır. Sepet hücrelerinin nükleusları piramidal hücre nükleuslarına benzer bu yüzden toplam nöron sayısı bu hücreleri kapsayacak şekilde hesaplanmıştır. Bu hücrelerin sayıma dahil edilmesi çalışmayı etkilememektedir (35). Mikroskoba yerleştirilen kesitte hipokampus x4 büyütmede belirlendikten sonra görüntü x100 büyütme getirildi. Hipokampus CA1, CA2 ve CA3 alanları piramidal tabakası belirlendi. “x” ve “y” ekseninde daha önce tanımlanan adımlamalara uygun olarak belirlenen kesit kalınlığı içinde optik disektör sayım kurallarına göre sayım işlemine başlandı. Optik disektör yüksekliği boyunca, yalnızca tarafsız sayım çerçevesinin içinde yer alan veya serbest kenarlarla kesişen nükleuslar sayıldı. Yasak kenarlarla veya bunların uzantıları ile kesişen nükleuslar ise sayım dışı bırakıldı. Güvenlik kuşağı içinde herhangi bir nükleus görüntüye girse bile sayıma dahil edilmedi. Her kesit için sayılan nöron sayısı ( $Q$ : disektör partikül sayısı ) kaydedildi. Bunların toplanması ile her sıçan için sayılan nöron sayısı ( $\sum Q$ : toplam disektör partikül sayısı) bulundu (Şekil-4).



**Şekil-4:** Çalışmamızda kullandığımız tarafsız sayım çerçevesi ve özellikleri (Sayım yapılırken beyaz kalın okla gösterilen nükleus sayıma dahil edilirken siyah kalın okla gösterilen nükleus sayıma dahil edilmemiştir.)

### **Toplam Nöron Sayısı**

Tüm bu işlemlerden sonra elde edilen parametreler aşağıdaki formüle uygun olarak yerleştirildi (35). Her sıçan için hipokampus CA1, CA2 ve CA3 alanlarındaki toplam piramidal nöron sayıları hesaplandı.

$$N(\text{toplam}) = (\sum Q^-) \times (1/ K_{e\ddot{O}O}) \times (1/ A\ddot{O}O) \times (1/K_{a\ddot{O}O})$$

### **Hata Katsayısı**

Örnekleme planının yeterliliği her sıçana ait hata katsayısı hesaplanarak kontrol edildi. Hata katsayısı hesaplanırken her bir sıçan için sayılan kesit sayıları ve her bir kesit için sayılan disektör partikül sayıları ( $Q^-$ ) kullanıldı (35). Hata katsayısının %10'un altında çıkması çalışmanın örnekleme planının yeterli ve



çalışmanın güvenilir olduğunu gösterir. Tablo-1’de kontrol 1 nolu sıçana ait disektör partikül sayıları ve hata katsayısının hesaplamasında kullanılan formül gösterildi.

**Tablo-1:** Kontrol-1 nolu sıçanın hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanlarındaki toplam nöron sayısının bulunması sırasında gözlenen Hata Katsayısı (HK) hesaplanması

Kesit No	Q <sup>-</sup>	Q <sup>-</sup> x Q <sup>-</sup>	Q <sup>-</sup> x (Q <sup>-</sup> +1)	Q <sup>-</sup> x (Q <sup>-</sup> +2)
1	41	1681	1722	1722
2	42	1764	1764	2058
3	42	1764	2058	1722
4	49	2401	2009	2009
5	41	1681	1681	1681
6	41	1681	1681	1353
7	41	1681	1353	1558
8	33	1089	1254	1320
9	38	1444	1520	1520
10	40	1600	1600	-
11	40	1600	-	-
<b>Toplam</b>	<b>∑Q=448</b>	<b>A=18386</b>	<b>B=16642</b>	<b>C=14943</b>

Q<sup>-</sup>: Bir sıçana ait her bir kesite ait disektör partikül sayısı

∑Q<sup>-</sup> : Kesitlerdeki toplam disektör sayısı

Q<sup>-</sup> +1: Serideki bir sonraki kesite ait disektör partikül sayısı

Q<sup>-</sup> +2: Serideki iki sonraki kesite ait disektör partikül sayısı

HK: hata katsayısı

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

Bu formüle göre Kontrol-1 nolu sıçana ait hata katsayısı 0,0111 bulunmuştur.

## İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

İstatistiksel analizler SPSS 13.0 for Windows istatistik programı ile yapılmıştır. İstatistiksel analizde temel olarak Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

## BULGULAR

### SIÇANLARIN HÜCRE SAYIMI SONUÇLARI VE HIPOKAMPUSTA GÖRÜLEN PATOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER

Kontrol grubundaki sıçanlardan elde edilen kesitlerde hipokampus CA1, CA2, CA3 piramidal tabaka alanındaki nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplamasında kullanılan parametreler Tablo-2’de gösterilmiştir. Beş sıçanın değerlendirildiği kontrol grubunda sıçanların toplam nöron sayısı en yüksek 304819, en düşük 217524 olarak sayılmıştır.

**Tablo-2:** Kontrol grubu sıçanların hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanlarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplamasında kullanılan parametreler

PARAMETRELER	SIÇANLAR				
	K-1	K-2	K-3	K-4	K-5
Disektör sayısı (Q)	448	459	400	345	322
1/K <sub>e</sub> ÖÖ	3	3	3	3	3
1/AÖÖ	162	162	162	162	162
1/K <sub>a</sub> ÖÖ	1.40	1.35	1.39	1.40	1.39
Ortalama kesit kalınlığı (t <sub>ort</sub> )	35.11	33.75	34.77	35.06	34.85
Disektör yüksekliği (h <sub>ort</sub> )	25	25	25	25	25
Hata Katsayısı (HK)	0.0111	0.0106	0.0100	0.0119	0.0163
<b>Toplam nöron sayısı (N)</b>	<b>304819</b>	<b>301150</b>	<b>270216</b>	<b>234738</b>	<b>217524</b>

Asfiksi sonrası yedinci günde yani deney grubundaki sıçanlardan elde edilen kesitlerde hipokampus CA1, CA2, CA3 bölgelerindeki toplam piramidal nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplamasında kullanılan parametreler Tablo-3’de gösterilmiştir. Beş sıçanın değerlendirildiği deney grubundaki sıçanların toplam piramidal nöron sayısı en yüksek 178051, en düşük 135157 olarak sayılmıştır.

**Tablo-3:** Asfiksiye maruz kalan deney grubu sıçanların hipokampus CA1, CA2, CA3 stratum piramidale alanlarındaki toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplamasında kullanılan parametreler

PARAMETRELER	SIÇANLAR				
	D-1	D-2	D-3	D-4	D-5
Disektör sayısı (Q)	206	239	258	210	241
1/KeÖO	3	3	3	3	3
1/AÖO	162	162	162	162	162
1/KaÖO	1.35	1.44	1.42	1.44	1.43
Ortalama kesit kalınlığı ( $t_{ort}$ )	33.75	36.09	35.45	35.97	35.63
Disektör yüksekliği ( $h_{ort}$ )	25	25	25	25	25
Hata Katsayısı (HK)	0.0121	0.0122	0.0112	0.0111	0.0109
<b>Toplam nöron sayısı (N)</b>	<b>135157</b>	<b>167262</b>	<b>178051</b>	<b>146966</b>	<b>167490</b>

### **Grupların Hipokampus CA1, CA2, CA3 Alanlarındaki Toplam Piramidal Nöron Ortalama Sayıları**

Bu çalışma, gruplar arasındaki toplam nöronların ortalama sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olduğunu göstermiştir ( $p=0,009$ ).

