



**T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**NEONATAL HİPOKSİK İSKEMİK SIÇAN MODELİNDE MAGNEZYUM SÜLFAT
İLE MELATONİN TEDAVİLERİNİN NÖROPROTEKTİF ETKİNLİKLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Merih ÇETİNKAYA

(DOKTORA TEZİ)

Bursa-2009



T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

NEONATAL HİPOKSİK İSKEMİK SIÇAN MODELİNDE MAGNEZYUM SÜLFAT İLE
MELATONİN TEDAVİLERİNİN NÖROPROTEKTİF ETKİNLİKLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI

Merih ÇETİNKAYA





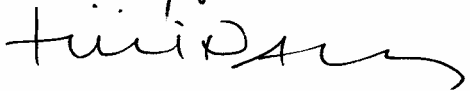
(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Doç. Dr. Fadıl ÖZYENER

Bursa-2009

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu tez, jürimiz tarafından Merih Çetinkaya'nın doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Adı ve Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Doç. Dr. Fadıl Özyener	
Üye	Prof. Dr. Gülderen Şahin	
Üye	Prof. Dr. Kasım Özlük	
Üye	Prof. Dr. Nilgün Köksal	
Üye	Doç. Dr. Tülin Alkan	

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun tarih, sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Gürsel Başmeç
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET.....	II
İNGİLİZCE ÖZET.....	III
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
GEREÇ ve YÖNTEM.....	16
Çalışma Protokolü ve Tedavi Grupları.....	16
Hipoksik-iskemik beyin hasarının oluşturulması....	17
İskemik infarktın ölçümü.....	17
İmmünohistokimya ve hücre sayımı.....	18
İstatistiksel değerlendirme.....	20
BULGULAR.....	21
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	31
KAYNAKLAR.....	36
TEŞEKKÜR.....	41
ÖZGEÇMİŞ.....	42

ÖZET

Perinatal hipoksik-iskemik beyin hasarı neonatal mortalite ve serebral palsy, mental retardasyon, epilepsi gibi uzun dönem nörolojik defisitlerin en önemli nedenlerinden birisidir. Çalışmanın amacı neonatal hipoksik-iskemik sıçan modelinde N-metil-D-aspartat (NMDA) antagonisti magnezyum sülfat (MgSO₄) ile serbest radikal temizleyicisi melatoninin, tekli ve kombine uygulamalarının nöroprotektif etkinliklerinin karşılaştırılmasıdır.

Yedi günlük sıçanlar, anestezi altında sağ arteria karotis kominis ligasyonu ve koterizasyonu sonrasında 2 saat boyunca hipoksida tutuldular. Sıçanlar randomize olarak 4 gruba ayrıldılar: hipoksi-iskemi uygulanan ve intraperitoneal (ip) olarak serum fizyolojik uygulanan kontrol grubu, MgSO₄ uygulanan grup, melatonin uygulanan grup ile MgSO₄ ile kombine şekilde melatonin uygulanan MgSO₄ ve melatonin grubu. İlaç tedavileri iskemi öncesi, hipoksi sonrası ve ikinci dozdan 24 saat sonra olmak üzere üç doz uygulandı.

İnfarkt hacmi yüzdesindeki azalmanın ilaç uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı ancak ilaç grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadığı saptandı. Tekli ve kombine ilaç tedavileri ile hipokampusun CA1, CA3 ve dentat girus alanlarındaki TUNEL pozitif hücre sayısının anlamlı olarak azaldığı görüldü. Kortekste, ilaç uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre daha az sayıda nöronun pozitif boyandığı ancak ilaç grupları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı belirlendi.

Bu çalışmada, hipoksi-iskemi sürecinin farklı basamaklarına etki eden MgSO₄ ve melatoninin tekli ve kombine uygulamaları beyin infarkt yüzde hacmini azaltarak ve apoptozisi önleyerek nöroprotektif etki göstermişlerdir. Sonuç olarak, bu iki ajanın hipoksik iskemik ensefalopatisi olan yenidoğanların tedavisinde kullanılabilecekleri düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, Magnezyum sülfat, Melatonin, Neonatal hipoksik-iskemi, Serebral nöroproteksiyon

SUMMARY

Neuroprotective effects of magnesium sulfate when used alone or in combination with melatonin on apoptosis induced neonatal hypoxic-ischemic rat model.

Perinatal hypoxic-ischemic brain damage is a major cause of neonatal mortality and severe long term neurological deficits such as cerebral palsy, mental retardation, and epilepsy. The aim of this study to compare the effects of two neuroprotective agents, magnesium sulfate (MgSO₄) as N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist and melatonin as a free radical scavenger as both mono and combined therapies in neonatal hypoxic-ischemic rat model.

After being anesthetized, 7-day-old pups underwent ischemia followed by exposure to hypoxia for 2 hours. The rats were randomly divided into 4 groups: vehicle treated animals were subjected to procedure and were injected saline intraperitoneally (ip); MgSO₄ treated animals, melatonin treated animals and combination of MgSO₄ and melatonin treated animals. The doses were administered just before ischemia, after hypoxia and 24 hours after the second dose, respectively.

Drug administration significantly reduced “the percent infarcted volume” compared to control animals. There was no significant difference between drug treated groups. TUNEL stain showed markedly reduced numbers of TUNEL positive cells at CA1, CA3 and dentate gyrus areas of hippocampus at drug treated groups. There were also small number of neurons stained positively in cortex at drug treated groups compared to control animals at unit area. There was no significant difference between drug treated groups for TUNEL staining.

