

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

**NEONATAL TERM SIÇANLARDA OLUŞTURULAN
HIPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI MODELİNDE
İNTRAPERİTONEAL UYGULANAN
VALPROİK ASİT VE FOLİK ASİDİN
BEYİN HASARINA ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. MEHMET DEMİRAYAK

TEZ DANIŞMANI

YRD. DOÇ. DR. MİNE CİNBİŞ

DENİZLİ-2008

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

**NEONATAL TERM SIÇANLARDA OLUŞTURULAN
HIPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI MODELİNDE
İNTRAPERİTONEAL UYGULANAN
VALPROİK ASİT VE FOLİK ASİDİN
BEYİN HASARINA ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. MEHMET DEMİRAYAK

TEZ DANIŞMANI

YRD. DOÇ. DR. MİNE CİNBİŞ

DENİZLİ-2008

Yrd.Doç.Dr.Mine CİNBIŞ'in danışmanlığında Dr. Mehmet DEMİRAYAK tarafından yapılan "Neonatal Term Sıçanlarda Oluşturulan Hipoksik İskemik Beyin Hasarı Modelinde İntraperitoneal Olarak Uygulanan Valproik Asit ve Folik Asidin Beyin Hasarına Etkileri" başlıklı çalışma jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr.Serap SEMİZ

Üye :Doç.Dr.Ahmet AKÇAY

Üye : Yrd.Doç.Dr.Mine CİNBIŞ

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

01/12/2008

Prof. Dr.Cüneyt Orhan KARA
Pamukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Dekan V.

TEŞEKKÜR

Herşeyden önce bana bu eğitim hayatını sağlayan çok sevdiğim ülkem ve ülkemizin güzel insanlarına; mesleki kariyerimin bu son basamaklarında engin bilgilerinden yararlandığım tez danışmanı hocam Yrd Doç Dr Mine CİNBİŞ ve her zaman saygıyla anacağım değerli hocalarım Doç. Dr. Serap SEMİZ, Prof Dr. Hacer ERGİN, Prof. Dr. İlknur KILIÇ, Doç. Dr. Dolunay GÜRSES, Doç. Dr. Ahmet AKÇAY, Prof Dr. Aziz POLAT ve Uz. Dr. Özmert ÖZDEMİR'e; uzmanlık eğitimim süresince bu yükü benimle paylaşan tüm asistan kardeşlerime, hemşire arkadaşlara ve diğer sağlık personeline; tez çalışmam esnasında tanımaktan ve birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum başta Doç. Dr. Ilgaz AKDOĞAN, Araş. Gör. N. Gökşin YONGUÇ DEMİRCİ, veteriner hekim Barbaros ŞAHİN olmak üzere tüm Anatomi Anabilim Dalı ve Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına; tezimin istatistik hesaplamalarında yaptığı katkılarından dolayı Prof Dr. Mehmet ZENCİR'e; tezimin gerçekleşmesinde yaptıkları katkıları hiç unutmayacağım Pınar PEZÜK ve Şerife YALÇINBAŞ'a;

Hayatım boyunca desteğini hiç esirgemeyen canım annem Feride DEMİRAYAK, kardeşim Zekeriya DEMİRAYAK ve her zaman minnetle andığım babam İsmail DEMİRAYAK'a; yaşadığım tüm sıkıntıları paylaşan, taşıdığım tüm yükü ve sorumluluğu benimle birlikte omuzlayan can yoldaşım sevgili eşim Yeliz DEMİRAYAK, biricik oğlum İ. Tuna DEMİRAYAK ve biricik kızım Miray DEMİRAYAK'a bana verdikleri büyük destek ve gösterdikleri sabırdan dolayı, benim için yapılanlar karşısında çok basit kalsa da bu birkaç satırla da olsa minnettarlığımı belirtmek isterim. Sizlere layık olmak dilekleriyle, SONSUZ TEŞEKKÜRLER.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	2
PERİNATAL HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI VE İSKEMİK HÜCRE ÖLÜMÜNÜN GENEL ÖZELLİKLERİ	2
BEYİN KAN AKIMI	4
Beyin mikrodolaşımının düzenlenmesi	5
BEYİN METABOLİZMASI	5
KRİTİK HİPOKSİ VE İSKEMİ DEĞERLERİ	6
PRİMER ENERJİ YETMEZLİĞİ	7
SEKONDER ENERJİ YETMEZLİĞİ	8
İSKEMİK ASİDOZ VE BEYİN HASARINA ETKİSİ	10
HİPOTERMİ VE BEYİN HASARINA ETKİSİ	10
NÖROPATOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER	10
SİTOTOKSİK MEKANİZMALAR	12
Hücre içi kalsiyum artışı	12
Serbest radikal salınımı	13
Eksitotoksisite ve glutamat reseptörleri	13
Nitrik oksid	15
İnflamatuvar mekanizmalar	15
Demir toksisitesi	16
DNA VE MAKROMOLEKÜLLERDE HASAR OLUŞUMU	16
PARP ENZİMİNİN ROLÜ	17
PROTEAZLARIN ROLÜ	17

<i>Caspase</i> 'lar	17
<i>Calpain</i> 'ler	18
<i>Cathepsin</i> 'ler	18
HİPOKSİ-İSKEMİ VE Bcl-2 GEN AİLESİ	19
LİPOLİZ VE LİPİD PEROKSİDASYONU	19
GAMA-AMİNO BÜTİRİK ASİT VE RESEPTÖRLERİ	20
VALPROİK ASİT	21
FOLİK ASİT	22
HİPOKAMPUS	26
SIÇANLAR VE SIÇANLARDA HİPOKAMPUS	28
GEREÇ VE YÖNTEM	29
PERİNATAL HİPOKSİK İSKEMİK ENSEFALOPATİ	
MODELİNİN OLUŞTURULMASI	30
İLAÇ VE SERUM FİZYOLOJİK UYGULAMASI	30
DOKUNUN HAZIRLANMASI	31
KESİTLERİN BOYANMASI	31
STEREOLOJİK YÖNTEMLER	32
Sistematik tekdüze rastgele örnekleme	33
Optik parçalama (fraksiyonlama) yöntemi	34
Tarafsız sayım çerçevesi ve sayım alanı	36
Optik disektör	37
OPTİK PARÇALAMA YÖNTEMİNE GÖRE TOPLAM	
NÖRON SAYISININ HESAPLANMASI	40
Kesit alma ve kesit örnekleme oranı	40
Alan örnekleme oranı	41
Kesit kalınlığının ölçümü	43
Kalınlık örnekleme oranı	44
Nöron sayımı	44

Toplam nöron sayısı	45
ÖRNEKLEME PLANININ YETERLİLİĞİ VE HATA KATSAYISI	45
İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER	46
BULGULAR	47
SIÇANLARIN VÜCUT AĞIRLIKLARI, HÜCRE SAYIM SONUÇLARI VE HÜCRE SAYIMINDA KULLANILAN PARAMETRELER	47
BÜTÜN GRUPLARIN SOL HİPOKAMPUS CA1, CA2-3 STRATUM PİRAMİDALİS ALANLARI VE TÜM SOL HİPOKAMPUSTAKİ TOPLAM NÖRON SAYISI ORTALAMALARI	56
TARTIŞMA	61
SONUÇLAR	80
ÖZET	81
YABANCI DİL (İNGİLİZCE) ÖZETİ	83
KAYNAKLAR	85

TABLolar ÇİZELGESİ

	Sayfa No
Tablo-1 Beyin kan akımındaki değişikliklerin hücre fonksiyonlarına etkisi ve eşik değerleri	7
Tablo-2 SF-1 nolu sıçana ait kesitlerde CA1 alanlarındaki disektör partikül sayıları ve hata katsayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler	46
Tablo-3 SF grubu sıçanların 13 günlükken vücut ağırlıkları, sol hipokampus CA1 stratum piramidalis alanı (CA1), sol hipokampus CA2-3 stratum piramidalis alanı (CA2-3) ve tüm sol hipokampusdaki (CA1+CA2-3) toplam nöron sayıları ile toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler	47
Tablo-4 VA grubu sıçanların 13 günlükken vücut ağırlıkları, sol hipokampus CA1 stratum piramidalis alanı (CA1), sol hipokampus CA2-3 stratum piramidalis alanı (CA2-3) ve tüm sol hipokampusdaki (CA1+CA2-3) toplam nöron sayıları ile toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler	49
Tablo-5 VA+FA grubu sıçanların 13 günlükken vücut ağırlıkları, sol hipokampus CA1 stratum piramidalis alanı (CA1), sol hipokampus CA2-3 stratum piramidalis alanı (CA2-3) ve tüm sol hipokampusdaki (CA1+CA2-3) toplam nöron sayıları ile toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler	51
Tablo-6 FA grubu sıçanların 13 günlükken vücut ağırlıkları, sol hipokampus CA1 stratum piramidalis alanı (CA1), sol hipokampus CA2-3stratum piramidalis alanı (CA2-3) ve tüm sol hipokampusdaki (CA1+CA2-3) toplam nöron sayıları ile toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler	53
Tablo-7 Grupların sol hipokampus CA1 stratum piramidalis alanı (CA1), CA2-3 stratum piramidalis alanı (CA2-3) ve tüm sol hipokampus (CA1+CA2-3) toplam nöron sayısı ortalamaları	57
Tablo-8 Grupların CA1, CA2-3, tüm sol hipokampus toplam nöron sayısı ortalamaları açısından Tukey testi kullanılarak yapılan ikili karşılaştırmalarının istatistiksel p değerleri	60

ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

	Sayfa No
Şekil 1 Yetişkinlerde arteriyel kan basıncı-beyin kan akımı eğrisi	5
Şekil-2 Yavru koyunlarda; 30 dakikalık global iskemi öncesinde, esnasında ve sonrasında beyin kan akımının zamanla değişimi	8
Şekil-3 Sinapslarda glutamat salınımı ve glutamat resptörleri	14
Şekil-4 Perinatal hipoksik-iskemik beyin hasarı	20
Şekil-5 GABA _A reseptörü ve bağlantı alanları	21
Şekil-6 Folik asidin yapısı	22
Şekil-7 Santral sinir sisteminde folat metabolizması ve folatın görev aldığı biyolojik süreçler	25
Şekil-8 İnsan (A) ve sıçan (B) beyninde hipokampus ve lokalizasyonu	27
Şekil-9 Optik parçalama örnekleme şeması, tanecik sayımının yapıldığı “disektör sondası” ve tarafsız sayım çerçevesinin görünümü	36
Şekil-10 Tarafsız sayım çerçevesi	37
Şekil-11 Tasarımsal olarak kesit kalınlığı içerisinde disektör sondasının görünümü	38
Şekil-12 Çalışmamızda kullanılan, Thoma lamına ait bir küçük karenin içine çizilen tarafsız sayım çerçevesi	42
Şekil-13 SF grubu sıçanların sol hipokampus CA1 stratum piramidalis alanı (CA1), CA2-3 stratum piramidalis alanı (CA2-3) ve tüm sol hipokampusdaki (CA1+CA2-3) toplam nöron sayıları	48
Şekil-14 VA grubu sıçanların sol hipokampus CA1 stratum piramidalis Alanı (CA1), CA2-3 stratum piramidalis alanı (CA2-3) ve tüm sol hipokampusdaki (CA1+CA2-3) toplam nöron sayıları	50
Şekil-15 VA+FA grubu sıçanların sol hipokampus CA1 stratum piramidalis alanı (CA1), CA2-3 stratum piramidalis alanı (CA2-3) ve tüm sol hipokampusdaki (CA1+CA2-3) toplam nöron sayıları	52
Şekil-16 FA grubu sıçanların sol hipokampus CA1 stratum piramidalis alanı (CA1), CA2-3 stratum piramidalis alanı (CA2-3) ve tüm sol hipokampusdaki (CA1+CA2-3) toplam nöron sayıları	54
Şekil-17 Her deney grubundan bir sıçana ait farklı mikroskop	

büyütmelerinde hipokampus görüntüleri	55
Şekil-18 Grupların ortalama toplam nöron sayıları	58

KISALTMALAR ÇİZELGESİ

ADP	: Adenozin difosfat
AMPA	: Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propiyonik Asit
AÖO	: Alan örnekleme oranı
ATP	: Adenozin trifosfat
Beyaz cevher BMHO₂	: Beyaz cevherde oksijen için beyin metabolik hızı
BMH	: Beyin metabolik hızı
BMHGlu	: Glukoz için beyin metabolik hızı
BMHO₂	: Beynin oksijen için metabolik hızı
BKA	: Beyin kan akımı
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
BPB	: Beyin perfüzyon basıncı
CA	: <i>Cornu Ammonis</i>
cm	: Santimetre
CO₂	: Karbondioksit
COX	: Siklooksijenaz
DHF	: Dihidrofolat
DHFR	: Dihidrofolat redüktaz
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
FA	: Folik asit
FAD	: Flavin-adenin-dinükleotid
FIGLU	: Formiminoglutamat
FMN	: Flavin mononükleotid
G	: G-protein
GABA	: Gama-amino bütirik asit
GABA-T	: GABA transaminaz
GAD	: Glutamat dekarboksilaz
Glu	: Glutamat
GLUT	: <i>Glucose Transporter</i>
g	: Gram

Gri cevher BMHO₂	: Gri cevherde oksijen için beyin metabolik hızı
H-E	: Hematoksilen-Eozin
HİE	: Hipoksi-iskemik ensefalopati
Hİ	: Hipoksik-iskemik
HK	: Hata katsayısı
İL	: İnterlökin
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
ip	: İnterperitoneal
KAR	: Kainik asit reseptörleri
KaÖÖ	: Kalınlık örnekleme oranını
KeÖÖ	: Kesit örnekleme oranı
Kg	: Kilogram
MAT	: Metiyonin adenozil transferaz
mGluR	: Metabotropik glutamat reseptörü
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
mRNA	: <i>Messenger RNA</i>
MTHFR	: Metilentetrahidrofolat redüktaz
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NMDA	: N-metil-D-aspartat
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NTD	: Nöral tüp defekti
OH⁻	: Hidroksil iyonu
PABA	: Para-aminobenzoik asit
PaCO₂	: Arteriyel parsiyel karbondioksit basıncı
PAF	: Trombosit agregasyon faktör
PaO₂	: Arteriyel parsiyel oksijen basıncı
PARP	: Poly (ADP-riboz) polimeraz
PGE₂	: Prostaglandin E ₂
PgG	: Prostaglandin G
PgH	: Prostaglandin H

PVL	: Periventriküler lökomalazi
SAH	: S-adenozilhomosistein
SAM	: S-adenozilmetiyonin
SF	: Serum fizyolojik
SHMT	: Serin hidroksimetiltransferaz
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
SSS	: Santral sinir sistemi
STRÖ	: Sistematik-tekdüze rastgele örnekleme
TCA	: Trikarboksilik asit
THF	: Tetrahitrofolat
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör- α
VA	: Valproik asit
VBKK	: Voltaj-bağımlı Ca ⁺⁺ kanalları

GİRİŞ

Hipoksik-iskemik ensefalopati (HİE) fetüs ve yenidoğanlarda akut mortalite ve morbiditenin önemli bir nedenidir (1). Asfiksi insidansı term bebeklerde 2-4/1000 iken düşük doğum ağırlıklı prematür bebeklerde ise yaklaşık %60'dır (2,3). Bunların yaklaşık %25'inde HİE gelişmektedir (4). HİE'li bebeklerin %15-20'si yenidoğan döneminde ölmektedir, yaşayanların %25-30'unda serebral palsy, zeka geriliği, öğrenme güçlüğü ve epilepsi gibi kalıcı nörolojik sekeller ortaya çıkmaktadır (5,6).

HİE'nin gelişmesinde eksitator amino asit reseptörlerinin aşırı uyarılması, hücre içi kalsiyum birikimi, lipid peroksidasyonu ve serbest radikal üretimi gibi birbirleri ile ilişkili birçok mekanizma rol oynamaktadır (7). Bu mekanizmaların açıklanması ve yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde hayvan çalışmalarının önemli katkısı vardır (2).

Valproik asit (VA) geniş spektrumlu bir antikonvülzandır (8). Folik asit (FA) ise vücutta tek karbon taşıyıcısı olarak görev yapan (9), eksikliğinde doğumsal nöral tüp defekti (NTD), gelişim geriliği, bunama, myelopati, konvülsiyon gibi nörolojik ve megaloblastik anemi gibi hematolojik belirtiler görülen, insan vücudunda sentezlenemeyen, diyet ile alınması gereken bir vitamindir (10-14). VA'nın antifolat aktivite gösterdiği, serum FA düzeylerini düşürdüğü; FA'nın ise VA'nın neden olduğu nöral tüp defektlerinden ve iskelet deformitelerinden koruduğu saptanmıştır. (14-17). Fakat VA'nın antifolat aktivitesine aracılık eden mekanizmalar ve NTD'de oynadığı rol açık değildir (14,15,16). FA'nın, VA'nın tetiklediği protein düzeyi değişikliklerini, gen sentezindeki bozulmayı ve homosisteinin neden olduğu oksidatif hasarı önleyerek; VA'nın neden olduğu NTD'den ve teratojeniteden koruduğu düşünülmektedir (14,16). Çeşitli yayınlarda VA ve FA'nın nöroprotektif etkilerinden bahsedilmektedir (8,10). Ancak HİE'de birlikte kullanımları ve nöroprotektif etkileri hakkında yayınlanmış bir çalışma yoktur.

Bu çalışmada term yenidoğan sıçan HİE modelinde VA ve FA'nın tek tek ve birlikte kullanımları ile nöroprotektif etkileri araştırıldı. Hipokampusun CA1 ve CA2-3 bölgelerinde nöron kaybı değerlendirildi ve kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

GENEL BİLGİLER

PERİNATAL HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI VE İSKEMİK HÜCRE ÖLÜMÜNÜN GENEL ÖZELLİKLERİ

Hipoksi, çeşitli nedenlere bağlı olarak kan veya beyinde oksijenin kısmi olarak azlığı; iskemi, hücre ve organlara normal fonksiyonlarını sürdürmesi için gerekli kan akımında yetersizliği (5); anoksi, oksijenin tam yokluğunu; asfiksi ise ilerleyici bir hipoksemi (kanda oksijen miktarının azalması) ve hiperkarbiye (kanda karbondioksit miktarının artması) neden olan plasental veya pulmoner gaz değişiminin azalması veya durması anlamındadır (1,5).

Yenidoğanda görülen ensefalopati veya konvülsiyonların çoğu perinatal olaylardan kaynaklanmaktadır. Ensefalopati term yenidoğanların beyin manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ve otopsi bulguları, %80'inin akut beyin hasarına bağlı, %1'inin prenatal hasarlanma ve %3'ünün hipoksi-iskemi dışında bir nedene bağlı olarak geliştiğini düşündürmektedir (5).

HİE yenidoğanlarda kalıcı beyin hasarının en önemli nedenidir (5,18). Meydana gelen sekonder nörolojik bozuklukların toplumsal maliyeti oldukça yüksektir (18). Bebeğin gebelik haftası hipoksik-iskemik (Hİ) beyin hasarının nöropatolojik görünümünü belirleyen en önemli kriterlerden biridir (1,18). Fetüs, hafif ve orta derecede hipoksiye oldukça dirençlidir. Orta derece hipokside beyin perfüzyonu sürdürülür, ancak hipoksi haftalarca devam ederse fetüste büyüme geriliği ortaya çıkar. Bu süre daha da uzarsa hücresel fizyoloji ve bütünlüğü bozan metabolik asidoz gelişir. Şiddetli hipokside beyin bölgesel kan akımında değişiklikler ortaya çıkar; ancak, beyin metabolizmasını sürdürecektir yeterli oksijeni elde edebilir. Miyokard fonksiyonlarında bozulma olursa kalp debisi azalır ve beyinde dolaşımın az olduğu alanlarda hasar ortaya çıkar (1). Fetüsün hipoksiye dolaşımsal cevabı, başlangıçta kalp debisini arttırarak bütün organlara giden kan akımını arttırmak şeklinde olur. Bradikardi gelişir, kan basıncı yükselir. Hipoksi şiddetli olup süresi uzar ise kan dolaşımı yeniden düzenlenir (redistribisyon). Duktus venosus, duktus arteriosus ve foramen ovale yoluyla şantlar ortaya çıkar. Beyin, kalp ve adrenal bezlerin dolaşımı

sürdürülmeye çalışılır. Cilt, kaslar, akciğerler, böbrekler, karaciğer ve bağırsakların dolaşımı ise kısıtlanır. Bu organlara ait bulgular ortaya çıkar (1,3,5,19). Uzayan hipoksi ve metabolik asidoz, myokard fonksiyonlarında bozulmaya ve kalp debisinin azalmasına neden olur. Kan basıncı düşer, beyinde iskemi ve Hİ hasar meydana gelir. Sonuçta hipoksinin üzerine iskeminin eklenmesi ile beyin hasarı ortaya çıkar (3,4). Hİ olaylardan sonra beyin hasarının nöro-patolojik dağılımını hücresele duyarlılık, matürite, bölgesel damarlanma, bölgesel hassaslık, hipoksik-iskemik yaralanmanın tipi ve diğer bazı faktörler (doğum esnasında annenin vücut ısısı, şiddetli fetal açlık, sepsis, ikiz bebek) belirler (1,3).

HİE, semptom ve bulgulara göre hafif, orta ve şiddetli olarak sınıflandırılır (1). Hafif HİE'li bebeklerde ciddi gelişimsel sekel neredeyse hiç oluşmaz (1). Orta derece HİE'li infantların %10'u ölür. Yaşayanların %30'unda sakatlıklar ortaya çıkar. Şiddetli HİE'li bebeklerin %60'ı ölür ve yaşayanların çoğu engellidir (20).

Hİ olaydan sonra hücre ölümü başlıca nekroz ve apoptozis (programlanmış hücre ölümü) olmak üzere iki farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir. Şiddetli hasarlanma nekroz ile sonuçlanırken hafif hasarlanma apoptozis ile sonuçlanabilir. Nekroz pasif bir süreçtir. İnflamatuvar mekanizmalar aktive olur. Hücre şişer, organelleri bozulur, membran bütünlüğü kaybolur ve en sonunda hücre ölür. Apoptozis ise aktif bir süreçtir. Hücre büzülür, çekirdekte piknoz (hücre çekirdeği ve kromatin kitlesinin büzülmesi) gelişir, kromatin yoğunlaşır, genomik parçalanma ortaya çıkar ve en sonunda hücre ölür. Bu olaylarda inflamatuvar mekanizmalar yer almaz (21). İskemik alanın merkezinde nekrotik hücre ölümü baskındır. İskemik penumbradaki (şiddetli iskemik alana bitişik kısmi iskemik alan) hücre popülasyonu ise nekrotik ve apoptotik hücre karışımından oluşur. Daha uzaktaki hücreler ise apoptozis ile ölür. Apoptozis aynı zamanda santral sinir sisteminin gelişimi esnasında normalde var olan homeostatik bir süreçtir (4). Hİ harabiyetin olduğu esnada erken veya primer hücre ölümü (nekrotik hücre ölümü belirgin), Hİ olaydan bir müddet sonra gecikmiş veya sekonder hücre ölümü (apoptotik hücre ölümü belirgin) ortaya çıkar. Sekonder hücre ölümü 8-72 saatte en belirgindir ve bir süre daha devam eder (1,3).

Çalışmalar hipokampusun CA1 bölgesindeki piramidal nöronların iskemiyeye seçici duyarlılığı olduğunu göstermiştir. Bu durum “eksitotoksik hipotez” ile açıklanmaktadır. Hücre dışında biriken eksitatör (uyarıcı) aminoasitler hücre ölümüne neden olmaktadır (22,23). Hayvan çalışmalarında beş dakika süren global iskeminin diğer hücre populasyonlarını etkilemezken, hipokampusun CA1 piramidal hücrelerinin hemen hemen tamamında gecikmiş hücre ölümüne neden olduğu; yirmi dakikalık global iskeminin ise gyrus dentatus granüler hücreleri ve CA1 internöronları üzerinde neredeyse hiç etkisi olmazken CA3 nöronlarında hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (24). Farklı yayınlarda, tek taraflı Hİ beyin hasarının oluşması için, hipoksi süresinin hayvanın cins ve ırkına bağlı olarak 30 dakika ile 2,5 saat arasında değişen sürelerde olması gerektiği belirtilmektedir (25). Hipoksi-iskemiden sonra nöron ölümüne neden olan en önemli mekanizma glutamat eksitotoksitesitesidir (25,26). Glutamat reseptör aktivasyonuna bağlı beyin hasarına özellikle hipokampus duyarlıdır (27).

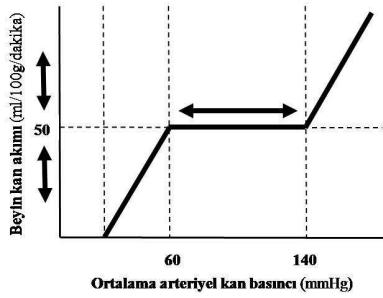
BEYİN KAN AKIMI (BKA)

Beyin kanlanmasının büyük bir kısmını internal karotik arterler ve vertebral arterler sağlar. Az miktarda kan da anterior spinal arter aracılığıyla götürülür. (28). Beyin perfüzyonu oldukça yüksektir. BKA otonom kontrol ile güvenli sınırlarda sürdürülür. Otonom kontrole neden olan uyarı beyin perfüzyon basıncı (BPB)'dir (29). Normal BPB 70-80 mmHg'dir. İskemi için kritik eşik değer ise 30-40 mmHg'dir (30). Sistemik kan basıncındaki değişikliklere cevap olarak arteriollerdeki çap değişiklikleri ile beyin damar direnci ve BKA ayarlanır (28). Sistemik kan basıncı azalınca arteriollerde vazodilatasyon, artar ise refleks vazokonstriksiyon ortaya çıkar ve beyin damar yatağı korunur. (28). BKA kaslar, metabolik ve nörojenik kontrol olmak üzere üç farklı mekanizma ile düzenlenmektedir (28). BKA'daki değişikliklerin metabolik gereksinimlere uygun olarak nörojenik mekanizmalarla başlatıldığına ve bölgesel kimyasal faktörlerle sürdürüldüğüne inanılmaktadır (31).

BKA istirahat halinde gri madde için 90 ml/100g/dakika, beyaz madde için 20 ml/100g/dakika, beyin geneli için 50 ml/100g/dakika'dır (30). Beyin hücreleri; BKA

10 ml/100g/dakika düzeyine indiğinde 3 saatte ölür, 5 ml/100g/dakika düzeyine indiğinde ise 30 dakikada ölür (30).

Yetişkinlerde beyin kan akımının normal sınırlarda sürdürülebilmesi için ortalama arteriyel kan basıncının alt sınırı 60 mmHg, üst sınırı 140 mmHg olmalıdır (Şekil 1). Bazı çalışmalarda sağlıklı yetişkinlerdeki kritik nihai kan basıncının alt sınırı (*Critical closing pressure*) yaklaşık 30 mmHg saptanmıştır (28).



Şekil 1: Yetişkinlerde arteriyel kan basıncı-beyin kan akımı eğrisi (28).

Yenidoğanlarda BKA'nın normal sınırlarda sürdürülmesi için ortalama arteriyel kan basıncındaki alt sınır yaklaşık 30 mmHg'dir; ancak üst sınır bilinmemektedir. Kritik nihai kan basıncının alt sınırı ise 23 ± 11 mmHg'dir (32).

Beyin mikrodolaşımının düzenlenmesi

Astrositler bölgesel beyin kan akımını nöronların aktiviteleri doğrultusunda ayarlarlar. Bu durum astrositler tarafından glutamat tutulumu aracılığı ile gerçekleştirilir. Glutamat uyarısı ile Ca^{++} salınımının, fosfolipaz A_2 ve siklooksijenazı (COX) aktive ettiği, bu sayede prostaglandin üretimi ve salınımını gerçekleştirdiği düşünülmektedir. COX-2 aktivasyonu ve prostaglandin E_2 (PGE_2) salınımı astrositlerin belirgin özelliğidir (33). PGE_2 vazodilatör bir ajandır (28). Beyin sapındaki *raphe* çekirdeğindeki nöronlardan salgılanan serotonin mikrovaskülerite üzerinde vazokonstrüktör etkiye sahiptir (28).

BEYİN METABOLİZMASI

BKA, beynin metabolik aktivitesi ile doğrudan ilişkilidir (29). Beyin birim ağırlık başına diğer vücut dokularına göre daha fazla enerji tüketir (30). Ağırlığın %2'si kadar olmasına rağmen (34) kalp debisinin yaklaşık %15-20'sini alır (28).

Beyin metabolik hızı (BMH) vücut ısısı ile doğrudan ilişkilidir. Vücut ısısının yükselmesi beyin metabolik gereksinimini ve BKA'yı arttırmaktadır (29). Beyin, vücuda giren oksijenin %20-25'sini kullanır (28,35). Beynin oksijen için metabolik hızı (BMHO₂) oldukça yüksektir ve beyin dokusunda O₂ rezervi yoktur (35). Gri cevherde oksijen için beyin metabolik hızı (Gri cevher BMHO₂) 3 ml/100g/dakika, beyaz cevherde oksijen için beyin metabolik hızı (beyaz cevher BMHO₂) 1 ml/100g/dakika'dır (30). Bazal şartlarda beyinde kullanılan enerjinin %60'ı Na⁺/K⁺-ATPaz iyon pompasında yakıt olarak kullanılır. Bu sayede hücre içi ve hücre dışı iyon gradienti (farklılığı) sürdürülür. Normal koşullarda beyin metabolik yakıtı sadece glukozdur. Glukoz beyin kapillerlerinde kan-beyin bariyerini GLUT 1 (*Glucose Transporter 1*) aracılığıyla aktif transport ile geçer. Daha sonra çeşitli transport molekülleri aracılığı ile santral sinir sistemi (SSS) hücrelerine dağılır. Glukoz için beyin metabolik hızı (BMHGlu) yaklaşık 30 µg/100gr/dakika'dır. Bu toplam vücut glukoz tüketiminin %25'idir. Beyin glukoz gereksinimi çok yüksek olmasına rağmen glukoz depolama yeteneği yoktur. Kortikal yapılar hipoglisemiye karşı beyin sapına göre daha hassastır. Glukoz beyin hücrelerinde glikoliz ve trikarboksilik asit yolları ile CO₂ ve H₂O'ya okside olur. Mitokondride kesintisiz olarak adenosin trifosfat (ATP) üretilir. Astrositler, hipoksik şartlarda glukozu anaerobik glikoliz ile laktata meabolize ederler. Bu sayede glutamat tutulumunu sağlayacak ATP üretilir. Laktat daha sonra hücre dışı alana salınır. Buradan nöronlar tarafından aktif olarak alınır ve pirüvata dönüştürülür. Pirüvat da aerobik şartlarda daha fazla enerji üretmek için trikarboksilik asit döngüsüne girer. Beyin, uzamış açlıkta alternatif enerji kaynağı olarak keton cisimlerini kullanır ve gliserol, glutamin, glisin gibi maddelerden glukoneogenez ile glukoz üretir (30).

KRİTİK HIPOKSI VE İSKEMİ DEĞERLERİ

Hipoksi ve iskemi net olarak birbirinden ayrılamaz. Beyin perfüzyonu normal değerlere yakın olsa bile, hipoksemi, beyin hasarı ile sonuçlanan beyin hipoksisine neden olabilir. PaO₂ (arteriyel parsiyel oksijen basıncı)'nin 50 mmHg'ye düşmesi ile solunum uyarılır, solunum sayısı artar ve PaCO₂ (arteriyel parsiyel karbondioksit basıncı) azalır. PaCO₂'nin azalması, sırasıyla arterioller vazokonstrüksiyona, BKA'nın azalmasına ve beyin hipoksisinin ağırlaşmasına neden olur. PaO₂ 35 mmHg ise anaerobik solunum başlar. Beraberinde hipoperfüzyon varsa hipoksi daha

yüksek PaO₂ düzeylerinde de ortaya çıkabilir (35,36); ancak PaO₂ 15 mmHg olsa bile normal kardiyovasküler fonksiyonlar bir saat kadar sürdürülebilir (1).

Beyin iskemisi kısmi (inkomplet) veya tam (komplet) olabilir. Tam iskemi oksijenlenmenin kesilmesine bağlı beyin hipoksisine, laktik asit ve karbondioksit gibi artık metabolizma ürünlerinin birikmesine neden olur. Kısmi iskemide ise beyin hücrelerine sınırlı miktarda O₂ ve glukoz ulaşır. Bu durum anaerobik metabolizma sonucu laktik asit üretimine ve serebral asidoza neden olur. Deneysel çalışmalar BKA'daki değişikliklerin hücre fonksiyonlarına etkisinin ve eşik değerlerinin tanımlanmasına yardımcı olmuştur (Tablo 1) (30,37,38).