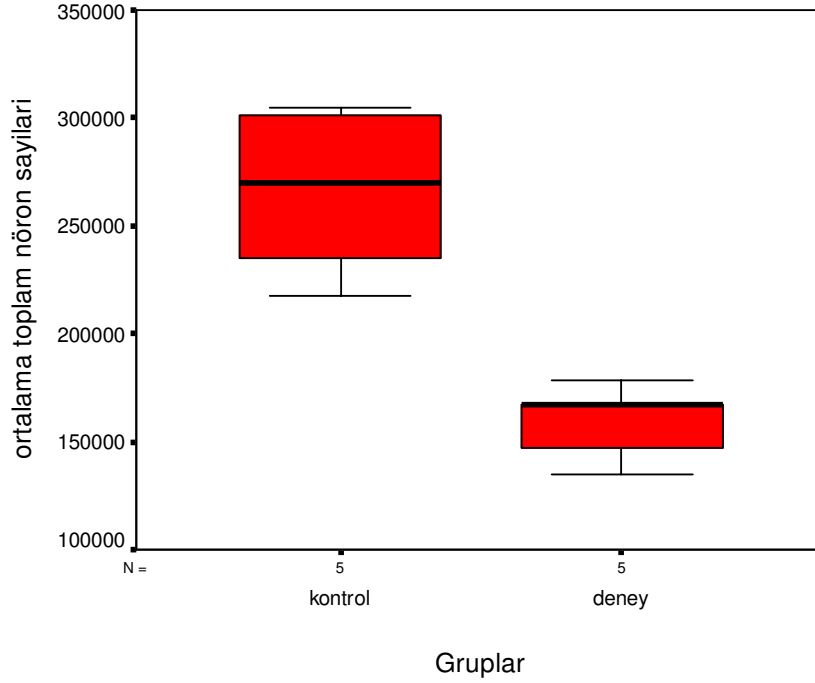
Kontrol grubundaki ortalama nöron sayısı  $265689,4 \pm 39009,5$  olarak hesaplanmıştır. Asfiksiye maruz kalan grubun ortalama nöron sayısı  $158985,2 \pm 17439,8$  olarak hesaplanmış olup, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalmıştır ( $p=0,009$ ).

İki grupta yer alan sıçanların hipokampus CA1, CA2, CA3 alanları toplam piramidal nöron sayıları ortalaması Tablo 4'te gösterilmiştir.

**Tablo- 4:** Grupların hipokampus CA1, CA2, CA3 piramidal tabaka alanları ortalama nöron sayıları

GRUPLAR	ORTALAMA TOPLAM NÖRON SAYILARI ( $\bar{x} \pm SD$ )
Kontrol grubu	$265689,4 \pm 39009,5$
Deney grubu	$158985,2 \pm 17439,8$

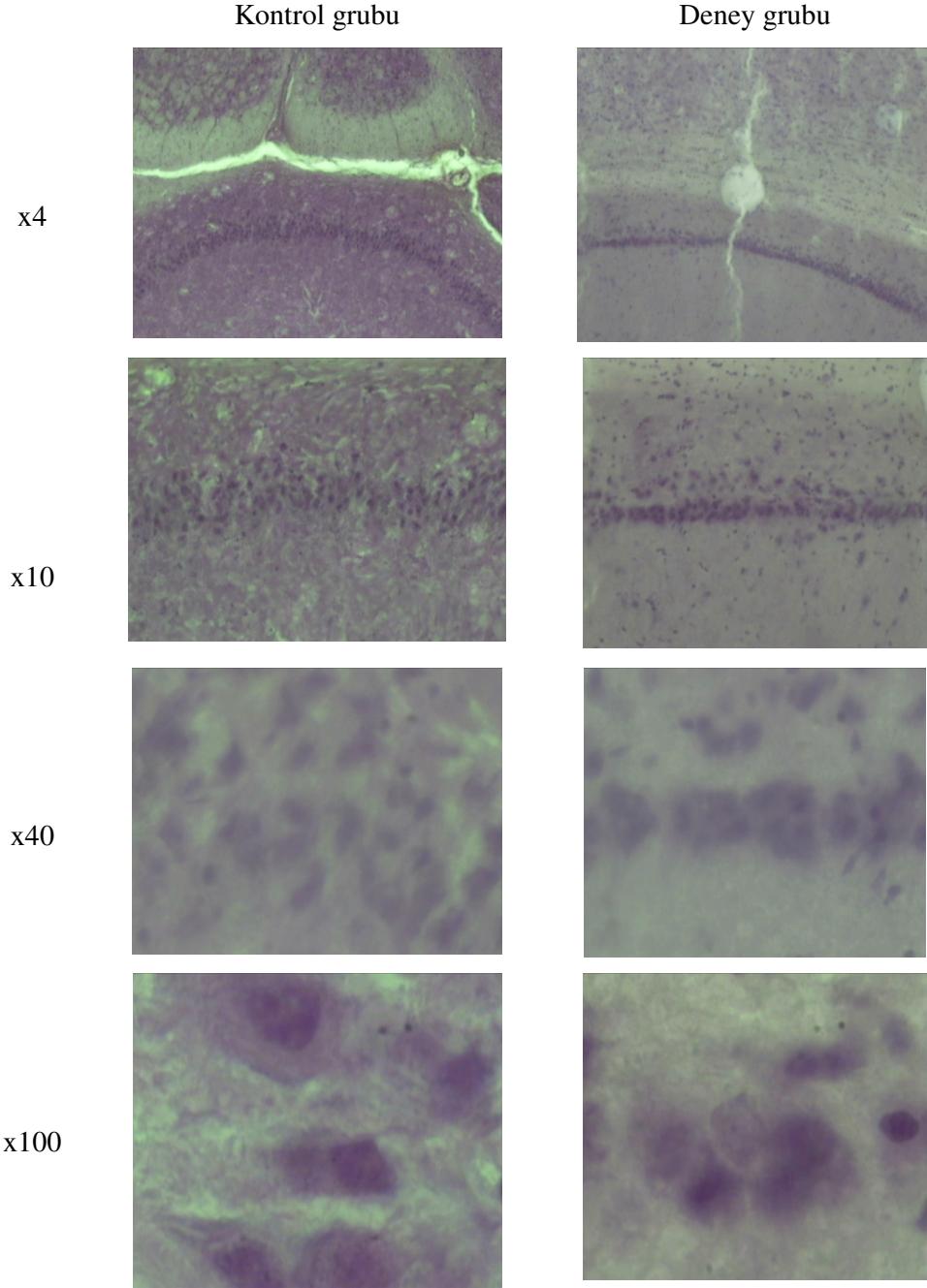
Kontrol ve deney grubunda yer alan sıçanların hipokampus CA1,CA2 ve CA3 bölgelerindeki ortalama toplam nöron sayılarının dağılımı Şekil-5'te verilmiştir.