Both MgSO₄ and melatonin, two agents acting different stages of HI, used either alone or in combination with had significantly decreased the percent infarct area, and apoptosis. It may be suggested that these agents can be used clinically in the treatment of infants with HI encephalopathy.

Key Words: Apoptosis, Cerebral neuroprotection, Magnesium sulfate, Melatonin, Neonatal hypoxic-ischemia.

GİRİŞ

Perinatal hipoksik-iskemik (Hİ) beyin hasarı; hem neonatal mortalitenin hem de serebral palsy, mental retardasyon, epilepsi ve öğrenme güçlüğü gibi çeşitli uzun dönem nörolojik bozuklukların en önemli nedenlerinden birisidir (1,2).

Literatürde term bebeklerde perinatal hipoksi sıklığının 1000 canlı doğumda 2-4 olduğu, prematüre doğan ya da çok düşük doğum ağırlığına sahip bebeklerde ise bu oranın %60'lara kadar çıktığı bildirilmiştir (3). Doğum sırasında hipoksiden etkilenen bebeklerin %20-50'si yenidoğan döneminde kaybedilmekte olup, daha hafif derecede etkilenen ve sağ kalan bebeklerin %25'inde ise çeşitli nörolojik bozukluklar görülmektedir. Uzun süreli izlem çalışmalarında, perinatal hipoksi-iskemiye bağlı orta derecede ensefalopatisi olan çocukların %20'sinde 3.5 ve 8 yaşlarında iken önemli nörolojik bozuklukların geliştiği bildirilmiştir (3,4). Günümüzde hipoksi-iskeminin bazı in-utero stres tetikleyicileri tarafından tetiklenen ve kısmen de olsa genetik olarak ortaya çıkan bazı kompleks ardışık olayların son ortak yolu olduğu yönünde artan kanıtlar mevcuttur (5).

Perinatal Hİ olay, değişken bir hipoksi-iskemi dönemini takip eden reperfüzyon ve reoksijenizasyon dönemleri ile karakterizedir. Gerçek Hİ olay sırasında, duyarlı olan nöronların çoğu ölmektedir. Ancak, iskemik nöronal hasarın sınırlanmasında beyine olan oksijen ve kan desteğinin tekrar sağlanması önemli olup, reperfüzyon fazı sırasında birbirleri ile bağlantılı çok sayıdaki biyokimyasal yolağın aktivasyonu ikincil enerji yetmezliği ve sonrasında ölüme neden olmaktadır (6). Perinatal Hİ olayı takiben uygulanacak nöroprotektif tedavinin amacı Hİ olay sonrasında canlı olmasına rağmen artmış eksitatör amino asit (EAA) üretimi, serbest oksijen radikalleri oluşumu, sitokin salınımı yolu ile ikincil enerji yetmezliği sonucu hasara uğrayabilecek nöronların kurtarılmasıdır (6,7). Deneysel neonatal Hİ modellerde çeşitli ajanların nöroprotektif oldukları gösterilmiş olmasına rağmen, bunlardan çok az bir kısmı klinik çalışmalarda term yenidoğan bebeklerde başarı ile kullanılmaktadır. Literatürde sadece bir yolağın etkisinin ortadan kaldırılması ile nöronal hücrelere olan aşırı kalsiyum girişinin tam olarak önlenemeyeceği ve bu nedenle de Hİ süreçte farklı basamaklara etki eden ilaçların kombinasyonlarının kullanılmasının, sadece bir aşamaya etkili tekli ilaç tedavisine göre daha fazla nöroproteksiyon sağlayacağı öne sürülmüştür (8).

Bu çalışmanın amacı, Hİ süreçte farklı basamaklara etki eden ve klinikte yenidoğan bebeklerin çeşitli hastalıklarının tedavisinde kullanılan magnezyum sülfat ile melatoninin tekli

kombine uygulamalarının nöroprotektif etkinliklerinin neonatal Hİ sıçan modelinde değerlendirilmesidir.

GENEL BİLGİLER

Beyin hasarı prematüre ve term bebeklerde sonradan gelişen nörolojik bozuklukların en sık nedenidir. Kanama, enfeksiyon, metabolik bozukluklar gibi çok sayıda durum yenidoğan bebeklerde beyin hasarına yol açsa da, yenidoğan döneminde en sık olarak Hİ olayı takiben gelişen ikincil beyin hasarı görülmektedir (9).

Yenidoğan bebeklerde gözlenen hipoksik iskemik ensefalopatinin (HİE) toplam 6 formu mevcuttur. En sık görülen formu selektif nöronal nekrozdur ve 5-30 dakika içinde gelişmektedir. Serebral korteks, hipokampus (özellikle CA1 bölgesi), putamen, talamus, serebellum ve major serebral arterler arası bölge en sık etkilenmektedir. İkinci form olan status marmaratus tablosu %5 oranında görülür. Bazal gangliyon ve talamus tutulur ve nöron kaybı, gliozis ve hipermyelinizasyon ile seyreder. Üçüncü formu intra veya periventriküler hemoraji oluşturmakta olup, germinal matriksten kaynaklanır ve sıklıkla serebral kan akım dalgalanmaları ile ilişkilidir. Dördüncü form olan parasagittal beyin hasarlanması term bebeklerdeki önemli bir iskemik lezyon formu olup, serebral yapıların parasagittal bölgelerindeki subkortikal beyaz cevher ve serebral korteks hasarı ile karakterizedir. Hasar iki taraflı ve genellikle simetriktir. Sıklıkla kist oluşumu ile ilişkili olan beşinci form tek taraflı, fokal veya multifokal beyin hasarıdır (10).