Tablo-1: Beyin kan akımındaki değişikliklerin hücre fonksiyonlarına etkisi ve eşik değerleri (30,37,38)

Beyin kan akımı (ml/100g/dakika)	Hücresel fonksiyonlara etkisi
< 35	Protein sentezinde azalma belirgindir.
< 23	Nörolojik kusur belirgindir.
≈ 20	Nörotoksik amino asitler salınır.
12-18	Anaerobik metabolizma başlar. Kortikal elektriksel aktivite durur.
8-10	ATP hızla azalır, iyon dengesi bozulur.
< 8	Hücre ölümü (süre ve metabolik hızı bağlı olarak)

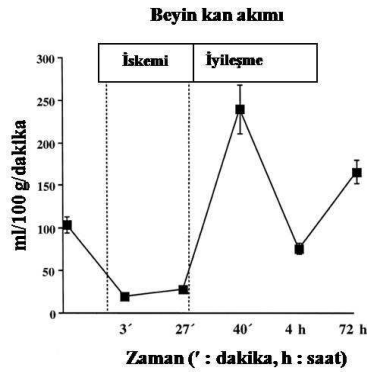
PRİMER ENERJİ YETMEZLİĞİ

Serebral hipoksi-iskemi, hücresel düzeylerde BKA'nın ve oksijen sunumunun azalması sonucunda oksidatif metabolizmadan anaerobik metabolizmaya (glikoliz) geçiş ile başlayan biyokimyasal olaylar zincirinin aktivasyonuna neden olur (21,39). Nikotinamid-adenin-dinükleotid (NADH), flavin-adenin-dinükleotid (FADH), laktik asit ve H⁺ iyonları birikir. Sonuçta anaerobik glikoliz hücresel enerji gereksinimlerine cevap veremez ve ATP dahil yüksek enerjili fosfat depoları tükenir (39). Piruvat laktata metabolize edilir. Hücre sitoplazmasında laktat birikir. Hücre içi pH düşer. Başlangıçta ATP azlığı kreatinin kinaz reaksiyonu ile kompanse edilir. Hipoksi-iskeminin uzaması ile yüksek enerjili fosfat molekülleri tükenir (40). Transsellüler iyon pompası yetersiz kalır ve intrasellüler Na⁺, Ca⁺⁺, Cl⁻ ve su birikir (sitotoksik ödem). Bu noktada hücresel fonksiyonlarda geri dönüşümsüz bozulma

ortaya çıkar (21,40). Hücre ölümü yakındır. Bu süreç primer enerji yetmezliği olarak adlandırılır. Hipoksi-iskeminin şiddetine bağlı olarak 20-30 dakikadan birkaç saate kadar değişebilir (40). Hipoksi-iskemi aynı zamanda akson sonlanmalarından eksitator amino asitlerin (glutamat) salınımını stimüle etmektedir. Glutamat, hücre yüzey reseptörlerini aktive eder ve hücre içine Na^+ ve Ca^{++} akışı gerçekleşir. Hücre membranında fosfolipid metabolizması artar ve hücre sitoplazmasında serbest yağ asitleri birikir. Serbest yağ asitleri daha sonra mitokondride indirgenme reaksiyonlarında ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri (SOR) ile peroksidasyona uğramaktadır. Aynı zamanda prostaglandin, ksantin ve ürik asit sentezi gerçekleştirilir. Voltaj-bağımlı Ca^{++} kanalları (VBKK) aracılığı ile hücre membranından hücre içine Ca^{++} akışının artması, dışarı akışın azalması, mitokondri ve endoplazmik retikulumdan Ca^{++} salınımı sonucunda hücre sitoplazmasında Ca^{++} iyonlarının miktarı artar. Nitrik oksit (NO) serbest radikal bir gazdır. Bazı nöronların Ca^{++} aracılı aktivasyonu ile üretilir. Bitişikteki duyarlı hücrelere diffüze olarak toksik etki gösterir. Hücresel enerji yetmezliği, asidoz, glutamat ve NO nörotoksitesi, serbest radikal üretimi, Ca^{++} birikimi ve lipid peroksidasyonu hücre yapısal bileşenlerinin bozulmasına neden olmaktadır (21,39).

SEKONDER ENERJİ YETMEZLİĞİ

Prenatal, natal ve postnatal iskemik hipoperfüzyon sonrası beyin perfüzyonu, dolayısı ile oksijenasyon ve glukoz desteği hızla düzelir. Şekil-2’de yavru koyunlarda 30 dakikalık global iskemi öncesinde, esnasında ve iskemi sonrasında BKA’da zamanla meydana gelen değişiklikler gösterilmiştir (21,40,41).



Şekil-2: Yavru koyunlarda; 30 dakikalık global iskemi öncesinde, esnasında ve sonrasında beyin kan akımının zamanla değişimi (41).

Resüsitasyon sonrası BKA, oksijenasyon ve glukoz desteğinin düzelmesi ile oksidatif fosforilasyon tekrar başlar. Adenozin difosfat (ADP)'den hızla ATP sentezlenir (reperfüzyon dönemi) (40). BKA bazal değerlerinin üzerine çıkar. Laktat ve H⁺ iyonları beyin venlerine ve sistemik dolaşıma geçer (40). Hücre içi pH'ı bazal değerlerine geri döner (21). Beyin laktat düzeyleri azalmasına rağmen bazal düzeylerin üzerinde kalır. ATP ve fosfokreatinin düzeyleri 2-3 saat içinde sıklıkla normal değerlerine ulaşır. Mitokondri fonksiyonları enerji gereksinimini karşılayacak hale gelir. Na⁺ ve su nöron membranından dışarı çıkar. Hücre ödemi azalır. Buna rağmen beyin enerji metabolizmasındaki bu düzelleme geçicidir. Çok şiddetli vakalarda nöronal fonksiyon kaybı geri dönüşsüzdür. Kortikal elektriksel aktivite baskılanmış veya bazı vakalarda tam olarak ortadan kalkmıştır. Hayvan çalışmalarında bu fazda mikrodializ yöntemleri ile inhibitör nörotransmitterlerin (özellikle GABA) arttığı saptanmıştır ve sinaptik aktiviteyi baskıladığı düşünülmektedir (40). Bununla birlikte 6-48 saat sonra, genellikle 24 saatten sonra sekonder enerji yetmezliği süreci ortaya çıkar (21,40). Primer olayın uzaması ve genişlemesi sonucu ortaya çıkan mitokondri fonksiyon bozukluğu sekonder enerji yetmezliğine neden olmaktadır (21). Mitokondride oksidatif fosforilasyon yetersizliğine bağlı olarak ATP ve fosfokreatinin gibi yüksek enerjili fosfatların konsantrasyonu azalır (40). Bu faz daha ileri beyin hasarına neden olan fosfokreatinin/inorganik fosfat oranında azalma, hücre içi pH değişikliğinin olmaması ve stabil kardiyopulmoner fonksiyonlar ile karakteristiktir (21). Bu süreç beyne sürekli O₂ ve glukoz sağlanmasına rağmen devam eder. Sitokrom zincirinde elektronlar toplanır ve beyinde laktat artar. Beyin laktat düzeylerinde artışa rağmen, sekonder enerji yetmezliği esnasında hücre içi pH değerleri normal sınırlar içinde bulunmuştur (40). Bu durum nöronların hücre membranından dışarı laktat taşıma kapasitesinin sınırlı olduğunu, ancak H⁺ iyonlarını hızlı bir şekilde taşıdığını düşündürmektedir (40). Sekonder enerji yetmezliğinin gelişimi, EEG'de paroksizmal bozukluk ve konvülsiyon gelişimi ile paralellik gösterir. Bu durum muhtemelen Na/K pompasındaki yetmezliğe bağlı nöron membranındaki depolarizasyon kadar, hücre içi alandan aşırı eksitatör nörotransmitter (glutamat, aspartat) salınımının bir sonucu olabilir (40). Asfiktik yenidoğanlarda sekonder enerji yetmezliği ne kadar şiddetli ise 1-4 yaştaki nöro-gelişimsel sonuçları da o kadar ağırdır (21).

İSKEMİK ASİDOZ VE BEYİN HASARINA ETKİSİ

Hücre ve dokularda enerji metabolizması ile asit-baz dengesi arasında çok yakın ilişki vardır. Bu denge şiddetli hipoksi ve iskemi esnasında bozulur. Hücre içi pH azalabilir, reperfüzyon döneminde hücre içinde alkaloz gelişebilir (36). Hangi pH düzeylerinde nöron hasarının olduğu tam olarak bilinmemektedir (42). Yüksek enerjili fosfatlar hücre içinin tamponlamasında ve H⁺ iyonlarının hücre dışına taşınmasında görev alırlar (36). Hipoksi-iskemide bu maddelerin miktarı azalır (40). İskemi esnasında oluşan asidoz proteinlerde bozulma ile nöron hasarına ve astrositlerin membran transport sistemlerinde yetmezliğe neden olabilir. SOR üretimi artabilir. Şiddetli hipoksi ve iskemi, glikoliz ile laktat üretimi ve doku asidozuna; azalmış oksidatif fosforilasyon CO₂ retansiyonuna ve ATP üretiminin azalmasına neden olur. pH 6,5 veya daha az olduğunda fosfofruktokinaz inhibisyonu ile glikoliz baskılanabilir. Na⁺/H⁺ değişimini sağlayan taşıyıcılar nötral pH'da aktif değildir. Hipoksi sonrası iyileşme sürecinde hafif asidoz yararlı bulunmaktadır. Asidozun hızlı düzelmesinin zararlı olabileceği belirtilmektedir (36).

HİPOTERMİ VE BEYİN HASARINA ETKİSİ

İskemi esnasında hipoterminin nöroprotektif etkisi kabul görmüşken, iskemi sonrası hipoterminin nöroprotektif etkisi daha az kesinlik kazanmıştır (43). Hipoterminin etkinliği başlangıç zamanı, süresi, derinliği (derecesi) (44) ve metodu (tüm vücut veya başın soğutulması) (43) gibi birçok faktöre bağlanmaktadır (44). Sadece başın soğutulması olası yan etkilerinin az olması nedeniyle daha caziptir. Vücudun tümünün soğutulmasına kıyasla daha fazla ısı farklılığı yaratmaktadır (43). Merkezi ısının (*core temperature*) 1-3 °C azaltılması hafif hipotermi, 4-6 °C azaltılması orta derece hipotermi ve 8-10 °C azaltılması şiddetli hipotermi ve 15-20 °C azaltılması derin hipotermi olarak tanımlanmaktadır. Şiddetli ensefalopati ve erken konvülsiyon geçiren bebeklerde etkili olmadığı saptanmıştır (44).

NÖROPATOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER

Hipoksi-iskemi prematür ve term bebeklerde farklı nöro-patolojik bulgulara neden olmaktadır (26). Prematür bebeklerde periventriküler bölge (özellikle beyaz cevher), bazal ganglionlar, beyin sapı, beyincik ve omurilik hipoksi-iskemiye daha

hassastır. Periventriküler lökomalazi (PVL) motor geriliğin en önemli nedenidir. Term bebeklerde parasagittal korteks, serebral neokorteks, talamus, dorsal hipokampus ve subkortikal beyaz cevher hipoksik-iskemik yaralanmadan en fazla etkilenen beyin bölgeleridir (3).

Hİ beyin lezyonları altı formda ortaya çıkar. Bunlar selektif nöron hasarı, status marmaratus, parasagittal beyin hasarı, periventriküler lökomalazi, intraventriküler veya periventriküler kanama, fokal veya multifokal iskemik lezyonlardır.

İmmatür fetüslerde beyin korteksi, hipokampus, beyincik ve spinal kordun  n boynuz hücrelerinde en sık selektif nöron hasarı ortaya çıkar. Kortekste büyük beyin arterlerinin arasında kalan sınır bölgeleri en fazla etkilenir. Oligodentrositler, astrositler ve mikroglialar hasar görmezken nöronlar en fazla etkilenen hücrelerdir.

EtkilenmiŐ  ocukların %5'inde status marmaratus gözlenir. sıklıkla bazal ganglionlar ve talamus etkilenir. Nöron kaybı, gliozis ve hipermiyelinizasyon ile karakterizedir.

Term yenidoğanlarda serebral iskemi sonrası sıklıkla parasagittal beyin hasarı oluşur. Özellikle parietal ve oksipital bölgeleri etkiler. Hayvan modellerinde lezyonların yayılımı, serebral iskeminin Şiddeti ve süresiyle ilişkili bulunmuştur. Kortekste oluşan beyin hasarı sulkuslarda gri cevherdekinden daha belirgindir.

Periventriküler lökomalazi, lateral ventriküllerin lateral ve dorsalindeki beyaz cevher hasarı ile karakterizedir. Sıklıkla immatür fetüslerde ortaya çıkar ve başlıca oksipital radyasyon ve foramen monronun etrafında bulunan beyaz maddeyi etkiler. Vakaların %25'inde parankim içi kanama eŐlik eder. Bir hastalık gibi ilerler ve nekrotik odakların dışında ultrasonografi ile belirlenebilen k  k kistler gelişir. Aynı Şekilde gliozis ilerler ve kistlerde büzülme ortaya çıkar. Oligodentrositlerin yaptığı yıkım ve lateral ventriküllerin genişlemesi nedeniyle myelinizasyonun yapılamaması hastalığın en belirgin özelliğidir. Gebeliğin 32. haftasından sonra bu bölgelerin damarlanması artar ve periventriküler lökomalazi insidansı azalır.

Ventrikül içi veya periventriküler kanama prematür yenidoğanlarda ortaya çıkar. Germinal matriksin damar yatağından kaynaklanır. Bu bölge gestasyon yaşı ilerledikçe küçülür ve term fetüslerde tam olarak kaybolur. Beynin bu bölgelerindeki damarlar çok frajildir. Perinatal dönemde BKA'da meydana gelen değişiklikler bu damarların yırtılmalarına, ventrikül içi ve periventriküler kanamalara neden olur. Beyin kanamasını takiben, germinal matriks yıkımı, periventriküler beyaz maddede hemorajik infarkt ve hidrosefali ortaya çıkabilir.

Fokal veya multifokal beyin hasarı genellikle bir veya birden fazla ana serebral arterin beslediği alanlarda ortaya çıkar. Bu tip beyin hasarı genelde gebeliğin 28. haftasından önce gözlenmez. Fetüsün matürasyonu ile insidansı artar. Histolojik olarak bütün hücre tiplerini içeren bir infarkttır (nöronlar, oligodentrositler, astrositler ve endotel hücreleri). İnfarkt genellikle arteriyel emboli veya venöz tromboz sonrası gelişir. Vakaların %90'ında arteriyel tıkanma tek taraflıdır ve sıklıkla sol arteria cerebri media etkilenir. Bu tip beyin infarktı dokuda skar bırakmaz ancak sıklıkla bir veya birden fazla kist oluşumuna neden olur. İnfeksiyon, travma ve ikiz doğumda daha sık görülür (41).

SİTOTOKSİK MEKANİZMALAR

Hücre içi kalsiyum artışı

Kalsiyum birçok hücre sel reaksiyonda gerekli intrasellüler ikincil habercidir. Fizyolojik şartlarda hücre içi Ca^{++} konsantrasyonu sıkı kontrol altındadır (21,43). Hipoksi-iskemi esnasında VBKK ve glutamat-bağımlı Ca^{++} kanalları aracılığı ile hücre içine Ca^{++} girişi olur ve hücre içi Ca^{++} konsantrasyonu artar. Aynı zamanda endoplazmik retikulumdan ve mitokondrilerden sitoplazmaya Ca^{++} salınır (21,40,43,45). Enerji yetmezliği nedeniyle hücre membranından dışarıya Ca^{++} akışı bozulur (21,43). Hücre içi Ca^{++} miktarındaki artış lipazlar, proteazlar, endonükleazlar ve fosfolipazların aktivasyonuna; SOR oluşumuna; nöron ve mitokondri bütünlüğünün bozulmasına neden olur (21,40,43). Sonuç olarak, hipoksi-iskemi sonrası hücre içinde Ca^{++} birikimi nöronlarda geri dönüşümsüz hasara neden olur (21,43). Nöron kültürlerinde yüksek hücre içi Ca^{++} 'nın nekroz, düşük hücre içi Ca^{++} 'nın ise apoptozis gelişimine yol açtığı gösterilmiştir (36).

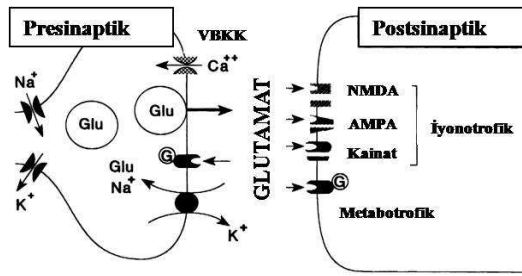
Serbest radikal salınımı

SOR, kendisini aşırı reaktif hale getiren, dış yörüngesinde eşleşmemiş elektron bulduran moleküllerdir. Normalde hücrede tüketilen O_2 'nin %80'den fazlası SOR üretimi olmaksızın sitokrom oksidaz tarafından kullanılır (45). Kalan %10-20'si stoplazma ve mitokondride süperoksit radikalleri (O_2^- , H_2O_2 , OH^-) üreten diğer oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında kullanılır (21,43,45). SOR dokularda normalde düşük konsantrasyonlarda üretilir; ancak patolojik durumlarda miktarları artmaktadır (25). Hücreler SOR'un zararlı etkilerinden enzimatik (katalazlar, endoperoksidazlar, dismutazlar) ve nonenzimatik mekanizmalar (glutatyon, kolesterol, askorbik asit ve α -tokoferol gibi antioksidan maddeler) ile kendisini korur (21,43,45). Hipoksi-iskemi esnasında ve sonrasında SOR üretimi, korunma kapasitesinin üzerine çıkar (21,43,45). Sitokrom zincirinde elektronların birikmesi süperoksit iyonlarının üretimine neden olur. SOR aynı zamanda siklooksijenazın araşidonik asit üzerine etkisi, ksantin oksidazın hipoksantin ve ksantin üzerine etkisi gibi birçok kimyasal reaksiyonda yan ürün olarak üretilebilir (21,40,43,45). Beyinde istirahat esnasında ksantin oksidaz aktivitesi çok düşüktür; ancak serebral iskemi esnasında aktivitesi artar. Serebral iskemi esnasında oksidatif fosforilasyonun kesilmesi ile yüksek enerjili fosfatlar hızla azalır. Dakikalar içinde adenzin ve hipoksantin birikir. Hipoksantin O_2 varlığında ksantin oksidaz ile reaksiyona girmesi sonucunda aşırı miktarda SOR (O_2^-) üretilir. Bunlar daha sonra süperoksit dismutaz ile hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürülür. Hidrojen peroksit ve süperoksit radikalleri Haber-Weiss reaksiyonuna girer ve hidroksil radikalleri (OH^-) ortaya çıkar (41). İnflamatuvar hücreler; özellikle aktif mikroglia hücreleri ve nötrofiller bu fazda SSS'i istila eder ve NO dahil çok miktarda SOR salınır (40,41). Aşırı miktarda üretilen SOR (O_2^- , OH^-) hücre membranının poliansatüre yağ asitlerine, hücre proteinlerine ve hücre DNA'sına saldırır; hücre zarının parçalanmasına ve hücre ölümüne yol açarak doku harabiyetine katkıda bulunur (21,43,46).

Eksitotoksisite ve glutamat reseptörleri

Glutamat SSS'de bulunan en önemli eksitator amino asittir (21,45,47). İyonotropik ve metabotropik reseptörler olmak üzere iki çeşit glutamat reseptörü vardır (48). Metabotropik glutamat reseptörleri intrasellüler G-protein aracılı sinyal

kaskadı ile ilişkili reseptörlerdir (41,49). Sekiz ayrı metabotropik glutamat reseptörü (mGluR) tanımlanmıştır (mGluR1, mGluR2..., mGluR8). Kendi içinde üç gruba ayrılırlar (grup I, grup II, grup III). Grup I metabotropik glutamat reseptörlerinin nöronal eksitabilite ve eksitasyonu arttırdığı, Grup II ve grup III'ün sinaptik eksitasyonu azalttığı, inhibitör otoreseptör olduğu (glutamat salınımını azalttığı), nöroprotektif etki gösterdiği düşünülmektedir (50). İyonotropik reseptörler ise iyon kanalları ile ilişkilidir (47). N-metil-D-aspartat (NMDA), alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propiyonik asit (AMPA) ve kainik asit reseptörleri (KAR) olmak üzere üç tip reseptörden oluşur (Şekil-3) (41,45,47,49).



Şekil-3: Sinapslarda glutamat salınımı ve glutamat reseptörleri. Glu: glutamat, VBKK: Voltaj-bağımlı Ca²⁺ kanalları, G: G-protein

NMDA reseptörleri gelişmekte olan beyinde ve gelişen beyin bölgelerinde (striatum ve hipokampus) daha fazla bulunur. Bu nedenle NMDA reseptörleri aracılığıyla oluşan beyin hasarı küçüklerde, yetişkinlerdekinden daha belirgindir (21,43,45,51). NMDA reseptörleri Ca⁺⁺ kanallarını düzenler. AMPA/KAR hücre içine Na⁺ girişi ve membran depolarizasyonu ile VBKK'yı açar. Grup I metabotropik reseptörler hücre içi Ca⁺⁺ depolarından Ca⁺⁺ salınımını uyarır. Sitoplazmada artan serbest Ca⁺⁺ hücre ölümüne neden olan süreçteki proteazları, lipazları ve endonükleazları aktifler (14,41,47,48,49,52). Glutamat salınımı fokal iskemi sonrası nöronal hücre ölümünde kritik bir rol oynar (41,49). Global iskemide durum fokal iskemidekinden farklıdır. Global iskemi sonrası oluşan beyin hasarının ortaya çıktığı bölgeler glutamat salınım özelliğine ve glutamat reseptörlerinin beyinde dağılımına uymaz (41). Glutamat antagonistlerinin yetişkin hayvanlar kadar yenidoğan hayvanlarda da hipoksik-iskemik beyin hasarına karşı nöroprotektif etkili oldukları gösterilmiştir (41,49).

Hipoksi-iskemi esnasında ortaya çıkan enerji yetmezliği nedeniyle presnaptik sinir sonlanmalarından glutamat geri alımı azalırken, membran potansiyelinde meydana gelen değişiklikler nedeniyle glutamat salınımı artar. Sinaptik aralıkta glutamat birikir. Artan glutamat kendi reseptörlerini etkileyerek (özellikle NMDA reseptörleri) hücre içine Ca^{2+} girişini kolaylaştırır ve en sonunda nöronal hücre ölümüne neden olan biyokimyasal kaskadı aktifleştirir (4,21,43,51).

Nitrik oksid (NO)

NO, L-argininin NO sentaz (NOS) tarafından L-sitrülline dönüştürülmesi esnasında ortaya çıkan zayıf bir serbest radikaldir (21,43). Yarılanma ömrü yaklaşık altı saniyedir (25,36). Fizyolojik şartlarda serebrovasküler tonüsün ayarlanmasında ve uyarı iletiminde görev alır (4). Serebral iskemi esnasında nöron hasarında önemli rol oynar (25). Hipoksi-iskemi sonrası hücre içinde artan Ca^{++} NOS'u aktif hale getirir (41,49). NOS'un bilinen üç izoenzimi vardır. Nöronal NOS (nNOS), endotelial NOS (eNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS) (25,36). nNOS normal metabolizma, hiperkapni ve iskemi esnasında BKA'nın düzenlenmesinde rol oynar (36). eNOS iskemi sonrası vazodilatasyonda rol oynar. iNOS ise reaktif mikroglia/makrofaj ve reaktif astrositlerde bulunur (4,25). Bu izoformun aktif makrofajlardan sitokin salınımı ile uyarıldığı düşünülmektedir (41). iNOS serebral iskemi gibi patolojik süreçlerde ortaya çıkmaktadır (4). Uzayan hipoksi-iskemide çok miktarda NO üretilir. NO, süperoksit ile birleşerek güçlü bir radikal olan peroksinitriti oluşturur (21,41,49). Peroksinitrit ise lipit peroksidasyonunu aktifler; DNA, protein ve hücre zarı hasarına yol açar (21,46). NO'in aynı zamanda glutamat salınımını arttırdığı gözlemlenmiştir (21). Yenidoğan sıçanlarda çok sayıda nöronun Hİ olay sonrası NOS enzimi içerdiği saptanmıştır (41).

İnflamatuvar mekanizmalar

Hİ beyin hasarı; patolojik mekanizmalara SSS'de mevcut olan mikroglia/makrofaj ve astrositlerin katılması, dolaşımdan gelen lökositlerin beyin dolaşımını işgal etmesi ve sitokin aracılı sitotoksitenin doğrudan etkisi ile ortaya çıkar (40). Hİ olay beyinde mikroglia/makrofaj hücrelerini yaklaşık 4-6 saat içinde aktif hale getirir, sayıları 48 saat içinde hızla artar (40,46). Nötrofiller reperfüzyonun

erken döneminde (24-48 saat içinde) kan akımının düşük olduğu alanlarda ve postkapiller venüllerde toplanırlar (4,46), mikrodolaşımda tıkaçlara, vazokonstrüktör mediatörlerin ve serbest radikallerin salınmasına neden olurlar (4). İskemi/reperfüzyon döneminde trombosit agregasyon faktör (PAF) düzeylerinin artması, lökosit adhezyon moleküllerinin uyarılmasında ve daha sonra gelişen inflamatuvar kaskatta çok önemlidir (26). T-hücreleri ve *naturel killer* hücreleri hasarlanmış beyin alanlarına geç iyileşme fazında ulaşırlar (46). Hİ sonrası 1-4 saat içinde beyin omurilik sıvısında mikroglia ve bazen astrositler tarafından üretilen interlökin-1B (İL-1B), interlökin 6 (İL-6), tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin, *messenger* RNA (mRNA) düzeylerinin ve nötrofillerin infarkt alanına invazyonu ile α ve β kemokinlerin miktarının arttığı saptanmıştır (21,40,41,43,46). İnflamatuvar sitokinlerin hipoksi-iskemi sonrası hem yararlı (örneğin İL-6) hem de zararlı (örneğin İL-1) etkilerinin olduğu bilinmektedir (21,43). Yenidoğan inme modellerinde nötrofil sayısının az olmasının nöroprotektif olduğu gösterilmiştir (53).

Demir toksisitesi

Demir hücre enerji metabolizmasında görevli birçok enzimin kofaktörü olarak görev yapar. DNA, RNA ve protein sentezi gibi diğer metabolik süreçlerde esansiyel bir metaldir (25). Fizyolojik şartlarda demir toksik olmayan ferrik durumunda olup proteinlere bağlıdır (ferritin, transferrin). Hipoksi-iskemi esnasında bu proteinlerden serbest ferrik demir salınır ve güçlü hidroksil radikallerini oluşturmak üzere peroksitlerle tepkimeye girer. Diğer taraftan serbest ferrik demir daha fazla serbest radikal hasarına neden olan ferröz formuna dönüşür (21,43). Bununla birlikte perinatal demir eksikliği, hipoksi-iskemi sonrası yenidoğan hipokampusünde metabolik aktivite kaybı için predispozan bir faktördür. Diğer taraftan yüksek demir düzeyleri ve immatür beynin kısıtlı antioksidan kapasitesi ise hücre için zararlı demir aracılı serbest radikallerin üretimine eğilim yaratır (25).

DNA VE MAKROMOLEKÜLLERDE HASAR OLUŞUMU

Geçici beyin iskemisi sonrası tek zincir kırıkları ve oksidatif hasarın temel karakteristik değişiklikleri reperfüzyon döneminde dakikalar içinde belirlenebilir.

Çift zincir kırıkları ise bir saat içinde ortaya çıkar. En önemli temel değişiklik DNA ve peroksinitritin reaksiyonu sonrası ortaya çıkan guaninin 8-nitroguanine dönüşümü ve guaninin deaminasyon ile ksantine dönüşümüdür. Ksantin, bunlar dışında birkaç farklı yoldan da üretilir. Peroksinitrit, hidroksil radikalleri, süperoksit ve daha az miktarda NO, DNA'da tek zincir kırıklarına, DNA'da deaminasyon ve nitrasyon dahil bazı değişikliklere neden olabilir. SOR ve nitrojenler, elektron taşıma zincirinin ve mitokondriyal solunumda görevli enzimlerin bozulmasına, hücre solunumu ve canlılığını etkileyen diğer birçok hasara neden olmaktadır (47).

PARP ENZİMİNİN ROLÜ

Poly (ADP-riboz) polimeraz (PARP), DNA zincir kırıklarının tamirinde görevli çekirdekte bol miktarda bulunan protein yapılı bir enzimdir. (4-25). DNA zincir kırıkları PARP aktivasyonuna neden olur ve böylece nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) kullanılarak proteinlere ADP-riboz eklenir (4). PARP'ın aşırı aktivasyonu enerji depolarının tükenmesine ve hücre ölümüne neden olur; çünkü ATP tüketimi NAD yenilenmesi için gereklidir (25). İskemik hasar ve aşırı miktarda oluşan DNA zincir kırıkları, aşırı miktarda PARP aktivasyonuna neden olmaktadır.

PROTEAZLARIN ROLÜ

***Caspase*'lar**

Caspase'lar (sisteinil aspartat-spesifik proteinazlar) apoptotik hücre ölümünün cellatları olarak bilinirler. *Caspase*'lar hedef proteinlerdeki aspartik asit kalıntılarını spesifik olarak ayıran bir sistein proteazlar ailesidir. Kendi içlerinde başlatıcı *caspase*'lar ve sonlandırıcı *caspase*'lar (cellat *caspase*'lar) olarak sınıflandırılırlar. İnaktif zimojen olarak üretilirler, apoptoz esnasında aktif hale geçerler. Başlatıcı *caspase*'ların aktivasyonu apoptotik *caspase* kaskadını tetikler. Sonlandırıcı *caspase*'ların aktivasyonu ile hücredeki çeşitli hedef noktalarında proteolitik bölünmeler ortaya çıkar ve sonunda hücre ölümü gerçekleşir. *Caspase*'ların içinde *Caspase-3* özel bir yere sahiptir. Spektrin gibi hücre iskeleti proteinlerini, DNA tamir enzimlerini, hücre döngüsü proteinlerini ve transdüksiyonda (yazılım) görevli enzimleri substrat olarak kullanmaktadır (54). Hipoksi-iskemi sonrası 12-18. saatlerde striatum ve hipokampüste *Caspase-3* aktivasyonu saptanmıştır (25).

Caspase'lar aynı zamanda proteoliz ile nekroz oluşumuna neden olmakta ve hücre ölümünde etkili *calpain* proteazları aktif hale getirmektedirler (54).

***Calpain*'ler**

Ca^{++} bağımlı nötral sistein proteazlardır. İskemik ve travmatik SSS hasarında rol alırlar. Ca^{++} tarafından aktif hale getirilirler ve hücre harabiyetine neden olurlar (25,54,55). *Calpain*'lerin, dokulara özgü yaklaşık 14 üyesi vardır. Bunlardan iki farklı izoform olan μ -*calpain* (*calpain-I*) ve *m-calpain* (*calpain-II*) her yerde bulunur (54). Hipokampüste özellikle CA-1 ve CA-3 bölgelerinin piramidal hücrelerinde ve girus dentatusun granüler hücrelerinde μ -*calpain* bulunmaktadır (48). *Calpain*'lerin *caspase*'ların baskılanmasına veya aktivasyonuna neden oldukları ve çeşitli mekanizmalarla AMPA, NMDA ve KA reseptörleri aracılığı ile oluşan eksitotoksitede görev aldıkları düşünülmektedir (54). Hücre içindeki Ca^{++} , hücre dışına hücre membranında bulunan " Na^+/Ca^{++} değiştiricisi" tarafından çıkarılmaktadır. İskemi esnasında eksitotoksositeye maruz kalan nöronlarda " Na^+/Ca^{++} değiştiricisi"nin *calpain*'ler tarafından parçalandığı gösterilmiştir (56).

***Cathepsin*'ler**

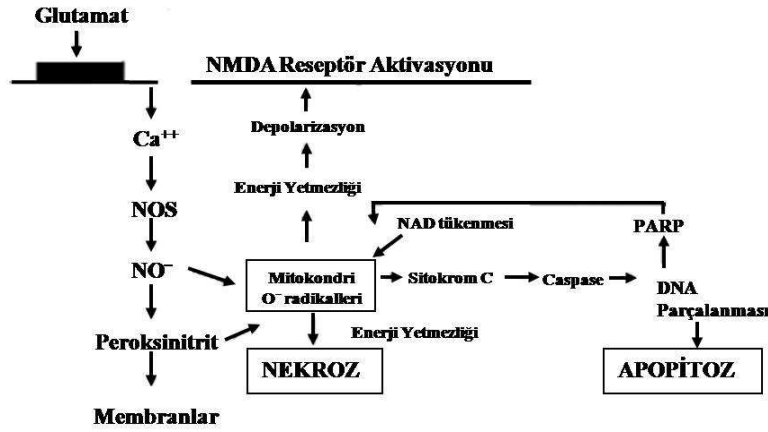
Lizozomal enzimler hücre ölümünde anahtar rol oynamaktadır. *Cathepsin* proteazlar, lizozom kaynaklı bir grup enzimdir (54,55). Hem hücre içi proteoliz olaylarında hem de hücre dışı matriksinin şekillenmesinde ve diğer birçok hücreysel süreçte rol oynamaktadırlar (54). Nöronal hücre ölümünde aspartil (*Cathepsin D*) ve sistein (*Cathepsin B, H* ve *L*) proteazlar olmak üzere 2 farklı lizozomal proteolitik enzim grubu çok aktif görülmektedir (54,55). "*Calpain-cathepsin* hipotezine" göre; iskemik yaralanmaya cevap olarak hücre içi serbest Ca^{++} miktarı artmakta, artan Ca^{++} μ -*calpain*'i aktif hale getirmekte, aktif μ -*calpain* lizozomal *cathepsin* proteazların stoplazmaya salınmasına ve hücre proteinlerinde bozulmalara neden olmaktadır. *Cathepsin B* ve *L*'nin global iskemi sonrası hipokampal nöron ölümüne aracılık ettiği; *cathepsin D*'nin yaşlanma, geçici ön beyin iskemisi ve eksitotoksosite ile ortaya çıkan nöron ölümüne aracılık ettiği saptanmıştır (55).

HIPOKSI-İSKEMİ VE Bcl-2 GEN AİLESİ

Proto-onkogenlerin *Bcl-2* ailesi farklı fizyolojik ve patolojik durumlarda programlanmış hücre ölümünü ayarlayan spesifik proteinleri kodlar (57). *Bcl-2* proteinleri yoğunlukla mitokondri dış zarında bulunurlar (58). *Bcl-2* gen ailesinin farklı üyeleri ya pro-apoptotik (*Bax*, *Bad*, *Bak* ve *Bok*) ya da anti-apoptotik (*Bcl-2* and *Bcl-XL*) fonksiyonlara sahiptir (3,48,59). *Bcl-2* gen ailesinin bir üyesi olan *Bcl-2*, fokal ve global iskemi sonrası ortaya çıkan anoksik/iskemik yaralanma ve serbest radikal aracılı hücre ölümüne karşı güçlü bir koruyucu etkiye sahiptir; ancak *Bcl-2* ailesinin diğer üyeleri birçok sistemde apoptotik hücre ölümüne neden olmaktadır (25). *Bcl-2* mitokondriyal fonksiyonlar üzerine de güçlü bir koruyucu etkiye sahiptir. Mitokondri geçiş porlarının açılmasını önleyerek sitokrom c'nin salınımını engellediği düşünülmektedir (25).