**Şekil-5:** Kontrol ve deney grubunda yer alan sıçanların hipokampus CA1, CA2 ve CA3 bölgelerindeki ortalama toplam piramidal nöron sayılarının dağılımı

### **Gruplarda Hipokampusta Gözlenen Patolojik Değişiklikler**

Mikroskopun x4 büyütmesinde, asfiksiye maruz kalan grupta yer alan sıçanlardan elde edilen kesitler, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, deney grubunda hipokampusta bir incelme olduğu gözlenmiştir. Bu incelme x10, x40 ve x100'lük büyütmelerde daha belirgin olarak görülmüştür. Kontrol ve asfiksiye maruz kalan deney grubundaki üçüncü sıçanlara ait dokuzuncu kesitlerden alınan x4, x10, x40 ve x100'lük büyütmelerdeki hipokampus görünümüleri Şekil-6'da verilmiştir.



**Şekil-6:** Kontrol ve deney grubundaki üçüncü sıçanlara ait dokuzuncu kesitlerden alınan x4, x10, x40 ve x100'lük büyütmelelerdeki hipokampus görünüşleri.

## TARTIŞMA

Solunumun temel amacı atmosferdeki oksijeni periferdeki doku hücrelerine ulaştırmak, dokulardaki karbondioksiti uzaklaştırmaktır (1, 2). Oksijen transferini engelleyen herhangi bir şey asfiksi olarak değerlendirilir. Asfiksi dokulardaki oksijen yetersizliği olup nabız yokluğu anlamına da gelir (1, 3).

Adli tıp uygulamalarında ölüm nedeni olarak asfiksiye sıklıkla rastlanmaktadır. Orjin kaza, intihar, cinayet ya da doğal ölümdür. Asfiksiye bağlı ölümlerde strangulasyon (ası, elle boğma, bağla boğma), suda boğulma gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır (3, 14, 16, 17, 19, 24, 42, 43).

Türkiye’de yapılan farklı çalışmalarda asfiksik ölümler değerlendirilmiştir. Konya ilinde 1991-2000 yılları arasında yapılan bir çalışmada tüm adli otopsilerde asfiksiye bağlı ölümlerin %5.8 olduğu bildirilmiştir (44). Edirne’de Azmak’ın yaptığı çalışmada adli otopsilerin %15.7’sinin asfiksiye bağlı ölüm olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada en yaygın yöntem ise ası (%41.8) olarak bildirilmiştir. Bunu suda boğulma (%30.5) ve karbonmonoksit zehirlenmesi (%8.2) izlerken bağla boğmanın %2.9, elle boğmanın ise %2.3 olarak saptandığı gözlenmiştir (4). Azmak ve arkadaşları (23) asfiksiye bağlı ölümleri değerlendirdikleri farklı bir çalışmada ise bu ölümlerin %42.8’inin asıya, %28.6’sının suda boğulmaya bağlı olduğunu, üç olgunun elle boğma ve üç olgunun da bağla boğma sonucu oluştuğunu bildirmişlerdir. İzmir ilinde 2004 yılında yapılan adli otopsilerin değerlendirildiği bir çalışmada da mekanik asfiksiye bağlı ölümlerde ası en sık kullanılan yöntem olarak saptanmıştır. Mekanik asfiksiye bağlı ölümlerde kullanılan diğer yöntemler ise elle bağla-kapama (%1.6), suda boğulma (%4), karbonmonoksit zehirlenmesi (%4.9) olarak belirlenmiştir (45).

Yurt dışında asfiksiye bağlı ölümlerin değerlendirildiği bir çalışmada ası (%62.13) en sık kullanılan yöntem olarak saptanırken bunu suda boğulma (%18.6) ve boğmanın (%14.33) izlediği gözlenmiştir (5). Sharma ve arkadaşları (46) yaptığı çalışmada 1746 adli otopside %5’inin asfiksiye bağlı ölüm olduğunu bildirmiştir. Bu ölümlerin %82’si boyun basısına bağlı olarak gerçekleşmiştir. En yaygın

kullanılan yöntem olan asiya, bu olguların %69'unda rastlanırken bunu %11 sıklıkla suda boğulma gözlenmiştir.

Asıda bir ucu yukarıya tutturulmuş, diğer ucu ilmek şeklinde boyuna geçirilmiş bir bağın, vücudun ağırlığı ile boynu sıkıştırması nedeniyle solunum yolu, damar ve sinirlere bası yapması sonucunda yaşamsal fonksiyonların engellenmesi ile ölüm gerçekleşmektedir (8, 14). Solunum yollarının kapanması, boyun damarlarının sıkışması, boyundaki glomus caroticus ve baroreseptörlerin uyarılması ile gelişen refleks kardiak arrest, medulla spinalis lezyonları asıda ölüme neden olan başlıca mekanizmalardır. Asıda ölüm genellikle beyin iskemisi ve vagal inhibisyon sonucunda kalbin durması şeklinde gelişir. Boyuna ani yoğun bir güç uygulanan (yüksek bir yerden boşluğa bırakılma, hükmi asılar vb.) asılarda servikal vertebraların özellikle orta bölümünde fraktür, atlanto-oksipital eklemden dislokasyon ve bazen fraktür ile medulla spinalis lezyonları meydana gelebilir. Bu bulgulara diğer asi şekillerinde rastlanmaz (7, 8)

Ası, kolay uygulanabilmesi, fazla özelliği olmayan kolaylıkla bulunan malzemelerin kullanılması ve sonucun kesin olması nedeniyle birçok ülkede yaygın olarak intihar amacıyla seçilen bir yöntemdir (7, 47).

Ülkemizde 1996-2005 yılları arasında intihar orjinli ölümlerin değerlendirildiği bir çalışmada intihar orjinli ölümlerin yıllar içinde artış gösterdiği ve asının her yaş grubunda en sık kullanılan yöntem olduğu bildirilmiştir (48). Erel ve arkadaşları (43) 1999-2003 yılları arasında yapılan 260 adli otopsiyi değerlendirmiştir. Bu olguların %18.1'inin intihar orjinli olduğunu saptamıştır. Ölümlerde %85.1 sıklıkla ası en sık kullanılan yöntem olarak belirlenmiştir. Eskişehir ilinde yapılan bir çalışmada intihar orjinli ölümlere bakıldığında %63.6'sının ası, %17.6'sının ateşli silahla yaralanma olduğu görülmüştür (20). İstanbul ilinde 5 yıllık dönemde intihar orjinli asiya bağlı ölümlere ait 761 olgu saptanmış ve bu ölümlerin yapılan tüm adli otopsilerin %5.2'sini oluşturduğu bildirilmiştir (49).