Term bebeklerdeki HİE tanısı ile en sık karıştırılan tablo prematüre bebeklerdeki periventriküler lökomalazidir (PVL). PVL, lateral ventrikülün arka ve yan kısmındaki beyaz cevherin hasarı ile karakterizedir. Sıklıkla prematüre bebeklerde, ventrikül içi kanaması olanlarda, kardiyak ve solunumsal bozukluğu olanlarda, antenatal/plasental/fetal enfeksiyonu olanlarda gelişmektedir. Görülme sıklığı gestasyonel yaş ile ters orantılıdır ve genellikle 26-28 gestasyonel haftalarda doğan bebeklerde pik yapmaktadır. PVL gelişiminde esas olarak serebrovasküler anatomik faktörler rol oynamaktadır. Damar içi (dalgalanmalar gösteren kan basıncı, serebral kan akımındaki artış, serebral venöz basınçtaki artış, serebral kan akımındaki azalma ve sistemik hipotansiyon ile trombosit ve pıhtılaşma bozuklukları), damarsal (zayıf kapiller bütünlük ve bu bölgedeki damarların hipoksi-iskemiye duyarlılığı) ve damar dışı (vasküler destek eksikliği ve artmış fibrinolitik aktivite) faktörler germinal matriks kanamaları ve sonrasında gelişen PVL'nin patogenezinde rol oynamaktadır. İmmatür oligodendrositlerin duyarlılığı ve antioksidan sistemin yetersizliği de PVL gelişimine neden olan diğer faktörlerdir. PVL, esas olarak fokal periventriküler nekroz ve daha yaygın olarak serebral beyaz cevher hasarını içermektedir (11).

Perinatal Hİ olaydaki temel patogenetik mekanizma bozulmuş serebral kan akımıdır. Bu durum esas olarak plasental gaz akımı ve gaz değişimindeki bozulmanın bir sonucu olup, sıklıkla hipoksi ya da şiddetli fetal asidemi (fetal umbilikal kord arter $pH \leq 7.00$) olarak tanımlanmaktadır. Serebral kan akımındaki azalmaya bağlı olarak dokulara giden oksijen miktarının azalması; asidoz, glutamat ve nitrik oksit (NO) eksitotoksitesisi, intrasellüler kalsiyum iyon (Ca^{2+}) birikimi, serbest radikal oluşumu ve oksidatif stres ile sonuçlanırken, bu durumu inflamasyon, apoptozis ve hücre ölümü takip etmektedir (12-14).

Orta dereceli hipoksemi sırasında anaerobik glikoliz hızının arttırılarak, fetusun serebral metabolizması ve yeterli adenozin trifosfat (ATP) düzeyleri devam ettirilir. Ancak devam eden hipoksi birkaç dakika içinde serebral korteksteki enerji metabolizmasının bozulmasına neden olur. Hİ olaya bağlı nöronal oksijen ve glukoz açığının artması ve yüksek enerjili fosfat depolarının yetersiz kalması sonucunda oksidatif metabolizma anaerobik metabolizmaya dönüşür. Hipoksi-iskemi, ATP sentezini durdurmasına rağmen, ATP'nin kullanımına engel olmaz. ATP, fosfokreatinin depoları azalana kadar kreatin kinaz reaksiyonu ile normal düzeylerinin %95'inde tutulur. Ancak, sonrasında ATP hızla azalmaya başlar. Laktat yapımı ile bir miktar ATP sentez edilmesine rağmen, enerji yetmezliği önlenemez. Sonuçta, yeterli enerji kaynağının olmaması nedeni ile uyarılan anaerobik glikolizis, asidoz ile sonuçlanır. Asidoz gelişimi iskemik dokunun iyileşmesini önler. Asidoz oluşumunda birçok mekanizma devreye girmektedir. Aerobik metabolizmadan anaerobik metabolizmaya zorunlu geçiş laktat yapımına ve yapılan her 2 ATP molekülü için 2 hidrojen atomunun (H^+) salınmasına neden olurken, hücre ve organel membranlarındaki $Ca^{2+}/2H^+$, Na^+/H^+ değişimi ve Ca^{2+} tamponlanması sırasında mitokondriden H^+ salınması gibi birçok diğer mekanizma da intrasellüler asidoza neden olur (10,15).

ATP'nin hayati fonksiyonlarından biri plazma ve intrasellüler membranlar boyunca iyon dengesini sağlamaktır. Sodyum iyonları (Na^+), potasyum iyonları (K^+) ve Ca^{2+} , hareketleri için ATP'ye bağımlıdır. Enerji bağımlı iyon pompalarının yetmezliği membrandaki iyon dengesini bozar. Hİ olay sırasında gelişen enerji eksikliği nedeni ile Na^+-K^+ ATPaz pompası çalışmaz ve hücre membranında Na^+ , K^+ ve Ca^{+2} konsantrasyon gradientleri düzenlenemediği için membran potansiyeli 0 mV'a yaklaşır. Hipoksiye bağlı depolarizasyon nedeni ile enerji yetmezliği olan hücrelerde; hücre içinde Na^+ birikirken, klor iyonlarının (Cl^-) da hücre içine geçmesiyle, Na^+ ve Cl^- 'un intrasellüler birikimi sonucu osmoz yolu ile hücrelerin şişmesi ve sitotoksik hücre ödemi meydana gelir. Aynı zamanda membran potansiyelinin kaybı ve Ca^{2+} iyon konsantrasyon gradienti nedeni ile, hem voltaj bağımlı hem de nörotransmitter bağımlı iyon kanallarının aktivasyonunun yanı sıra Na^+-Ca^{+2} pompasının