LİPOLİZ VE LİPİD PEROKSİDASYONU

Beyin iskemisi esnasında ve reperfüzyon döneminde fosfolipaz C (depolarizasyon ile aktive olur) ve fosfolipaz A₂ (artan Ca⁺⁺ ile aktive olur) aktivitesi ile serbest yağ asitleri ve özellikle araşidonik asit salınır. Siklooksijenaz doymamış yağ asitlerine iki molekül O₂⁻'nin eklenmesini katalizler ve PgG (prostaglandin G) üretilir. PgG hızla peroksidasyona uğrar ve PgH oluşur. Bu reaksiyon esnasında PgH ile birlikte O₂⁻ salınımı gerçekleşir. Bu durum "serbest radikal hipotezi" ni ortaya çıkarmıştır. Bu hipoteze göre; "reperfüzyon esnasında lipid peroksidasyonu sonucu aşırı oksijen radikali üretilmesi ağır yapısal hasara neden olur". O₂⁻ tek başına güçlü bir oksidan değildir. Geçiş metallerinin varlığında (ferröz gibi) lipid peroksidasyonu geometrik olarak artar. Ayrıca reperfüzyon esnasında ortaya çıkan peroksinitrit de lipid peroksidasyonuna neden olur. Lipid peroksidasyonu sonucunda ortaya çıkan hücre zarının yağ asitlerindeki biçim değişiklikleri hücre zarı akışkanlığını ve geçirgenliğini değiştirir. Bu değişikliklerden hücre zarındaki reseptörler, iyon kanalları, diğer proteinler ve fonksiyonları olumsuz olarak etkilenmektedir. Lipoliz beyin iskemiyeye hassas bölgelerinde diğer alanlardan daha yüksektir (48). Şekil-4'de perinatal hipoksik-iskemik beyin hasarının mekanizmaları kısaca özetlenmiştir (60).

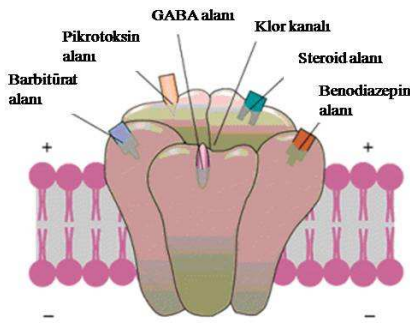


Şekil-4: Perinatal hipoksik-iskemik beyin hasarı

GAMA-AMİNO BÜTİRİK ASİT VE RESEPTÖRLERİ

Gama-aminobütirik asit (GABA), SSS'de en önemli inhibitör nörotransmitterdir (61). Glutamatın, glutamat dekarboksilaz (GAD) enzimi ile geri dönüşümsüz olarak α -dekarboksilasyona uğraması ile sentezlenmekte, GABA transaminaz (GABA-T) enzimi ile geri dönüşümlü olarak süksinik semialdehite metabolize edilmektedir (62,63). GABA ayrıca periferik sinir sistemi, endokrin sistem ve sinir sistemi dışındaki bazı dokularda da tesbit edilmiştir. Bu dokularda farklı fizyolojik roller üstlendiği düşünülmektedir (63). Farmakolojik olarak 3 farklı reseptör tipi ile etkisini göstermektedir. Bunlar iyonotrofik GABA_A ve GABA_C reseptörleri ve G-protein aracılı metabotropik GABA_B reseptörleridir. GABA_A ve GABA_B reseptörleri SSS'de her yerde bulunurken GABA_C reseptörleri belirli alanlarda bulunur (retina, süperior kollikulus, pretektal çekirdek kompleksi, dorsal genikulat çekirdek) (64). GABA_A ve GABA_C reseptörleri aracılığı ile hızlı sinaptik inhibisyon, GABA_B reseptörleri aracılığı ile yavaş ve uzun sinaptik inhibisyon ortaya çıkmaktadır (64). GABA_A reseptörleri makromoleküler bir protein kompleksidir. Bu kompleks; üzerinde GABA, benzodiazepinler, barbitüratlar, pikrotoksin ve bazı steroidler için spesifik bağlanma bölgeleri bulunur (Şekil-5) (65,66). GABA_A reseptörleri ligand-kapılı Cl⁻ kanallarıdır (66). GABA_A reseptör kompleksi anksiyete, epilepsi, uyku bozukluğu, ağrı sendromları, depresyon, şizofreni gibi nörolojik ve psikiyatrik hastalıkların tedavisinde kullanılan birçok ilacın hedef noktasıdır. GABA_A reseptörleri üzerindeki GABA bağlantı bölgelerinde yapı ve fonksiyonları birbirinden farklı α , β , γ , δ , ϵ ve θ gibi birçok GABA_A reseptörü bağlantı alt ünitesi

bulunmaktadır (67). GABA_B reseptörleri hem presinaptik nörotransmitter salınımının baskılanmasına (Ca⁺⁺ kanallarını inhibe ederek), hem de postsnaptik nöronal uyarılabilirliğin baskılanmasına (K⁺ kanallarının aktivasyonu ile) aracılık etmektedir. Sonuçta postsinaptik membranda hiperpolarizasyon gelişir ve eksitasyon engellenir (68). Bu nedenle çeşitli epilepsi tipleri, ağrı duyusu ve ilaç bağımlılığında önemli rol oynamaktadır (61). Serebral iskemi sonrası reperfüzyon döneminde ekstrasellüler aspartat, glutamat, GABA ve taurin konsantrasyonlarında hızlı bir artış; glisin, alanin, serin ve fosfoetanolamin konsantrasyonlarında gecikmiş bir artış olmaktadır (69).



Şekil-5: GABA_A reseptörü ve bağlantı alanları.

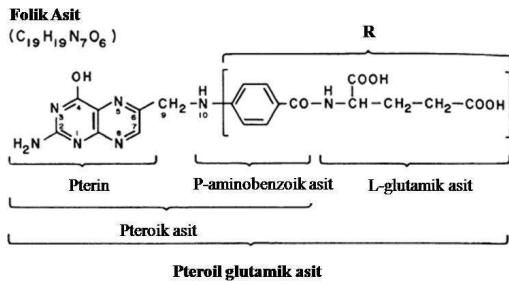
VALPROİK ASİT (*N-DİPROPYLACETİC ACİD*)

VA (*N-dipropylacetic acid* veya *2-propylpentanoic acid*) geniş spektrumlu bir antiepileptiktir (70,71). VA anti-epileptik olarak kullanılmasının dışında, bipolar bozukluk, refrakter migren, apopitosis, serebral iskemi ve diğer bazı nöropatolojik durumlarda da kullanılmaktadır (8). Farmakolojik etkilerini; artmış GABAerjik ileti, eksitator amino asitlerin salınımının (glutamat, aspartat) ve/veya etkilerinin azaltılması, voltaj-bağımlı Na⁺ kanallarının engellenmesi, dopaminerjik ve serotoninerjik iletinin ayarlanması gibi birçok farklı mekanizma ile gerçekleştirmektedir (70). Aynı zamanda eksitator bir amino asit olan β -hidroksi bütirik asit salınımını azalttığı, glutamatın NMDA reseptör aracılı eksitasyonunu hafiflettiği ve voltaj-bağımlı Na⁺ kanallarının engellenmesi ile hücre zarı uyarılabilirliği üzerine doğrudan etki gösterdiği bulunmuştur (70,72). VA plazma proteinlerine %90 oranında bağlanmakta ve beyin omurilik sıvısı (BOS)'na %60 oranında geçmektedir. Büyük bir kısmı konjugasyon, mitokondriyal β -oksidasyon ve sitokrom P450-bağımlı mekanizmalar ile metabolize edilir. Eliminasyon yarı ömrü 9-

18 saattir (70). VA kullanımına bağlı görülen en sık yan etkiler bulantı, kusma, karın ağrısı, sindirim bozukluğu, kabızlık, çok nadiren ishal ve sedasyon, kognitif fonksiyonlarda çok hafif dereceli etkilenme, doz ile ilişkili olarak ortaya çıkan ince tremor (en yaygın görülen nörolojik yan etkisidir), başağrısı, çok nadiren idiyosenkrazik trombositopeni, ağırlık artışı (VA'nın hiperinsülinemik etkisine bağlanmış), kan amonyak seviyesinde artış (çoğu hastada asemptomatiktir ve önemsizdir), plazma karnitin seviyelerinde düşüklüktür (70). Nadir görülmelerine rağmen VA ile ilgili iki önemli yan etki de teratojenite (örneğin spina bifida) ve idiyosenkrazik karaciğer toksisitesidir. Yüksek riskli hastaların tanımlanması idiyosenkrazik karaciğer toksisitesinin insidansını oldukça azaltmıştır (70,71). Çoklu ilaç tedavi alan 2 yaşından küçük çocuklarda VA'ya bağlı karaciğer toksisite riski 1/600-1/800 arasındadır. Genel hasta grubunda ise risk 1/20000'dir (70).

FOLİK ASİT (PTEROİL GLUTAMİK ASİT)

Folik asit B grubu vitaminlerin üyesi, suda eriyen esansiyel bir vitamindir (73). Kimyasal olarak, para-aminobenzoik aside (PABA) bir metilen köprüsü (C⁹-N¹⁰) ile bir adet bi-siklik pterin bağlanır, oluşan yapı pteroik asittir. Pteroik asit bir molekül L-glutamik asitle peptid bağı aracılığıyla birleşerek pteroil glutamik asiti (Folik asit) oluşturmaktadır (Şekil-6) (74).



Şekil-6: Folik asidin yapısı.

Hayvanlar PABA veya glutamik aside pteridin ekleme yeteneğine sahip değildirler. Bu nedenle diyetlerinde almak zorundadırlar (75). Yapraklı sebzeler, karaciğer, böbrek, kuru baklagiller, yumurta sarısı, buğday, mayalı yiyecekler en önemli FA kaynaklarıdır (74-76). Doğal folatların labil olması nedeniyle yiyeceklerin pişirilmesi folat içeriğini azaltır (77). Anne sütü ve inek sütü yaklaşık olarak 50-60 µg/litre folat içermektedir. Kolostrum ve erken dönemde anne sütünde

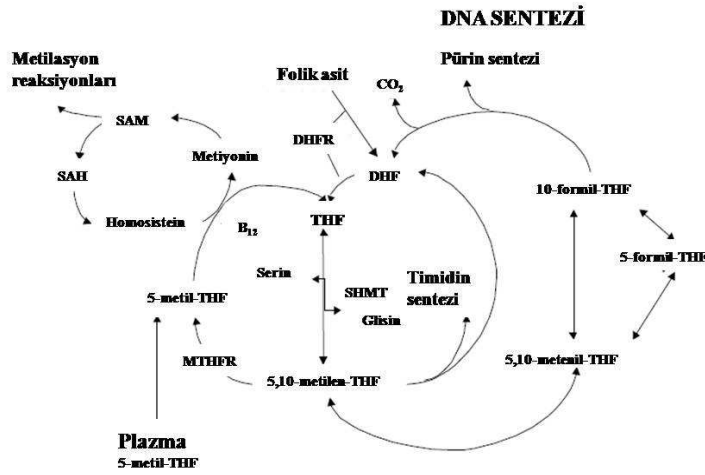
folat düzeyleri oldukça düşüktür (78). FA güvenilir olması nedeniyle çok aşırı dozlarda bile yüklenme bulgusu yoktur (79). Hayatın ilk beş ayında diyet ile 65 µg/gün FA alınması önerilmektedir (80).

Hasta malabsorbsiyon sendromu olsa bile FA emilimi oldukça iyidir (76). DiyetSEL doğal folatların biyoyararlanımı yaklaşık %50 kadarken sentetik folatların biyoyararlanımı yaklaşık %100'dür (81). Folatlar başlıca jejunumdan aktif olarak emilmektedir (81). Bitkilerde poliglutamit konjugatları olarak bulunur. Diyet kaynaklı folat emilebilmesi için spesifik bağırsak enzimleri tarafından monoglutamil folat'a parçalanır. Bunun da büyük bir kısmı bağırsak hücrelerinde dihidrofolat redüktaz enzimi tarafından tetrahidrofolat'a indirgenir (75). Tetrahidrofolat aktif folattır (75). Biyokimyasal reaksiyonlarda folik asidin indirgenmiş formları gereklidir (79). Tetrahidrofolat (H₄folat) tek karbon ünitelerinin aktif taşıyıcısıdır (75). Plazmada bulunan başlıca folat 5-metiltetrahidrofolatdır (81). Plazma 5-metiltetrahidrofolat düzeyleri yaklaşık olarak 3-30 ng/ml civarındadır. Eritrosit folatının büyük bir kısmı ise 5-metiltetrahidrofolat ve formiltetrahidrofolattan oluşmaktadır. Eritrosit folat konsantrasyonları ise 140-450 ng/ml (*packed cells*) civarındadır. Folat miktarları hakkında en iyi bilgi eritrosit folat konsantrasyonlarının ölçülmesi ile elde edilir; çünkü eritrosit folat konsantrasyonları en son alınan diyetlerden etkilenmemektedir (82,76). Folat'ın 2/3'ü plazmada proteinlere bağlı olarak bulunur (83). N⁵,N¹⁰-metilen-H₄folat tek karbon metabolizmasında merkezi bir rol oynar. N⁵,N¹⁰-metilen-H₄folat, N⁵-metil-H₄folat'a indirgenir. N⁵-metil-H₄folat homosisteinin metiyonin'e metilasyonunda çok önemli rol oynar. Metilkobalamin kofaktörüdür. N⁵,N¹⁰-metilen-H₄folat alternatif olarak N⁵,N¹⁰-metenil-H₄folat'a oksitlenir. N⁵,N¹⁰-metenil-H₄folat daha sonra ya N¹⁰-formil-H₄folat ya da N⁵-formil-H₄folat'a hidrate olabilir. N⁵-formil-H₄folat folinik asit olarak bilinir (75). Normalde karaciğerde ve diğer dokularda 5-20 mg folat depolanmaktadır (76,79). Karaciğerde en fazla bulunan pteroil pentaglutamat formudur (83,75). Hepatik dihidrofolat redüktaz enzimi, depolanmış poliglutamit formların metabolik olarak aktif olan tetrahidrofolik asit formuna dönüşümünü katalizlemektedir (79). Folatlar idrar ve gayta ile atılır. Bir kısmı da katabolizma esnasında yıkılır (76).

Hızlı proliferasyon gösteren dokulardaki biyokimyasal reaksiyonlarda önemli miktarda tetrahidrofolat kullanılır. Folat çeşitli biyolojik süreçlerde kofaktör veya

koenzim olarak anahtar rol oynar (81). Koenzim formu, nükleik asit metabolizmasında tek karbon ünitelerinin hem alıcısı hem vericisi olarak (tek karbon taşıyıcısı) görev yapmaktadır. Pürin ve primidin sentez yollarında esansiyel rol oynar. Pürin sentezinde erken dönemde N¹⁰-formil-H₄folat, primidin sentezinde ise son basamaklarda N⁵,N¹⁰-metilen-H₄folat gereklidir (timidin oluşumunda). Bu basamak DNA sentezinde hız kısıtlayıcı basamaktır (81,83). Metilasyon reaksiyonlarının gerçekleşmesi için metil grupları gereklidir. Normal diyet ile alınan metil grupları gereksinimleri karşılamak için yetersizdir. Bu ek metil grupları tek-karbon folat havuzundan *de nova* metil sentezi ile üretilir (84). Metiyonin bir S-adenozilmetiyonin (SAM) öncülüdür (83). Metiyoninin, SAM'a dönüşümü için 5-metil H₄folat gereklidir (84). SAM; DNA ve RNA'nın (81), yağ asitlerinin, fosfolipidlerin, polisakkaritlerin ve proteinlerin metilasyonu dahil yüzden fazla kimyasal reaksiyonda kullanılmaktadır (85). Folat'ın, myelin biyosentezinde ve amino asit metabolizmasında önemli görevleri vardır. Glisin, glutamik asit, ve metiyonin üretiminde görev almakta; homosisteinin serum düzeylerinin ayarlanmasında esansiyel rol oynamaktadır (81). Homosistein, metiyonin metabolizması sırasında oluşan ve sülfür içeren bir aminoasittir (157→86). Homosistein düzeyleri iki önemli mekanizma ile normal sınırlarda tutulur. Birinci mekanizmada, homosistein folat ve B₁₂ vitamini aracılığı ile tekrar metilasyona uğrar ve metiyonin oluşur. İkinci mekanizmada, homosistein sistatyonin-β-sentaz enzimi aracılığı ile sistatyonin'e dönüştürülmektedir. Bu iki enzimin miktarlarında ve fonksiyonlarında meydana gelen değişiklikler homosistein düzeylerini etkilemektedir (84). Plazma homosistein düzeylerindeki artış kardiyovasküler hastalıklar ve inme açısından bağımsız bir risk faktörüdür (87). Homosisteinik asit gibi homosistein metabolitleri, glutamaterjik NMDA reseptörleri üzerinde eksitotoksik etki göstermektedir. Bu etki glutamatın etkisinden daha fazla olup, hücre içinde kalsiyumun artmasına ve proapoptotik proteinlerin aktivasyonu ile apoptoz ve hücre ölümüne neden olmaktadır. Homosistein aynı zamanda SAH'a metabolize olur. SAH'da metilasyon reaksiyonlarının inhibisyonu ile nörotoksik etki oluşturmaktadır (158→88). Homosistein plazmaya katılınca, hızlıca disülfid homosistein veya homosistein tiolaktone okside olmakta; bu reaksiyon esnasında hidrojen peroksit ve süperoksit radikali gibi reaktif oksijen ürünleri oluşmaktadır. Homosisteinin NMDA reseptörleri aracılığı ile de hücre içi SOR üretimini arttırdığı belirtilmektedir

(157→86,162→89). Folatlar; serotonin, melatonin ve katekolaminler gibi nörotransmitterlerin sentezinde de görev almaktadır (81). SSS’de metil-folat yetersizliği veya desteğinin kesilmesi; DNA sentezinin azalması, DNA transkripsiyon, metilasyon ve gen üretiminin bozulması, doku büyümesi, farklılaşması ve tamirini etkileyen mekanizmaların zayıflaması ile sonuçlanmaktadır (90). Şekil-7’de Santral sinir sisteminde folat metabolizması ve folatın görev aldığı biyolojik süreçler gösterilmiştir (85).



Şekil-7: Santral sinir sisteminde folat metabolizması ve folatın görev aldığı biyolojik süreçler. THF, tetrahitrofolat; DHF, dihidrofolat; DHFR, dihidrofolat redüktaz; MTHFR, metilentetrahidrofolat redüktaz; SHMT, serin hidroksimetiltransferaz; SAM, S-adenozilmetiyonin; SAH, S-adenozilhomosistein (85).

Vücutta folat miktarının ve metabolizmasının yeterli olması; DNA sentezi, replikasyonu (kopyalama), hücre bölünmesi, büyümesi ve canlılığının sürdürmesi için gereklidir. Hamilelerde normal embriyonik büyüme, gelişim ve SSS’nin maturasyonu için de gereklidir (85). Folat metabolizmasındaki bozukluklara ve folat eksikliğine en hassas hücreler gastrointestinal, hematolojik ve immünolojik hücreler gibi çok hızlı bölünen hücrelerdir. Anormal folat metabolizmasının klinik bulguları, şiddeti, ve karakteristik özellikleri; altta yatan neden, folat metabolizmasında veya emiliminde meydana gelen blok düzeyi, hastanın yaşı ve folat eksikliğinin süresi ile ilişkilidir. Çoğu vakada klinik görünüm spesifik değildir (81). Folat eksikliğinde oral histidin yükleme testi ile idrarda formiminoglutamat (FIGLU) atılımı artar (75). Doğumsal folat malabsorpsiyonu ve enzim eksiklikleri gibi primer sendromlar (81);

çölyak hastalığı, tropikal spru, jejunal rezeksiyon, malabsorpsiyon sendromu, gereksinimde artış (hızlı büyüme dönemi, gebelik, laktasyon, kronik hemolitik anemi gibi), vücuttan atılımında artış (hemodiyaliz hastaları), folat emilim ve metabolizmasını engelleyen ilaç kullanımı (antiepileptik ilaçlar, metotreksat, primetamin, trimetoprim) ve karaciğer fonksiyonlarında bozulma, diyet ile yetersiz alım gibi sekonder nedenler (76,81) serum ve BOS folat düzeylerinde azalmaya neden olan bazı klinik durumlardır.

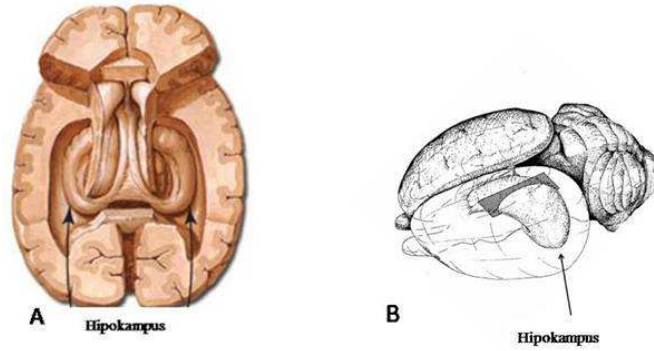
FA eksikliğinin erken evrelerinde bulgular çok hafiftir. Bu dönemde tek bulgu nötrofillerdeki hipersegmentasyon olabilir. Megaloblastik anemi, kan eritrosit sayısında azalma, BOS folat düzeylerinde azalma, serum homosistein düzeylerinde artış, şiddetli folat eksikliğinin göstergesidir (81). Folat eksikliğinde depresyon, kognitif fonksiyonlarda bozulma, periferik nöropati, vasküler hastalıklar ve gebede FA eksikliğinde bebekte NTD ortaya çıkabilir (76,90). Bazı çalışmalar folat eksikliği ve yüksek homosistein düzeyleri ile Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı gibi bazı nörodejeneratif hastalıklar arasında ilişki olduğunu, folat eksikliğinin ve homosistein yüksekliğinin psikiyatrik hastalıkların patogeneğinde rol oynadığını düşündürmektedir (84,124→91).

Folat eksikliği oldukça sıktır (76). FA tedavisine altta yatan neden ortadan kaldırılıncaya veya düzeltilinceye kadar devam edilmelidir (76).

HİPOKAMPUS

Hipokampus filogenetik olarak beynin en eski bölümlerinden biridir (92). Yan ventriküllerin tabanında bulunan, ortalama 5 cm uzunluğundaki bu yapıya, deniz atına benzemesi nedeniyle hipokampus (deniz atı) denilmiştir (93). Hipokampus sagittal (93) ve koronal (92) kesitlerde C harfi şeklinde görülür. Ventriküle bakan yüzü konveks, hemisferin alt kısmına bakan yüzü ise konkavdır (92,93). Hipokampus, alt mediale doğru subikulum ve girus parahipokampalis ile devam eder (94). Hipokampusun öne doğru uzanan ve parmak şeklinde genişleyerek sonlanan kısmına pes hipokampi, yukarda lateral ventriküle komşu yüzünü örten beyaz cevher kısmına ise alveus hipokampi adı verilir (94). Alveus'u oluşturan myelinli lifler, hipokampus'de bulunan sinir hücrelerinin aksonlarıdır (93). Bu lifler medialde

birleşerek fimbria hipokampi'yi oluşturur (94). Girus dentatus, hipokampusun medialinde, fimbria hipokampi ile subikulum arasında yer alır (94). Hipokampusa koç boynuzuna benzediği için "*Cornu Ammonis (CA)*"de denilmektedir (95). İnsan ve sıçan beyinde hipokampusun yerleşimi Şekil-8'de görülmektedir. Hücre yapısındaki değişikliklere bağlı olarak CA1, CA2, CA3, CA4 gibi farklı alanlara bölünmüştür. Bunlardan CA1 subikulum'a, CA4 ise girus dentatus'a en yakın alanlardır (92,95).



Şekil-8: İnsan (A) ve sıçan (B) beyinde hipokampus ve lokalizasyonu.

Hipokampus histolojik olarak tabakalara ayrılmıştır. Bunlar ventriküler yüzeyden başlayarak derine doğru şu şekilde sıralanır.

- 1- Alveus: Hipokampus ve subikulumuna ait piramidal hücre aksonlarını içerir.
- 2- Stratum oriens: Başlıca piramidal hücrelerin bazal dentritleri ve internöronların yerleştiği bölgedir.
- 3- Stratum pyramidalis: Bu tabakada karakteristik olarak büyük piramidal ve Golgi tip II hücreleri çoğunluktadır. Hipokampusun şeklini bu tabakada bulunan piramidal hücrelerin dizilimi belirlemektedir.
- 4- Stratum lucidum: CA1 ve CA2 alanlarında bulunmaz. CA3 alanındaki piramidal liflerle bağlantılı yosunsu lifleri içerir.
- 5- Stratum radiatum
- 6- Stratum lakunosum
- 7- Stratum molekölare (92).

Hipokampus, beynin birçok bölgesinden duyu lifleri alır. Algı ve bellek sistemleri arasında bağlantı kurar. Aldığı bu duyuları, forniks aracılığıyla hipotalamus, talamus ve septal sahaya iletmektedir. Subkortikal alanlarla bağlantısı

sayesinde, beynin birçok bölgesi ile iletişim halindedir. Öğrenme ve hafıza üzerinde önemli rol oynar. Yeni elde edilen bilgilerin depolanması ve anıların kısa süreli hafızadan uzun süreli hafızaya geçirilmesinde görev almaktadır (96).

SIÇANLAR VE SIÇANLARDA HİPOKAMPUS

Günümüzde laboratuvar sıçanı biyomedikal çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Sıçanların ortalama ömrü 2,5-3,5 yıl arasında değişmektedir. Vücut ağırlıkları erkeklerde yaklaşık 250-450 g, dişilerde 250-300 g'dır. Normal vücut ısıları 35,9-37,5 °C'dir. Doğumda bir yavrunun ağırlığı 5-6 g'dır. 18-23 günlerde sütten kesilirler. Sıçanlar nokturnal hayvanlardır. Gün içinde en etkin oldukları dönem, gece ve sabahın erken saatleridir. Laboratuvar ortamında, ışık siklusu 12 saatlik aydınlık-karanlık olacak şekilde ayarlanarak etkin dönemin kontrolü mümkün olur (97). Kalp atım hızı 330-480 atım/dakika, toplam kan hacmi 56-71 ml/kg'dır (97). Sıçanlarda ortalama beyin ağırlığı 1,8 gr/250 g'dır (98). Doğumda sıçanların beyni çok az gelişmiş olup insan fetüs beyninin yaklaşık 15. haftasına karşılık gelmektedir. Sıçanlarda beynin hızlı büyüme dönemi postnatal üçüncü haftanın sonunda tamamlanır. İnsanda bu dönemin karşılığı gebeliğin ikinci trimestirinden postnatal yaşamın 2. yılına kadardır. Beynin hızlı büyüme döneminin postnatal hayatta gerçekleşmesi, sıçanları postnatal dönemde sinir sisteminin gelişimini araştırmada ideal bir deney hayvanı modeli yapmaktadır (99).

Sıçanlarda hipokampus Lorente de No tarafından kendi içinde üç ayrı bölgeye ayrılmıştır (CA1, CA2 ve CA3). CA2 ve CA3 alanları Ramon y Cajal'ın büyük hücreli "*regio inferior*" ve CA1 bölgesi küçük hücreli "*regio superior*" bölgesine karşılık gelmektedir. CA1 ve CA3 bölgelerindeki piramidal hücrelerin büyüklük farklılıklarına ek olarak bağlantı farklılıkları da vardır. CA3 piramidal hücreleri girus dentatus'tan yosunsu liflerle uyarı alırken, CA1 piramidal hücreleri almaz. CA2 alanı ise tartışmalı olup, CA3 ve CA1 arasında, bu iki alanın birbirine karıştığı dar bir geçiş alanıdır. CA3'teki gibi büyük hücre gövdeleri içerir; fakat CA1 hücreleri gibi yosunsu lif inervasyonu almaz. CA2, çeşitli bakımlardan CA3 alanının uç parçası gibidir (100).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya başlamadan önce 07.03.2007 tarihinde Pamukkale Üniversitesi Deneysel Hayvanları Etik Kurulu'ndan Etik Kurul Onayı alındı. Deneysel çalışma Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda, histolojik çalışmalar ise Anatomi Anabilim Dalı Laboratuvarı ve Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda 07.03.2007-01.11.2007 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Çalışma süresince deney hayvanları çalışma etiği kurallarına uyuldu.

Çalışmamızda kortikal tabakalaşma, germinal matriksin involüsyonu ve myelinizasyon açısından term yenidoğana eşdeğer gelişim göstermesi nedeniyle her iki cinsten toplam 24 adet 13 günlük yenidoğan Wistar sıçan kullanıldı (2). Sıçanlar rastgele 4 gruba ayrıldı ve tekrar annelerinin yanına konuldu. VA, FA ve serum fizyolojik (SF) intraperitoneal (ip) uygulandı

Kontrol grubu (SF grubu) (sıçan sayısı: 6): Hipoksi-iskemi sonrası beş gün 0,1 ml serum fizyolojik (%0,9 NaCl) uygulanan grup.

Valproik asit grubu (VA grubu) (sıçan sayısı: 6): Hipoksi-iskemi sonrası beş gün 400 mg/kg/gün valproik asit uygulanan grup.

Valproik asit+Folik asit grubu (VA+FA grubu) (sıçan sayısı: 6): Hipoksi-iskemi sonrası beş gün 400 mg/kg/gün valproik asit ve 80 µg/kg/gün folik asit uygulanan grup.

Folik asit grubu (FA grubu) (sıçan sayısı: 6): Hipoksi-iskemi sonrası beş gün 80 µg/kg/gün folik asit uygulanan grup.

Perinatal hipoksi-iskemi modelinin oluşturulduğu 13. günde sıçanların ağırlıkları 10,1-14,3 g olarak saptandı. Deney süresince altı plastik, üstü tel ve içinde talaş bulunan özel kafeslerde, oda ısısında (22±2 °C), %50±5 nem bulunan bir ortamda izlendi. Biyoretimlerine uygun olacak şekilde 12 saatlik aydınlık-karanlık uygulaması yapıldı. Annelerinin beslenmesi kafesin üzerine bırakılan standart sıçan yemleri ve cam suluklar ile yapıldı. Bütün deneklere hipoksi-iskemi öncesi ve sonrası standart bakım uygulandı.

Bu çalışmada, term yenidoğanlarda perinatal Hİ beyin hasarında gözlenen nöropatolojik lezyonlara benzer beyin hasarının oluşturulduğu Levine'in modifiye hayvan modeli kullanıldı. Beyinde tek taraflı Hİ beyin hasarı oluşturuldu (2,6,8,101).

PERİNATAL HİPOKSİK İSKEMİK ENSEFALOPATİ MODELİNİN OLUŞTURULMASI

Deneklere postnatal 13. günde hafif eter anestezi uygulandı (6,8). Anestezi altındaki sıçanlar operasyon masasına sırtüstü pozisyonda yatırıldı. Ekstremiteleri abduksiyona getirilerek operasyon masasına sabitlendi. Operasyon süresince spontan solunumlarına engel olmayacak şekilde boyunları hiperekstansiyon pozisyonuna getirildi. Cerrahi girişim öncesi boyun bölgesi antiseptik solüsyon (Betadine®) ile temizlendi. Antisepsi uygulanan boyun bölgesine ön-orta hattan 0,5-1 cm vertikal cilt, cilt altı insizyonu yapıldı. Submandibular bez künt diseksiyon ile etraf dokulardan ayrıldı. Submandibular bezin altından, trakeanın sol tarafından boyun kasları künt diseksiyon ile aralanarak boyun sinir-damar paketine ulaşıldı. Boyun sinir damar paketinde sol arteria karotis kommunis'in atımı tesbit edildi. Arteria karotis kommunis, sinir-damar paketindeki diğer dokulardan ayrılarak askıya alındı ve 5/0 ipek ile bağlandı. Sol arteria karotis kommunisin bağlanmadan önce pulsasyonunun varlığı ve bağlandıktan sonra pulsasyonunun olmadığı mikroskop altında doğrulandı. Sol arteria karotis kommunisleri bağlanan hayvanlar insizyon yeri dikildikten sonra annelerinin yanına bırakıldı. Cerrahi işlemin süresi hiçbir zaman 15 dakikayı geçmedi. Cerrahi işlem esnasında arteria karotis kommuniste ve diğer damarlarda yırtılma-kopma olan denekler ile kanama veya anesteziye bağlı solunum arresti gelişen denekler çalışmadan çıkarıldı. Sıçanlar annelerinin yanında kaldıkları iki saatlik iyileşme, beslenme süresinden sonra anestezi kabinine konuldu. Anestezi kabininde bir saat süreyle, 1 litre/dakika akış hızında, nemlendirilmiş %92 nitrojen ve %8 oksijen gaz karışımı bulunan hipoksik ortamda solutuldu. Deney süresince sıçanların vücut ısısı 36,5-37 °C'de tutuldu (2,6,8,97,101,102,103).

İLAC VE SERUM FİZYOLOJİK UYGULAMASI

HİE oluşturulan bütün gruplar beş dakika oda havasında reoksijenize edildi. Daha sonra kontrol grubundakilere (SF grubu) 0,1 ml serum fizyolojik (%0,9 NaCl),

VA grubundakilere 0,1 ml serum fizyolojik içinde 400 mg/kg valproik asit (Depakin ampul®) (8), VA+FA grubundakilere 0,1 ml serum fizyolojik içinde 400 mg/kg valproik asit ve 80 µg/kg folik asit (Folic acid flakon®) (8,10), FA grubundakilere 80 µg/kg folik asit ip (8) olarak verildi. Takip eden beş günde serum fizyolojik ve ilaç dozları aynı dozda tekrarlandı.

DOKUNUN HAZIRLANMASI

HİE modeli oluşturulduktan sonra beş gün süreyle serum fizyolojik ve ilaç dozları tekrarlanan denekler 18. günde hafif eter anestezisi altında servikal dislokasyon ve dekapitasyon ile sakrifiye edildi. Beyin dokuları çıkarıldı. Çıkarılan beyin dokuları Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda daha önceden -15 °C'ye ayarlanmış kriyostat cihazına (Leica CM3050) konuldu. Kriyostat cihazında kısa bir süre içinde dondurulan beyin dokularından 150 mikrometre kalınlığında horizontal kesitler alındı. Kesitler daha sonra Hematoksilen-Eozin (H-E) boyası ile boyandı.

KESİTLERİN BOYANMASI

Kesitlerin boyama işlemi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapıldı. Lam üzerine alınmış olan kesitler, sırasıyla içerisinde %96, %90, %80 ve %70'lik alkol bulunan kaplarda 10'ar dakikalık sürelerle bekletildi. Alkol banyolarından sonra su ile yıkanan preparatlar, içerisinde hematoksilen bulunan kaptaki 2,5-3 dakika bekletildi. Hematoksilen ile boyandıktan sonra asit-alkol solüsyonuna daldırılıp çıkarıldı ve daha sonra amonyak solüsyonunda 1-2 dakika bekletildi. Amonyaktan arındırılmak için tekrar su ile yıkanan preparatlar, yıkama işleminden sonra beş saniye süre ile eosin solüsyonuna daldırılıp çıkartıldı. Bu işlemlerden sonra preparatlar %70, %80, %90 ve %96'lık alkol solüsyonlarından sırasıyla tekrar geçirildi. Preparatlar boyama işlemi tamamlandıktan sonra 30 dakika süreyle ksilol içinde bekletildi. Ksilolden çıkartıldıktan sonra entellanla üzerine lamel konularak kapatıldı ve kurumaya bırakıldı.