Ası sıklığı da yıllar içinde artış saptanan ve fatalitesi (yaklaşık %70) yüksek olan bir yöntemdir. Ası uygulandıktan 5 dakika sonra yaklaşık %70'i ölümlerle

sonuçlanırken sağ olarak hastaneye ulaşanların ölüm nedenleri bronko-pnömoni, akut solunum sıkıntısı sendromu ve pulmoner ödemdir (7, 47). Meel'in (50) yaptığı çalışmada 1993 yılında her 100.000 kişide 5.2 sıklıkta rastlanan ası orjinli ölümlerin 2003 yılında 100.000 kişide 16.2'ye yükseldiğini bildirmiştir.

Strangulasyon, asfiksi yöntemlerinden biridir. Bir kişinin boyun bölgesine ip, bağ, el, ön kol veya herhangi bir sert cismin dıştan aktif bir kuvvet uygulanması sonucu, hava yolları ve/veya damarların tam veya kısmen kapatılması ile oluşturulan eyleme boğma denir (22). Bir çalışmada strangulasyon olgularının %94.89'unu cinayet, %5.11'ini kaza oluşturduğu belirtilmiştir (5). Mekanik asfiksiye bağlı ölümlerin değerlendirildiği bir başka çalışmada ölümlerin %27'sinin cinayet orjinli olduğu bu ölümlerde ise en sık kullanılan yöntemin boğma olduğunu bildirilmiştir (51). Ölüm solunum yollarının kapanması, boyun damarların sıkışması, boyundaki glomus caroticus ve baroreseptörlerin uyarılması ile gelişen refleks kardiak arrest sonucu meydana gelir (8, 14).

Bağla boğma aktif bir kuvvet kullanılarak ip ya da benzeri bir cisimle bir kişinin boynunun sıkılması olayıdır. Bağla boğmaların orjininin çoğunu cinayet oluşturur. Nadiren kaza ve intihar olguları da görülür (3, 22, 24).

Elle boğma boynun önden ya da yanlardan arkaya doğru bir ya da iki elle bastırılmasıdır. Elle boğma olgularının orjini cinayettir. Çok nadir olarak kazaen boyna yönelik girişimler sırasında ölüm meydana gelebilir. Elle boğmada ölüm mekanizması sıklıkla solunum yollarının kapanmasına bağlı hipoksi sonucu ani ölüm şeklindedir (8, 11).

Bağla boğma sıklıkla cinayet orjinlidir (52). Cinayet orjinli ölümlerin değerlendirildiği olgu serileri literatürde bildirilmiştir (53). Abder-Rahman ve arkadaşları (51) mekanik asfiksiye bağlı ölümleri değerlendirdiği çalışmada ölümlerin %27'sinin cinayet orjinli olduğu ve en sık kullanılan yöntemin boğma olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada boğma olgularının %54.8'inin ise bağla boğma olduğu saptanmıştır. Bağla boğmaların %5'inin intihar orjinli olduğu tahmin



edilmektedir (52). İntihar orjinli bağla boğmaya nadiren rastlanırken adli tıp literatürlerinde vaka sunumları şeklinde bildirilmiştir (52, 54, 55). Mehmet Atılğan (52) tarafından sunulan olgu bağla boğma sonucu intihar orjinli bir ölümdür. Odasında ölü bulunan 70 yaşındaki erkek olgunun hazırladığı bağı bastonuna sabitleyip turnike uygulayarak intihar ettiği saptanmıştır. Depresyon öyküsü olması ve mücadeleye ait çevresel bulgu olmaması ölümün intihar orjinli olduğunu düşündürürken çevresel bulgular ve olgunun yaşı göz önünde bulundurulduğunda otoerotik asfiksiye bağlı ölümden uzaklaşmıştır.

Shields ve arkadaşlarının (56) yaptığı çalışmada 10 yıllık zaman diliminde yaptıkları çalışmada 102 strangulasyon sonrası hayatta kalan olgu değerlendirilmiş ve en sık saptanan yöntem elle boğma (%79) olarak saptanmıştır. Boğma olgularının 15 yıllık dönemde değerlendirildiği bir çalışmada ise olguların %82'sinin elle boğma, %16'sının bağla boğma ve %2'sinin elle-bağla boğma olduğu bildirilmiştir (57).

Otoerotik asfiksilerde sıklıkla ası, bağla boğma ve ağız-burun kapanması yöntemleri kullanılmaktadır. Kaza, cinayet ya da intihar orjinli olabilmektedir. Literatürde otoerotik asfiksiler ile ilgili olgu sunumları bildirilmiştir. Bildirilen olgularda ölümün, kaza orjinli strangulasyona bağlı asfiksi sonucu oluştuğu görülmektedir (58, 59).

Adli tıp literatürlerinde strangulasyonla ilgili temel makaleler otopsilere ait postmortem bulgularla ilgilidir. Strangulasyonla ilgili literatürlerde yaşayan kurbanların fiziksel bulguları, postmortem özelliklerinin derlendiği bir çalışmada; özellikle Rusya ve Almanya'da yapılan çalışmalarda erken ve gecikmiş mental durum değişiklikleri olduğu ve bunların geçici beyin anoksisi veya post-travmatik stres sendromu kaynaklı olabileceği bildirilmiştir. Bu davranış değişiklikleri bazı faktörlere bağlı olarak geçici ya da kalıcı olabilmektedir (60).

Strangulasyondan kurtulan olgular acil servislere hiperventilasyon ve panik atak ile gelebilmektedir. Birçoğunda hiperventilasyonla birlikte kısık boğuk ses ve genizden konuşma gibi semptomlara rastlandığı saptanmıştır (60). McClane ve

arkadaşları (60) strangulasyona maruz kalan olguların %7'sinde hiperventilasyon, hafıza kaybı ve kontrolsüz titreme gibi semptomları diğer literatürlere benzer şekilde bildirilmiştir.

Literatürde strangulasyondan kurtulan olguların değerlendirildiği çalışmalarda olguların semptom ve bulguları bildirilmiştir. Shields ve arkadaşlarının (56) yaptığı çalışmada tüm olguların %22'sinde subkonjonktival hemoraji, %24'ünde ağız içi yaralanma, %85'inde boyun yaralanması ve %54'ünde boyun ağrısı olduğu gözlenmiştir. Olgularda uygulanan görüntüleme ve invaziv yöntemlerle saptanan bulgular; dispne, davranış veya nöral durum değişiklikleri veya boyun lezyonlarıdır. Yaşayan olgularda hipoksiye sekonder mental durum değişiklikleri, pulmoner ödem, aspirasyon pnömonisi, burun kemiği kırığına bağlı gelişen hemoptizi, larinks fraktürüne bağlı olarak yumuşak doku içinde subkutan amfizem, hyoid kemik kırığı, ödem ve/veya hematoma bağlı trakeal deviasyon, nörolojik lateralizan bulgular, farenkste ödem peteşi ve vokal kord ve trakea hasarına bağlı dispne, disfoni, afoni veya odinofaji semptom ve bulguları görüldüğü belirlenmiştir (60).