çalışmamasına bağlı olarak hücre içine Ca^{2+} akımı olmakta ve hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunda aşırı bir artış meydana gelmektedir. Ayrıca, intrasellüler Na^+ artışı mitokondriden, ATP'deki azalma ise endoplazmik retikulumdan (ER) Ca^{2+} salınımını uyarır. Sitozolik Ca^{2+} miktarındaki artışın en önemli nedeninin enerji bağımlı geri alımdaki yetersizlik ile membran depolarizasyonuna bağlı artmış glutamat salınımı olduğu düşünülmektedir.

Tüm bu nedenlere bağlı olarak ortaya çıkan intrasellüler Ca^{2+} düzeylerindeki aşırı artış proteaz, lipaz ve endonükleaz aktivasyonu ile hücre hasarına yol açmaktadır. Kalsiyum, fosfolipaz aktivasyonu ile membran hasarına, proteaz aktivasyonu ile sitoskeleton parçalanmasına, nükleazlar yolu ile deoksiribonükleik asit (DNA) yıkımına, oksidatif fosforilasyonun bozulması yolu ile ATP'nin azalmasına, artmış glutamat salınımı ve nitrik oksit sentaz (NOS) aktivasyonu ile NO oluşumuna neden olmaktadır (10,16).

Dinlenim durumundaki bir hücrede sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonu nöronların çoğunluğunda 10^{-7} M düzeylerinde iken, hücre dışı ortamda ve hücre içi Ca^{2+} depoları olan ER ve sarkoplazmik retikulumda (SR) 10^{-3} M düzeylerindedir. Hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonu, hücre dışındaki 10 000 katlık farka rağmen çok sıkı bir şekilde korunmakta ve kontrol edilmektedir. Uyarılma sırasında hücre zarından ve hücre içi Ca^{2+} depolarından kalsiyum kanalları yoluyla hücre içine girerek işlevleri tetikleyen Ca^{2+} , yine hücre ve ER zarlarında bulunan kalsiyum pompaları ve Na^+/Ca^{2+} değiştiricileri yardımıyla hücre dışına ve depolara taşınmaktadır (17).

Hücre zarında yer alan voltaj bağımlı ve reseptör bağımlı Ca^{2+} kanalları ile, ER'da bulunan inositoltrifosfat (IP3) ile aktive olan Ca^{2+} kanalları hücre içi kalsiyum dengesinde rol oynamaktadır. Voltaj bağımlı Ca^{2+} kanallarının açılması lokal membran potansiyeli ile kontrol edilir. Oluşan depolarizasyon voltaj bağımlı Ca^{2+} kanallarının açılmasına neden olmaktadır (15).

İnternal Ca^{2+} depolarından Ca^{2+} salınması, intrasellüler serbest Ca^{2+} konsantrasyonuna belirgin katkıda bulunur. ER'da internal Ca^{2+} depoları için iki ayrı havuzun olduğu ve Ca^{2+} 'un bu havuzlardan tamamen farklı mekanizmalarla salındığı ileri sürülmüştür. Birinci mekanizmada, ER veya SR zarında bulunan kanallar, IP3 ile aktive olurlar ve kanal aktivasyonu sonucu ER depolarından serbestleşen Ca^{2+} hücre içine geçer. IP3, fosfolipaz C enzimi etkisiyle hücre zarından serbestleşmektedir. IP3'ün ER zarında bağlanarak aktifleştirdiği kalsiyum kanalı voltaj bağımsız katyon kanalı özelliklerini taşımaktadır. Uyarılan IP3, hücrelerin G protein-ilişkili reseptörleri yoluyla serbest Ca^{2+} 'un santral düzenleyicisi olarak görev yapmaktadır. İkinci bir mekanizmada, Ca^{2+} 'un, Ca^{2+} 'la aktive olan

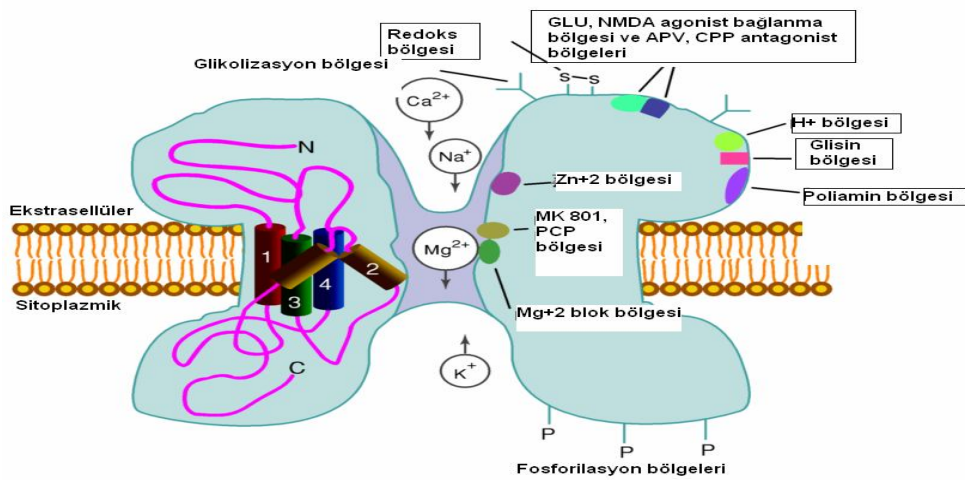
kalsiyum kanallarından salınmasıdır. ER veya SR zarında bulunan bu kanallar, hücre içi artan kalsiyum tarafından aktive edilmektedirler (18).