Preparatlar kurduktan sonra ışık mikroskopunda 4, 10, 40 ve 100'lük büyütmelemler kullanılarak incelendi. Kesitlerde tüm beyin dokusunun olması nedeniyle sağ ve sol hemisfer ayırımı yapıldı.

STEREOLOJİK YÖNTEMLER

Stereoloji, yapıların kesitlerinin iki boyutlu görünümüne ait verileri analiz ederek üç boyutlu yapısını anlamaya çalışan bir bilim dalıdır. Bunun için geometri ve istatistiksel yöntemlerden yararlanır (104). Stereolojik çalışmalar literatüre yaklaşık 55 yıl önce (1943) girmiş ve giderek sık kullanılmaya başlanılmıştır (104). Stereoloji, 1984 yılında disektör yönteminin tanımlanması ile yeni bir boyut kazanmıştır (105,106).

Biyolojik yapıların tamamını histolojik kesitlere ayırıp, her bir kesitte partikül sayımı yapmak doğru sonuç verecek olsa da pratik ve etkin bir yol değildir; çünkü, aynı yapıdaki toplam tanecik sayısını gerçeğe yakın olarak hesaplamak için çeşitli yöntemler zaten vardır (107). Biyolojik yapılara ilişkin sayısal verilerin elde edilmesinde kullanılacak birçok yöntemin olması, bu yöntemler arasından en uygun ve güvenilir olanının seçilmesi sorununu da beraberinde getirmektedir (108). Önemli olan, herhangi bir niceliği hesaplar veya ölçerken, yapıdan mümkün olduğunca tarafsız sonuçların elde edilmesini sağlayabilecek bir yöntemin tercih edilmesidir. Bu nedenle tasarım-tabanlı “*design-based*” stereolojik yöntemler, bu gerekliliği hem teorik olarak sağlam temellere dayandırması, hem de pratik olmaları sayesinde yaygın biçimde tercih edilmektedir. Stereolojik yöntemlerin birçoğu, uygulamada ilgilenilen yapının sistematik-tekdüze-rastgele elde edilmiş örnekleri üzerinde ölçümler yaparak, o yapıdaki söz konusu sayısal niceliğin belli ve istatistiksel olarak kabul edilebilir bir hata payı dahilinde hesaplanmasına dayanır (108). Stereolojik yöntemler, pratik anlamda kesitlerde gözlenen mikroskobik yapıların üç boyutlu yapısı hakkında kantitatif veriler elde etmek için kullanılan, oldukça kesin sonuç veren yöntemlerdir (109). Çoğu zaman üzerinde çalışılan yapıda araştırılan nicelik (örneğin hücre sayısı) büyük olduğundan, o yapıda belli oranda örnekleme yapmak gerekir (108). Bu örnekleme sonucunda elde edilecek verilerin güvenilirliği ise, uygulama aşamalarında gösterilecek özen ile doğrudan ilişkilidir. Üzerinde çalışılan makroskobik yapının paralel dilim ve kesitlere ayrılması, bu kesitlerin mikroskopta incelenmesi, bu inceleme sırasında belli büyüklükte adımlamalarla ilgilenilen doku bileşenlerinin taranması ve mikroskobik görüntüsü üzerinde büyüklüğü önceden belirlenmiş olan örnekleme alanlarında ardışık görüntülerin karşılaştırılması, kesit kalınlığının ölçülmesi gibi aşamalarda dikkatli

ve kurallara uygun davranılması ile güvenilir sonuçlara ulaşmak mümkündür (108). Bu yöntemle yapılan toplam tanecik sayısı hesaplamaları sonucunda elde edilen değer, gerçek toplam tanecik sayısının tamamen eşiti olmasa da istatistiksel olarak kabul edilebilir bir hata katsayısı sınırları içerisinde, söz konusu organ veya yapıda bulunan toplam tanecik sayısı hakkında güvenilir, etkin ve tarafsız bir bilgi sağlayacaktır (107). Tarafsızlık ve etkinlik stereoloji ile ilgili iki önemli kavramdır (109). Tarafsızlık, gerçek değerden sistematik sapma göstermeyen (107), etkinlik ise kısa sürede en düşük hata payı ile sonuca ulaşma anlamına gelmektedir (109).

Stereolojik metodlar kullanılarak yapıdaki partikül sayısı, partikül alanı, partikül hacmi (105), partikül uzunluğu ölçülebilmekte; bu sayede çekirdek sayısı, korteksin, beyaz cevherin, santral gri cevherin, ventriküllerin boyut ve hacimleri, glomerül sayısı ve boyutları, glomerül kapiller damar uzunluğu gibi birçok yapı ölçülebilmektedir (109).

Sistematik tekdüze rastgele örnekleme (STRÖ)

İdeal bir örneklem, bütün basamaklarda istatistiksel anlamda tarafsız olmalıdır. Bunun anlamı, bir örnekleme bütün kesitler eşit olasılıkla temsil edilebilmeli; bu kesitlerdeki bütün lokalizasyonlar sayım sondasında (iki boyutlu iki kesit düzleminin kullanılmasıyla oluşturulan üç boyutlu tanecik sayım alanı) eşit olasılıkla örneklenebilmeli ve kesit sondasındaki bütün nesnelere eşit olasılıkla sayılabilmelidir (110,111). Eğer örneklemin herhangi bir seviyesinde kurallara uyulmazsa örneklem taraflı olur (110).

STRÖ, klasik rastgele örneklemeden farklıdır. Klasik rastgele örnekleme, herhangi bir sıralama gözetmeksizin, her örneğin bir öncekinden bağımsız ve rastgele olarak seçildiği bir yöntemdir. Sistematik örnekleme ise, sabit bir başlangıç ve ardından sabit aralıklarla seçim yapmayı içerir. STRÖ'de ise, rastgele seçilen bir başlangıç noktasından başlanarak, organın tümünün "sistematik" olarak örnekleneceği söz konusudur (107). Sistematik olması, örneklemin önceden belirlenmiş aralıklarla yapılmasını; rastgele olması, örneklemin başlangıçta belirlenen sistematik örnekleme aralığı içerisindeki rastgele bir sayı ile başlamasını ifade eder (112,113).

Sistematik ve rastgele bir örnekleme yapmak için öncelikle "örnekleme aralığı" belirlenir. Örneğin seri kesitlere ayrılmış bir organda, her dört kesitten bir tanesini seçmeye karar verirsek örnekleme aralığımız dört olur. Bu, organın yaklaşık 1/4'lik bir bölümünü örnek olarak alacağımız anlamına gelir (107). Böylece örneklememizin "sistematik" kısmını tamamlamış oluruz. Bundan sonraki basamak ise, örneklemenin "rastgelelik" özelliğini yerine getirmektir. Kesit almaya başladığımızda, ilk dört dilim arasından tamamen rastgele olarak başlangıç kesiti seçerek -sözgelimi üçüncüyü seçelim- örneklemin rastgele özelliğini yerine getirmiş oluruz. Bu seçimden sonra örnekleme sistematik olarak devam edecektir. Rastgele seçilen başlangıç kesiti ve bundan sonra gelen her 4. kesit örneklem olarak alınır. Bu şekilde, organ, başından sonuna kadar örneklenir (107,112). STRÖ ile, araştırma için kullanılacak kesitlerin sayısı azaltılmakta ve çalışılan yapının her noktasına eşit olasılıkla örnekleme şansı verilmektedir. İlk seçilen kesitin rastgele konumlandırılması, o organ için örneklenecek olan tüm parça veya kesitlerin yerlerini de belirlemektedir. Bu işlem birden fazla bireyde uygulandığında, çalışılan organla ilgili değerler istatistiksel anlamda tarafsız "*unbiased*" olarak elde edilmektedir (107).

Optik parçalama (fraksiyonlama) yöntemi

Parçalama yöntemi, bilinen en etkin toplam tanecik sayısı hesaplama yöntemidir. Bu yöntem ile elde edilen sayı, o organ veya yapıdaki toplam tanecik sayısının tarafsız olarak hesaplanmasıdır (107). Histo-patolojik örneklerde tüm dokuda partikül sayımı yapılması genellikle pratik değildir. Onun yerine, belirlenen bir referans alanının küçük bir parçasında (fraksiyon) sayım yapılması tercih edilmektedir (106).

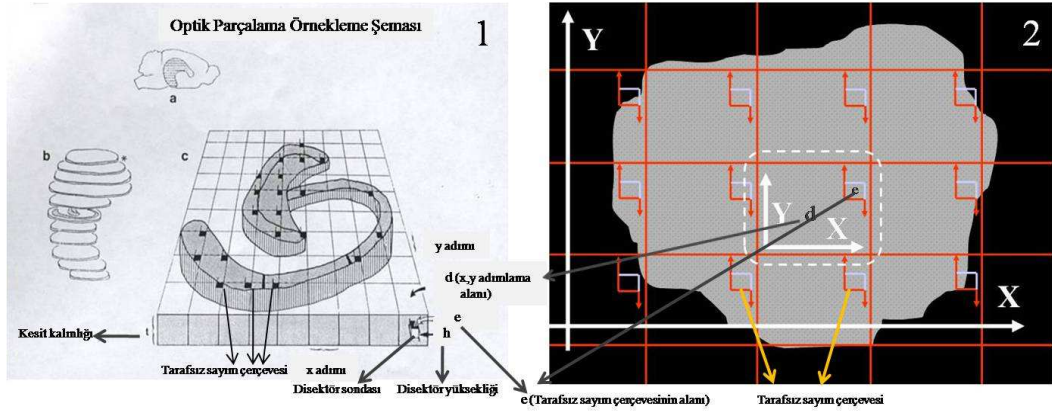
Stereolojideki en önemli gelişmelerden birisi optik disektör ile "parçalama örnekleme şeması"nın kombine edilmesidir (112,113). Literatürde "optik parçalama" olarak bahsedilen bu kombinasyonun nöro-anatomik yapıların ve histolojik preparatların sayılmasında pratik özellikleri vardır. Optik parçalama yöntemiyle; sistematik tekdüze örnekleme ile belirlenen analiz edilecek bölgenin küçük bir parçasında (disektör sondası) optik disektör metodu ile herhangi bir hücre -örneğin nöron sayımı- organel veya partikül sayımı yapılabilir (113). Optik parçalama pratik

olarak, sistematik örnekleme aracılığı ile kesit kalınlığının küçük bir parçasında sayım yapılmasıdır (112,113).

Optik parçalama, dokunun hazırlanması esnasında ortaya çıkan doku büzüşmesi veya genişlemesinden etkilenmez. Dondurma yöntemi (frozen), vibratom, selloidin ve parafin kesitlerde (boyama ve gömme esnasında doku büzüşmesi belirgin ve sayım işlemi zordur) kolaylıkla uygulanabilir (113). Nöron sayısını bulmak için “optik parçalama örnekleme şeması” kullanıldığında, bölgenin hacminin ve kesitsel profilinin bilinmesi gerekli değildir. Sadece ilgilenilen bölgenin nöro-anatomik sınırlarını tanımlamak yeterlidir. Optik parçalama yöntemi, birçok histolojik preparat hazırlama yöntemi ile birlikte kullanılabilir; doku büzüşmesinden etkilenmemesi ve sistematik örnekleme planının (optik parçalama örnekleme şeması) etkin olması sayesinde, tanecik sayımı dahil birçok nöro-biyolojik problemin çözülmesinde tercih edilmektedir (112,113). Örnekleme şemasının oldukça kesin sonuç vermesi sayesinde toplam tanecik sayısını hesaplamak için az sayıda örnekleme yapmak yeterlidir (112).

Bu yöntem ile organ veya yapı, oranı bilinen küçük parçalar şeklinde örneklendirilir (107). Seçilmiş olan her bir kesitin sayım yapılacak dokuyu içeren her bir optik parçasında optik disektör aracılığı ile tanecik sayımı (örneğin nöron) yapılır. Örneklenen kısımdan elde edilen tanecik sayısı, sayım yapılan bu parçanın ana yapıya oranı (parçalanma katsayıları) ile çarpılırsa o yapıya ait toplam tanecik sayısına ulaşılmış olur (107,112).

Optik parçalama yöntemi ile yapılan hesaplamaların bütün alanlarda tarafsız olması için kesit kalınlıkları olabildiğince kalın olmalı -dondurma ve parafin yöntemleri ile alınan kesitlerin kalınlıkları 20 µm'den daha az olmamalıdır- ve yüksek sayısal açıklıklı objektife sahip mikroskoplar kullanılmalıdır (böylece ince kesitlerde odaklama derinliği mümkün olduğunca küçük tutulabilmektedir) (112,113). Şekil-9'da optik parçalama örnekleme şeması, tanecik sayımının yapıldığı “disektör sondası” ve tarafsız sayım çerçevesi görülmektedir.

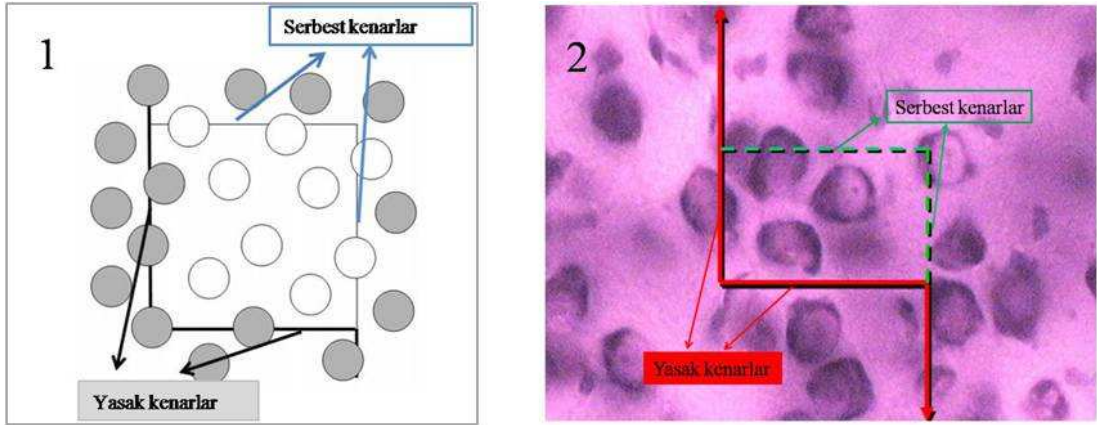


Şekil-9: Optik parçalama örnekleme şeması, tanecik sayımının yapıldığı “disektör sondası” ve tarafsız sayım çerçevesinin görünümü (1,2). a: sıçan beyinde hipokampus (1), b: beyin kesitleri (1), c: Hipokampusun kesit üzerinde “optik parçalama örnekleme şeması” ile parçalanması ve “disektör sondası” (1), X: X eksenini (2), Y: Yeksenini (2), d: x,y adımlama alanı (1,2), e: tarafsız sayım çerçevesinin alanı (1,2), t: kesit kalınlığı (1), h: disektör yüksekliği (1) (112,113).

Tarafsız sayım çerçevesi ve sayım alanı

Sayım sırasında uyulması gereken kuralların temel mantığı, her taneciği yalnızca bir defa örnekleme. Bir taneciğin yalnızca bir defa örneklenmesini sağlamak için iki boyutlu kesit düzlemlerinde bir takım sayım kuralları geliştirilmiştir. Eğer görüntü alanında aynı anda gözlenemeyen geniş ve çok sayıda izdüşüm veya tanecik içeren bir alanda çalışıyorsak, belli bir alanda, belirli kurallar çerçevesinde sayım yapma zorunluluğu ortaya çıkar. Alanı sınırlandırarak sayım yapma ve bundan kaynaklanan sorunlar, stereoloji literatüründe kenar etkisi “*edge effect*” olarak bilinmektedir. Bir sayım çerçevesi kullanıldığında, çerçevenin tamamen içine düşen taneciklerin sayılması konusunda araştırmacılar arasında herhangi anlaşmazlık yoktur. Problem, çerçevenin sınırları ile kesişen tanecik izdüşümlerinin sayılıp sayılmayacağı konusundadır. Bunun için, bir tanecik yalnızca ait olduğu alanda, bir defa sayılacak biçimde örnekleme yapılmalıdır. İki boyutlu düzlemlerde gerçek sayımın nasıl bulunacağını, Gundersen, 1977 yılında, “tarafsız sayım çerçevesi” olarak adlandırılan bir sayım çerçevesi modeli geliştirerek tarif etmiştir. Tarafsız sayım çerçevesinin sayım kuralları şu şekilde özetlenebilir.

1. İzdüşümleri tamamen sayım çerçevesi içerisinde kalan, yani herhangi bir kenar veya köşeyle kesişmeyen tanecikler sayıma dahil edilir.
2. Çerçevenin "yasak kenarları" ile kesişen izdüşümler sayılmazlar.
3. "Serbest kenarlar" ile temas eden tanecik izdüşümleri sayıma dahil edilir.
4. Çerçevenin yasak kenarlarının uzantıları ile herhangi bir şekilde kesişen izdüşümler de sayıma dahil edilmezler (Şekil-10) (109,111).



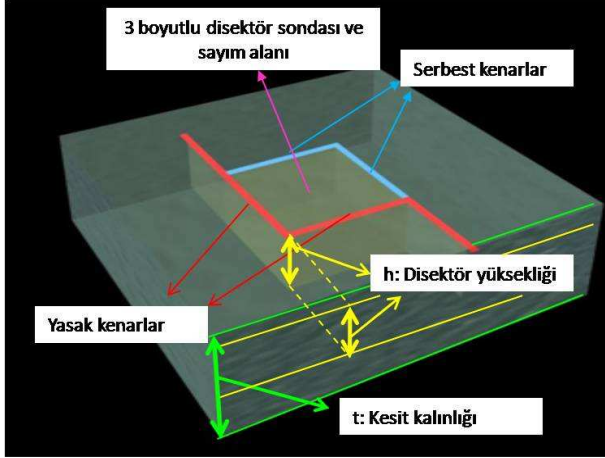
Şekil-10: Tarafsız sayım çerçevesi (1 ve 2); Kalın-siyah çizgi yasak kenarları, ince-gri çizgi serbest kenarları göstermektedir (1). Açık renkle boyanmış olan partiküller sayıma dahil edilirken diğerleri dahil edilmez (1).

Optik disektör

Disektör metodu, modern anlamda ilk defa 1984 yılında Sterio tarafından geliştirilip yeniden tariflenmiştir. Bu metod ile doku ya da organ içerisindeki tanecik sayısı tarafsız bir biçimde hesaplanabilmektedir. Kesitlerin alınma yönü, sayılacak olan taneciğin büyüklüğü, doku içindeki yönelimi (oriyantasyon) ve dokunun histolojik işlemler sırasında büzüşme ve genişlemesi gibi hesaplama hatalarına sebep olabilecek durumlardan etkilenmemektedir (105,111,112).

Optik disektör ise 1986 yılında Gundersen tarafından tarif edilmiştir (114,115). Sterio tarafından 1984 yılında tarif edilen, fiziksel disektör olarak adlandırılan orjinal yaklaşımdan en önemli farkı Z-ekseninde (dikey eksen) ve tek kesitte örnekleme yapılabilmesidir (114,115). Kesit kalınlığı içinde Z-ekseninde yapılan bu örnekleme, "örnekleme sondası", "optik disektör" olarak adlandırılmaktadır (113,115). Bu yöntemle fiziksel disektör yönteminde ortaya çıkan iki ayrı kesidin birbirini

tamamlayan parçalarını bulmak gibi zor ve zaman kaybettiren bir sorun ortadan kalkmaktadır (107,113). Şekil-11’de tasarımsal olarak kesit kalınlığı içinde disektör sondası görülmektedir.



Şekil-11: Tasarımsal olarak kesit kalınlığı içerisinde disektör sondasının görünümü

Yüksek sayısal açıklıklı mikroskop objektifleri kullanarak kalın histolojik kesitlerde (kesit kalınlığı $> 20 \mu\text{m}$) ince ($< 1 \mu\text{m}$) optik kesitler almak mümkündür. Bu objektifler ile oldukça sığ odak derinliğinde görüntü elde edilebilmektedir (106,112,113,115,116). Optik disektör metodunda, kalın bir kesit içerisinde, mikroskopun odaklama ayarını değiştirmek suretiyle bir dizi sanal kesit olarak, yani adeta kesit içerisinde bir sondaj yaparak tanecik sayımı yapılmaktadır (106,107,113). Optik disektör uygulamalarında kübün iç kısmına ve tarafsız sayım çerçevesi kurallarına göre serbest kenarlara isabet eden ve tanecik olarak nitelendirilen yapılar sayılmaktadır (117). Optik disektörde tanecik sayımı esnasında uyulması gereken diğer bir kural, kesidin alt ve üst yüzeylerinde oluşan yüzey düzensizlikleri ve yarı kesilmiş partiküller gibi, kesit kalınlığına veya tanecik sayısına etki edebilecek (*lost caps fenomeni*) fiziksel bozulmalardan kaçınmak üzere, sayım yapılacak hacim ile, kesidin alt ve üst yüzeyleri arasında bir "güvenlik kuşağı", "güvenlik aralığı" bırakmaktır (105,107,112,117). Dolayısıyla sayım işlemi üst ve alt güvenlik kuşaklarının haricinde yani kesidin orta kısımlarında gerçekleştirilmektedir (113,115,117). "Lost caps" olayından korunmak için kesit üstünde ve altında yaklaşık 3-7 μm derinliğinde güvenlik kuşağı bırakılmalı ve bu alanlarda tanecik sayımı yapılmamalıdır (112). Üst ve alt güvenlik kuşakları çıkarıldığında, kesitin

ortasında kalan sayım yapılan bölgenin yüksekliğinin (h), kesit kalınlığına (t) oranı bize toplam tanecik (nöron vb.) sayısının hesaplanmasında gerekli olan kalınlık örnekleme oranını (KaÖÖ) vermektedir (107). Partikül sayımı esnasında, sayım çerçevesinin içinde sayılabilir bir pozisyonda bulunan bir taneciğin, alt veya üst güvenlik kuşağı ile disektör hacmi arasındaki sınırlarda bulunması durumunda (taneciğin bir kısmı sayımın yapıldığı disektör hacmi içine yerleşmişken, geri kalanı sayım yapılmayan güvenlik kuşağında yer alabilir), bu tanecikler başka hacimlerce de paylaşıldıklarından sayım hatalarına sebep olmaktadır. Taneciklerin bu iki sınır düzeyine düşme ihtimallerinin eşit olduğu düşünülürse, bu düzeylerden birinde görülen tanecikleri sayıma dahil edip diğerini sayım dışı bırakmak, sayımların doğruluğu için yeterli olmaktadır (107). Optik disektör uygulamalarında, sayım çerçevesinin boyutları, her bir örnekleme alanında ve her bir üç boyutlu disektör sondası boyunca bir veya iki tanecik sayılabilecek şekilde ayarlanır. Yani, belirlenen bir örnekleme alanında optik odaklama ile yapılan sondaj boyunca, çerçevenin sayılabilir alanı içine bir veya iki tanecik düşmektedir (107).

Stereoloji terminolojisinde, disektör hacmi içindeki sayılabilen tanecik izdüşümleri (bir doku bileşeninin kesitlerde ortaya çıkan iki boyutlu görüntüsü) "disektör taneciği" olarak isimlendirilir ve "Q" simgesi ile gösterilmektedir (111,114).

Kesit görüntüsü üzerinde gezerek yapılan tanecik sayımlarında, mikroskop tablası X ve Y eksenleri boyunca adım adım hareket ettirilir. Mikroskop tablasının sağa-sola hareketi "X" eksenini, ileri geri hareketi "Y" eksenini, aşağı-yukarı hareketi de "Z" eksenini oluşturur. Adımlarımızın büyüklüğünü X ve Y eksenleri belirler. Z eksenini ise kesiti derinlemesine kat etmektedir ve kesit içinde odaklama ve görüntü netliği bu eksende gerçekleştirilir (107). Yukarıdan aşağıya veya tersi yönde mikroskopta gerçekleştirilen bir odak ilerlemesi esnasında kesitin ilk net görüntüsünün alındığı nokta (optik düzlem) belirlenir. Burası kesitin üst (veya alt) yüzeyi olarak kabul edilir. Buradan sonra, kesitin diğer yüzüne doğru odaklama ilerletilir ve en son net görüntünün alındığı nokta (optik düzlem) ise kesitin alt (veya üst) yüzeyi olarak belirlenir. Ölçüm cihazından okunan bu iki seviye arasındaki fark kesit kalınlığıdır (t) (107). Kesit kalınlığı "mikrokator" adı verilen, ölçüm etkinliği

oldukça güçlü elektronik aletler ile ölçülmektedir. Mikrokator, mikroskop tablasının Z-eksenine (dikey eksenine) monte edilen harekete duyarlı bir bölüm ile, burada meydana gelen değişimleri sayısal olarak gösteren bir dijital gösterge kısmından oluşmaktadır (106, 107,113,116). Kesit kalınlığı mikroskop mikrovidasının kalibre edilmesi yöntemi ile de hesaplanabilmektedir (116).

Optik disektör ile sayım işleminde kesitlerden elde edilen mikroskobik görüntülerde disektör sayım kurallarına göre mikroskop başında ya da monitör görüntüsünde partikül sayımı yapılabilmektedir (118,119). Etkin ve kısmen kolay kullanılması, optik disektörle sayım yöntemini bir çok yöntemle kıyaslandığında avantajlı hale getirmektedir (117).

OPTİK PARÇALAMA YÖNTEMİNE GÖRE TOPLAM NÖRON SAYISININ HESAPLANMASI

Kesit alma ve kesit örnekleme oranı (KeÖO)

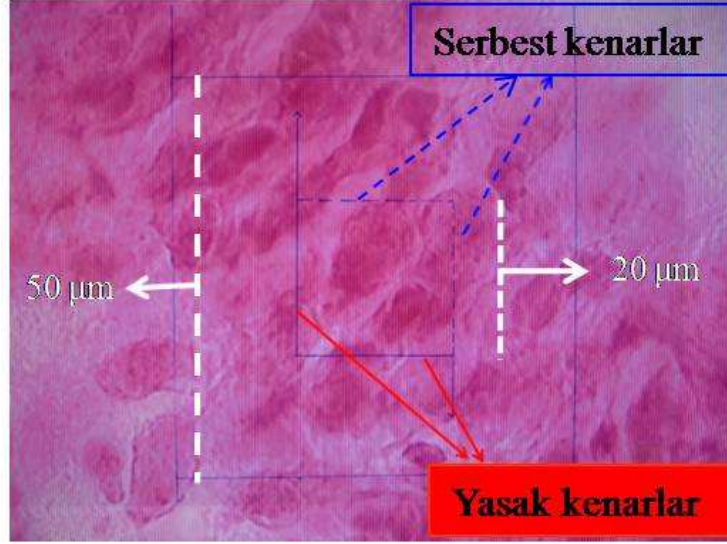
Deney hayvanları postnatal 18. günde kısa süreli eter anestezisi altında servikal dislokasyon ve dekapitasyon ile sakrifiye edildikten sonrası kraniyotomi ile tüm beyin dokusu dikkatli bir şekilde çıkarıldı. Çıkarılan beyin dokusu önceden -15 C° ye ayarlanmış kriyostat içine konuldu. Beyin dokusunun donması için yaklaşık 60 dakika beklenildikten sonra kesit alma işlemine geçildi. Her sıçanın tüm beyin dokusundan horizontal planda, 150 µm kalınlıkta, 48-56 kesit lam üzerine alındı. (112,119). Kesitler sırasıyla numaralandırıldıktan sonra boyama işlemi yapıldı ve boyanan kesitler arasından hipokampus görünümü mevcut olan kesitler ayrıldı. Ayrılan bu kesitlerin içinden STRÖ yöntemine uygun bir şekilde, sırasıyla, her dört kesitten bir tanesinde sayım yapıldı. Sayım yapılacak ilk kesit, ilk dört kesit arasından rastgele seçildi (yani ilk dört kesit arasından rastgele seçilen birinci kesit ve sonradan gelen her dördüncü kesitte sırasıyla sayım yapıldı). Her sıçanın beyin kesitlerinde STRÖ ve optik parçalama yöntemine uygun bir şekilde ayrı ayrı sayım işlemi gerçekleştirildi. Böylece optik parçalama yöntemine göre toplam hücre sayısını hesaplamak için gerekli parametrelerden biri olan, kesit örnekleme oranı belirlenmiş oldu (KeÖO=1/4) (107,112,113,119).

Alan örnekleme oranı (AÖO)

Optik parçalama yöntemine göre toplam tanecik sayımı, seçilen bu kesitler üzerinde önceden belirlenmiş olan “optik parçalama örnekleme şeması”na uygun olarak yapılmaktadır. “optik parçalama örnekleme şeması”na göre örnekleme, seçilen kesitlerde ilgilenilen bölgenin alanının mikroskop altında X ve Y eksenleri boyunca önceden belirlenmiş olan düzenli X, Y adımlamaları ile taranarak optik parçalara bölünmesi ve örnekleme ile gerçekleştirilmektedir. Hücre sayımının gerçekleştirildiği tarafsız sayım çerçevesi, sistematik-tekdüze-rastgele örnekleme yöntemine göre bölünen bu optik parçalardan (X, Y adımlamaları ile ortaya çıkan alanlar) ilk parçanın içine rastgele yerleştirilir. Böylece tarafsız sayım çerçevesinin aynı kesit üzerindeki diğer optik parçalardaki konumu da belirlenmiş olur (aynı alana yerleştirilir). Daha sonra ilgilenilen alan üzerinde (hipokampus) tarafsız sayım çerçevesinin yerleştirildiği her bir optik parçada optik disektör aracılığı ile tanecik sayımı (nöron) yapılır. Toplam nöron sayısını hesaplamak için gerekli diğer bir parametre olan “alan örnekleme oranı” (AÖO); tarafsız sayım çerçevesi alanının, “x,y adımlama alanı” na oranlanması ile belirlenir (107,112,119).

Çalışmamızda X, Y adımlama alanını belirlemek için önce Thoma lamı ile görüntü kalibrasyonu yapıldı. Thoma lamı çizgilerinin X100 büyütmedeki görüntüsü ışık mikroskobuna (Olympus CX31) monte edilmiş video kamera (Sony Exwave HAD Color Video Camera SSc-DC88P) aracılığı ile monitöre (Sony LCD monitor LMD-2010) aktarıldı. Thoma lamına ait bir küçük karenin X100 büyütmedeki monitör görüntüsü bulundu ve netleştirildi. Daha sonra monitördeki bu kare görüntüsü bir cetvel ve asetat kalemi yardımı ile monitör üzerine yerleştirilen asetata çizildi. Böylece asetat üzerinde kenar uzunluğu 50 µm (0.05 mm) olan bir kare elde edildi (Thoma lamının bir küçük karesinin kenar uzunluğu 0.05 mm'dir). Thoma lamı aracılığı ile görüntü kalibrasyonu yapılarak elde edilen bu karenin ortasına, gerekli kalibrasyon yapılarak daha sonra içinde hücre sayımı yapılacak olan bir kenar uzunluğu 20 µm kare şeklinde tarafsız sayım çerçevesi çizildi. Böylece tarafsız sayım çerçevesinin alanı $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m} = 400 \mu\text{m}^2$ olarak belirlenmiş oldu. Tarafsız sayım çerçevesinin birbirine dik sol ve alt kenarları yasak kenarlar, diğer iki kenar ise serbest kenarlar olarak tayin edildi. Yasak kenarların uzantıları da çizilerek görüntü kalibrasyon işlemimiz tamamlanmış oldu. Üzerine Thoma lamının bir küçük

karesi ve bu karenin ortasına tarafsız sayım çerçevesi çizilen asetata monitör üzerine yapıştırılarak çalışma boyunca monitör üzerinde adımlama ve hücre sayımı işlemlerinde kullanıldı (120). Şekil-12’de çalışmamızda kullanılan, Thoma lamına ait bir küçük karenin içine çizilen tarafsız sayım çerçevesi görülmektedir.



Şekil-12: Çalışmamızda kullanılan, Thoma lamına ait bir küçük karenin içine çizilen tarafsız sayım çerçevesi.

Optik parçalama yöntemine göre hücre sayımı yapmak üzere kesitler mikroskop üzerine yerleştirildi. Sol hipokampus görüntüsü X4 büyütmede bulunduktan sonra mikroskop objektifi X100 büyütme getirildi. Görüntü netliği sağlandıktan sonra mikroskop tablası X-ekseninde 300 µm, Y-ekseninde 300 µm hareket ettirilmek suretiyle monitör görüntüsü üzerinde X, Y adımlamaları yapıldı. Böylece bu iki eksenindeki adımlama alanı (X, Y adımlama alanı) 300 µm x 300 µm = 90 000 µm² olarak belirlenmiş oldu. Monitördeki kesit görüntüsü üzerinde her adımlama mesafesini belirlemek için daha önceden asetata çizilmiş, kenar uzunluğu 50 µm olan kare kullanıldı. Sonuç olarak sol hipokampusun CA1, CA2, CA3 stratum piramidalis alanları X ve Y eksenlerinde yukarıda tanımlanan aralıklarla taranmış oldu. Daha sonra tarafsız sayım çerçevesinin alanı; X, Y adımlama alanına oranlanarak AÖO hesaplandı. Çalışmamızda AÖO $400 \mu\text{m}^2 / 90\,000 \mu\text{m}^2 = 1/225$ olarak bulundu.