Strangulasyon sonrası hayatta kalan olguların derlendiği bir çalışmada ise uzun dönemdeki seyri literatürlerde yerini bulmuştur. Psikometrik çalışmayla 1991 yılında sol temporal lob lezyonuna bağlı olarak oluşan hafıza bozukluğunun, anoksik beyin hasarıyla ilgili bulguları gösterilmiştir. Fibromuskuler displazi veya travma bulgusu olmayan genç bayan olgudaki felcin ayırıcı tanısında elle boğmanın yer alabileceği ise 1999 yılında bildirilmiştir (61).

Literatürde strangulasyona maruz kalan kişilerde oluşan mental değişiklikler tanımlanmış olup bu değişikliklerin uzun dönemde oluşturabileceği sonuçlar; psikoz ve amnezidir. Strangulasyona maruz kalanlarda belki de en önemli olanı, herhangi bir görünür hasarlanma olmaksızın kısmi hafif semptomlar ve günler veya haftalar sonra bile belirginleşebilen progresif geri dönüşsüz ensefalopatidir (60).

Asfiksiden kurtulan kişilerde en sık rastlanan bulgu amnezi iken psikik bozukluklar da görülür. Ayrıca epileptik, koreik hareketler ve odak belirtileri gözlenir. Değişik organlarda iskemik hasara bağlı bulgular ortaya çıkar (8). Yapılan

çalışmalar hipokampusun amnezi ile ilişkisi olduğunu göstermiştir (9). Hipokampus'u etkileyen lezyonu olan hastada kısa süreli hafızanın uzun süreli hafızaya dönüştürülmediği (anterograd amnezi) görülmüştür. Lezyonun sol hipokampusta olduğu durumlarda daha çok sözel hafıza etkilenirken, sağda olduğu durumlarda görsel hafıza etkilenir (2, 10).

Strangulasyonların tümü ölümlle sonuçlanmaz (6, 7). Örneğin; ası uygulayanların yaklaşık %30'u ası sonrası hayatta kalır (7). Oluşan asfiksi başta santral sinir sistemi olmak üzere birçok sistemi etkiler (4). Beyinde yer alan nöronların ölümünde kaspas bağımlı apoptoz temel ölüm nedenidir. Ek olarak otofaji, morfolojik ve mekanizmal değişimlere bağlı ölüm görülebilir. Eksitotoksik nöron ölümüne yol açan serebral iskemide farklı hücre ölüm programları aktive olabilir ve farklı görünümeler ortaya çıkarabilir. Etkilenen subjenin yaşına ve etkilenen beyin bölgesine bağlı olarak nekrotik, apoptotik kaskad ya da apoptotik-nekrotik kaskad görülebilmektedir. Hasarlanma iskemisi sonrası hemen başlar ve beşinci günde sonlanır (27, 62). Nöronlardaki hipoksik değişiklikler yedi saatlik özel bir zaman süresinde gösterilebilir. Strangulasyon ve suda boğulmaya bağlı ani ölümlerde oluşan nöropatolojik değişiklikler halen gösterilememiştir ve yeni çalışmalara ihtiyaç vardır (63).

Hipokampustaki piramidal hücreler anoksi-iskemiye yüksek düzeyde hassastır (64). Geçici iskemi hipokampusun CA1 bölgesi gibi özellikli beyin alanlarında nöronların ölümü ile sonuçlanan hasara yol açmaktadır. Kardiyak cerrahide geçici kardiyak arrestten dokuz gün sonra ölen 63 yaşında kadın hastanın hipokampusunun histolojik değerlendirilmesinde özellikle CA1 bölgesinde yaklaşık olarak nöronların tamamının öldüğü gösterilmiştir (27). İskemi sonrası reperfüzyon süresince hipokampusta özellikle CA1 bölgesinde gecikmiş nöron hasarının ortaya çıktığı bilinmektedir (27, 28, 65). CA1 bölgesindeki piramidal hücrelerde iskemi sonrası 2-3 günde histolojik değişiklikler ilk kez ortaya çıkarken beşinci ve yedinci günlerde belirgin hale gelir (27, 28).

Son çalışmalarda kardiyak arreste bağlı iskemiye takiben 14 gün sonra sıçan hipokampusunun CA2 dışındaki tüm alanlarında toplam nöron sayılarında azalma

olduğu gösterilmiştir (65). Memeli hipokampuslarında CA2 bölgesinin iskemiye dirençli bir bölge olduğu bilinmektedir ve nöronal ölüm gecikir (65, 66).

İskemiden 5-10 dakika sonra CA1 bölgesinde piramidal hücreler dejenere olurken CA3 bölgesinde ve dentate gyrus nöronları korunur. CA3 bölgesi iskemiye CA1 bölgesine göre daha dirençlidir (66, 67).

Asfiksiye bağlı beyin hasarı, tipik olarak iskemiden fazla etkilenen bölge olan hipokampusta gösterilebilir (9). Çalışmamızda da sıçan hipokampusları üzerinden iskeminin beyne etkisi değerlendirilmiştir.

Amerika'da her yıl 4000 kişi ası ile intihar etmektedir. Asıdan kurtulanlarda oluşan nöropsikolojik sekeller hakkında bilinenler halen sınırlıdır. Asıya bağlı olan ve Korsakoff's sendromuna benzer anterograd amnestik sendrom tanımlanmıştır. Asıyla ilişkili anterograd amnezisi olan ve hafif bradikinezi ve tremor dışında nörolojik bulgusu bulunmayan iki olgu sunulmuştur. Bu iki vakada nörolojik ve nöropsikolojik semptomlar ası epizodu sonrasında ortaya çıkmış. Olgularda temel olarak bağın vücut ağırlığı etkisi ile sirkülasyonun durması sonucunda ventilasyonun bozulması ile amnezi oluşmuştur. Sirkülasyondaki bozulma iskemik hipokampal hasarlanmaya ve amneziye yol açaabilmektedir. Sunulan olgularda da geçici sınırlı retrograd amnezi ve derin anterograd amnezi gözlenmiş ki bu amnestik profil sıklıkla hipokampal lezyonlarda görülür (68).

Zola-Morgan ve arkadaşları (9) iskemik epizod sonrasında hafıza kaybı gelişen olguya ait klinik ve histolojik bulguları paylaştığı olgu sunumunda; olguda anterograd hafıza kaybı olduğunu, CA1 bölgesinde bilateral hasar bulunduğunu ve beynin diğer alanlarındaki hasarın düşük düzeyde olduğunu bildirmiştir. Sonuç olarak amneziye hipokampustaki lezyon yol açaaktadır. Holdstock ve arkadaşları (69) da bilateral hipokampal hasarı olan global anterograd amnezili bir olguyu bildirmiştir.

İskemi beyin alanlarında nöronların ölümü ile sonuçlanan hasara yol açaaktadır (27). Sinir sisteminin temel birimi nöronlar olması nedeni ile santral sinir

sistemini etkileyen iskeminin sonuçlarının değerlendirilmesinde toplam nöron sayısı en önemli kriterdir (65). Bizim çalışmamızda da strangulasyon yöntemi ile iskemiye maruz kalan sıçanlar ile kontrol grubunu oluşturun sıçanların hipokampuslarındaki toplam nöron sayıları değerlendirilmiştir.