Enerji yetmezliği esnasında Ca^{2+} 'un içeri girmesine neden olan diğer bir etki de Na^+/Ca^{2+} pompasında olur. Bu pompanın görevi normalde ekstrasellüler-intrasellüler Na^+ gradientini düzenlemektir. Enerji yetmezliği esnasında transmembran Na^+ dengeleri bozulunca pompa tersine çalışmaya başlar. Ca^{2+} dışarı, Na^+ içeri pompalanması gerekirken, Ca^{2+} içeri, Na^+ dışarı pompalanmaya başlar. Hücre içindeki Ca^{2+} artışı çeşitli şekillerde santral sinir sisteminde EAA olan glutamatın salınmasını tetiklemektedir (2).

Normal beyin fonksiyonunun devam edebilmesi için eksitatör ve inhibitör nörotransmitter aktivitesinde çok hassas denge gerekmektedir. Eksitatör nörotransmitter olarak fonksiyon gören glutamat; beyin dokusundaki tüm eksitatör presinaptik terminallerde milimolar doku düzeylerinde bulunur, presinaptik veziküllerde depolanır ve presinaptik membranın depolarizasyonu sonucu salgılanır. Presinaptik aralığa salınan glutamat, nöronlar ve glia üzerinde birçok postsinaptik membran reseptörleri aracılığı ile etkisini göstermektedir (2). Glutamat reseptörleri, farmakolojik, elektrofizyolojik ve biyokimyasal çalışmalar sonucu iyonotropik ve metabotropik reseptörler olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. İyonotropik reseptörler de, α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazol propiyonik asit (AMPA), Kainat ve N-metil-D-Aspartat (NMDA) reseptörleri olarak alt gruplara ayrılırlar. NMDA reseptörleri esas olarak serebral korteks, hipokampus, korpus striatum ile serebellumda yoğun olarak bulunmaktadır. AMPA reseptörlerinin dağılımı da NMDA reseptörlerine benzer ancak NMDA reseptörleri serebellumda granüler hücre tabakasında yoğun iken AMPA reseptörleri moleküler tabakada daha fazladır. Kainat reseptörleri ise hipokampusda, neokorteksin iç ve dış tabakalarında bulunmaktadır. NMDA reseptörlerinin uzun süreli potansiyalizasyon özellikleri mevcuttur. NMDA reseptörleri Ca^{2+} iyon kanalları üzerinden etki gösterirken, AMPA ve Kainat reseptörleri Na^+ girişini sağlayan iyon kanalları üzerinden etki etmektedir. NMDA reseptör kompleksinin diğer iyanotropik reseptörlere göre Ca^{2+} 'a karşı 5 kat geçirgen olduğu gösterilmiştir (19,20).

NMDA reseptör kompleksi başlıca 6 bölgeden oluşmaktadır. NMDA ve diğer agonist tanıma bölgesi; NMDA, glutamat ve diğer agonistler ile reaksiyona girerek reseptör içindeki iyon kanalının açılmasını sağlayarak normal eksitatör etkinin oluşmasını sağlamaktadır. Kompetitif EAA antagonistleri buraya yapışmak için glutamat ile yarışmaktadırlar. Katyon bağlanma bölgesi kanal içinde yer alır, buraya magnezyum (Mg^{+2}) bağlanır ve membran boyunca iyon akımını bloke eder. Magnezyumun etkisi agonist ve voltaj bağımlıdır. Yani iyon kapısı olarak işleyen reseptörü istirahat membran potansiyeli (-70mV) durumunda bloke