Kesit kalınlığının ölçümü

Işık mikroskopunda, mikroskopun mikrovidası döndürülerek kesit içinde Z-ekseni boyunca optik olarak ilerlerken ilk netleşen görüntü ile son netleşen görüntü arasındaki mesafe kesit kalınlığını verir. Bu mesafe mikrovida üzerindeki rakamların okunması ile ölçülebilmektedir. Kesit kalınlığını hesaplayabilmek için mikroskopun mikrovidasının her bir derecelik dönüşünün Z-ekseninde ne kadarlık mesafeye karşılık geldiğinin bilinmesi gerekmektedir (116). Çalışmamızda kesit kalınlığını hesaplamak için önce ışık mikroskopunun mikrovidası bir lamel aracılığıyla kalibre edildi. Lamelin üst ve alt yüzeylerine sırasıyla kırmızı ve mavi renkte iki farklı çizgi çizildi. Bu lamel daha sonra bir lam üzerine yapıştırıldı. Mikroskopun mikrovidası döndürülerek lamelin üst yüzeyine çizilen kırmızı çizgi netleştirildi. Bu durumdaki mikrovida değeri derece olarak kaydedildi. Daha sonra mikrovida döndürülmeye devam edilerek lamelin altına çizilen mavi çizgiye ulaşıldı. Mikrovidanın bu konumdaki değeri de derece olarak kaydedildi. Mikrovida üzerinde okunan bu iki değer arasındaki fark derece olarak hesaplandı. Mikrovida üzerindeki bu değerlerin gerçek karşılığını bulmak için lamel, küçük bir parafin damlası kullanılarak 90° dik konumda mikroskop tablasına yerleştirildi. Üst ve alt yüzeyleri çizilmiş olan lamelin kenar görüntüsü X100 büyütmede önceden Thoma lamı ile kalibre edilmiş olan monitöre aktarıldı. Monitör görüntüsünde lamelin gerçek kalınlığı ölçüldü. Lamelin gerçek kalınlığı ile mikrovida döndürülerek bulunan derece cinsinden kalınlık değerleri karşılaştırıldı. Böylece mikrovidanın bir derecelik dönüşünün Z-ekseninde ne kadarlık mesafeye karşılık geldiği μm olarak bulundu. Çalışmamızda kullanılan mikroskopun mikrovidasındaki bir derecelik dönüşün 0,83 μm 'ye karşılık geldiği bulunmuştur.

Mikroskopun mikrovidası kalibre edildikten sonra kesit kalınlıkları hesaplandı. Mikrovidanın döndürülmesi ile kesitler içinde z-ekseni boyunca optik olarak ilerlendi. Bu hareket esnasında ilk netleşen görüntü ile en son netleşen görüntü arasındaki fark, mikrovida üzerinde derece olarak belirlendi. Mikrovidanın kalibrasyonu sonucunda elde edilen değer ile çarpılarak her kesit için kesit kalınlığı (t) μm olarak hesaplandı. Daha sonra her sıçan için ortalama kesit kalınlığı (t_{ort}) bulundu (116,120).

Kalınlık örnekleme oranı (KaÖÖ)

Her kesit için kesit kalınlığı belirlendikten sonra her kesitin üst seviyesinde 5 µm kalınlığında güvenlik kuşağı bırakıldı. Bu optik seviyeden sonra tarafımızca belirlenmiş olan disektör yüksekliğinde (h) sayım yapıldı. Sayım yapılan kesitlerin kalın kesitler olması nedeniyle bütün kesitlerde aynı disektör yüksekliğinde (30 µm) sayım yapılabilirdi. Bu nedenle ortalama disektör yüksekliği (h_{ort}) sabit kaldı. Her kesitte farklı derinlikte alt güvenlik kuşağı bırakıldı; ancak bu değer hiçbir zaman 5µm'den daha az olmadı. Her hayvan için ortalama disektör yüksekliği (h_{ort}) ortalama kesit kalınlığına (t_{ort}) bölünerek kalınlık örnekleme oranı ($KaÖÖ = h_{ort} / t_{ort}$) hesaplandı (119).

Nöron sayımı

Hipoksi-iskemiye hipokampusun daha hassas olduğu bilinmektedir; ancak hipoksik-iskemik beyin hasarı modellerinde hipokampusun CA1 ve CA3 alanlarının hipoksi-iskemiye duyarlılıklarının farklı olduğu belirtilmektedir (22,23,24).

Çalışmamızda sol hipokampusün CA1 ve CA3 stratum pyramidalis tabakalarında bulunan hücrelerin nükleusları ayrı ayrı sayıldı. CA2 alanı dar bir alan olup, çeşitli bakımlardan CA3 alanının uç bir parçası gibidir. Bu alandaki stratum pyramidalis tabakasının hücre gövdeleri CA3'teki gibi büyüktür (100). Bu nedenle bu alandaki piramidal hücre nükleusları CA3 alanı içinde sayıldı ve sayım sonuçları CA2-3 olarak gösterildi. Her piramidal hücrenin tek bir çekirdeği olması nedeniyle, hesaplamalarda çekirdek sayıları hücre sayısı olarak kabul edildi (112).

Mikroskoba yerleştirilen kesitlerde X4 büyütmede hipokampus belirlendikten sonra kesit üzerine bir damla immersiyon yağı damlatıldı ve objektif X100 büyütme getirildi. Hipokampusun CA1 ve CA2-3 stratum pyramidalis tabakaları belirlendikten sonra daha önce tanımlanan X ve Y eksenlerindeki adımlamalara uyularak ilgilenilen hipokampus alanlarında, X, Y adımlama alanı içerisinde, disektör sondası ile disektör sayım kurallarına uygun şekilde nükleus sayımı yapıldı. Belirlenen kesit kalınlığında kesitin üst seviyesinde 5 µm güvenlik kuşağı bırakıldı. Her kesitte belirlenen disektör yüksekliği ($h = 30 \mu m$) boyunca optik olarak ilerlendi.

Optik disektör yüksekliği boyunca, tarafsız sayım çerçevesinin içine düşen ve serbest kenarlarla kesişen nükleuslar sayıldı. Yasak kenarlara ve bunların uzantılarına temas eden nükleuslar sayım dışı bırakıldı. Kesitlerin kalın kesitler olması nedeniyle, bütün kesitlerde alt güvenlik kuşağının derinliği 5 µm'den daha büyüktü. Bütün kesitlerde her iki güvenlik kuşağı içerisinde görüntüye giren nükleuslar sayıma dahil edilmedi. Üst güvenlik kuşağı ile optik disektör sınırındaki nükleuslar sayıma dahil edilirken, alt güvenlik kuşağı ile optik disektör sınırındaki nükleuslar sayıma dahil edilmedi. Her kesit için sayılan nöron sayısı (Q^- ; disektör partikül sayısı) kaydedilerek, bunların toplanmasıyla her sıçan için sayılan nöron sayısı (ΣQ^- ; toplam disektör partikül sayısı) bulundu.

Toplam nöron sayısı

Optik parçalama yöntemi ile elde edilen tüm bu parametreler, toplam nöron sayısının hesaplanmasında kullanılan aşağıdaki formüle uygun olarak yerleştirildi. Her sıçanın sol hipokampus CA1 ve CA2-3 stratum pyramidalis tabakalarındaki toplam nöron sayıları hesaplandı.

$$N(\text{toplam}) = (\Sigma Q^-) \times (1/ K_{e\ddot{O}O}) \times (1/ A_{\ddot{O}O}) \times (1/ K_{a\ddot{O}O}) \quad (112).$$

ÖRNEKLEME PLANININ YETERLİLİĞİ VE HATA KATSAYISI

Örnekleme planının etkinliğini değerlendirmek için hata katsayısı (HK) kullanılır. Örnekleme planının, çalışma için uygun olup olmadığı hakkında bilgi verir ve her sıçana ait hata katsayısı hesaplanarak kontrol edilmektedir. Hata katsayısı hesaplanırken, her sıçanda sayılan kesit sayısı ve her kesitte sayılan disektör partikül sayıları (Q^-) kullanılmaktadır. Hata katsayısının %10'un altında olması, çalışmanın örnekleme planının yeterli ve çalışmanın güvenilir olduğunu göstermektedir. Tablo-2'de SF-1 nolu sıçana ait kesitlerdeki CA1 alanlarının disektör partikül sayıları ve hata katsayısının hesaplanmasında kullanılan parametreler gösterilmiştir.

Tablo-2: SF-1 nolu sığana ait kesitlerde CA1 alanlarındaki disektör partikül sayıları ve hata katsayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler.

Kesit No	Q^-	$Q^- \times Q^-$	$Q^- \times (Q^- + 1)$	$Q^- \times (Q^- + 2)$
1	7	49	91	105
2	13	169	195	143
3	15	225	165	135
4	11	121	99	88
5	9	81	72	54
6	8	64	48	56
7	6	36	42	36
8	7	49	42	
9	6	36		
Toplam	$\sum Q^- = 82$	A=830	B=754	C=617

Q^- : Kesite ait CA1 alanındaki disektör partikül sayısı, Q^-+1 : Bir sonraki kesite ait CA1 alanındaki disektör partikül sayısı, Q^-+2 : İki sonraki kesite ait CA1 alanındaki disektör partikül sayısı, $\sum Q^-$: Tüm kesitlere ait CA1 alanlarındaki toplam disektör partikül sayısı.

$$\text{Hata katsayısı (HK)} = \sqrt{[(3A+C-4B)/12] / \sum Q^-} \quad (112).$$

Buna göre SF-1 nolu sığana ait kesitlerdeki CA1 alanının hata katsayısı 0,033 bulundu.

İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

İstatistiksel analiz “SPSS for Windows” istatistik programının 10.0 versiyonu kullanılarak yapıldı. Grupların ortalama toplam nöron sayıları arasındaki farklılık ANOVA (varyans analizi) ile değerlendirilirken, grupların kendi aralarındaki farklılıkların incelenmesinde Tukey testi kullanıldı. İkili karşılaştırmalar için istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

SIÇANLARIN VÜCUT AĞIRLIKLARI, HÜCRE SAYIM SONUÇLARI VE HÜCRE SAYIMINDA KULLANILAN PARAMETRELER

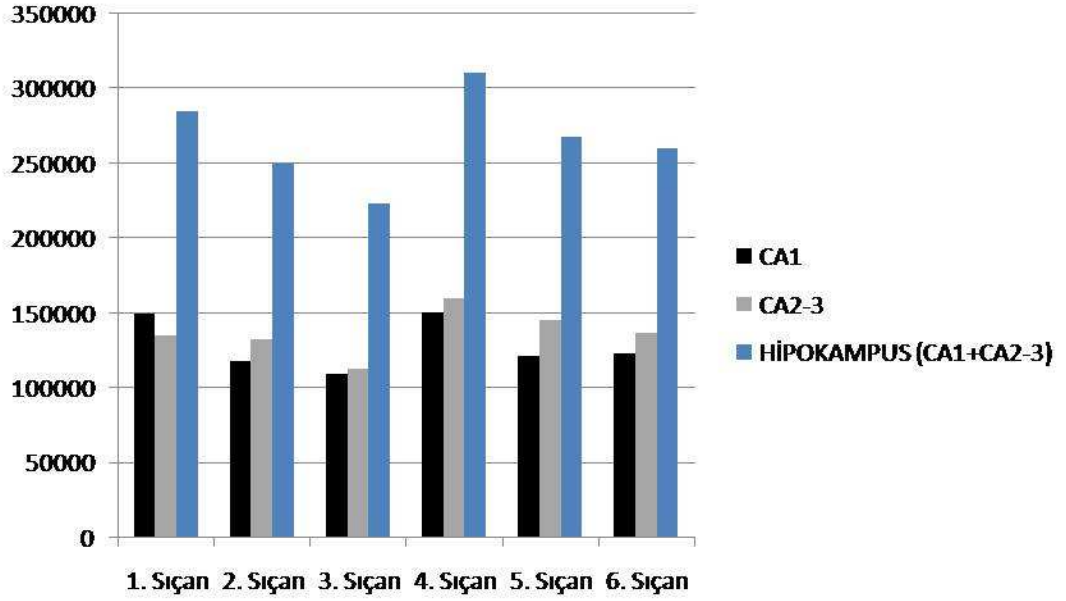
Kontrol grubu (SF grubu) altı term yenidoğan sıçanın 13 günlükken ölçülen vücut ağırlıkları, sol hipokampus CA1 stratum piramidalis alanı (CA1), sol hipokampus CA2-3 stratum piramidalis alanı (CA2-3) ve tüm sol hipokampusdaki (CA1+CA2-3) toplam nöron sayıları ile toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler Tablo-3’de gösterilmiştir.

Tablo-3: SF grubu sıçanların 13 günlükken vücut ağırlıkları, sol hipokampus CA1 stratum piramidalis alanı (CA1), sol hipokampus CA2-3 stratum piramidalis alanı (CA2-3) ve tüm sol hipokampusdaki (CA1+CA2-3) toplam nöron sayıları ile toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler

PARAMETRELER	SIÇANLAR					
	1	2	3	4	5	6
Vücut ağırlığı (g)	11,5	10,6	11,8	13,4	14,2	12,6
1/KeÖO	4	4	4	4	4	4
Ortalama kesit kalınlığı (t_{ort}) (μm)	60,83	60,42	58,09	62,78	62,34	59,44
Disektör yüksekliği (h_{ort}) (μm)	30	30	30	30	30	30
1/KaÖO	2,02	2,01	1,93	2,09	2,07	1,98
1/AÖO	225	225	225	225	225	225
CA1 disektör partikül sayısı (Q^-_{CA1})	82	65	63	80	64	69
CA1 hata katsayısı (HK_{CA1})	0,033	0,047	0,042	0,047	0,055	0,039
CA1 toplam nöron sayısı (N_1)	149641	117819	109790	150672	121563	123040
CA2-3 disektör partikül sayısı (Q^-_{CA2-3})	74	73	65	85	78	77
CA2-3 hata katsayısı (HK_{CA2-3})	0,039	0,057	0,049	0,038	0,053	0,045
CA2-3 toplam nöron sayısı ($N_{2,3}$)	135042	132319	113275	160089	145875	137306
Toplam disektör partikül sayısı (Q^-)	156	138	128	165	142	146
Hipokampus için hata katsayısı (HK_H)	0,033	0,047	0,041	0,038	0,050	0,038
Toplam hipokampus nöron sayısı (N) ($N_1+N_{2,3}$)	284683	250138	223065	310761	267438	260346

KeÖO: Kesit örnekleme oranı, KaÖO: Kalınlık örnekleme oranı, AÖO: Alan örnekleme oranı

Perinatal hipoksik-iskemik ensefalopati modeli oluşturulup hipoksi-iskemi sonrası 5 gün süreyle 0,1 ml serum fizyolojik verilen term yenidoğan sıçanlarda (SF grubu) sol hipokampus CA1 stratum piramidalis alanı (CA1), CA2-3 stratum piramidalis alanı (CA2-3) ve tüm sol hipokampusdaki (CA1+CA2-3) toplam nöron sayıları Şekil-13'de gösterilmiş olup; tüm sol hipokampusda toplam nöron sayısı en düşük 223065, en yüksek 310761 bulunmuştur.



Şekil-13: SF grubu sıçanların sol hipokampus CA1 stratum piramidalis alanı (CA1), CA2-3 stratum piramidalis alanı (CA2-3) ve tüm sol hipokampusdaki (CA1+CA2-3) toplam nöron sayıları

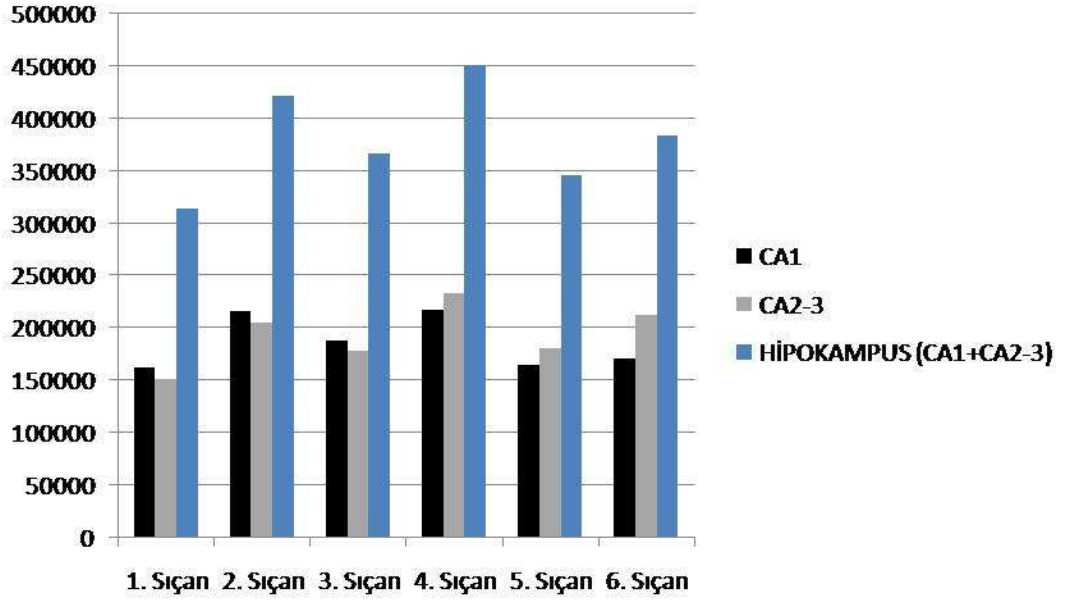
Valproik asit grubu (VA grubu) altı term yenidoğan sıçanın 13 günlükken ölçülen vücut ağırlıkları, sol hipokampus CA1 stratum piramidalis alanı (CA1), sol hipokampus CA2-3 stratum piramidalis alanı (CA2-3) ve tüm sol hipokampusdaki (CA1+CA2-3) toplam nöron sayıları ile toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler Tablo-4’de gösterilmiştir.

Tablo-4: VA grubu sıçanların 13 günlükken vücut ağırlıkları, sol hipokampus CA1 stratum piramidalis alanı (CA1), sol hipokampus CA2-3 stratum piramidalis alanı (CA2-3) ve tüm sol hipokampusdaki (CA1+CA2-3) toplam nöron sayıları ile toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler

PARAMETRELER	SIÇANLAR					
	1	2	3	4	5	6
Vücut ağırlığı (g)	12,3	11,9	13,2	14,1	10,1	12,6
1/KeÖO	4	4	4	4	4	4
Ortalama kesit kalınlığı (t_{ort}) (μm)	63,09	59,56	60,52	62,14	61,02	61,55
Disektör yüksekliği (h_{ort}) (μm)	30	30	30	30	30	30
1/KaÖO	2,10	1,98	2,01	2,07	2,03	2,05
1/AÖO	225	225	225	225	225	225
CA1 disektör partikül sayısı (Q_{CA1}^-)	86	121	104	117	90	93
CA1 hata katsayısı (HK_{CA1})	0,040	0,045	0,046	0,042	0,050	0,055
CA1 toplam nöron sayısı (N_1)	162772	216202	188822	218111	164754	171724
CA2-3 disektör partikül sayısı (Q_{CA2-3}^-)	80	115	98	125	99	115
CA2-3 hata katsayısı (HK_{CA2-3})	0,043	0,039	0,055	0,046	0,051	0,039
CA2-3 toplam nöron sayısı ($N_{2,3}$)	151416	205482	177928	233025	181229	212347
Toplam disektör partikül sayısı (Q^-)	166	236	202	242	189	208
Hipokampus için hata katsayısı (HK_H)	0,041	0,040	0,048	0,037	0,045	0,043
Toplam hipokampus nöron sayısı (N) ($N_1+N_{2,3}$)	314188	421684	366750	451136	345983	384071

KeÖO: Kesit örnekleme oranı, KaÖO: Kalınlık örnekleme oranı, AÖO: Alan örnekleme oranı

Perinatal hipoksik-iskemik ensefalopati modeli oluşturulup hipoksi-iskemi sonrası 5 gün süreyle 400 mg/kg/gün valproik asit verilen term yenidoğan sıçanlarda (VA grubu) sol hipokampus CA1 stratum piramidalis alanı (CA1), CA2-3 stratum piramidalis alanı (CA2-3) ve tüm sol hipokampusdaki (CA1+CA2-3) toplam nöron sayıları Şekil-14'de gösterilmiş olup; tüm sol hipokampusda toplam nöron sayısı en düşük 314188, en yüksek 451136 bulunmuştur.



Şekil-14: VA grubu sıçanların sol hipokampus CA1 stratum piramidalis alanı (CA1), CA2-3 stratum piramidalis alanı (CA2-3) ve tüm sol hipokampusdaki (CA1+CA2-3) toplam nöron sayıları

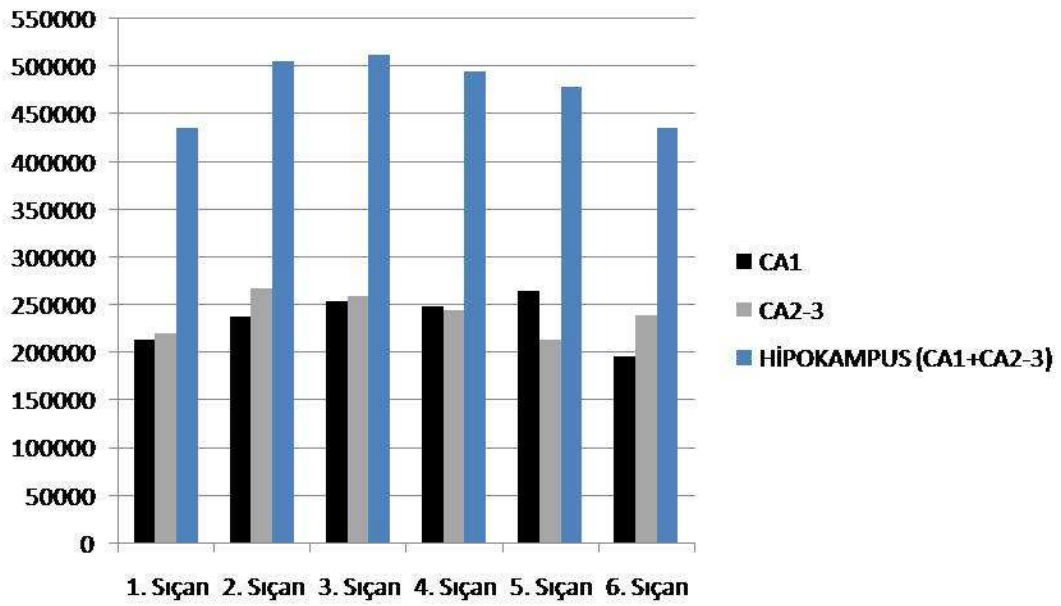
Valproik asit+Folik asit grubu (VA+FA grubu) altı term yenidoğan sıçanın 13 günlükken ölçülen vücut ağırlıkları, sol hipokampus CA1 stratum piramidalis alanı (CA1), sol hipokampus CA2-3 stratum piramidalis alanı (CA2-3) ve tüm sol hipokampusdaki (CA1+CA2-3) toplam nöron sayıları ile toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler Tablo-5’de gösterilmiştir.

Tablo-5: VA+FA grubu sıçanların 13 günlükken vücut ağırlıkları, sol hipokampus CA1 stratum piramidalis alanı (CA1), sol hipokampus CA2-3 stratum piramidalis alanı (CA2-3) ve tüm sol hipokampusdaki (CA1+CA2-3) toplam nöron sayıları ile toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler

PARAMETRELER	SIÇANLAR					
	1	2	3	4	5	6
Vücut ağırlığı (g)	10,2	12,6	11,9	12,1	14,3	13
1/KeÖO	4	4	4	4	4	4
Ortalama kesit kalınlığı (t_{ort}) (μm)	60,43	62,42	61,71	58,84	60,37	59,59
Disektör yüksekliği (h_{ort}) (μm)	30	30	30	30	30	30
1/KaÖO	2,01	2,08	2,05	1,96	2,01	1,98
1/AÖO	225	225	225	225	225	225
CA1 disektör partikül sayısı (Q^-_{CA1})	118	127	137	141	146	110
CA1 hata katsayısı (HK_{CA1})	0,049	0,049	0,056	0,049	0,054	0,052
CA1 toplam nöron sayısı (N_1)	213922	237820	253628	248893	264420	196647
CA2-3 disektör partikül sayısı (Q^-_{CA2-3})	122	143	140	139	118	134
CA2-3 hata katsayısı (HK_{CA2-3})	0,039	0,043	0,055	0,047	0,049	0,041
CA2-3 toplam nöron sayısı ($N_{2,3}$)	221173	267781	259182	245362	213709	239551
Toplam disektör partikül sayısı (Q^-)	240	270	277	280	264	234
Hipokampus için hata katsayısı (HK_H)	0,041	0,045	0,053	0,046	0,041	0,052
Toplam hipokampus nöron sayısı (N) ($N_1+N_{2,3}$)	435095	505601	512810	494255	478129	436198

KeÖO: Kesit örnekleme oranı, KaÖO: Kalınlık örnekleme oranı, AÖO: Alan örnekleme oranı

Perinatal hipoksik-iskemik ensefalopati modeli oluşturulup hipoksi-iskemi sonrası 5 gün süreyle 400 mg/kg/gün valproik asit ve 80 µg/kg/gün folik asit verilen term yenidoğan sıçanlarda (VA+FA grubu) sol hipokampus CA1 stratum piramidalis alanı (CA1), CA2-3 stratum piramidalis alanı (CA2-3) ve tüm sol hipokampusdaki (CA1+CA2-3) toplam nöron sayıları Şekil-15’de gösterilmiş olup; tüm sol hipokampusda toplam nöron sayısı en düşük 435095, en yüksek 512810 bulunmuştur.



Şekil-15: VA+FA grubu sıçanların sol hipokampus CA1 stratum piramidalis alanı (CA1), CA2-3 stratum piramidalis alanı (CA2-3) ve tüm sol hipokampusdaki (CA1+CA2-3) toplam nöron sayıları

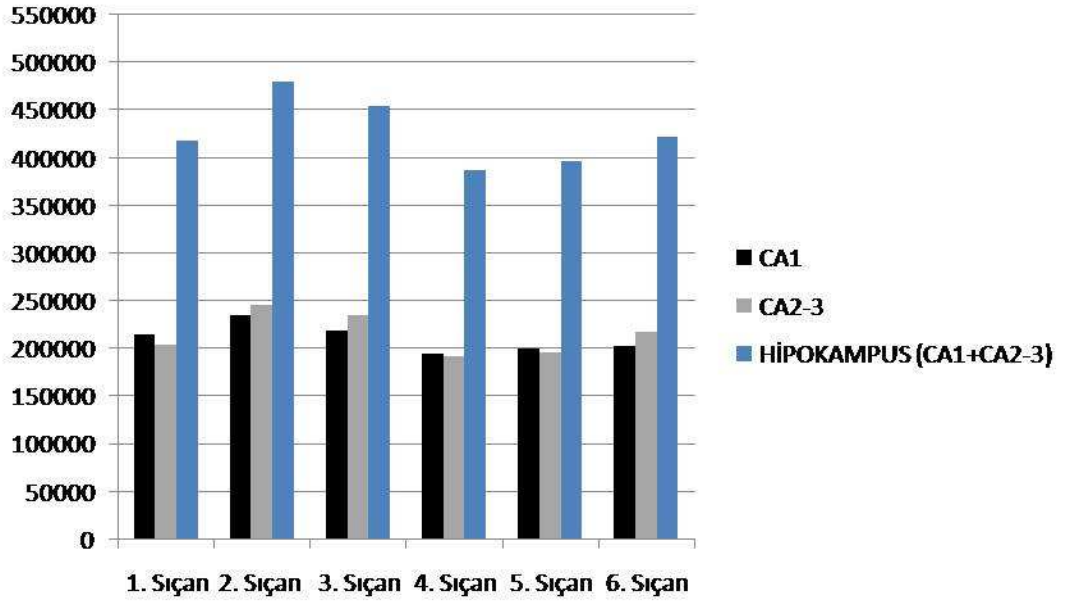
Folik asit grubu (FA grubu) altı term yenidoğan sıçanın 13 günlükken ölçülen vücut ağırlıkları, sol hipokampus CA1 stratum piramidalis alanı (CA1), sol hipokampus CA2-3 stratum piramidalis alanı (CA2-3) ve tüm sol hipokampusdaki (CA1+CA2-3) toplam nöron sayıları ile toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler Tablo-6’da gösterilmiştir.

Tablo-6: FA grubu sıçanların 13 günlükken vücut ağırlıkları, sol hipokampus CA1 stratum piramidalis alanı (CA1), sol hipokampus CA2-3 stratum piramidalis alanı (CA2-3) ve tüm sol hipokampusdaki (CA1+CA2-3) toplam nöron sayıları ile toplam nöron sayısı hesaplanmasında kullanılan parametreler

PARAMETRELER	SIÇANLAR					
	1	2	3	4	5	6
Vücut ağırlığı (g)	12,4	13,9	11	10,4	13,2	14
1/KeÖO	4	4	4	4	4	4
Ortalama kesit kalınlığı (t_{ort}) (μm)	60,17	61,63	62,08	60,35	61,32	59,55
Disektör yüksekliği (h_{ort}) (μm)	30	30	30	30	30	30
1/KaÖO	2,00	2,05	2,06	2,01	2,04	1,98
1/AÖO	225	225	225	225	225	225
CA1 disektör partikül sayısı (Q^-_{CA1})	119	127	118	108	109	114
CA1 hata katsayısı (HK_{CA1})	0,050	0,042	0,042	0,042	0,035	0,050
CA1 toplam nöron sayısı (N_1)	214806	234810	219763	195534	200516	203661
CA2-3 disektör partikül sayısı (Q^-_{CA2-3})	113	133	126	106	107	122
CA2-3 hata katsayısı (HK_{CA2-3})	0,050	0,044	0,045	0,041	0,044	0,049
CA2-3 toplam nöron sayısı ($N_{2,3}$)	203976	245903	234662	191913	196837	217953
Toplam disektör partikül sayısı (Q^-)	232	260	244	214	216	236
Hipokampus için hata katsayısı (HK_H)	0,050	0,033	0,033	0,034	0,037	0,048
Toplam hipokampus nöron sayısı (N) ($N_1+N_{2,3}$)	418782	480713	454425	387447	397353	421614

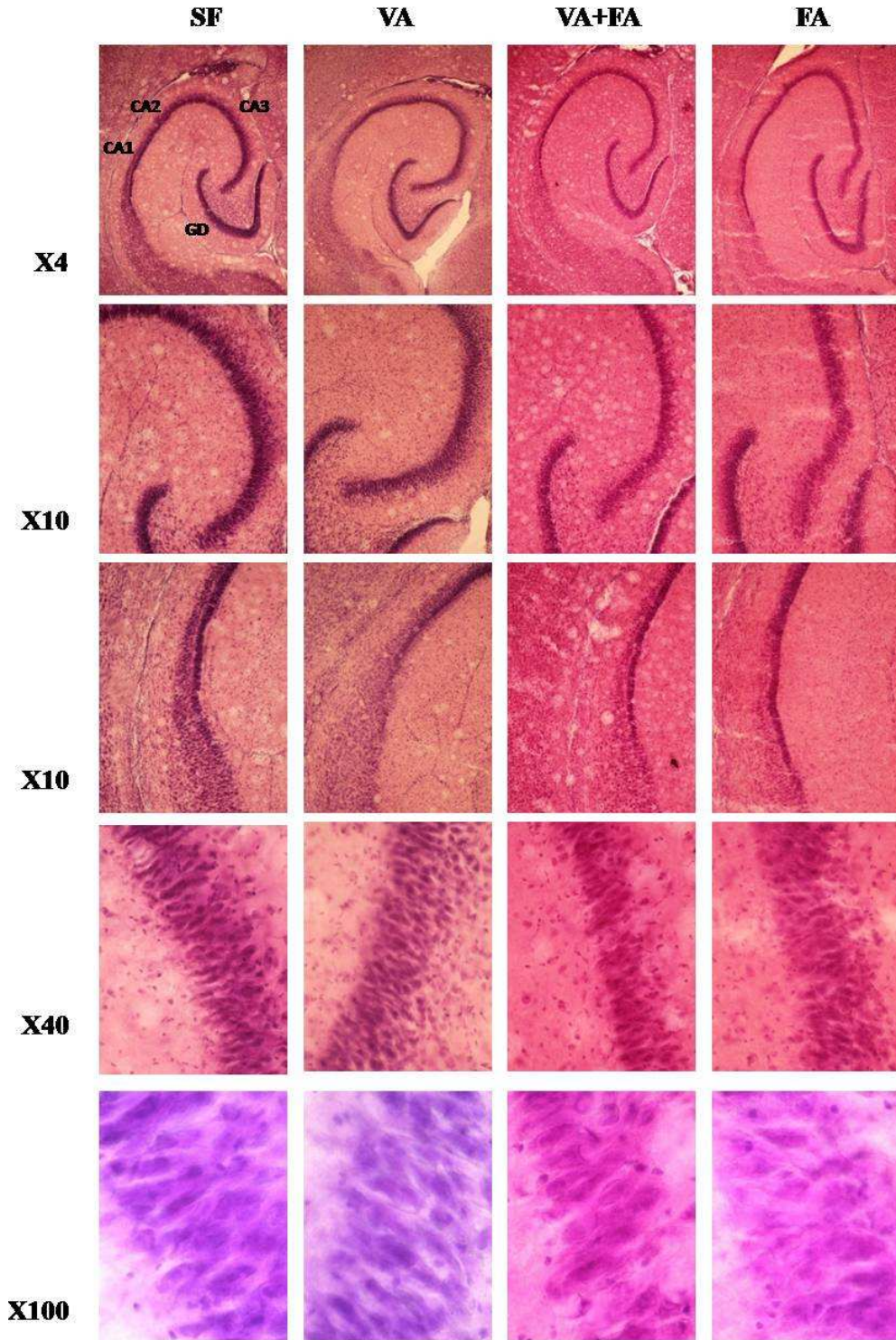
KeÖO: Kesit örnekleme oranı, KaÖO: Kalınlık örnekleme oranı, AÖO: Alan örnekleme oranı

Perinatal hipoksik-iskemik ensefalopati modeli oluşturulup hipoksi-iskemi sonrası 5 gün süreyle 80 µg/kg/gün folik asit verilen term yenidoğan sıçanlarda (FA grubu) sol hipokampus CA1 stratum piramidalis alanı (CA1), CA2-3 stratum piramidalis alanı (CA2-3) ve tüm sol hipokampusdaki (CA1+CA2-3) toplam nöron sayıları Şekil-16'de gösterilmiş olup; tüm sol hipokampusda sayılan toplam nöron sayısı en düşük 387447, en yüksek 480713 bulunmuştur.



Şekil-16: FA grubu sıçanların sol hipokampus CA1 stratum piramidalis alanı (CA1), CA2-3 stratum piramidalis alanı (CA2-3) ve tüm sol hipokampusdaki (CA1+CA2-3) toplam nöron sayıları

Her deney grubundan bir sıçana ait hipokampus görüntüleri farklı mikroskop büyütmelerinde Şekil-17’de görülmektedir.



Şekil-17: Her deney grubundan bir sıçana ait farklı mikroskop büyütmelerinde hipokampus görüntüleri. Kesitler Hematoksilen-Eozin ile boyanmıştır.