Toplam nöron sayısını en iyi temelde tarafsız ve etkin bir metot olan stereolojik sayım belirleyebilir (65). Stereoloji iki boyutlu kesit düzlemlerini kullanarak, üç boyutlu bir cismin hacim, yüzey alanı, sayı ve uzunluk gibi geometrik özellikleri hakkında sayısal verileri elde etmeye çalışan bir bilim dalıdır. Etkin olma özellikleri en az zamanda en güvenilir sonuca götürmesidir. Stereolojik yöntemlerle beyindeki toplam nöron sayısı, sinaps yoğunluğu veya toplam beyin hacmi gibi hesaplamalar yapılabilir (31, 32, 33). Çalışmamızda da stereolojik yöntemle hipokampus CA1, CA2 ve CA3 bölgeleri toplam nöron sayısını belirledik.

Kontrol grubunda yer alan sıçanların toplam nöron sayısı en yüksek 304819, en düşük 217524 olarak sayılmıştır. Asfiksi uygulanan grupta yer alan sıçanların toplam nöron sayısı en yüksek 178051, en düşük 135157 olarak sayılmıştır. Çalışmamızda asfiksi sonrası yedinci günde vaka ve kontrol grubunun hipokampus CA1, CA2 ve CA3 bölgeleri toplam nöron sayıları arasında anlamlı farklılık saptanmıştır. Çalışmamızın sonuçları literatürdeki çalışmaları destekler niteliktedir.

Literatürde sıçanlarda yapılan farklı çalışmalarda özellikle CA1 bölgesinde nöron sayısında azalma olduğu ve iskemi sonrası CA1 bölgesinde atrofi gözleendiği bildirilmiştir (70, 71, 72). Herguido ve arkadaşlarının (71) yaptığı çalışmada iskemiye maruz kalan gruplar ile kontrol grubu CA1 alanındaki ortalama toplam nöron sayısı arasında anlamlı farklılık olduğu saptanmıştır. Wu ve arkadaşlarının (73) yaptığı çalışmada da CA3 ve CA1 bölgelerinin iskemi ve kontrol grubunda karşılaştırması sonucunda iskemi sonrası sıçanlarda nöron sayısının azaldığı saptanmıştır. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada iskemi sonrası hayvanların farklı fonksiyonel yeteneklerinde bozulmalar saptandığı bildirilmiştir. Sıçan hipokampuslarında iskemi sonrası CA1 bölgesinde atrofi saptanmıştır (72). Plamondon ve arkadaşları (70), yaptığı çalışmada 3 veya 6 dakika iskemi sonrası 180 gün sıçanları gözlemlemiş; CA1 bölgesi piramidal nöron sayısının kontrollere göre

azalmış olduğunu, iskemi sonrası 15 dakika içinde iskemiye uğrayan sıçanların kontrollere göre daha aktif olduğunu bildirmiştir.

Sonuç olarak, strangulasyonların tümü ölümlle sonuçlanmaz. Bu olgularda oluşan asfiksi başta santral sinir sistemi olmak üzere birçok sistemi etkiler. Asfikside kurtulan kişilerde en sık rastlanan bulgu amnezidir. Amnezi hipokampus hasarı ile ilişkilendirilmiştir. Sinir sisteminin temel birimi nöronlar olması nedeni ile santral sinir sistemini etkileyen iskeminin sonuçlarının değerlendirilmesinde toplam nöron sayısı en önemli kriterdir. Toplam nöron sayısını en iyi temelde tarafsız ve etkin bir metot olan stereolojik sayım belirleyebilir. Çalışmamızda stereolojik metotla hipokampus CA1, CA2 ve CA3 bölgelerinin yapılan değerlendirmesinde; asfiksi sonrasında sıçan hipokampus piramidal nöron sayısında azalma olduğu belirlenmiştir.

## SONUÇLAR

Sıçanların mekanik asfiksiye maruz kalması sonucunda oluşan hipoksinin hipokampusta hücre sayısına etkilerinin incelendiği bu çalışmada şu sonuçlar elde edilmiştir;

1. Asfiksiye maruz kalan grupta yer alan sıçanlardan alınan kesitler, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, asfiksiye maruz kalan grupta hipokampusta (CA1, CA2, CA3 alanları ) belirgin bir incelme ve hücre yoğunluğunda azalma gözlenmiştir.

2. Asfiksiye maruz kalan grupta ortalama hücre sayısının (158985,2±17439,8) kontrol grubuna göre (265689,4±39009,5) anlamlı biçimde azaldığı görülmüştür.

## ÖZET

### HAYATTA KALAN MEKANİK ASFİKSİ OLGULARINDA HİPOKAMPAL NÖRON SAYISINDAKİ DEĞİŞİKLİĞİN STEREOLOJİK METODLA GÖSTERİLMESİ: DENEYSEL SIÇAN ÇALIŞMASI

Dr. Cüneyt Destan Cenger

Adli tıp uygulamalarında ölüm nedeni olarak asfiksiye sıklıkla rastlanmaktadır. Orjin kaza, intihar, cinayet ya da doğal ölümdür. Strangulasyonların tümü ölümle sonuçlanmamaktadır. Asfikside kurtulan kişilerde farklı organlarda iskemik hasara bağlı bulgular ortaya çıkar. En sık rastlanan bulgu amnezi'dir. Hipokampusu etkileyen lezyonu olan hastalarda amnezi görülmüştür.

Çalışmamızda sıçanlarda ası sonucu oluşturulan asfiksi sonrasında stereolojik yöntemler kullanılarak hipokampustaki CA1, CA2 ve CA3 alanlarındaki piramidal nöron sayılarının ortalamasının bulunması ve hipoksi sonrası hipokampal hasarın hipokampustaki CA1, CA2 ve CA3 alanlarındaki piramidal nöron sayıları üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Sıçanlar kontrol grubu ve strangulasyonla asfiksiye maruz kalan olmak üzere iki gruba ayrıldı. Strangulasyon uygulandıktan yedi gün sonra derin anestezi altında kraniotomi yapılarak sıçanların beyinleri çıkartıldı. Kriyostat cihazında "Sistemik Rastgele Örneklem Stratejisine" göre alınan horizontal kesitler Hemotoksilen Eozin ile boyandı. Bu kesitlerde hipokampusun CA1, CA2, CA3 alanlarındaki toplam piramidal nöron sayıları "Optik Parçalama Yöntemi" ile hesaplandı.

Çalışmamızda asfiksiye maruz kalan grupta ortalama hücre sayısının (158985,2±17439,8) kontrol grubuna göre (265689,4±39009,5) anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür (p=0,009). Sonuç olarak asfiksi hipokampal nöron kaybına neden olmaktadır.



## YABANCI DİL ÖZETİ

### PRESENTATION OF CHANGES IN HIPPOCAMPAL NEURONAL NUMBERS BY STEREOLOGICAL METHODS IN ALIVE MECHANICAL ASPHYXIA CASES: AN EXPERIMENTAL RAT STUDY

Dr. Cüneyt Destan Cenger

Asphyxia is the most common death cause in Forensic Medicine. It is originated from accidents, suicides, murders, or natural deaths. Strangulations do not always result in death. Cases recovering from asphyxia have many disturbances in different organs because of ischemia. The most frequent symptom is amnesia. Amnesia is especially in patients with hippocampal lesions.