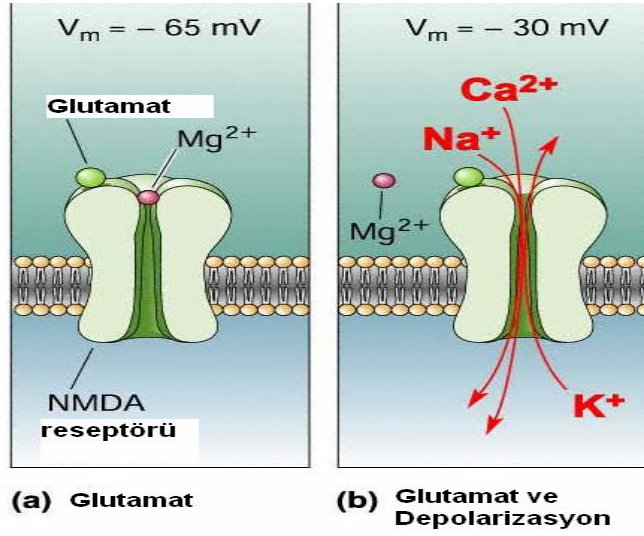
eder. Reseptörün tekrarlayan, uzun süreli uyarılarca (NMDA tanıma bölgesine sürekli bağlanan agonistlerin varlığında) depolarize edilmeye başladığı ve membran potansiyeli -30 mV düzeylerine ulaştığı zaman Mg^{2+} 'un etkisi kaybolarak iyon kapısı açılır. Glisin bağlanma bölgesi ise eksitator iletiyi kuvvetlendirmektedir. Poliamin bağlanma bölgesi de glisin bağlanma bölgesine benzer şekilde reseptörün aracılık ettiği yanıtı arttırmaktadır. Çinko bağlanma bölgesi inhibitör etki göstermektedir ve çinko blokajı voltaj bağımlıdır. Kanal antagonist bağlanma bölgesi kompleksin alt kısmında yer alır ve eksitotoksik etkiyi antagonize edebilecek farmakolojik manüplasyonlara açık bir bölgedir. Bu bölgeye bağlanacak antagonistin bağlanma yerine ulaşabilmesi için kanalın açık olması, yani reseptörün NMDA, glutamat veya benzeri agonistlerce uyarılmış ve magnezyumun kanal kapatıcı etkisinin ortadan kaldırılmış olması gerekmektedir. Bu etki agonist bağımlı olmakla birlikte non-kompetitifdir yani bağlanma yeri için agonistlerle yarışmaz, aksine onların açtığı kanala girerek kanalın kapanmasını sağlar. Postsinaptik membran reseptörünün uyarılması arttıkça bu bölgeye bağlanan non-kompetitif antagonistlerin etkinliği de artmaktadır. AMPA reseptörleri monovalan katyonlar (Na^+ , K^+ , H^+) için daha seçicidirler ve hızlı eksitator sinaptik geçişte rol oynamaktadırlar. Bu kanalların açılması ile Na^+ hücre içine girer ve depolarizasyon oluşur. AMPA reseptörlerindeki GluR2 alt ünitesinin erken dönemlerde nöronlarda bulunmaması, AMPA reseptörünün immatür nöronlarda Ca^{2+} a geçirgen olmasını sağlayarak, yenidoğanlardaki HI hasarda rol oynamasına neden olmaktadır (2,19). Şekil 1, NMDA reseptörünün yapısını göstermektedir.



Şekil-1: NMDA Reseptörünün Yapısı (Kandel ve ark. (21), 1991, çalışmasından uyarlanmıştır)

NMDA reseptör kanalları, fizyolojik fonksiyonlarıyla diğer reseptör kanallarından farklılık göstermektedirler. Bu kanallar, hem ligand hem de voltaj bağımlı olarak çalışırlar. Voltaj bağımlılıkları iyon kanalı içindeki Mg^{2+} bloğundan kaynaklanır. Enerji yetmezliği sonucu ortaya çıkan depolarizasyon, normalde iyon girişini önleyen Mg^{2+} katyonlarının NMDA kanallarından yer değiştirmelerine neden olur. Bu durum EAA'lerle, NMDA akımlarının aktivasyonuna yol açarak, Ca^{2+} 'un hücre içine girişini kolaylaştırır.

Depolarizasyon aynı zamanda sinaptik terminallerden glutamat salgılanmasını da arttırırken, nöronlarda ve glialarda enerji bağımlı glutamat geri dönüşünde azalma ortaya çıkar. Bunların sonucunda artan glutamat ve diğer EAA konsantrasyonlarının, hem in vivo hem de in vitro olarak NMDA ve diğer glutamat reseptörlerini aktive ederek nörodejenerasyonu tetiklediği düşünülmektedir. Diğer iyonotropik reseptörlerin aktivasyonu, Na^+ , K^+ ve Ca^{2+} permeabilitelerine göre ilgili iyon kanallarının açılmalarını düzenlemektedir. Kanalın açılmasından sonra bu reseptörler hassasiyetlerini kaybederek kanalın tekrar kapanmasına neden olurlar. Metabotropik reseptörler ise iyon kanalları ile ilişkili değildirler. Etkilerini fosfoinositid hidrolizini ortaya çıkararak G protein bağımlı mekanizmalarla, internal depolardan Ca^{2+} iyonlarını mobilize ederek, IP3 ve diaçilgliserol oluşumu ile gösterirler. Böylece glutamat değişik membran reseptörleriyle intrasellüler Ca^{2+} düzeyini birbirinden farklı mekanizmalarla etkilemektedir. Her bir glutamat reseptör alt tipinin aktivasyonunun bazı durumlarda Hİ süreçteki nöronal harabiyetin ortaya çıkmasından sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür. Ayrıca belli glutamat reseptör alt tiplerinin aktivasyonunun belirli tipte nöral harabiyet oluşturduğu da gösterilmiştir (2, 15, 22). NMDA reseptörünün, NMDA dışındaki diğer iyonotropik glutamat reseptörleriyle kıyaslandığında, daha yüksek Ca^{2+} geçirgenliğinden dolayı glutamat nörotoksitesinin ortaya çıkmasında anahtar rolü oynadığı hakkında fikir birliği mevcuttur. Ancak, son zamanlarda başta prematüre bebeklerdeki oligodendroglial hasar ve PVL ile term bebeklerdeki Hİ olayda AMPA ve Kainat reseptörlerinin de aktif rol oynadığı ve bu reseptörlerin aktivasyonunun önlenmesi ile beyin hasarının azaltılabileceği bildirilmiştir (9, 23-25). Sonuç olarak, NMDA ve diğer EAA'ların nöronlarda hücre içine Ca^{2+} girişini arttırdığının saptanmasından sonra aşırı sinaptik aktivitenin, ekstrasellüler glutamat fazlalığının ve hücre içinde aşırı Ca^{2+} birikiminin Hİ süreçteki nöron harabiyetini başlatan ana neden olduğu ileri sürülmektedir (2). Şekil 2, membran potansiyelinin değiştiği depolarizasyon sırasında Mg^{2+} bloğunun ortadan kalkışını ve hücre içine Ca^{2+} girişini göstermektedir.