GD: Girus dentatus

BÜTÜN GRUPLARIN SOL HİPOKAMPUS CA1, CA2-3 STRATUM PİRAMİDALİS ALANLARI VE TÜM SOL HİPOKAMPUSTAKİ TOPLAM NÖRON SAYISI ORTALAMALARI

SF grubu sıçanlarda CA1 stratum piramidalis alanı toplam nöron sayısı ortalaması (SF-CA1) 128754 ± 17206 , CA2-3 stratum piramidalis alanı toplam nöron sayısı ortalaması (SF-CA2-3) 137317 ± 15491 , tüm sol hipokampus toplam nöron sayısı ortalaması (SF-CA1+CA2-3) 266071 ± 29938 bulunmuştur.

VA grubu sıçanlarda CA1 stratum piramidalis alanı toplam nöron sayısı ortalaması (VA-CA1) 187064 ± 25056 , CA2-3 stratum piramidalis alanı toplam nöron sayısı ortalaması (VA-CA2-3) 193571 ± 29069 , tüm sol hipokampus toplam nöron sayısı ortalaması (VA-CA1+CA2-3) 380635 ± 49951 bulunmuştur.

VA+FA grubu sıçanlarda CA1 stratum piramidalis alanı toplam nöron sayısı ortalaması (VA+FA-CA1) 235888 ± 25783 , CA2-3 stratum piramidalis alanı toplam nöron sayısı ortalaması (VA+FA-CA2-3) 241126 ± 21008 , tüm sol hipokampus toplam nöron sayısı ortalaması (VA+FA-CA1+CA2-3) 477014 ± 34118 bulunmuştur.

FA grubu sıçanlarda CA1 stratum piramidalis alanı toplam nöron sayısı ortalaması (FA-CA1) 211515 ± 14557 , CA2-3 stratum piramidalis alanı toplam nöron sayısı ortalaması (FA-CA2-3) 215207 ± 21607 , tüm sol hipokampus toplam nöron sayısı ortalaması (FA-CA1+CA2-3) 426722 ± 35147 bulunmuştur. Grupların tüm alanlarda toplam nöron sayısı ortalamaları Tablo-7'de gösterilmiştir.

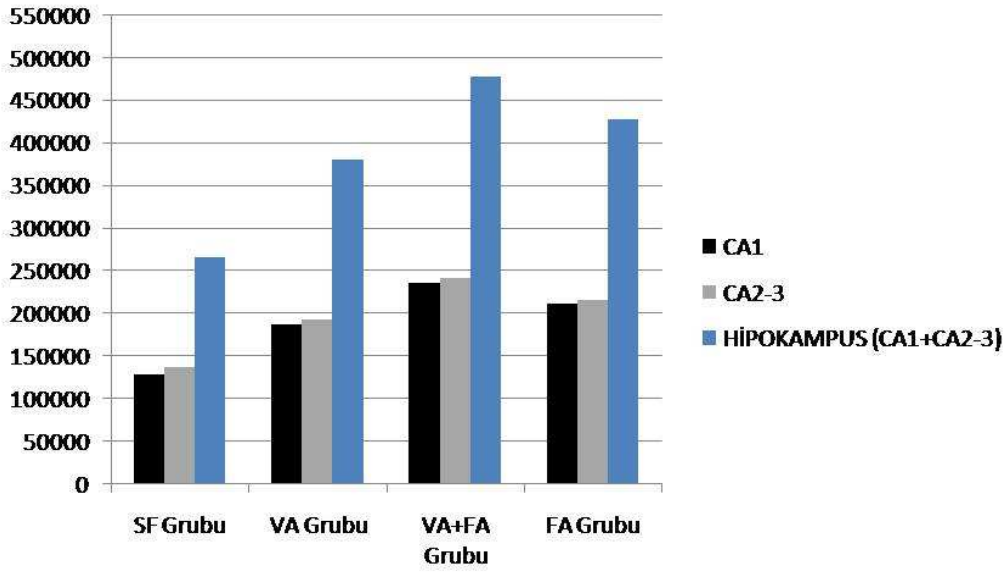
Tablo-7: Grupların sol hipokampus CA1 stratum piramidalis alanı (CA1), CA2-3 stratum piramidalis alanı (CA2-3) ve tüm sol hipokampus (CA1+CA2-3) toplam nöron sayısı ortalamaları

GRUPLAR	ORTALAMA TOPLAM NÖRON SAYILARI		
	CA1	CA2-3	HİPOKAMPUS (CA1+CA2-3)
SF Grubu	128754±17206	137317±15491	266071±29938
VA Grubu	187064±25056	193571±29069	380635±49951
VA+FA Grubu	235888±25783	241126±21008	477014±34118
FA Grubu	211515±14557	215207±21607	426722±35147

SF grubu: Serum fizyolojik grubu (Kontrol grubu), VA grubu: Valproik asit grubu, VA+FA grubu: Valproik asit+Folik asit grubu, FA grubu: Folik asit grubu. Veriler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

Bu çalışma, gruplar arasında CA1, CA2-3 ve tüm sol hipokampus toplam nöron sayısı ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğunu göstermiştir ($p=0,0001$) (Şekil-18).

Tüm grupların sol hipokampus CA1stratum piramidalis alanı (CA1), CA2-3 stratum piramidalis alanı (CA2-3) ve tüm sol hipokampus (CA1+CA2-3) toplam nöron sayısı ortalamaları Şekil-18’de gösterilmiştir. En düşük CA1 toplam nöron sayısı ortalaması 128754 (SF grubunda), en yüksek 235888 (VA+FA grubunda); en düşük CA2-3 toplam nöron sayısı ortalaması 137317 (SF grubunda), en yüksek 241126 (VA+FA grubunda); en düşük tüm sol hipokampus (CA1+CA2-3) toplam nöron sayısı ortalaması 266071 (SF grubunda), en yüksek 477014 (VA+FA grubunda) bulunmuştur.



Şekil-18: Grupların ortalama toplam nöron sayıları

VA grubu, VA+FA grubu ve FA grubu sıçanların CA1 toplam nöron sayısı ortalaması, SF grubu sıçanların CA1 toplam nöron sayısı ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$). Tukey testi kullanılarak yapılan ikili karşılaştırmaların istatistiksel p değerleri Tablo 8’de gösterilmiştir.

VA grubu, VA+FA grubu ve FA grubu sıçanların CA2-3 toplam nöron sayısı ortalaması, SF grubu sıçanların CA2-3 toplam nöron sayısı ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$). Tukey testi kullanılarak yapılan ikili karşılaştırmaların istatistiksel p değerleri Tablo 8’de gösterilmiştir.

VA grubu, VA+FA grubu ve FA grubu sıçanların tüm sol hipokampus toplam nöron sayısı ortalaması, SF grubu sıçanların tüm sol hipokampus toplam nöron sayısı ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$). Tukey testi kullanılarak yapılan ikili karşılaştırmaların istatistiksel p değerleri Tablo 8’de gösterilmiştir.

VA+FA grubu sıçanların CA1 toplam nöron sayısı ortalaması, VA grubu sıçanların CA1 toplam nöron sayısı ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ($p = 0,004$) (Tablo 8).

VA grubu sıçanların CA1 toplam nöron sayısı ortalaması ile FA grubu sıçanların CA1 toplam nöron sayısı ortalaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p=0,223$) (Tablo 8).

VA+FA grubu sıçanların CA2-3 toplam nöron sayısı ortalaması, VA grubu sıçanların CA2-3 toplam nöron sayısı ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ($p=0,007$) (Tablo 8).

VA grubu sıçanların CA2-3 toplam nöron sayısı ortalaması ile FA grubu sıçanların CA2-3 toplam nöron sayısı ortalaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p=0,360$) (Tablo 8).

VA+FA grubu sıçanların tüm sol hipokampus toplam nöron sayısı ortalaması, VA grubu sıçanların tüm sol hipokampus toplam nöron sayısı ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ($p=0,001$) (Tablo 8).

VA grubu sıçanların tüm sol hipokampus toplam nöron sayısı ortalaması ile FA grubu sıçanların tüm sol hipokampus toplam nöron sayısı ortalaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p=0,188$) (Tablo 8).

VA+FA grubu sıçanların CA1 toplam nöron sayısı ortalaması ile FA grubu sıçanların CA1 toplam nöron sayısı ortalaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p=0,225$) (Tablo 8).

VA+FA grubu sıçanların CA2-3 toplam nöron sayısı ortalaması ile FA grubu sıçanların CA2-3 toplam nöron sayısı ortalaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p=0,217$) (Tablo 8).

VA+FA grubu sıçanların tüm sol hipokampus toplam nöron sayısı ortalaması ile FA grubu sıçanların tüm sol hipokampus toplam nöron sayısı ortalaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p=0,134$) (Tablo 8).

Tablo-8: Grupların CA1, CA2-3, tüm sol hipokampus toplam nöron sayısı ortalamaları açısından Tukey testi kullanılarak yapılan ikili karşılaştırmalarının istatistiksel p değerleri

İkili Karşılaştırılan Gruplar	p Değerleri
SF-CA1 / VA-CA1	0,001*
SF-CA1 / VA+FA-CA1	0,0001*
SF-CA1 / FA-CA1	0,0001*
SF-CA2-3 / VA-CA2-3	0,002*
SF-CA2-3 / VA+FA-CA2-3	0,0001*
SF-CA2-3 / FA-CA2-3	0,0001*
SF-CA1+CA2-3 / VA-CA1+CA2-3	0,0001*
SF-CA1+CA2-3 / VA+FA-CA1+CA2-3	0,0001*
SF-CA1+CA2-3 / FA-CA1+CA2-3	0,0001*
VA-CA1 / VA+FA-CA1	0,004*
VA-CA1 / FA-CA1	0,223
VA-CA2-3 / VA+FA-CA2-3	0,007*
VA-CA2-3 / FA-CA2-3	0,360
VA-CA1+CA2-3 / VA+FA-CA1+CA2-3	0,001*
VA-CA1+CA2-3 / FA-CA1+CA2-3	0,188
VA+FA-CA1 / FA-CA1	0,225
VA+FA-CA2-3 / FA-CA2-3	0,217
VA+FA-CA1+CA2-3 / FA-CA1+CA2-3	0,134

SF-CA1: SF grubu sıçanların CA1 toplam nöron sayısı ortalaması, SF-CA2-3: SF grubu sıçanların CA2-3 toplam nöron sayısı ortalaması, SF-CA1+CA2-3: SF grubu sıçanların tüm sol hipokampus toplam nöron sayısı ortalaması, VA-CA1: VA grubu sıçanların CA1 toplam nöron sayısı ortalaması, VA-CA2-3: VA grubu sıçanların CA2-3 toplam nöron sayısı ortalaması, VA-CA1+CA2-3: VA grubu sıçanların tüm sol hipokampus toplam nöron sayısı ortalaması, FA-CA1: FA grubu sıçanların CA1 toplam nöron sayısı ortalaması, FA-CA2-3: FA grubu sıçanların CA2-3 toplam nöron sayısı ortalaması, FA-CA1+CA2-3: FA grubu sıçanların tüm sol hipokampus toplam nöron sayısı ortalaması, VA+FA-CA1: VA+FA grubu sıçanların CA1 toplam nöron sayısı ortalaması, VA+FA-CA2-3: VA+FA grubu sıçanların CA2-3 toplam nöron sayısı ortalaması, VA+FA-CA1+CA2-3: VA+FA grubu sıçanların tüm sol hipokampus toplam nöron sayısı ortalaması.

*İstatistiksel anlamlılık düzeyi ($p < 0.05$) olarak kabul edildi.

TARTIŞMA

Ağır klinik ve sosyo-ekonomik sonuçlarına rağmen perinatal beyin hasarı gelişmesini önlemeye yönelik, halen etkin tedavi stratejileri geliştirilememiştir. Nöronal hücre hasarına neden olan pato-fizyolojik süreç hipoksik-iskemik olaydan sonra birkaç saat içinde başlayıp, günlerce devam edebilmektedir. Bu nedenle bu süreç terapötik pencere dönemi olarak kabul edilebilir (49). Perinatal dönemde hücre yıkım süreci yetişkinlerdekinden çok daha hızlıdır (39). Deneysel çalışmalara göre etkin müdahale zamanının 2-6 saat arasında değiştiği tahmin edilmektedir. Bu nedenle yüksek riskli bebekler doğumdan sonra kısa sürede teşhis edilmeli ve tedaviye başlanılmalıdır (21). İskemiden sonraki ilk 6 saatte kan-beyin bariyeri engelinin en belirgin şekilde açıldığı, 24 saat içinde normale döndüğü, iskemiye hassas bölgelerdeki nöron ölümünün iskemiden sonraki 1-3 günde belirgin hale geldiği belirtilmektedir (121). Bu nedenle iskemiden sonraki ilk 6 saatlik süre, toksik metabolik ürünlerin kan-beyin bariyerinden geçişine olanak tanınması, SOR artışına neden olması yanında beyin kanlanmasını artırarak glukoz ve oksijen desteğinin sağlanmasına, nöroprotektif farmakolojik ajanların etkin bir şekilde beyin dokusuna geçişine fırsat olabilir. Çalışmamızda hipoksik-iskemik beyin hasarından koruyucu etkileri araştırılan ilaçlar (VA, FA) hipoksi-iskemi sonrası 5. dakikada verilmiştir.

Hipoksik-iskemik beyin hasarının mekanizmaları oldukça karışıkır. Bu mekanizmalara dolaşıma ait faktörler (BKA'nın ayarlanmasını bozulur), metabolik faktörler (anaerobik metabolizmanın artması, ATP'nin azalması, hipoglisemi, laktik-asidemi) ve biyokimyasal faktörler (eksitator aminoasitlerin artması, hücreiçi Ca^{++} birikimi, Ca^{++} bağlayan proteinlerin disfonksiyonu, nitrik oksid sentezinin artması, serbest radikal üretimi) karışmaktadır. Hipoksik-iskemik beyin hasarının mekanizmaları aynı zamanda yeni tedavi yaklaşımlarının gelişmesine temel oluşturmaktadır (44). Etkin nöroprotektif stratejilerin, hücre ölümüne neden olan mekanizmaların baskılanması ya da hücrel regülatör proteinlerin indüklenmesi ile gerçekleştirilebileceği düşünülmektedir (18). HİE gelişimine neden olan perinatal asfiksi bir multiorgan hastalığıdır. Bu bağlamda tedavi de HİE'ye ve perinatal asfiksisinin komplikasyonlarına yönelik olacaktır (44).

Yenidoğanda HİE antepartum (%20), intrapartum (%30), intrapartum ve antepartum (%35) veya postpartum (%10) gelişmektedir. HİE’de birincil yaklaşım HİE’nin önlenmesidir (44). Doğum esnasında anormal fetal kalp hızı, APGAR skoru düşük ve şiddetli deprese, doğum odasında entübasyon ve kardiyak masaj gibi canlandırma işlemi uygulanan, şiddetli fetal asidemisi olan (umbilikal arter pH < 7, baz açığı > 16 mEq/l), nörolojik muayenede anormallik ve EEG bulgusu olan bebekler HİE gelişimi açısından yüksek riskli bebeklerdir (21,43). Perinatal hipoksik-iskemik ensefalopati tedavisine genel yaklaşım, HİE gelişme riski yüksek olan bebeklerin erken tanımlanması, yeterli ventilasyonun sağlanması, yeterli beyin perfüzyonunun sürdürülmesi (hipotansiyon ve hipertansiyondan kaçınılmalı), uygun sıvı-elektrolit tedavisi verilmesi (serum elektrolitleri, kalsiyum ve magnezyum düzeyleri izlenmeli), kan glukoz düzeyinin normal sınırlarda sürdürülmesi, komplikasyonların tedavi edilmesi (konvülziyonlar ve beyin ödemi) ve kalıcı beyin hasarını önlemeye yönelik uygulanan diğer koruyucu (nöroprotektif) tedaviler şeklindedir (21,43,44).

Yapılan çalışmalar hipotermiye karşı nöroprotektif etkili olduğunu göstermiştir. Hipotermi uygulamasının ilk 6 saat içinde başlanılmasının, tercihen yalnızca başın soğutulmasının, orta derecede bir hipotermi (32-34 °C) oluşturulmasının, tedavinin 24-72 saat devam edilmesinin daha etkili olabileceği belirtilmektedir. Çalışmalar hipoksi-iskemiye takiben 6. saatten sonra veya ilk nöbetten sonra başlanılan hipotermi tedavisinin nöroprotektif etkisi olmadığını göstermiştir. Yenidoğanda hipotermi nedeniyle ortaya çıkan hipoglisemi, miyokard kontraktilesinde azalma, ventilasyon-perfüzyon uygunsuzluğu, kan viskozitesinde artış, asit-baz ve elektrolit dengesizliği, enfeksiyon riskinde artış gibi olası yan etkiler önemli bir sorundur (21,43).

Antiepileptik ilaçlar kullanılarak yapılan farmakolojik tedavinin en önemli amacı eksitator iletiyi azaltarak yada nöronal inhibisyonu arttırarak anormal beyin eksitasyonunu baskılamaktır. İlginç olarak epilepside olduğu gibi beyin iskemisinde de aşırı miktarda eksitator amino asit salınımı ve nöronal inhibisyonda azalma ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle antiepileptik ilaçların beyin iskemisinde olası nöroprotektif etkileri üzerinde durulmakta ve birçok antiepileptik ilaç hayvan çalışmalarında inme

modellerinde test edilmektedir (122). Yüksek doz (40 mg/kg) fenobarbital tedavisinin beyin metabolizmasını ve oksijen tüketimini azaltarak nöroprotektif etkili olduğu belirtilmektedir (44). Yüksek doz fenobarbital uygulanan grubun 3 yıl sonraki nörogelişimsel sonuçlarının kontrol grubuna göre daha iyi olduğu, ancak yenidoğan döneminde konvülsiyon sıklığı açısından fark olmadığı saptanmıştır (21,39,44).

Literatürde ayrıca trombosit agregasyon faktör (PAF) antagonistleri (26), eritropoetin (123), kreatin (124), pentoksifilin (bir fosfodiesteraz inhibitörü) (26), GM1 monosialogangliozid (39), sinir büyüme faktörleri (21) gibi bir çok ajanın ve gen tedavisi (44), kök hücre transplantasyonu (125) gibi uygulamaların nöroprotektif etkili olduğundan bahsedilmektedir.

Çalışmamızda kullanılan ilaçlardan biri olan VA'nın, tedavi edici etkilerini birden fazla mekanizma üzerinden gösterdiği düşünülmektedir (126).VA'nın antikonvülzan aktivitesini GABA reseptörleri aracılığı ile nöronal inhibisyonu artırarak, eksitator nöronal iletiyi baskılayarak, voltaj bağımlı Na⁺ kanallarını bloke ederek ve T-tipi Ca⁺⁺ kanallarının aktivitesini azaltarak gösterdiği düşünülmektedir. *In vivo* olarak sıçan hipokampusunda hücre dışı GABA düzeylerini arttırdığı ve beyin eksitator amino asit (aspartat) konsantrasyonlarını azalttığı saptanmıştır (8,127). Bu mekanizmalara ek olarak NMDA reseptörlerinin inhibisyonu ile nöronal eksitasyonu azaltarak etkili olduğu düşünülmektedir (8,70).

FA tek karbon metabolizmasında kofaktör olarak görev yapmakta, homosisteinin re-metilasyonunda görev almaktadır. Homosistein ise DNA zincir kırıklarına, oksidatif strese ve apoptoza neden olan, sülfür içeren sitotoksik bir aminoasittir. Diyetel folatlar sinir dokusunun oluşumu ve gelişmesinde, programlanmış hücre ölümünde önemli rol oynamaktadır (91). Folat ve homosisteinin nöronal homeostazdaki rolünü daha iyi anlamak, nörolojik hastalıkları önlemek ve tedavi etmek için yeni yaklaşımlarına imkan tanımaktadır (91). Çeşitli yayınlarda VA (8) ve FA'nın (10) nöroprotektif etkilerinden bahsedilmektedir; ancak term yenidoğan sıçanlarda perinatal HİE modelinde FA'nın tek başına, VA ve FA'nın birlikte nöroprotektif etkilerini değerlendiren bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır.

Çalışmamızda term yenidoğan sıçanlarda, HİE sonrası terapötik dönemde verilen VA ve FA'nın tek tek ve birlikte nöroprotektif etkileri araştırıldı.

Spandou ve arkadaşları, Hİ beyin hasarı oluşturulan yenidoğan sıçanlarda, hipoksi-iskemi sonrası ip verilen ketaminin sıçan beynini Hİ hasardan kısmi olarak koruduğunu saptamışlardır (128). Yine volatil anesteziklerden halotan (129) ve isofluranın da nöroprotektif etkileri olduğunu belirten çalışmalar mevcuttur (130,131). Eter hakkında, nöroprotektif veya nörotoksik etkileri olduğunu gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda eter anestezisi kullanılmıştır (6,8).

Hipoksi-iskemi beyin hasarına neden olan biyokimyasal olaylar zincirini aktive eder. Oksijen yetersizliğinde ATP üretimi azalır ve voltaj duyarlı kalsiyum kanalları aracılığıyla hücre içine aşırı kalsiyum akışı ortaya çıkar. Bu da glutamat salınımına, NMDA ve AMPA reseptörlerinin aktivasyonuna neden olur (132). Hipoksik-iskemik beyin hasarı gelişmesini önlemek için glutamat salınımı ve postsinaptik reseptör aktivitesinin baskılanması üzerinde durulmuş ve bu konuda glutamat reseptör antagonistleri deneysel hayvan modellerinde kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Dizosilpin (MK-801), Magnezyum (Mg), fensiklidin, deksrometorfan ve ketamin hipoksik iskemik beyin hasarında nöroprotektif etkileri araştırılan NMDA reseptör antagonistlerinden bazılarıdır (21). MK-801'in yetişkin ve yenidoğan hayvan modellerinde hipoksik iskemik beyin hasarından koruduğu saptanmış; koruyucu etkinin immatür hayvanlarda yetişkin hayvanlardan daha belirgin olduğu vurgulanmıştır. Bunun nedeninin gelişmekte olan beyinde glutamat reseptör alt tiplerinin yoğunluk ve dağılımlarındaki farklılıklara bağlı olabileceği belirtilmiştir (39). Bu çalışmalarda olduğu gibi çalışmamızda da VA'nın yenidoğan sıçanlarda HİE modelinde hipokampusun CA-1 ve CA2-3 alanlarında piramidal hücreleri Hİ beyin hasarından koruduğu saptanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar VA'nın etki mekanizmalarından biri olan glutamat salınımını önleyici etkisinin hipokampusun CA-1 ve CA2-3 alanlarında nöroprotektif etkiyi sağladığını düşündürmektedir. Çünkü glutamat eksitotoksitesine ençok hipokampus duyarlıdır (27).

SYM 2081 eksitotoksik bir ajandır. Kanai ve arkadaşları VA'nın nöronları SYM 2081 tarafından oluşturulan eksitotoksisiteyi baskılayarak apoptotik nöron ölümünü engellediğini belirtmişlerdir (133). Leng ve Chuang, VA'nın sıçan serebellar hücre kültürlerinde glutamatın tetiklediği eksitotoksisiteyi baskılayarak nöroprotektif etki gösterdiğini bildirmişlerdir (134). Ren ve arkadaşları yetişkin sıçanlarda oluşturdukları geçici fokal serebral iskemi modelinde, iskemiden hemen sonra verilen VA'nın infarkt alanını ve iskeminin tetiklediği nörolojik kusur skorunu azalttığını tesbit etmişlerdir (135). Bu çalışmalar VA'nın nöroprotektif etkilli olduğunu, bu etkiyi hücre ölümüne giden eksitotoksik mekanizmayı baskılayarak gösterdiğini düşündürmektedir. Çalışmamızda yüksek dozda ve erken dönemde başlanan kısa süreli VA tedavisi ile nöroprotektif etki elde edilmiştir.

Caspase inhibitörlerinin sitokin üretimini baskılayarak ve apoptotik hücre ölümünü engelleyerek nöroprotektif etki gösterdikleri düşünülmektedir. Ma ve arkadaşları, yetişkin erkek farelerde MK-801 ve *caspase* inhibitörlerinin birlikte geçici beyin iskemisi sonrası oluşan beyin hasarından koruduğunu, sinerjik etkileri olduğunu saptamıştır (136). Magnezyum, Ca⁺⁺'un iyon kanalları aracılığı ile hücre içine girişini engelleyen bir NMDA reseptör antagonistidir. Magnezyumun etkinliğinin glutamat reseptör sisteminin maturasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (21,43). Çalışmalar MgSO₄ tedavisinin şiddetli Hİ beyin hasarından korumadığını, orta şiddetteki Hİ beyin hasarından koruduğunu ve bu koruyucu etkinin Hİ olay sonrası ilk birkaç saat (hatta ilk saat) içinde verilmesi ile oluştuğunu göstermektedir (137,138).

Hİ beyin hasarı oluşmasında daha çok glutamat üzerinde durulurken az sayıda çalışmada inhibitör nöronal ileti üzerindeki etkiler araştırılmıştır. Serebral iskeminin nöronal GABA_A iletilerinde erken dönemde bozulmaya neden olduğu, ortaya çıkan bu GABA ileti kaybının iskemi sonrası erken reperfüzyon döneminde nöronal eksitasyonu ve nöron ölümünü arttırdığı düşünülmektedir. GABA aracılı nöroprotektif stratejiler, sinapslarda GABA'nın geri emilimini ve metabolizmasını azaltarak veya GABA agonistleri aracılığıyla GABA_A reseptör aktivitesini arttırmak suretiyle GABA aktivitesini arttırmak üzerine kurulmuştur. Bu nöroprotektif stratejilerin bazıları hayvanlarda yapılan serebral iskemi modellerinde etkili olmuştur

(139). Çalışmamızda kullanılan ilaçlardan VA'nın etki mekanizmalarından biriside GABA reseptörleri aracılığı ile nöronal inhibisyonu arttırmasıdır.

In vivo çalışmalarda VA'nın 200-400 mg/kg/gün dozunda postsinaptik GABA cevaplarını arttırdığı gösterilmiştir (71,140). Bizim çalışmamızda da VA HİE modelinde 400 mg/kg/gün dozunda kullanılmış olup, postsinaptik GABA cevabını arttırabilecek dozdur. Köpeklerde *in vivo* VA infüzyonu ile BOS, serebral korteks ve plazma GABA düzeylerinde artış saptanmıştır (71). Aynı şekilde VA tedavisi uygulanan epilepsi ve şizofreni hastalarında da BOS'da GABA seviyelerinde artış saptanmıştır (71,140). Çalışmalarda saptanan VA'nın GABA düzeylerini yükseltici etkisi, GABA-T enzim inhibisyonuna bağlanmak istenilmiştir; ancak bu etkiye *in vitro* çalışmalarda çok yüksek VA konsantrasyonlarında ulaşılmıştır. *In vivo* çalışmalarda ise bahsedilen konsantrasyonlara ulaşılamamıştır. VA'nın, GABA düzeylerindeki bu artışı, presinaptik GABAerjik uçlardan potasyum aracılı GABA salınımını arttırarak gerçekleştirdiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (71). VA'nın postsinaptik GABA_A reseptörleri üzerine doğrudan etkisi saptanmamıştır (71,140). Bazı çalışmalarda, VA verilen fare ve sıçanlarda GAD aktivitesinde artış saptanmıştır (71,140); ancak bu artış beynin sadece bazı bölgelerindedir. Bu durum VA'nın GAD aktivitesi üzerindeki etkisinin beyin bölgesine özgül olduğunu düşündürmektedir (71). Yenidoğan sıçanlarda VA tarafından oluşturulan GAD aktivasyonundaki artışın yetişkin sıçanlardaki artıştan daha belirgin olduğu gösterilmiştir (71). Bizim çalışmamızda da yenidoğan sıçanlar kullanılmış olup, bu sonuçlar elde ettiğimiz nöroprotektif etkinin GABA seviyelerinde artış ile de ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte VA'nın çok yüksek dozlarda GAD aktivitesini baskılandığı ve GABA sentezini azalttığı da saptanmıştır (71). Bazı çalışmalarda VA'nın normal dozlarda da GABA düzeylerini azalttığından bahsedilmektedir. O'Donnell ve arkadaşlarının çalışmasında lityum ve VA'nın inhibitör ve eksitator nörotransmitter amino asitler üzerine etkisi araştırılmış; üç farklı sıçan grubuna iki hafta süreyle tedavi dozunda lityum, VA ve serum fizyolojik verilmiş; her iki ilaç grubunda beyin aspartat, glutamat ve taurin konsantrasyonları azalırken, GABA ve alanin konsantrasyonları sadece VA verilen grupta düşük bulunmuştur. GABA ve alanin konsantrasyonlarındaki bu düşüklüğün önceki çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermediği, GABA ve alanin düzeylerindeki

azalmanın olasılıkla beyin sıvı miktarının aşırı arttığı bir dönemde analiz edilmiş olmasına veya VA'nın tetiklediği GABA salgılayan nöron kaybına bağlı olabileceği belirtilmiştir (126). Papazisis ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, Hİ ensefalopati modeli oluşturulan yenidoğan sıçanlarda, hipoksi-iskemiden hemen sonra iskemi oluşturulan taraftaki hipokampusta glutamat, aspartat ve GABA düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Hipoksi-iskemiden 7 gün sonra bakılan glutamat ve aspartat düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulunurken GABA düzeylerinin kontrol değerlerine düştüğü saptanmıştır. Aynı çalışmada 10 mg/kg ip tek doz lamotrijin tedavisinin hipoksi-iskemi sonrası 7. gündeki glutamat ve aspartat düzeylerindeki yüksekliği azalttığı; 20 mg/kg ip tek doz lamotrijin tedavisinin ise hipoksi-iskeminin tetiklediği glutamat ve aspartat artışını tamamen önlediği ve lamotrijin verilen her iki grupta GABA düzeylerinde değişiklik olmadığı saptanmıştır (141). Sonuç olarak bu çalışmada, hipoksi-iskemi sonrası 7. günde GABA düzeylerinin kontrol değerlerine gerilemesi, glutamat ve aspartat düzeylerindeki yüksekliğin devam etmesi, hipoksi-iskemi sonrası GABAerjik nöronlarda kayıp olduğunu düşündürmekte; Hİ beyin hasarında eksitator amino asitlerin baskın rol oynadığını ve hipoksi-iskemi sonrası verilen lamotrijin tedavisinin nöroprotektif etkili olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda kullandığımız ilaçlardan VA'nın terapötik etki mekanizmalarından biriside eksitator aminoasit salınımının baskılanmasıdır.

Hayvan çalışmalarında lamotrijin dışında benzodiazepinler, fenobarbital, fenitoin, felbamat, gabapentin, tiagabin, topiramet, vigabatrin gibi antiepileptik ilaçların iskemi ve konvülziyonlara karşı nöroprotektif etkilerinin olduğunu; VA'nın ise iskemiye karşı nöroprotektif etkisinin olmadığı, ancak konvülziyonlara karşı kısmi nöroprotektif etki sağladığını belirten yayınlar da vardır (142). Çalışmamızda yüksek doz VA'nın Hİ beyin hasarına karşı nöroprotektif etkili olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar geniş spektrumlu bir antiepileptik olan VA'yı, hipoksi-iskemiye karşı olmasa bile sonradan ortaya çıkan konvülziyonların tedavisinde kullanabileceğimizi, antiepileptik ve nöroprotektif etkilerinden yararlanabileceğimizi düşündürmüştür.

Kabakuş ve arkadaşları VA'nın HİE'ye karşı nöroprotektif etkilerini araştırmış; apopitotik nöron sayısını ve infarkt alanının büyüklüğü değerlendirilmişlerdir. Bu

çalışmada istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, yüksek doz VA tedavisinin (400 mg/kg) düşük doz (200 mg/kg) VA tedavisine ve kontrol grubuna kıyasla daha fazla nöroprotektif etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (8). Çalışmamızda ise, neonatal sıçanlarda HİE modeli oluşturulduktan sonra VA grubu ve VA+FA grubuna yüksek doz (400 mg/kg) VA tedavisi verildi ve beşinci günün sonunda dekapite edilen sıçanların sol hipokampus CA1 ve CA2-3 stratum piramidalis alanlarında apoptoz-nekroz ayırımı yapılmadan, hematoksilen-eozin ile boyanan nöronların sayımı yapıldı. Yüksek doz VA verilen gruplarda nöron sayıları kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu. Bu sonuçlar, sıçanlarda neonatal HİE modelinde hipoksi-iskemiden kısa süre sonra başlanan, kısa süreli yüksek doz VA tedavisinin nöroprotektif etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir.

Mora ve arkadaşları, farmakolojik dozlarda akut VA tedavisinin serebellar hücre kültürlerini apoptozisten koruduğunu saptamıştır (143). Cui ve arkadaşları, VA'nın yetişkin sıçanlarda siyatik sinir kesisi sonrası *Bcl-2* düzeylerini yükselterek, siyatik sinir aksonal rejenerasyonunu artırdığını ve kas liflerinin reinervasyonunu gerçekleştirdiğini saptamışlar; kan-beyin bariyerini geçebilmesi nedeniyle hem periferik hem de SSS'nde aksonal rejenerasyonu arttırabileceğini belirtmişlerdir (144). Bu sonuçlar VA'nın santral ve periferik sinir sisteminin farklı alanlarında nöroprotektif etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızda VA tedavisi ile hipokampusun CA1 ve CA2-3 alanlarında elde edilen nöroprotektif etkileri desteklemektedir.

Minato ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, sol orta serebral arteri bağlanarak geçici fokal beyin iskemisi oluşturulan sıçanlarda iskemi öncesi ve iskemi sonrası verilen VA'nın (1000 mg/kg, po, 2 dozda) infarkt alanı hacminde kontrol grubuna göre koruyucu etki göstermediği saptanmıştır (145). Bu çalışmanın bulguları VA'nın nöroprotektif etkiye sahip olmadığını düşündürmektedir. Ancak bu çalışmada infarkt alanı değerlendirilmiştir. Çalışmamızda ise sınırlı bir alan değerlendirilmiş olup; yenidoğan sıçan beyinde sadece hipokampusun stratum piramidalis tabakasının hücreleri sayılmıştır. Bu durum verdiğimiz ilaçların hipokampusda veya piramidal hücreler üzerinde daha fazla koruyucu etkiye sahip

olduğunu düşündürmektedir. Ancak beynin diğer bölgeleri üzerindeki etkisi hakkında bilgi vermez.