In this study, using stereological methods, after asphyxia was performed by hanging, the mean number of pyramidal neurons in hippocampal CA1, CA2 and CA3 regions and the changes were aimed to evaluate.

Rats are divided into two groups. The first one was the control group and the other one was asphyxiated by strangulation. The brains of strangulated group rats were extracted after seven days. Horizontal sections were taken by cryostat machine with the method of “Systematic Randomised Sample Strategy” and stained with hematoxylen-eosin. In these sections, total pyramidal neuronal numbers in hippocampal CA1, CA2 and CA3 regions were determined by the “Optical Fractioning Method”.

In our study, the mean cell number of asphyxiated group was (158985.2±17439.8) and it is significantly less in the control group (265689.4±39009,5), (p=0.009).

In conclusion, asphyxia is resulted in hippocampal neuronal lost.

## KAYNAKLAR

1. Knight B. Forensic Pathology. London: E Arnold, 1996: 319-333.
2. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. 10. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2001: 432-688.
3. Di Maio VJM, Dana SE, editors. Forensic Pathology. U.S.A: Landes Bioscience 1998: 137-145.
4. Azmak D. Asphyxial deaths a retrospective study and review of the literature. Am J Forensic Med Pathol 2006; 27: 134-144.
5. Verma SK, Lal S. Strangulation death during 1993-2002 in East Delhi (India). Leg Med 2006; 8:1-4.
6. Shields LBE, Corey TS, Weakley-Jones B, Stewart D. Living victims of strangulation A 10- year review of cases in a metropolitan community. Am J Forensic Med Pathol 2010; 31: 1-6.
7. Gunnell D, Bennewith O, Hawton K, Simkin S, Kapur N. The epidemiology and prevention of suicide by hanging: A systematic review international. J Epidemiol 2005; 34: 433-442.
8. Koç S, Özaslan A. Genel olarak asfiksiler, ası, boğma, tıkama-tıkanma, kimyasal asfiksiler. Editörler: Soysal Z, Çakalır C. Adli Tıp, İstanbul: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Yayınevi, 1999: 405-457.
9. Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. J Neurosci 1986; 6: 2950-2967.

10. Taner D. Fonksiyonel Nöroanatomi. Ankara: ODTÜ Yayıncılık, 2005: 226-231.
11. Klinik Gelişim. İstanbul: İstanbul Tabip Odası'nın Yayınları 2009; 22: 23-32.
12. Yurdakul AS, Öztürk C. Asfiksi kavramı. Solunum 2003; 6: 237-239.
13. Polatlı M. Toksik gaz inhalasyonu. Solunum 2003; 5: 244-256.
14. Polat O, İnanıcı MA, Aksoy ME. editörler. Adli Tıp Ders Kitabı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 1997: 71-97.
15. Salaçin S. Adli Tıp Ders Notu. Adana: Çukurova Üniversitesi Yayınları, 1998: 41-47.
16. Hancı H. Ali Tıp ve Adli Bilimler. Ankara: Seçkin Yayıncılık, 2002: 357-388.
17. Gören S, Tıraşçı Y, Üzün İ. Diyarbakır'da asiya bağlı ölümlerin retrospektif değerlendirilmesi. Türkiye Klinikleri 2005; 2: 1-4.
18. Nikolic S, Micic J, Atanasijevic T, Djokic V, Djonic D. Analysis of neck injuries in hanging. Am J Forensic Med Pathol 2003; 24: 179-182.
19. Aydın B, Turla A, Boz H, Karaarslan B. Samsun ilinde asiya bağlı ölümler. Adli Tıp Bülteni 2006; 11: 23-29.
20. Balcı YG. Eskişehir'de 1997-2001 yılları arasındaki intiharlar. Adli Tıp Dergisi 2003; 17: 33-39.
21. Khokhlov VD. Pressure on the neck calculated for any point along the ligature. Forensic Sci Int 2001; 123: 178-181.

22. Alper B, Azmak D, Çekin N, Gülmen MK, Koç S, Salaçin S. Adli Otopsi ve Adli Patoloji. Soyer A. editor. Birinci Basamak için Adli Tıp El Kitabı. Ankara: Türk Tabipleri Birliği Adli Tıp Uzmanlar Derneği, 1999: 36-82.
23. Azmak D, Erdönmez Ö, Altun G, Zeren C, Yılmaz A. Edirne ilinde otopsi yapılan 77 asfiksi olgusunun değerlendirilmesi. In: Cantürk G, Ağrıtmış H editörler. Yıllık Adli Tıp Toplantıları 2002 Mayıs 16-19; Antalya; 2002. P. 197-202.
24. Doğan KH, Demirci S, Günaydın G, Buken B. Accidental ligature strangulasyon by an ironing machine: an unusual case. J Forensic Sci 2010; 1: 251-253.
25. Arıncı K, Elhan A, editörler. Anatomi 2. Cilt. Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. Şti, 1995: 338-408.
26. Lokkegaard A, Nyengaard JR, West MJ. Stereological estimates of number and length of capillaries in subdivisions of the human. Hippocampus 2001; 11: 726-740.
27. Yamashima T. Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases in ischemic neuronal death A conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates. Cell Calcium 2004; 36: 285-293.
28. Rami A, Jansen S, Giesser I, Winckler J. Post-ischemic activation of caspase-3 in the rat hippocampus. Neurochem Int 2003; 43: 211-223.
29. Suckow MA, Sharp PE, La Regina MC. editors. The Laboratory Rat. U.S.A: CRC Pres LLC, 1998: 1-19.
30. Hirvonen J, Kortelainen M-L, Huttunen P. Pulmonary and serum surfactant phospholipids and serum catecholamines in strangulation An experimental study on rats. Forensic Sci Int 1997; 90: 17-24.

31. Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 1984; 134: 127-136.
32. Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Niesen K et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96: 379-394.
33. Gundersen HJG, Bagger P, Bentsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N et al. The new stereological tools: disektor, fractionator, nucleator and point sampled intercept and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96: 857-881.
34. Gundersen HJG, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 1987; 147: 229-263.
35. West MJ, Siomianka L, Gundersen HJG. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 1991; 231: 482-497.
36. Korkmaz A, Tmkaya L. Estimation of the section thickness and optical disektor height with a simple calibration method. *J Microsc* 1997; 187: 104-109.
37. West MJ. New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol Aging* 1993; 14: 275-285.
38. Dorph-Petersen KA, Nyengaard JR, Gundersen HJG. Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. *J Microsc* 2001; 204: 232-246.
39. Adigzel E, Dzcan SE, Akdoğan I, Tufan AC. A simple low-cost method for two dimensional microscopic measuring and stepping on the microscopic plate. *Neuroanatomy* 2003; 2: 6-8.