Şekil-2: Hipoksinin Neden Olduğu Depolarizasyon ile NMDA Reseptöründeki Mg⁺² Bloğunun Ortadan Kalkışı ve Hücre İçine Ca⁺² Girişi (Kandel ve ark. (21), 1991, çalışmasından uyarlanmıştır.)

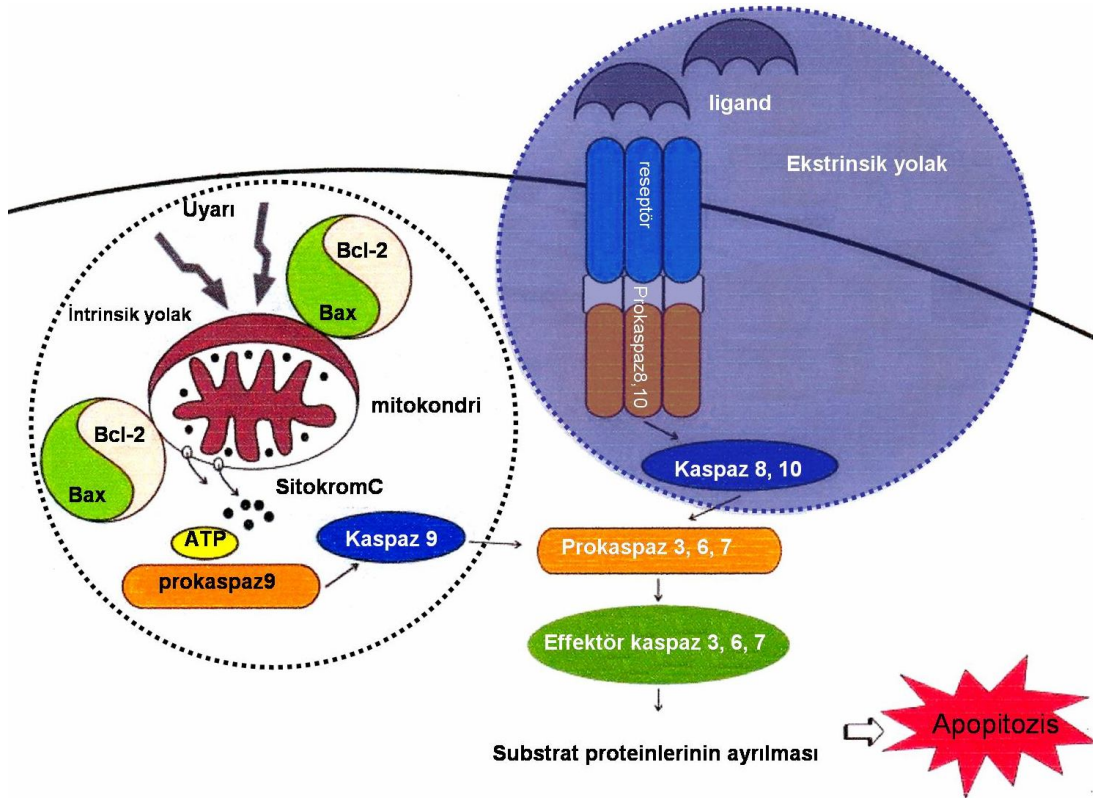
Serbest radikaller, normal hücresel işlemler esnasında mitokondrial elektron transport sisteminde, prostoglandinin hidroperoksidazla katalize edilen reaksiyonunda, katekolaminler gibi küçük moleküllerin oto-oksidasyonunda, mikrozomal sitokrom P-450 redüktaz sisteminde düşük miktarlarda oluşturulurlar. Serbest radikaller, NMDA reseptörleri de dahil olmak üzere birçok membran reseptörlerinin fonksiyonlarının düzenlenmesinde görev alabilirler. Ancak, depolarizasyona bağlı gelişen intrasellüler Ca²⁺ artışı sekonder olarak serbest radikal yapımını arttırmaktadır (17).

İskemik olaylarda, oksijen miktarındaki azalma mitokondrideki flavin adenin dinükleotid ve koenzim Q' nun parçalanmasına neden olarak aşırı miktarlarda serbest radikal oluşumuna yol açmaktadır. Serbest radikaller aynı zamanda reperfüzyon döneminde de araşidonik asitin prostoglandin ve lökotrienlere dönüşümü sırasında yan ürün olarak ortaya çıkmaktadırlar. Membran fosfolipidlerinden salgılanan araşidonik asit, özellikle iskemik şartlarda daha fazla miktarlarda bulunmaktadır. Bu salgılanmanın Ca²⁺-bağımlı fosfolipaz A₂'nin uyarılmasıyla tetiklendiği düşünülmektedir. Hİ hasarlanma sırasında intrasellüler Ca²⁺'un artmasına neden olan diğer olaylar da araşidonik asit zincirinin aktivasyonuna ve serbest radikal yapımının daha da artmasına katkıda bulunmaktadır. İskemi sırasında Ca²⁺-bağımlı lipazların ve fosfolipazların tetiklenmesi; serbest yağ asitlerinin salgılanmasına ve serbest radikal yapımının artmasına neden olmaktadır. Serbest radikaller; proteinler, lipidler ve ekstrasellüler matriks glikozaminoglikanları gibi moleküller ile reaksiyona girerek, onları