Perinatal Hİ beyin hasarının engellenmesinde bir başka yaklaşımda serbest oksijen radikal inhibitörleri ve *scavengers* olarak bilinen ajanların kullanılmasıdır (21,39). Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, gibi antioksidan enzimlerin polietilen glikol ile konjuge bileşiklerinin Hİ beyin hasarını azalttıkları ve kan-beyin bariyeri stabilitesinin devamlılığını sağladıkları gösterilmiştir; ancak bu ilaçların terapötik doz aralıkları dar olup, yenidoğan hayvanlarda yalnızca Hİ olaydan birkaç saat önce verilmeleri halinde nöroprotektif etkili oldukları saptanmıştır (21,39). Hİ beyin hasarını azalttıkları tesbit edilmiş olan diğer bir grup SOR inhibitörü ise allopurinol ve oksipurinol gibi ksantin oksidaz inhibitörleridir. Bu iki ilacın immatür sıçanlarda Hİ olay sonrası resüsitasyondan hemen sonra verilmeleri halinde nöroprotektif etkili oldukları gösterilmiştir (21,39); ancak perinatal asfiksi sonrası yenidoğan bebeklere verilen allopurinol'ün yararlı olduğunu gösteren herhangi bir kanıt saptanmamıştır (146).

Hayvan çalışmalarında, deferoksamine, melatonin, N-asetil-sistein ve edaravon gibi ajanların çeşitli anti-oksidan mekanizmalarla nöroprotektif etki sağladıkları belirtilmektedir. Bu ilaçlardan edaravon, nNOS ve iNOS miktarını azaltarak, hidroksil radikallerini temizleyerek, demir aracılı oksidatif hasarı önleyerek nöroprotektif etki göstermekte olup; Japonya'da klinikte inme tedavisinde kullanılmaktadır (46). Melatonin ise normal sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde çok önemli rol oynamakta olup; çocuklarda uyku bozukluklarında kullanılmaktadır (46). Antioksidan vitaminler olan vitamin C ve E'nin, deneysel çalışmalarda nöroprotektif etkilerinden bahsedilmektedir; ancak vitamin C'nin nöroprotektif dozu bilinmemektedir. Çok az miktardaki aşırı dozunun, kortikal nöron kültürlerinde protein sentezini baskıladığı ve geç nöron ölümüne neden olduğu tesbit edilmiştir (44). Vitamin E'nin ise yağda eriyen bir vitamin olması nedeniyle, dolaşımda ve beyinde etkin konsantrasyona ulaşmak için Hİ olaydan birkaç gün önce verilmesi gerekmektedir (44). Preterm infantlarda vitamin E desteğinin intrakranial hemoraji ve şiddetli retinopati riskini azalttığı, fakat sepsis riskini arttırdığı, rutin vitamin E desteği için yeterli kanıt olmadığı belirtilmektedir (147).

Beyin özellikle çoklu doymamış fosfolipidlerden zengindir ve bu nedenle SOR saldırısına çok hassastır (39). Shao ve arkadaşları, sıçanlarda kronik lityum ve VA tedavilerinin kortikal nöronlarda lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonunu baskıladığını saptanmışlardır. Her iki ilacın glutamatın tetiklediği hücre içi serbest Ca^{++} miktarındaki artışı baskılayarak bu etkiyi gösterdiği belirtilmiştir (148). Wang ve ark.'ı VA'nın sıçan beyin korteks hücre kültürlerinde lipid ve proteinleri oksidatif hasardan koruduğunu saptamışlardır. Antiapoptotik faktör *Bcl-2* miktarlarını arttırarak, lipid ve proteinleri oksidatif hasardan koruduğunu düşünmüşlerdir (149). Başka bir çalışmada ise sıçanlarda doğumdan sonraki ilk haftada neokorteks ve hipokampüste güçlü bir *Bcl-2* varlığı gösterilirken, yaş ilerledikçe *Bcl-2*'nin azaldığı, yetişkinlerde çok düşük düzeylere indiği gösterilmiştir (25). Bu çalışmaların sonuçları çalışmamızda VA tedavisi (VA grubu ve VA+FA grubu) ile elde edilen nöroprotektif etkileri desteklemektedir. VA'nın antikonvülzif etki mekanizmaları aracılığıyla lipid ve proteinleri peroksidasyondan koruyarak ve *Bcl-2* düzeylerini arttırarak nöroprotektif etki göstermiş olabileceğini düşündürmektedir. Ancak çalışmamızda sadece nöron sayımı yapılmış olup; VA'nın etki mekanizmaları değerlendirilmemiştir.

Çalışmamızda 400 mg/kg dozunda verilen VA'nın nöroprotektif etkili olduğunu saptadık; ancak bazı yayınlarda VA'nın terapötik dozlarda büyümekte olan rat beyinlerinde apoptotik nörodejenerasyona neden olduğu da belirtilmektedir (150,151). Bazı vaka raporlarında da VA tedavisine bağlı protein C düzeylerinin azaldığı ve buna bağlı inme geliştiği (152), kortikal atrofi ve kognitif fonksiyonlarda bozulma (zeka puanında azalma) yaptığı belirtilmektedir (153). VA'nın olası önemli bir olumsuz etkisi de glutatyon düzeyleri üzerinde oluşturduğu etkidir. VA verilmesinden sonra glutatyon düzeylerinin belirgin bir şekilde azaldığı saptanmıştır. VA verilen insanların alyuvarlarında ve sıçanların karaciğerlerinde glutatyon düzeylerinin doz bağımlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Bu etkiye glutatyon redüktaz enzimini baskılayarak neden olduğu düşünülmektedir. Hishida ve Nau'nın yaptığı çalışmada, sıçanlarda VA verildikten bir saat sonra glutatyon hidroliz ürünlerinin (yıkım ürünleri) doz bağımlı olarak arttığı saptanmıştır (16). Çalışmamızda glutatyon düzeyleri bakılmamıştır; ancak bu sonuçlar ve VA'nın olumsuz etkileri hipoksik-iskemik ensefalopati tedavisinde kullanımını sınırlandırabilir. Çalışmamızda VA

verilerek elde edilen nöroprotektif etkinin, VA'nın diğer mekanizmalar üzerinden yaptığı nöroprotektif etkisinin glutasyon düzeylerini düşürücü etkisinden daha baskın olduğunu düşündürmektedir. Nordhoff ve arkadaşları ise, VA tedavisi alan çocuklarda VA'nın glutasyon redüktaz enzimi üzerine herhangi bir etkisi olmadığını saptamıştır (154). Bu da VA'nın hipoksi-iskemi esnasında glutasyon düzeylerini değiştirmeyebileceğini, nöroprotektif amaçlı kullanmamızda sakınca olmadığını düşündürmektedir.

VA antiepileptik olarak kullanılmasının dışında santral sinir sistemi kaynaklı birçok hastalıkta kullanılmaktadır. Bu çalışmada yüksek doz VA tedavisi ile term yenidoğan sıçanlarda HİE modelinde hipokampusun CA-1 ve CA2-3 alanlarında nöroprotektif etki elde edilmiştir. VA'nın elde edilen bu nöroprotektif etkiyi olasılıkla antiepileptik ve terapötik etki mekanizmaları aracılığıyla göstermiş olabileceği düşünüldü. Ancak çalışmamızda VA verilerek elde edilen bu nöroprotektif etkiyi açıklayacak mekanizmalar laboratuvar olarak tesbit edilmemiştir.

SSS'nin sağlıklı bir şekilde gelişmesi için, bebeğin bu gelişim sürecinde tiroid fonksiyonlarının normal olması gerekir. Verrotti ve arkadaşları yaklaşık iki buçuk yıl sadece VA tedavisi alan epileptik çocuklarda tiroid hormonlarında değişiklik saptamamıştır. Bu durum beyin gelişiminin çok hızlı olduğu yaşamın ilk iki yılında yapılacak VA tedavisinin tiroid hormonlarında değişiklik yapmayabileceğini ve beyin gelişimini etkilemeyebileceğini düşündürmektedir; ancak bu çalışmaya alınan çocukların yaşları ortalama sekizdir (155). Yine Bentsen ve arkadaşları, yaşları 16 ile 46 arasında değişen, epilepsi nedeniyle VA tedavisi alan hastalarda yaptıkları çalışmada T4, FT4, FT3 düzeylerinde düşüklük saptamış, TSH düzeylerinde ise değişiklik saptamamıştır. Folik asit düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik saptanmamıştır. Tiroid hormonlarındaki azalmanın enzim indüksiyonuna bağlı olabileceği düşünülmüştür (156). Literatürde VA tedavisinin iki yaşın altındaki çocuklarda tiroid fonksiyonlarında değişiklik yaptığını veya yapmadığını gösteren bir yayına rastlanmamıştır. Çalışmamızda HİE modeli oluşturulan yenidoğan sıçanlarda tiroid fonksiyonlarına bakılmamıştır.

Folat metabolizması bozukluğu veya folat eksikliği plazma homosistein düzeylerinde yükselme ve metiyonin sentezinde azalma ile sonuçlanmaktadır (15,84). Yüksek homosistein düzeylerinin normal seviyelere çekilmesine yönelik uygulamalar, altta yatan nedenlere göre değişmektedir. Bununla birlikte bu yönde en etkili maddenin folik asit olduğu; folik asidin, vitamin B₆ ve vitamin B₁₂ ile birlikte veya tek başına kullanımının plazma homosistein seviyesini düşürdüğü belirtilmektedir (90,86). Bu nedenle nörodejeneratif hastalıklardan (Alzheimer hastalığı) ve kardiyovasküler hastalıklardan korunmak için diyetel FA desteği yapılmaktadır (10,82).

VA ve diğer bazı antiepileptik ilaçları kullananlarda serum folik asit düzeylerinin azaldığı, folat metabolizmasının baskılandığı, metiyonin düzeylerinin azaldığı ve homosistein düzeylerinde ise artış olduğu bildirilmektedir (15,16). VA, metiyoninin homosisteine dönüşümünü hızlandırmaktadır. Bu durum metiyonin eksikliğine ve aşırı SAM üretimine neden olmaktadır. SAM hızlı bir şekilde SAH'a, SAH da homosisteine dönüşmektedir. VA'nın bu etkisini metiyonin adenoil transferaz enzimini (MAT) aktive edip, metiyoninin SAM'a dönüşümünü artırarak gösterdiği belirtilmektedir. VA'nın doğrudan glutamat formil transferaz enzimini baskılayarak ve dolaylı olarak da SAM tarafından 5,10-metilen-THF redüktaz enziminin baskılanması ile 5-metil-THF'in azalmasına neden olarak folat metabolizmasını baskıladığı belirtilmektedir (16). Karabiber ve arkadaşları VA ve karbamezepin tedavisi alan çocuklarda serum homosistein düzeylerinde belirgin yükseklik ve FA düzeylerinde belirgin düşüklük saptamışlar; karbamezepin tedavisi alan çocuklarda serum vitamin B₁₂ düzeylerinde düşüklük saptarken, VA tedavisi alan hastalarda vitamin B₁₂ düzeylerinde değişiklik saptamamışlardır (15). VA tedavisine bağlı FA eksikliğinin mekanizmasının tam olarak bilinmediğini, ancak antiepileptik ilaçların karaciğerde enzim indüksiyonu yaparak, FA'nın intestinal absorpsiyonunu ve koenzimlerinin metabolizmasını engelleyerek FA eksikliğine neden oldukları belirtilmiştir. VA ve karbamezepin tedavisi alan hastalarda serum homosistein düzeylerine bakılması ve vasküler hastalık gelişme riskini azaltmak için bu hastalara ek olarak FA verilmesi önerilmiştir (15). Ubeda ve arkadaşları, sıçanlarda tek doz VA (400 mg/kg) enjeksiyonundan bir saat sonra metiyonin metabolizmasının zarar gördüğünü; MAT aktivitesinin %56 azaldığını, karaciğer

SAM konsantrasyonlarının ve oksidasyona uğramış glutatyon miktarının arttığını; SAM/SAH transmetilasyon oranının azaldığını, tüm bu değişikliklerin 24 saat sonra serum VA düzeylerinin azalması ile normale döndüğünü saptamışlardır (157). Hendel ve arkadaşları ise iki aylık karbamezepin ve VA tedavisinin folat metabolizması üzerine etkilerini araştırmışlar; bağırsak folat dekonjugasyonunda, karaciğer FA metabolizmasında, böbreklerden folat atılımında farklılık olmadığını, ancak FA absorpsiyonunun azaldığını saptamışlardır (158). Kishi ve arkadaşlarının çalışmasında, fenobarbital ve karbamezepin gibi enzim induksiyonu yapan ilaçların uzun dönem kullanılmasının, serum folat konsantrasyonlarını anlamlı olarak düşürdüğü; VA ve zonisamid gibi enzim induksiyonu yapmayan ilaçların ise serum folat düzeylerini değiştirmedeği görülmüştür. Bu çalışmada VA tedavisinin süresi uzadıkça serum folat düzeylerinde azalma gözlenmiş; ancak istatistiksel olarak anlamlı bir düşüklük saptanmamıştır. Folat metabolizmasında antiepileptiklere bağlı oluşan değişikliklerin mekanizmaları çok iyi bilinmemektedir, ancak serum folat düzeylerinde antiepileptiklere bağlı azalmaya neden olan en önemli mekanizmanın mikrozomal enzim induksiyonu olduğu bildirilmiştir (159). Bu bulgulara zıt olarak Geda ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, yaşları 14 ay ile 12 yıl arasında değişen, uzun dönem VA tedavisi alan, 26 epileptik hasta, tedavi sürelerine ve yaşlarına göre gruplara ayrılmış; serum lipidleri, B₁₂ vitamini ve folik asit düzeylerine bakılmış; gruplar kendi aralarında ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum lipidleri, B₁₂ vitamini ve folik asit düzeyleri açısından farklılık saptanmamıştır (160). Gidal ve arkadaşları lamotrijin ve VA tedavisi alan 20 epileptik hastada plazmada homosistein ve folat, eritrositlerde folat ve B₁₂ vitamini düzeylerini ölçmüşler; lamotrijin tedavisinin plazmada ölçülen parametrelerde değişiklik yapmadığını, VA tedavisinin plazma homosistein düzeylerini azalttığını, plazma B₁₂ vitamini, folat ve eritrosit folat düzeylerini arttırdığını saptamışlar; lamotrijin ve VA tedavisi alan epilepsili hastalarda homosistein düzeylerinin klinikte problem olmadığını belirtmişlerdir (161). Tüm bu çalışmaların sonuçları VA ile FA metabolizması arasında yakın bir ilişki olduğunu düşündürmektedir; ancak bu çalışmalarda VA tedavisinin serum FA ve homosistein düzeyleri üzerine etkisi hakkında çelişkili sonuçlar elde edilmiştir.

Yaşlılarda, serum ve BOS folat konsantrasyonları yaşla birlikte azalmakta, homosistein konsantrasyonları ise artmaktadır. Bazı yayınlarda bu durumun

yaşlanma sürecine katkıda bulunduğu belirtilmektedir (90). Gelişmekte olan SSS, folat metabolizması bozukluklarına oldukça duyarlıdır. Küçük çocuklarda BOS'da 5-metiltetrahidrofolat düzeylerinin yüksek olmasının bu durumu gösteren bir bulgu olabileceği düşünülmektedir (81,162).

Bazı yayınlarda da folik asidin homosistein artışının zararlı etkilerinden ve VA'nın neden olduğu teratojenik etkilerden (örneğin NTD) koruduğu belirtilmektedir; ancak folatın NTD'yi önleme mekanizması tam olarak anlaşılammıştır. Muhtemelen FA'nın gelişmekte olan fetüsde nükleik asit ve amino asit metabolizması üzerindeki rolünün etkili olduğu (83), homosisteinin remetilasyonunu artırarak NTD'yi önlediği düşünülmektedir (16). Benzer şekilde diyetsel FA desteğinin, kalıtsal folat metabolizması kusuru olan bireylerde de metabolik kusurları düzeltebileceği belirtilmektedir (83).

Wegner ve Nau sıçan embriyoları üzerinde yaptıkları çalışmada, organogenez esnasında teratojenik dozlarda VA verilmesinin embriyonik 5-formil H₄folat ve 10-formil H₄folat düzeylerini azalttığını, tetrahidrofolat düzeylerini arttırdığını saptamışlar; bu değişikliklerin, formil gruplarının transfer işlemi gerçekleştirilen glutamat formiltransferaz enziminin VA tarafından inhibe edilmesine bağlı olabileceğini düşünmüşlerdir. NTD, embriyonik folat metabolizması değişiklikleri ve bazı enzimlerin inhibisyonu ile VA konsantrasyonları arasında doğru orantılı bir ilişki olduğu; VA tarafından oluşturulan NTD'nin embriyonik folat metabolizmasının engellenmesi ile oluştuğu belirtilmektedir (163). Gebe farelerde yapılan bir başka çalışmada ise, ip olarak VA verilen grupta plazma homosistein konsantrasyonlarında artış ve VA ile birlikte folat verilen grupta ise homosistein konsantrasyonlarında azalma saptanmıştır. Her iki grupta plazma metiyonin düzeylerinin azaldığı saptanmıştır (16). Alonso-Aperte ve arkadaşlarının gebe sıçanlarda yaptığı çalışmada, VA tedavisi uygulanan sıçanlarda annenin serum metiyonin konsantrasyonlarının, karaciğer metiyonin sentaz aktivitesinin ve karaciğer DNA'sının metilasyonunun azaldığı; buna rağmen annenin metilasyon oranının (SAM/SAH), serum homosistein, folat ve Vitamin B12 konsantrasyonlarının değişmediği saptanmıştır. VA'ya maruz kalan fetüslerde ise, karaciğer metiyonin miktarının değişmediği, fakat metilasyon oranının ve DNA

metilasyonunun azaldığı saptanmış; metilasyon sentezindeki bu değişikliklerin ve DNA metilasyonundaki azalmanın folinik asit ile engellendiği tesbit edilmiştir. Bu çalışmada VA alan anne sıçanlarda serum homosistein, folat ve Vitamin B₁₂ konsantrasyonlarında değişiklik olmamasına rağmen hem anne hem de fetüste DNA metilasyonunda azalma olduğu ve bu azalmanın bir FA türevi olan folinik asit ile önlenildiği gösterilmiştir (164). Dawson ve arkadaşları CD-1 farelerde FA ve pantotenik asidin VA'nın neden olduğu NTD'den koruduğunu saptamıştır (14). Trotz ve arkadaşları da, benzer şekilde gebe farelerde VA verilmeden önce iki ve VA verildikten sonra tek doz (toplam üç doz) folinik asit tedavisinin VA'nın tetiklediği NTD sıklığını azalttığını saptamışlardır (165). Başka bir çalışmada da FA'nın fare fetüslerini A vitamini ve VA'nın neden olduğu iskelet bozukluklarından koruduğu saptanmıştır (17). Bu sonuçlar VA ile FA metabolizması arasında yakın bir ilişki olduğunu, VA'nın neden olduğu antifolat aktivitenin, DNA metilasyonundaki azalmanın, hücre ölümüne neden olabilecek DNA sentez ve tamir işlemlerindeki bozuklukların, FA ve FA türevi ilaçlarla önlenebileceğini düşündürmektedir. Hansen ve arkadaşları ise VA tedavisinden bir saat önce verilen folinik asitin VA'nın neden olduğu NTD'yi engellemediğini, embriyonik çinko düzeylerini değiştirmedeğini saptamışlardır (166).

Folik asit beyin ve spinal kordun büyümesi ve farklılaşması esnasında çok önemli rol oynamaktadır (167). *İn vitro* ve *in vivo* çalışmalar, FA'nın NTD'den koruyucu etkisi dışında nöroprotektif etkilerinin de olduğunu göstermektedir. Iskandar ve ark.'nın yaptığı çalışmada, sıçanlarda deneysel olarak medulla spinalis ve optik sinir yaralanması oluşturulmuş; yaralanmanın üç gün öncesinden, iki hafta sonrasına kadar değişik dozlarda günlük ip FA verilmiş; FA'nın medulla spinalis ve optik sinir hasarında istatistiksel olarak anlamlı nöron rejenerasyonu sağladığı gözlenmiştir. En etkin optimal dozun 80 µg/kg/gün olduğu bulunmuştur (10). Tagliari ve arkadaşlarının çalışmasında, oksijen ve glukozdan mahrum bırakılan (*in vitro* hipoksi-iskemi modeli) sıçan hipokampus hücre kültürlerinde, dışarıdan homosistein verilerek oluşturulan akut ve kronik yüksek homosistein düzeylerinin hücre hasarını ve iskemik olaylara duyarlılığı arttırdığını tesbit etmişler; akut yüksek homosistein düzeyleri ile oluşturulan hücre hasarının FA verilmesi ile tam olarak önlenildiğini, E vitamini verilmesiyle ise kısmen önlenbildiğini gözlemlemişlerdir

(168). Matte ve arkadaşları ise, sıçanlarda homosistein verilerek oluşturulan akut yüksek homosistein düzeylerinin parietel korteks ve serumda Na^+ , K^+ -ATPaz ve butirilkolinesteraz aktivitesini belirgin olarak azalttığını saptamışlardır. Bu değişikliklerin akut hiperhomosisteinemi öncesi verilen FA tedavisi ile tamamen engellendiğini göstermişler ve yüksek homosistein düzeylerine bağlı nörolojik hasarın önlenmesi için FA desteği yapılmasının yeni bir tedavi stratejisi olabileceğini belirtmişlerdir (169). Bu sonuçlar FA'nın santral sinir sistemi (medulla spinalis, hipokampus) hasarına karşı ve kranial sinir yaralanmasına karşı nöroprotektif etkili olduğunu, yüksek homosistein düzeylerine bağlı nörolojik hasarın FA tedavisi ile önlenebileceğini göstermiştir. Çalışmamızda elde edilen nöroprotektif etkileri desteklemektedirler. Çalışmamızda ise postnatal dönemde hipoksi-iskemi sonrası 5. dakikada başlanan ve beş gün süreyle verilen FA tedavisi ile (FA grubu, VA+FA gruplarında) yenidoğan sıçanlarda daha az nöron kaybı olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda, ilaç verilen tüm grupların (VA grubu, VA+FA grubu, FA grubu) sol hipokampus CA1, CA2-3 ve tüm sol hipokampus alanlarında (CA1+CA2-3) sayılan piramidal hücre sayısı ortalamaları, SF grubunun benzer alanlarındaki piramidal hücre sayısı ortalamalarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$). Bu da verilen ilaçların bu bölgelerde hipoksik-iskemik etkiye karşı nöroprotektif etkili olduklarını düşündürmektedir. FA grubu sıçanların sol hipokampus CA1, CA2-3 ve tüm sol hipokampus (CA1+CA2-3) alanlarındaki piramidal hücre sayısı ortalamaları ile VA grubu sıçanların benzer alanlarındaki piramidal hücre sayısı ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p > 0,05$); ancak FA grubu sıçanların belirtilen hipokampus alanlarındaki piramidal hücre sayısı ortalamaları VA grubu sıçanların benzer hipokampus alanlarındaki piramidal hücre sayısı ortalamalarından daha yüksek bulunmuştur (Örneğin FA-CA1 alanındaki piramidal hücre sayısı ortalaması VA-CA1 alanındaki piramidal hücre sayısı ortalamasından daha yüksek bulunmuştur). Aynı şekilde VA+FA grubu sıçanların sol hipokampus CA1, CA2-3 ve tüm sol hipokampus (CA1+CA2-3) alanlarındaki piramidal hücre sayısı ortalamaları ile FA grubu sıçanların benzer alanlarındaki piramidal hücre sayısı ortalamaları arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p > 0,05$); ancak VA+FA grubu sıçanların belirtilen hipokampus alanlarındaki piramidal hücre sayısı ortalamaları,

FA grubu sıçanların benzer hipokampus alanlarındaki piramidal hücre sayısı ortalamalarından daha yüksek bulunmuştur.

VA'nın istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber FA'dan daha az nöroprotektif etkiye sahip olmasının, VA'nın olası yan etki profilinin fazla (antifolat aktivite göstermesine bağlı metiyonin eksikliği, SAM eksikliği ve homosistein yüksekliği gelişmesi gibi) olmasına, FA'nın yan etki profilinin ise daha düşük, yararlı etkilerinin doğrudan ve daha fazla (metilasyon reaksiyonlarında, aminoasit metabolizmasında, DNA sentez ve tamir işlemlerinde görev alması) olmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

VA+FA grubu sıçanların sol hipokampus CA1, CA2-3 ve tüm sol hipokampus (CA1+CA2-3) alanlarında sayılan piramidal hücre sayısı ortalamalarının tüm diğer grupların (SF grubu, VA grubu, FA grubu) benzer alanlarında sayılan piramidal hücre sayısı ortalamalarından daha yüksek bulunması (FA grubu ile karşılaştırıldığında sayısal farklılık olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur), VA ve FA'nın birlikte daha güçlü nöroprotektif etkiye sahip olduklarını göstermektedir. Bu da FA'nın, VA'nın neden olduğu olası antifolat aktiviteyi, birçok metabolik yolda görev alan metiyoninin eksikliğini ve serbest radikal aktivitesi gösteren homosistein yüksekliğini (16) ortadan kaldırmış olabileceğini; DNA tamir süreçlerinin daha iyi çalışıp VA ve FA'nın nöroprotektif etkilerinin birlikte daha iyi ortaya çıktığını; böylece daha az hücre hasarının oluştuğunu düşündürmektedir. Ancak böyle bir ilişkinin kurulabilmesi için nöroprotektif amaçlı verilen bu ilaçların etki mekanizmalarının laboratuvar olarak tespit edilmesine ihtiyaç vardır.

FA verilerek elde edilen nöroprotektif etkilerin, FA'nın olasılıkla SSS'deki primer fonksiyonlarına (SSS'de metilasyon reaksiyonlarında, pürin ve pirimidin sentezinde, DNA sentezi ve hasarlanmış DNA tamirinde, aminoasit metabolizmasında oynadığı roller gibi) ve homosistein sentezini baskılamasına bağlı homosistein aracılı SSS hasarı gelişmesini önleyerek gerçekleştirmiş olabileceğini düşünmekteyiz. Ancak bu mekanizmalar aracılığı ile etkileyip etkilemediği ve nöroprotektif etkide hangi mekanizmanın daha baskın olduğu laboratuvar olarak desteklenmemiştir.

Çalışmamızda serum, BOS ve beyin dokusunda FA, homosistein, metiyonin, SAM, glutatyon gibi VA ile ilişkili; hücre hasarı gelişiminde veya hücrelerin korunmasında rol oynayan parametrelerin düzeylerine ve VA verilen gruplarda elde edilen nöroprotektif etkiyi açıklayacak VA'nın literatürde belirtilen etki mekanizmalarına (GABA artışı, glutamat aktivitesinin baskılanması, Ca⁺⁺ kanal blokajı gibi) ve FA'nın nöroprotektif etkisine aracılık ettiği düşünülen mekanizmalara bakılmamıştır. Böyle bir ilişkinin doğrulanması için daha fazla veriye ve belirtilen ilaçların etki mekanizmalarına aracılık eden parametrelerin laboratuvar olarak tespit edilmesine ihtiyaç vardır. Çalışmamızda sadece hücre sayımı yapılmış olup, etki mekanizmaları değerlendirilmemiştir.

VA veya diğer antiepileptik ilaçları alan kadınlara gebelik öncesi ve gebelik süresince FA verilmesi önerilmektedir (70). Annenin diyet ile folat alımının, folat profilinin ve folat metabolizması bozukluğu olup-olmadığının bilinmesi antenatal ve perinatal dönemde bebeğin folat eksikliği açısından olası risklerinin tesbit edilmesini sağlayacak ve gerekirse folat desteği yapılmasına imkan tanıyacaktır. Bu çalışmada antenatal dönemde veya hipoksi-iskemi öncesi verilen FA'nın nöroprotektif etkisi değerlendirilmemiştir.

VA'nın olası yan etkilerinin fazla olması, iki yaş altında idiyosenkrazik karaciğer toksisitesi ortaya çıkması, literatürde nöroprotektif etkisi olmadığını belirten yayınların olması, büyümekte olan rat beyinlerinde apoptotik nörodejenerasyona neden olduğunun belirtilmesi, glutatyon düzeylerini düşürdüğünün belirtilmesi, HİE tedavisinde kullanılmasını tartışmalı hale getirmektedir. Ancak çok yüksek dozlarda bile yan etkisi olmadığı belirtilen FA'nın, hipoksi-iskemi sonrası erken dönemde tek başına veya HİE nedeniyle FA metabolizmasını bozan bir antiepileptik ilaç kullanılması halinde mevcut tedaviye ek olarak idame dozunda kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Hipoksi-iskemi modeli oluşturulan term yenidoğan sıçanlarda valproik asit ve folik asidin beyin hasarına etkileri araştırılan bu çalışmada, hipoksi-iskemiden kısa süre sonra (beş dakika) uygulanan valproik asit, folik asidin tek tek ve birlikte hipokampusun CA-1 ve CA2-3 alanlarında nöron kaybını önlediği gösterildi. Sonuç

olarak bu çalışmada term yenidoğan sıçanlarda HİE modelinde valproik asit ve folik asit tek tek ve birlikte kullanımları ile nöroprotektif etkili oldukları; yan etki ve etkinlik açısından kıyaslandığında folik asit tedavisinin HİE'nin erken dönemde tedavisi için klinik kullanıma aday olduğu; ancak daha fazla preklinik ve klinik çalışmaya ihtiyaç olduğu kanısına varıldı.

SONUÇLAR

Modifiye Levine modeli kullanılarak miadında doğmuş yenidoğan sıçanlarda oluşturulan perinatal HİE'de, hipoksi-iskemi sonrası erken dönemde (hipoksiden 5 dakika sonra) ip başlanan kısa süreli (beş gün) 400 mg/kg VA, 400 mg/kg VA + 80 µg/kg FA ve 80 µg/kg FA tedavilerinin hipokampusun CA1, CA2-3 ve tüm sol hipokampus (iskemi oluşturulan taraf) stratum pyramidalis alanlarında nöron kaybını önlediği stereolojik yöntemler kullanılarak saptandı.

SF, VA, VA+FA ve FA tedavisi verilen gruplar kendi aralarında karşılaştırıldı. İlaç verilen tüm grupların (VA grubu, VA+FA grubu, FA grubu) CA1, CA2-3 ve tüm sol hipokampus alanlarının toplam nöron sayısı ortalaması ile SF verilen grubun benzer alanlarının toplam nöron sayısı ortalaması karşılaştırıldığında; ilaç tedavilerinin (VA, VA+FA, FA) sayım yapılan tüm alanlarda nöroprotektif etkili olduğu saptandı. Elde edilen bu sonuçlar VA, VA+FA, FA tedavileri ile hipoksik-iskemik beyin hasarına bağlı nöron kaybının azaltılabileceğini düşündürdü. VA verilen grubun CA1, CA2-3 ve tüm sol hipokampus alanlarının toplam nöron sayısı ortalaması ile FA verilen grubun benzer alanlarının toplam nöron sayısı ortalaması karşılaştırıldığında nöroprotektif etki açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. FA verilen grubun CA1, CA2-3 ve tüm sol hipokampus alanlarının toplam nöron sayısı ortalaması ile VA+FA verilen grubun benzer alanlarının toplam nöron sayısı ortalaması karşılaştırıldığında da nöroprotektif etki açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. VA+FA verilen grubun CA1, CA2-3 ve tüm sol hipokampus alanlarının toplam nöron sayısı ortalaması ile VA verilen grubun benzer alanlarının toplam nöron sayısı ortalaması karşılaştırıldığında, belirtilen tüm alanlarda VA+FA'nın nöroprotektif etkisi VA'nın nöroprotektif etkisinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu.

Sonuç olarak bu çalışmada term yenidoğan sıçanlarda HİE modelinde VA ve FA'nın tek tek ve birlikte kullanımları ile nöroprotektif etkili oldukları; yan etki ve etkinlik açısından kıyaslandığında FA tedavisinin HİE'nin erken dönemde tedavisi için klinik kullanıma aday olduğu; ancak daha fazla prelinik ve klinik çalışmaya ihtiyaç olduğu kanısına varıldı.

ÖZET

NEONATAL TERM SIÇANLARDA OLUŞTURULAN HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI MODELİNDE İNTRAPERİTONEAL UYGULANAN VALPROİK ASİT VE FOLİK ASİDİN BEYİN HASARINA ETKİLERİ

Dr. Mehmet DEMİRAYAK

Hipoksik-iskemik ensefalopati (HİE) yenidoğanlarda akut mortalite ve morbiditenin önemli bir nedenidir. Valproik asit (VA) geniş spektrumlu bir antikonvülzandır. Folik asit (FA) ise tek karbon taşıyıcısı olarak görev yapan bir vitamindir. FA'nın, VA'nın neden olduğu teratojeniteden koruduğu bilinmektedir. Bazı yayınlarda VA'nın FA metabolizmasını olumsuz etkilediği bildirilirken VA ve FA'nın nöroprotektif etkilerinin olduğu da belirtilmektedir. VA'nın terapötik etkilerine birden fazla mekanizma aracılık etmektedir. FA ise amino asit metabolizmasında, metilasyon reaksiyonlarında, DNA sentezinde, hasarlanmış DNA'nın tamirinde, myelin sentezinde görev almaktadır.

Çalışmamızda, modifiye Levine modeline göre sol karotis kommunisi bağlanarak HİE oluşturulan term yenidoğan sıçanlarda VA ve FA'nın nöroprotektif etkileri araştırıldı.

Her iki cinsten, 13 günlük, 24 Wistar sıçan kullanıldı. Hipoksi-iskemiden beş dakika sonra %0,9 NaCl ip uygulanan sıçanlar SF grubu; 400 mg/kg/gün VA, 400 mg/kg/gün VA ve 80 µg/kg/gün FA, 80 µg/kg/gün FA ip uygulanan sıçanlar ise sırasıyla VA grubu, VA+FA grubu ve FA grubu olarak ayrıldı. Grupların sıçan sayısı altı olarak belirlendi. Sıçanlar beş günlük tedaviden sonra sakrifiye edildi. Beyin dokularından horizontal kesitler alınarak Hematoksilen-Eozin ile boyandı. Stereolojik yöntemler ile hipokampusun CA1 ve CA2-3 stratum pyramidalis alanlarında nöron sayımı yapıldı.