40. Wieloch T, Cardell M, Bingren H, Zivin J, Saitoh T. Changes in the activity of protein kinase C and the differential subcellular redistribution of its isozymes in the rat striatum during and following transient forebrain ischemia. *J Neurochem* 1991; 56: 1227-1235.
41. Kurtuluş A, Acar K, Adıgüzel E, Boz B. Hippocampal neuron loss due to electric injury in rats: A stereological study. *Leg Med* 2009; 11: 59-63.
42. Demirci Ş, Günaydın G, Doğan KH. Konya'da 2000-2005 yılları arasında gerçekleşen intihar orjinli ölüm olgularının retrospektif değerlendirilmesi. *Adli Tıp Bülteni* 2007; 12: 62-67.
43. Erel Ö, Katkıcı U, Dirlik M, Özkök MS. Anabilim dalımız tarafından otopsileri yapılan intihar olguların değerlendirilmesi. Ağrıtmış H editör. 10. Ulusal Adli Tıp Günleri 2003 Ekim 8-12; 2003: 191-193.
44. Günaydın G, Demirci Ş, Şahin TK, Konya Adliyesinde 1991-2000 yılları arasında incelenen adli ölüm olgularının retrospektif olarak değerlendirilmesi. Yayıncı N, Cantürk G editörler. Yıllık Adli Tıp Toplantıları 2001 Nisan 25-27; İstanbul; 2001: 109-113.
45. Çengel G, Ergöner AT, Can İÖ, Sönmez Y, İzmir ilinde 2004 yılında adli otopsi yapılan olguların değerlendirilmesi. *Adli Tıp Bülteni*. 2008; 13: 13-18.
46. Sharma BR, Harish D, Sharma A, Sharma S, Singh H, Injuries to neck structures in deaths due to constriction of neck, with a special reference to hanging. *J Forensic Leg Med* 2008; 15: 298-305.
47. Kaga M, Takeshima T, Matsumoto T. Suicid and its prevent in Japan. *Leg Med* 2009; 11: 18-21.

48. Asirdizer M, Yavuz MS, Demirağ Aydın S, Dizdar MG, Suicides in Turkey between 1996 and 2005. *Am J Forensic Med Pathol* 2010; 31: 138-145.
49. Üzün İ, Büyük Y, Gürpınar K, Suicidal hanging: Fatalities in İstanbul Retrospective analysis of 761 autopsycases. *J Forensic Leg Med* 2007; 14: 406-409.
50. Meel B, Epidemiology of suicide by hanging in Transkei, South Africa. *Am J Forensic Med Pathol* 2006; 27: 75-78.
51. Abder-Rahman HA, Abu-Alrageb SY. Killing tools in mechanical asphyxia. *Leg Med* 1999; 1: 2-5.
52. Atılğan M. A case of suicidal ligature strangulation by using a tourniquet method. *Am J Forensic Med Pathol* 2010; 31: 85-86.
53. Hakkanen H, Homicide by ligature strangulation in Finland: Offence and offender characteristics. *Forensic Sci Int* 2005; 152: 61-64.
54. Di Nunno N, Costantinides F, Conticchio G, Mangiatordi S, Vimercati L, Di Nunno C. Self-strangulation an uncommon but not unprecedented suicid method. *Am J Forensic Med Pathol* 2002; 23: 260-263.
55. Demirci S, Doğan KH, Erkol Z, Gunaydın G. Suicide by ligature strangulation three case reports. *Am J Forensic Med Pathol* 2009; 30: 369-372.
56. Shields LBE, Corey TS, Weakley-Jones B, Steawart D. Living victims of strangulation A 10-year rewiev of cases in a metropolitan comunity. *Am J Forensic Med Pathol* 2010; 31: 1-6.

57. Plattner T, Bolliger S, Zollinger U. Forensic assesment of survived strangulation. *Forensic Sci Int* 2005; 153: 202-207.
58. Ueno Y, Asano M, Nushida H, Nakagawa K, Adachi J, Nagasaki. Sexuel asphyxia by hanging- a case report and a review of the literature. *Leg Med* 2003; 5: 175-180.
59. Focardi M, Gualco B, Norelli GA. Accidental death in autoerotic maneuvers. *Am J Forensic Med Pathol* 2008; 29: 64-68.
60. McClane GE, Strack GB, Hawley D. A rewiev of 300 attempted strangulation cases part II: Clinical evulation of the surviving victim. *J Emerg Med* 2001; 21: 311-315.
61. Taliaferro E, Mills T, Walker S, Walking and talking victims of strangulation . Is there a new epidemic? A commentary. *J Emerg Med* 2001; 2: 293-295.
62. Walton M, Connor B, Lawlor P, Young D, Sirimanne E, Gluckman P et al. Neuronal death and survival in two models of hypoxic-ischemic brain damage. *Brain Res* 1999; 29: 137-168.
63. Oehmichen M, Meisser C, Wurmb-Schwark NV, Schwark T. Methodical approach to brain hypoxia/ischemia as a fundamental problem in forensic neuropathology. *Leg Med* 2003; 5: 190-201.
64. Yılmaz I, Adıgüzel E, Akdoğan I, Kaya E, Hatip-Al-Khatib I. Effects of second generation tetracyclines on penicillin-epilepsy-induced hippocampal neuronal loss and motor incoordination in rats. *Life Sci* 2006; 79: 784-790.



65. Canan S, Pakkenberg B, Kaplan S, Aslan H. A stereological investigation on the effects of forebrain ischemia on hippocampal neuron number in chick. *Neurosci Res Commun* 2002; 1: 27-33.
66. Shamloo M, Rytter A, Wieloch T. Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase cascade in the hippocampal CA1 region in a rat model of global cerebral ischemic preconditioning. *Neuroscience* 1999; 93: 81-89.
67. Joelsing FC, Billeskov R, Christensen JR, West M, Pakkenberg B. Hippocampal neuron and glial cell numbers in Parkinson's disease-a stereological study. *Hippocampus* 2006; 16: 826-833.
68. Medalia AA, Merriam AE, Ehrenreich JH. The neuropsychological sequelae of attempted hanging. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991; 54: 546-548.
69. Holdstock JS, Mayes AR, Gong QY, Roberts N, Kapur N. Item recognition is less impaired than recall and associate recognition in a patient with selective hippocampal damage. *Hippocampus* 2005; 15: 203-215.
70. Plamondon H, Davignon G, Khan S, Charron C. Cerebral ischemic preconditioning induces lasting effects on CA1 neuronal survival, prevents memory impairments but not ischemia-induced hyperactivity. *Behav Brain Res* 2008; 189: 145-151.
71. Herguido MJ, Carceller F, Roda JM, Avendano C. Hippocampal cell loss in transient global cerebral ischemia in rats: A critical assesment. *Neuroscience* 1999; 93: 71-80.

72. Langdon KD, Granter-Button S, Corbett D. Persistent behavioral impairments and neuroinflammation following global ischemia in the rat. *Eur J Neurosci* 2008; 28: 2310-2318.
73. Wu CP, Cheung G, Rakhshani N, Parvardeh S, Nassiri Asl M, Huang HL, et al. CA3 neuronal activities of dorsal and ventral hippocampus are differentially altered in rats after prolonged post-ischemic survival. *Neuroscience* 2005; 130: 527-539.