Toplam nöron sayısı ortalaması SF grubunun CA1 alanında 128754±17206, CA2-3 alanında 137317±15491, tüm sol hipokampusda (CA1+CA2-3) 266071±29938; VA grubunun CA1 alanında 187064±25056, CA2-3 alanında 193571±29069, tüm sol hipokampusda 380635±49951; VA+FA grubunun CA1 alanında 235888±25783, CA2-3 alanında 241126±21008, tüm sol hipokampusda 477014±34118; FA grubunun CA1 alanında 211515±14557, CA2-3 alanında 215207±21607, tüm sol hipokampusda 426722±35147 bulundu.

CA1, CA2-3 ve tüm sol hipokampus toplam nöron sayısı ortalamaları, ilaç verilen gruplarda (VA grubu, VA+FA grubu, FA grubu) SF grubundan yüksek bulundu ($p<0,05$).

CA1, CA2-3 ve tüm sol hipokampus toplam nöron sayısı ortalamaları VA+FA grubunda VA grubundan yüksek bulundu ($p<0,05$).

FA grubunun CA1, CA2-3 ve tüm sol hipokampus toplam nöron sayısı ortalamaları, VA+FA grubu ve VA grubunun toplam nöron sayısı ortalamaları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$); ancak toplam nöron sayısı ortalamaları FA grubunda VA grubundan yüksek, VA+FA grubunda FA grubundan yüksek bulundu.

Bu çalışma neonatal term sıçanlarda oluşturulan hipoksi-iskemi modelinde VA ve FA'nın tek tek ve birlikte nöroprotektif etkili olduklarını göstermiştir.

SUMMARY

EFFECTS OF INTRAPERITONEAL ADMINISTRATED VALPROIC ACID AND FOLIC ACID ON HYPOXIC ISCHEMIC BRAIN DAMAGE MODEL IN NEONATAL TERM RATS

Dr. Mehmet DEMİRAYAK

Hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) is an important cause of acute mortality and morbidity in newborns. Valproic acid (VA) is a wide spectrum anti-convulsant. Folic acid (FA) is a vitamin acting as mono-carbon carrier. It is known that FA protects from the teratogenicity produced by VA. In some articles, it's reported that VA badly affects on FA metabolism and VA and FA have neuroprotective effects. VA's therapeutic effects are mediated by more than one mechanism. FA serves in amino acid metabolism, methylation reactions, DNA synthesis, repairing of damaged DNA and myelin synthesis.

In this study, we investigated the neuroprotective effects of VA and FA in term newborn rats with HIE, generated via tying the left carotis communis as the modified Levine model.

In both gender 24 Wistar rats, at 13 day-old, were used. Rats, 5 minutes after the hypoxia-ischemia, were randomly divided into four groups as SF group (%0.9 NaCl intraperitoneally, ip), VA group (400 mg/kg/d VA ip), VA+FA group (400 mg/kg/d VA and 80 µg/kg/d FA ip), FA group (80 µg/kg/d FA ip). Rats were sacrificed after 5th day of treatment. Horizontal sections were taken from brain tissue and stained with hematoxylen-Eosin. Neuron counts were performed in hippocampus CA1 and CA2-3 stratum pyramidalis areas with stereologic methods.

Total neuron count mean at SF group was 128754 ± 17206 in CA1 area, 137317 ± 15491 in CA2-3 area and 266071 ± 29938 in the whole left hippocampus; at VA group 187064 ± 25056 in CA1 area, 193571 ± 29069 in CA2-3 area and 380635 ± 49951 in the whole left hippocampus; at VA+FA group 235888 ± 25783 in

CA1 area, 241126 ± 21008 in CA2-3 area and 477014 ± 34118 in the whole left hippocampus; and at FA group 211515 ± 14557 in CA1 area, 215207 ± 21607 in CA2-3 area and 426722 ± 35147 in the whole left hippocampus.

Total neuron count means in CA1, CA2-3 areas and the whole hippocampus were found to be higher in drug treated groups (VA, VA+FA, FA groups) than SF group ($p < 0.05$).

Total neuron count means in CA1, CA2-3 areas and the whole hippocampus were found to be higher in VA+FA group than VA group ($p < 0.05$).

When comparing FA group's total mean neuron counts in CA1, CA2-3 areas and the whole hippocampus to the total neuron count means of VA+FA and VA groups no significant difference was reported ($p > 0.05$); but total neuron count means were higher in FA group than VA group and higher in VA+FA group than FA group.

This study is shown that VA and FA have alone and together neuroprotectively effective on hypoxia-ischemia model generated in neonatal term rats.

KAYNAKLAR

- 1) Levene MI, Vries LD. Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. In: Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh MC, editors. Neonatal-Perinatal Medicine VIII. Philadelphia: Mosby 2006:938-956.
- 2) Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT, Palmer C, Smith MB, Towfighi J et al. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Neurosci Res* 1999;55:158-163.
- 3) Gluckman PD, Pinala CS, Gunn AJ. Hypoxic-ischemic brain injury in the newborn: pathophysiology and potential strategies for intervention. *Semin Neonatol* 2001;6:109-120.
- 4) Biagas K. Hypoxic-ischemic brain injury: advancements in the understanding of mechanisms and potential avenues for therapy. *Curr Opin Pediatr* 1999;11:223-228.
- 5) Adams-Chapman I, Stoll BJ. Hypoxia-Ischemia. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, Stanton BF, editors. *Nelson Textbook of Pediatrics*. Philadelphia: WB Saunders Company 2007:718-720.
- 6) Mishima K, Ikeda T, Aoo N, Takai N, Takahashi S, Egashira N et al. Hypoxia-ischemic insult in neonatal rats induced slowly progressive brain damage related to memory impairment. *Neurosci Lett* 2005;376:194-199.
- 7) Uhma CS, Kimc KB, Lima JH, Peec DH, Kimd YH, Kima H et al. Effective treatment with fucoidin for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Neurosci Lett* 2003;353:21-24.
- 8) Kabakus N, Ay I, Aysun S, Söylemezoglu F, Ozcan A, Celasun B. Protective effects of valproic acid against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *J Child Neurol* 2005;20:582-587.
- 9) Davis CD, Uthus EO. Dietary folate and selenium affect dimethylhydrazine-induced aberrant crypt formation, global DNA methylation and one-carbon metabolism in rats. *J Nutr* 2003;133:2907-2914.
- 10) Iskandar BJ, Nelson A, Resnick D, Skene JH, Gao P, Johnson C et al. Folic acid supplementation enhances repair of the adult central nervous system. *Ann Neurol* 2004;56:221-227.

- 11) Brouwer IA, van Dusseldorp M, Thomas CM, Duran M, Haustvast JG, Eskes TK et al. Low-dose folic acid supplementation decreases plasma homocysteine concentrations: a randomized trial. *Am J Clin Nutr* 1999;69:99-104.
- 12) Mattson MP, Kruman II, Duan W. Folic acid and homocysteine in age-related disease. *Ageing Res Rev* 2002;1:95-111.
- 13) Ambruso DR, Hays T, Lane PA, Nuss R. Hematologic Disorder. In: Hay WW, Levin JL, Sondheimer JM, Deterding RR, editors. *Current Pediatric Diagnosis and Treatment*. McGraw-Hill Companies, 2005:855-910.
- 14) Dawson JE, Raymond AM, Winn LM. Folic acid and pantothenic acid protection against valproic acid-induced neural tube defects in CD-1 mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;211:124-32.
- 15) Karabiber H, Sonmezgoz E, Ozerol E, Yakinci C, Yologlu S. Effects of valproate and carbamazepine on serum levels of homocysteine, vitamin B12, and folic acid. *Brain Dev* 2003;25:113-115.
- 16) Hishida R, Nau H. VPA-induced neural tube defects in mice. I. Altered metabolism of sulfur amino acids and glutathione. *Teratog Carcinog Mutagen* 1998;18:49-61.
- 17) Lortlar N, Erdoğan D. Fetüslerde valproik asit ve A vitamininin neden olduğu iskelet sistemi defektleri ve folik asitin koruyucu etkisinin incelenmesi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 2003;5:5-12.
- 18) Hossain MA. Hypoxic-ischemic injury in neonatal brain: involvement of a novel neuronal molecule in neuronal cell death and potential target for neuroprotection. *Int J Dev Neurosci* 2008;26:93-101.
- 19) Thilo EH, Rosenberg AA. The Newborn Infant. In: Hay WW, Levin JL, Sondheimer JM, Deterding RR, editors. *Current Pediatric Diagnosis and Treatment*. McGraw-Hill Companies, 2005:1-66.
- 20) Shankaran S, Laptook AR. Hypothermia as a treatment for birth asphyxia. *Clin Obstet Gynecol* 2007;50:624-635.
- 21) Perlman JM. Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury. *Clin Ther.* 2006;28:1353-1365.
- 22) Abraham H, Losonczy A, Czeh G, Lazar G. Rapid activation of microglial cells by hypoxia, kainic acid, and potassium ions in slice preparations of the rat hippocampus. *Brain Res* 2001;906:115-126.

- 23) DeGracia DJ, Kumar R, Owen CR, Krause GS, White BC. Molecular pathways of protein synthesis inhibition during brain reperfusion: implications for neuronal survival or death. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:127-141.
- 24) Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 1999;79:1431-1568.
- 25) Vexler ZS, Ferriero DM. Molecular and biochemical mechanisms of perinatal brain injury. *Semin Neonatol* 2001;6:99-108.
- 26) Volpe JJ. Perinatal brain injury: from pathogenesis to neuroprotection. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2001;7:56-64.
- 27) Hilton GD, Nunez JL, McCarthy MM. Sex differences in response to kainic acid and estradiol in the hippocampus of newborn rats. *Neuroscience* 2003;116:383-391.
- 28) Franco Folino A. Cerebral autoregulation and syncope. *Prog Cardiovasc Dis* 2007;50:49-80.
- 29) Ross N, Eynon CA. Intracranial pressure monitoring. *Current Anaesthesia and Critical Care* 2005;16:255-261.
- 30) Taylor C, Hirsch N. Applied cerebral physiology. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine* 2007;8:407-412.
- 31) Gwinnutt CL, Saha B. Cerebral blood flow and intracranial pressure. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine* 2005;6:153-156.
- 32) Greisen G. Autoregulation of cerebral blood flow in newborn babies. *Early Human Development* 2005;81:423-428.
- 33) Kahlert S, Reiser G. Glial perspectives of metabolic states during cerebral hypoxia-calcium regulation and metabolic energy. *Cell Calcium* 2004;36:295-302.
- 34) Nortje J, Menon DK. Applied cerebrovascular physiology. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine* 2004;5:325-331.
- 35) Garner A, Hirsch N. Pharmacological and pathological modulation of cerebral physiology. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine* 2007;8:413-417.
- 36) Zauner A, Daugherty WP, Bullock MR, Warner DS. Brain oxygenation and energy metabolism: part I-biological function and pathophysiology. *Neurosurgery* 2002;51:289-301.
- 37) Gilkes CE, Whitfield PC. Intracranial pressure and cerebral blood flow. *Surgery (Oxford)* 2007;25:530-535.

- 38) Cunningham AS, Menon DK. Pharmacological and pathological modulation of cerebral physiology. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine* 2004;5:331-335.
- 39) Vannucci RC, Perlman JM. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 1997;100:1004-1114.
- 40) Wyatt J. Applied physiology: brain metabolism following perinatal asphyxia. *Current Paediatrics* 2002;12:227-231.
- 41) Berger R, Garnier Y. Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Res Brain Res Rev* 1999;30:107-134.
- 42) Budd SL. Mechanisms of neuronal damage in brain hypoxia/ischemia: focus on the role of mitochondrial calcium accumulation. *Pharmacol Ther* 1998;80:203-229.
- 43) Shalak L, Perlman JM. Hypoxic-ischemic brain injury in the term infant-current concepts. *Early Hum Dev* 2004;80:125-141.
- 44) Legido A, Katsetos CD, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Perinatal hypoxic ischemic encephalopathy: Current and future treatments. *Int pediatr* 2000;15:143-151.
- 45) Delivoria-Papadopoulos M, Mishra OP. Mechanisms of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategies for prevention. *J Pediatr* 1998;132:30-34.
- 46) Hagberg H, Rousset CI, Wang X, Mallard C. Mechanisms of perinatal brain damage and protective possibilities. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 2006;3:397-407.
- 47) Love S. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol* 1999;9:119-131.
- 48) White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI et al. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci* 2000;179:1-33.
- 49) Jensen A, Garnier Y, Middelani J, Berger R. Perinatal brain damage-from pathophysiology to prevention. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;110:70-79.
- 50) Oja SS, Saransaari P. Modulation of taurine release by glutamate receptors and nitric oxide. *Prog Neurobiol* 2000;62:407-425.
- 51) Hossain MA. Molecular mediators of hypoxic-ischemic injury and implications for epilepsy in the developing brain. *Epilepsy Behav* 2005;7:204-213.

- 52) Hilton GD, Nunez JL, Bambrick L, Thompson SM, McCarthy MM. Glutamate-mediated excitotoxicity in neonatal hippocampal neurons is mediated by mGluR-induced release of Ca⁺⁺ from intracellular stores and is prevented by estradiol. *Eur J Neurosci* 2006;24:3008-3016.
- 53) Hudome S, Palmer C, Roberts RL, Mauger D, Housman C, Towfighi J. The role of neutrophils in the production of hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat. *Pediatr Res* 1997;41:607-616.
- 54) Artal-Sanz M, Tavernarakis N. Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration. *FEBS Lett* 2005;579:3287-3296.
- 55) Yamashima T. Ca²⁺-dependent proteases in ischemic neuronal death A conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates. *Cell Calcium* 2004;36:285-293.
- 56) Bano D, Young KW, Guerin CJ, Lefevre R, Rothwell NJ, Naldini L et al. Cleavage of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger in excitotoxicity. *Cell* 2005;120:275-285.
- 57) Ferrer I, Lopez E, Blanco R, Rivera R, Ballabriga J, Pozas E et al. Bcl-2, Bax, and Bcl-x expression in the CA1 area of the hippocampus following transient forebrain ischemia in the adult gerbil. *Exp Brain Res* 1998;121:167-173.
- 58) Wu LY, Ding AS, Zhao T, Ma ZM, Wang FZ, Fan M. Underlying mechanism of hypoxic preconditioning decreasing apoptosis induced by anoxia in cultured hippocampal neurons. *Neurosignals* 2005;14:109-116.
- 59) Parsadanian AS, Cheng Y, Keller-Peck CR, Holtzman DM, Snider WD. Bcl-xL is an antiapoptotic regulator for postnatal CNS neurons. *J Neurosci* 1998;18:1009-1019.
- 60) Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, Nakajima W. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatr Res* 2001;49:735-741.
- 61) Tu H, Rondard P, Xu C, Bertaso F, Cao F, Zhang X et al. Dominant role of GABAB2 and Gbetagamma for GABAB receptor-mediated-ERK1/2/CREB pathway in cerebellar neurons. *Cellular Signal* 2007;19:1996-2002.
- 62) Shelp BJ, Bown AW, McLean MD. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends in Plant Sci* 1999;4:446-452.

- 63) Tillakaratne NJ, Medina-Kauwe L, Gibson KM. Gamma-aminobutyric acid (GABA) metabolism in mammalian neural and nonneural tissues. *Comp. Biochem Physiol* 1995;112:247-263.
- 64) Schlicker K, Boller M, Schmidt M. GABAC receptor mediated inhibition in acutely isolated neurons of the rat dorsal lateral geniculate nucleus. *Brain Res Bull* 2004; 63:91-97.
- 65) Gravielle MC, Novara AM, Fiszler de Plazas S. GABA-stimulated chloride uptake during avian CNS development: modulation by neurosteroids. *Int J Devl Neurosci* 1998;16:469-475.
- 66) Van Rijn CM, Willems-van Bree E. A four-ligand hypercube model to quantify allosteric interactions within the GABAA receptor complex. *Eur J Pharmacol* 2004;485:43-51.
- 67) Mitchell EA, Herd MB, Gunn BG, Lambert JJ, Belelli D. Neurosteroid modulation of GABAA receptors: Molecular determinants and significance in health and disease. *Neurochem Int* 2008;52:588-595.
- 68) Ulrich D, Bettler B. GABA(B) receptors: synaptic functions and mechanisms of diversity. *Curr Opin Neurobiol* 2007;17:298-303.
- 69) Phillis JW, O'Regan MH. Characterization of modes of release of amino acids in the ischemic/reperfused rat cerebral cortex. *Neurochem Int* 2003;43:461-467.
- 70) Perucca E. Pharmacological and therapeutic properties of valproate: a summary after 35 years of clinical experience. *CNS Drugs* 2002;16:695-714.
- 71) Löscher W. Basic Pharmacology of Valproate: a review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy. *CNS Drugs* 2002;16:669-694.
- 72) Porter RJ, Meldrum BS. Antiseizure Drugs. In: Katzung BG editors. *Basic and Clinical Pharmacology*. Mc Graw-Hill 2001:409-411.
- 73) Kamen B. Folate and antifolate pharmacology. *Semin Oncol* 1997;24:30-39.
- 74) Arcot J, Shrestha A. Folate: methods of analysis. *Trends in Food Science and Technology* 2005;16:253-266.
- 75) Mayes PA. Structure and Function of the Water-Soluble Vitamins. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW editors. *Harper's Biochemistry*. California: Appleton and Lange 1991:557-558.

- 76) Santi DV, Masters SB. Agents Used in Anemias; Hematopoietic Growth Factors. In: Katzung BG editors. Basic and Clinical Pharmacology. USA: Mc Graw-Hill 2001:555-557.
- 77) Stover PJ. Physiology of folate and vitamin B12 in health and disease. *Nutr Rev* 2004;62:3-12.
- 78) Herbert V. Recommended dietary intakes (RDI) of folate in humans. *Am J Clin Nutr* 1987;45:661-670.
- 79) Jacobs P, Wood L. Hematology of malnutrition. Part two. *Dis Mon* 2003;49:624-690.
- 80) Bailey LB, Gregory JF. Folate metabolism and requirements. *J Nutr* 1999;129:779-782.
- 81) Djukic A. Folate-responsive neurologic diseases. *Pediatr Neurol* 2007;37:387-397.
- 82) Lucock M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol Genet Metab* 2000;71:121-138.
- 83) Bhagavan NV. Medical biochemistry. Massachusetts: Harcourt/Academic Press 2001.
- 84) Mattson MP, Kruman II, Duan W. Folic acid and homocysteine in age-related disease. *Ageing Res Rev* 2002;1:95-111.
- 85) Ramaekers VT, Blau N. Cerebral folate deficiency. *Dev Med Child Neurol* 2004;46:843-851.
- 86) Dikmen M. Homosistein metabolizması ve hastalıklarla ilişkisi. *T Klin J Med Sci* 2004;24:645-652.
- 87) Eichholzer M, Tönz O, Zimmermann R. Folic acid: a public-health challenge. *Lancet* 2006;367:1352-1361.
- 88) McIlroy SP, Dynan KB, Lawson JT, Patterson CC, Passmore AP. Moderately elevated plasma homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase genotype, and risk for stroke, vascular dementia, and Alzheimer disease in Northern Ireland. *Stroke* 2002;33:2351-2356.
- 89) Streck EL, Vieira PS, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wyse AT. In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. *Metab Brain Dis* 2003;18:147-154.

- 90) Reynolds E. Vitamin B12, folic acid, and the nervous system. *Lancet Neurol* 2006;5:949-960.
- 91) Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 2003;26:137-146.
- 92) Songur A, Özen OA, Sarsılmaz M. Hipokampus. *T Klin Tıp Bilimleri* 2001;21:427-431.
- 93) Arıncı K, Elhan A. *Anatomi 2. Cilt*. Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. Şti., 1997.
- 94) Taner D. *Fonksiyonel Nöroanatomi*. Ankara: ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve İletişim A.Ş. - METU PRESS yayınları 2002:226-227.
- 95) Akdoğan I. Penisilin ile deneysel epilepsi oluşturulan sıçanlarda hipokampus nöron sayılarının optik parçalama yöntemiyle hesaplanması. Doktora Tezi. Osmangazi Üniversitesi Tıp fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalı. Eskişehir. 1999.
- 96) Kuş İ, Zararsız İ, Ögetürk M, Yılmaz HR. Formaldehit nörotoksitesine bağlı hipokampusta gelişen oksidatif hasar ve melatonin hormonunun koruyucu etkisi: deneysel bir çalışma. *Fırat Tıp Dergisi* 2007;12:256-260.
- 97) Bayramiçli M. *Deneysel Mikrocerrahi*. 1. Baskı. ARGOS İletişim Hizmetleri Reklamcılık ve Ticaret A.Ş. 2005.
- 98) Sharp PE, La Regina MC. *The Laboratory Rat*. Florida CRC Press 1998.
- 99) Yücel F, Ünal N, Erçakır M, Güven G. Rat beynindeki yaşa bağlı hacim değişikliklerinin Cavalieri yöntemi ile saptanması. *Erciyes Tıp Dergisi* 2003;25:179-185.
- 100) Witter MP, Amaral DG. Hippocampal Formation. In: Paxinos G, editors. *The Rat Nervous System*. Third Edition. China: Elsevier 2004:635-704.
- 101) Levine S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* 1960; 36:1-17.
- 102) Rodrigues AL, Arteni NS, Abel C, Zylbersztejn D, Chazan R, Viola G et al. Tactile stimulation and maternal separation prevent hippocampal damage in rats submitted to neonatal hypoxia ischemia. *Brain Res* 2004;1002:94-99.
- 103) Nedelcu J, Klein MA, Aguzzi A, Martin E. Resuscitative hypothermia protects the neonatal rat brain from hypoxic-ischemic injury. *Brain Pathol* 2000;10:61-71.

104) Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc* 2003;75:469-486.

105) Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 1984;134:127-136.

106) Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988;96:857-881.

107) Canan S, Şahin B, Ünal B, Aslan H, Bilgiç S, Kaplan S. Parçacıkların toplam sayısının hesaplanması için bir metot: parçalama. *T Klin Tıp Bilimleri* 2002;22:30-46.

108) Canan S, Bahadır A, Yıldırım Ş, Odacı E, Şahin B, Baş O, Çolakoğlu S, Bilgiç S, Kaplan S. Stereolojik uygulamalarda kullanılan pratik gereçler ve bilgisayar destekli stereolojik analiz cihazları. *T Klin J Med Sci* 2004;24:672-680.

109) Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988;96:379-394.

110) West MJ. Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. *Trends Neurosci* 1999;22:51-61.

111) Bünyamin Ünal B, Canan S, Aslan H, Şahin B, Çataloluk O, Kaplan S. Doku Örneklerindeki Objelerin Sayılarının Hesaplanmasında Tarafsız Stereolojik Metodlar: Fiziksel Disektör. *T Klin J Med Sci* 2002; 22:15-24.

112) West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 1991;231:482-497.

113) West MJ. New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol Aging* 1993;14:275-285.

114) Gundersen HJ. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones in memory of William R. Thompson. *J Microsc* 1986;143:3-45.

115) Dorph-Petersen KA, Nyengaard JR, Gundersen HJ. Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. *J Microsc* 2001;204:232-246.

- 116) Korkmaz A, Tumkaya L. Estimation of the section thickness and optical disector height with a simple calibration method. *J Microsc* 1997;187:104-109.
- 117) Odacı E, Yıldırım Ş, Bahadır A, Canan S, Şahin B, Baş O et al. Yeni stereolojik yöntemlerin olası hata kaynakları ve çözüm yolları. *T Klin Tıp Bilimleri* 2004;24:78-87.
- 118) Yılmaz I, Adiguzel E, Akdogan 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.
- 119) Akdogan I, Unal N, Adiguzel E. Estimation of the number of neurons in the hippocampus of rats with penicillin induced epilepsy. *Image Anal Stereol* 2002;21:117-120.
- 120) Adiguzel E, Duzcan SE, Akdogan I, Tufan AC. A simple low-cost method for two dimensional microscopic measuring and stepping on the microscopic plate. *Neuroanatomy* 2003;2:6-8.
- 121) Preston E, Foster DO. Evidence for pore-like opening of the blood-brain barrier following forebrain ischemia in rats. *Brain Res* 1997;761:4-10.
- 122) Calabresi P, Cupini LM, Centonze D, Pisani F, Bernardi G. Antiepileptic drugs as a possible neuroprotective strategy in brain ischemia. *Ann Neurol* 2003;53:693-702.
- 123) Kumral A, Uysal N, Tugyan K, Sonmez A, Yilmaz O, Gokmen N et al. Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Behav Brain Res* 2004;153:77-86.
- 124) Berger R, Middelani J, Vaihinger HM, Mies G, Wilken B, Jensen A. Creatine protects the immature brain from hypoxic-ischemic injury. *J Soc Gynecol Investing* 2004;11:9-15.
- 125) Ma J, Wang Y, Yang M, Chang KA, Zhang L, Jiang F et al. Treatment of hypoxic-ischemic encephalopathy in mouse by transplantation of embryonic stem cell-derived cells. *Neurochem Int* 2007;51:57-65.
- 126) O'Donnell T, Rotzinger S, Ulrich M, Hanstock CC, Nakashima TT, Silverstone PH. Effects of chronic lithium and sodium valproate on concentrations of brain amino acids. *Eur Neuropsychopharmacol* 2003;13:220-227.

- 127) Zhang MM, Xiao C, Yu K, Ruan DY. Effects of sodium valproate on synaptic plasticity in the CA1 region of rat hippocampus. *Food Chem Toxicol* 2003;41:1617-1623.
- 128) Spandou E, Karkavelas G, Soubasi V, Avgovstides-Savvopoulou P, Loizidis T, Guiba-Tziampiri O. Effect of ketamine on hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Brain Res.* 1999;819:1-7.
- 129) Oka M, Itoh Y, Fujita T. Halothane attenuates the cerebroprotective action of several Na⁺ and Ca²⁺ channel blockers via reversal of their ion channel blockade. *Eur J Pharmacol* 2002;452:175-181.
- 130) Gray JJ, Bickler PE, Fahlman CS, Zhan X, Schuyler JA. Isoflurane neuroprotection in hypoxic hippocampal slice cultures involves increases in intracellular Ca²⁺ and mitogen-activated protein kinases. *Anesthesiology* 2005;102:606-615.
- 131) Sullivan BL, Leu D, Taylor DM, Fahlman CS, Bicker PE. Isoflurane prevents delayed cell death in an organotypic slice culture model of cerebral ischemia. *Anesthesiology* 2002;96:189-195.
- 132) Feng Y, Fratkins JD, LeBlanc MH. Treatment with tamoxifen reduces hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Eur J Pharmacol* 2004;484:65-74.
- 133) Kanai H, Sawa A, Chen RW, Leeds P, Chuang DM. Valproic acid inhibits histone deacetylase activity and suppresses excitotoxicity-induced GAPDH nuclear accumulation and apoptotic death in neurons. *Pharmacogenomics J* 2004;4:336-344.
- 134) Leng Y, Chuang DM. Endogenous α -synuclein is induced by valproic acid through histone deacetylase inhibition and participates in neuroprotection against glutamate induced excitotoxicity. *J Neurosci* 2006;26:7502-7512.
- 135) Ren M, Leng Y, Jeong M, Leeds PR, Chuang DM. Valproic acid reduces brain damage induced by transient focal cerebral ischemia in rats potential roles of histone deacetylase inhibition and heat shock protein induction. *J Neurochem* 2004;89:1358-1367.
- 136) Ma J, Endres M, Moskowitz MA. Synergistic effects of caspase inhibitors and MK-801 in brain injury after transient focal cerebral ischemia in mice. *Br J Pharmacol* 1998;124:756-762.

- 137) Penrice J, Amess PN, Punwani S, Wylezinska M, Tyszczuk L, D'Souza P et al. Magnesium sulfate after transient hypoxia-ischemia fails to prevent delayed cerebral energy failure in the newborn piglet. *Pediatr Res* 1997;4:443-447.
- 138) Spandou E, Soubasi V, Papoutsopoulou S, Augoustides-Savvopoulou P, Loizidis T, Pazaiti A et al. Neuroprotective effect of long-term MgSO₄ administration after cerebral hypoxia-ischemia in newborn rats is related to the severity of brain damage. *Reprod Sci* 2007;14:667-677.
- 139) Schwartz-Bloom RD, Sah R. Gamma-Aminobutyric acid(A) neurotransmission and cerebral ischemia. *J Neurochem*. 2001;77:353-371.
- 140) Löscher W. Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. *Prog Neurobiol* 1999;58:31-59.
- 141) Papazisis G, Kallaras K, Kaiki-Astara A, Pourzitaki C, Tzachanis D, Dagklis T et al. Neuroprotection by lamotrigine in a rat model of neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Int J Neuropsychopharmacol* 2008;11:321-329.
- 142) Trojnar MK, Malek R, Chroscinska M, Nowak S, Blaszczyk B, Czuczwar SJ. Neuroprotective effects of antiepileptic drugs. *Pol J Pharmacol* 2002;54:557-566.
- 143) Mora A, Gonzalez-Polo RA, Fuentes JM, Soler G, Centeno F. Different mechanisms of protection against apoptosis by valproate and Li⁺. *Eur J Biochem* 1999;266:866-891.
- 144) Cui SS, Yang CP, Bowen RC, Bai O, Li XM, Jiang W et al. Valproic acid enhances axonal regeneration and recovery of motor function after sciatic nerve axotomy in adult rats. *Brain Res* 2003;975:229-236.
- 145) Minato H, Kikuta C, Fujitani B, Masuda Y. Protective effect of zonisamide, an antiepileptic drug, against transient focal cerebral ischemia with middle cerebral artery occlusion-reperfusion in rats. *Epilepsia* 1997;38:975-980.
- 146) Chaudhari T, McGuire W. Allopurinol for preventing mortality and morbidity in newborn infants with suspected hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008;2:1-14.
- 147) Buonocore G, Groenendaal F. Anti-oxidant strategies. *Semin Fetal Neonatal Med* 2007;12:287-295.
- 148) Shao L, Young LT, Wang JF. Chronic treatment with mood stabilizers lithium and valproate prevents excitotoxicity by inhibiting oxidative stress in rat cerebral cortical cells. *Biol Psychiatry* 2005;58:879-884.

- 149) Wang JF, Azzam JE, Young LT. Valproate inhibits oxidative damage to lipid and protein in primary cultured rat cerebrocortical cells. *Neuroscience* 2003;116:485-489.
- 150) Bittigau P, Sifringer M, Genz K, Reith E, Pospischil D, Govindarajalu S, et al. Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:15089-15094.
- 151) Kaindl AM, Asimiadou S, Manthey D, Hagen MV, Turski L, Ikonomidou C. Antiepileptic drugs and the developing brain. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:399-413.
- 152) Gruppo R, DeGrauw A, Fogelson H, Glauser T, Balasa V, Gartside P. Protein C deficiency related to valproic acid therapy: A possible association with childhood stroke. *J Pediatr* 2000;137:714-718.
- 153) Straussberg R, Kivity S, Weitz R, Harel L, Gadoth N. Reversible cortical atrophy and cognitive decline induced by valproic acid. *Eur J Paediatr Neurol* 1998;2:213-218.
- 154) Nordhoff A, Schirmer RH, Mayatepek E, Becker K. No evidence for inhibition of human glutathione reductase by valproic acid. *Biochem Pharmacol* 1994;47:1453-1456.
- 155) Verrotti A, Basciani F, Morresi S, Morgese G, Chiarelli F. Thyroid hormones in epileptic children receiving carbamazepine and valproic acid. *Pediatr Neurol* 2001;25:43-46.
- 156) Bentsen KD, Gram L, Veje A. Serum thyroid hormones and blood folic acid during monotherapy with carbamazepine or valproate. A controlled study. *Acta Neurol Scand* 1983;67:235-241.
- 157) Ubeda N, Alonso-Aperte E, Varela-Moreiras G. Acute valproate administration impairs methionine metabolism in rats. *J Nutr* 2002;132:2737-2742.
- 158) Hendel J, Dam M, Gram L, Winkel P, Jorgensen I. The effects of carbamazepine and valproate on folate metabolism in man. *Acta Neurol. Scand* 1984;69:226-231.
- 159) Kishi T, Fujita N, Eguchi T, Ueda K. Mechanism for reduction of serum folate by antiepileptic drugs during prolonged therapy. *J Neurol Sci* 1997;145:109-112.

- 160) Geda G, Caksen H, İçagasioğlu D. Serum lipids, vitamin B12 and folic acid levels in children receiving long-term valproate therapy. *Acta Neurol Belg* 2002;102:122-126.
- 161) Gidal BE, Tamura T, Hammer A, Vuong A. Blood homocysteine, folate and Vitamin B-12 concentrations in patients with epilepsy receiving lamotrigine or sodium valproate for initial monotherapy. *Epilepsy Res* 2005;64:161-166.
- 162) Ormazabal A, Garcia-Cazorla A, Perez-Duenas B, Gonzalez V, Fernandez-Alvarez E, Pineda M et al. Determination of 5-methyltetrahydrofolate in cerebrospinal fluid of paediatric patients: reference values for a paediatric population. *Clin Chim Acta* 2006;371:159-162.
- 163) Wegner C, Nau H. Alteration of embryonic folate metabolism by valproic acid during organogenesis: implications for mechanism of teratogenesis. *Neurology* 1992;42:17-24.
- 164) Alonso-Aperte E, Ubeda N, Achon M, Perez-Miguelsanz J, Varela-Moreiras G. Impaired methionine synthesis and hypomethylation in rats exposed to valproate during gestation. *Neurology* 1999;52:750-756.
- 165) Trotz M, Wegner C, Nau H. Valproic acid-induced neural tube defects: reduction by folinic acid in the mouse. *Life Sci* 1987;41:103-110.
- 166) Hansen DK, Grafton TF, Dial SL, Gehring TA, Siitonen PH. Effect of supplemental folic acid on valproic acid-induced embryotoxicity and tissue zinc levels in vivo. *Teratology* 1995;52:277-285.
- 167) Martinasevic MK, Rios GR, Miller MW, Tephly TR. Folate and folate-dependent enzymes associated with rat CNS development. *Dev Neurosci* 1999;21:29-35.
- 168) Tagliari B, Zamin LL, Salbego CG, Netto CA, Wyse AT. Hyperhomocysteinemia increases damage on brain slices exposed to in vitro model of oxygen and glucose deprivation: prevention by folic acid. *Int J Dev Neurosci* 2006;4:285-291.
- 169) Matte C, Durigon E, Stefanello FM, Cipriani F, Wajner M, Wyse AT. Folic acid pretreatment prevents the reduction of Na(+),K(+)-ATPase and butyrylcholinesterase activities in rats subjected to acute hyperhomocysteinemia. *Int J Dev Neurosci* 2006;1:3-8.