harabiyete uğratırlar. Özetle, hipoksi, gelişmekte olan beyinde anaerobik metabolizmadaki artışla birlikte laktik asit ve serbest oksijen radikallerinde artışa neden olur. Serebral iskemi sırasında yüksek enerjili fosfatların hızla azalması ile birlikte yüksek miktarlarda adenozin ve hipoksantin birikmektedir. Biriken bu metabolitler reperfüzyon fazında ksantin oksidaz ile ksantin ve ürik aside dönüştürülürken, süperoksid radikalleri ortaya çıkmaktadır. Süperoksid radikalleri de süperoksid dismutaz ile hidrojen perokside dönüştürülür. Aktive olan nötrofiller ve glial hücreler de hipoksiye yanıt olarak süperoksid oluşturmaktadır. Sonuçta, EAA salgılanması ve serbest radikallerin yapımının; lipid peroksidasyonu ve iskemiyle oluşan membran harabiyetinin ortaya çıkmasında sinerjik hareket edebileceği düşünülmektedir (2, 26).

Biyokimyasal ve morfolojik kriterlere göre hücre ölümü apoptotik veya nekrotik olarak sınıflandırılmaktadır. Nekrotik ölüm şiddetli bir olayın sonucu olup, membran bütünlüğünün bozulması, sitoplazmik içeriğin ekstrasellüler aralığa kaçıışı ve ikincil bir inflamatuvar yanıt ile karakterizedir. Apoptozis ise daha düzenli ve enerji gerektiren bir olay sürecidir. Burada erken dönemde nüklear yoğunlaşma ve büzüşme belirgin olsa da, membran ve organeller son döneme kadar sağlam kalmaktadır (1). Apoptozis, DNA parçalanmasına yol açan enerji bağımlı bir işlemdir. Apoptozisin başlamasında etken olan hücre dışından kaynaklanan sinyallerin yanı sıra, hücre içinden kaynaklanan veya mitokondri bağımlı sinyaller de mevcuttur. DNA hasarı, hücre içi kalsiyum seviyesinde artış, hücre içi pH'da düşme ve metabolik bozukluklar sonucu hücre içinden kaynaklanan sinyaller proteazları, endonükleazları ve lipazları aktive ederek apoptotik süreci başlatabilir. Bu olayları takiben apoptotik hücrede; kromatin kondensasyonu, hücre gövdesinde ve sitoplazmada büzülme, endonükleolitik DNA fragmantasyonu görülür ve plazma membranının bütünlüğü kaybolur. Özellikle kaspaz ailesi nöronal apoptoziste kritik mediatör olarak görev almaktadır. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik olaylar zincirini başlatırlar. Kaspaz 8, kaspaz 9, kaspaz 10 gibi bazı kaspazlar başlatıcı; kaspaz 3, kaspaz 6, kaspaz 7 ise efektör rol oynamaktadır. Bcl-2 ailesi de *bcl-2*, *bcl-xL*, *bcl-w* ve *bcl-g* gibi anti-apoptotik ve *bax*, *bid*, *bad* ve *diva* gibi proapoptotik proteinler içeren, apoptoziste düzenleyici rol oynayan bir protein ailesidir. Bcl-2, mitokondrinin dış membranında yer alan 26 kDa moleküler ağırlığa sahip integral membran proteinidir. Merkezi sinir sistemindeki gerek nekrotik gerekse apoptotik hasarlanmalar karşısında koruyucu rol oynadığı bilinmektedir. Apoptozisin geçici global serebral iskemik harabiyetten sonra gecikmiş nöronal ölümden belirgin bir rolü olduğu ortaya konmuştur. Geçici fokal serebral iskemi ile global serebral iskemide, özellikle hipokampus, kaudat nükleus ve putamendeki etkilenmiş nöronlarda kaspaz 3 aktivitesi artmıştır. Bu

durum, sonuçta kromatin kondensasyonuna ve DNA parçalanmasına neden olarak hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Apoptozisin santral sinir sistemindeki fizyolojik rolünün gelişme veya rejenerasyon sırasında hedef hücrelerini bulamayan nöronların ortadan kaldırılması ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Çalışmaların çoğunda hipoksi-iskeminin neden olduğu apoptozisin gelişimsel apoptozisten farklı olduğu ve çoğunlukla hibrid nekrotik-apoptotik fenotiplerin görüldüğü ancak Hİ olayda biyokimyasal olarak apoptotik sürecin yer aldığı bildirilmiştir. Yapılan deneysel çalışmalarda, pan-kaspaz inhibitörlerinin nöroprotektif oldukları bildirilmiş olup, anti-apoptotik tedavilerin anti-eksitotoksik tedavilere ek olarak uygulanması fayda sağlayacağı ön görülmektedir (2, 17, 27-29). Şekil 3 apoptotik süreç ile apoptozisde yer alan proteinleri göstermektedir.



Şekil-3: Apoptotik süreç ve bu süreçte yer alan proteinler (Padosch ve ark. (29), 2001 çalışmasından uyarlanmıştır).

Sonuç olarak, Hİ süreçteki enerji yetersizliği nöronların depolarizasyonu ve buna bağlı olarak da EAA'ların ekstrasellüler aralığa salınımı ile sonuçlanmaktadır. Bu da glutamatin birikimi ve NMDA reseptörlerinin aktive olması sonucunda intrasellüler Ca^{2+} düzeylerinin artışı ile hücre ölümüne yol açan hücresel olaylar sürecinin başlamasına neden olmaktadır. Enerji metabolizmasındaki akut bozulma aynı zamanda protein sentezinin azalması ve inhibisyonu ile sonuçlanmaktadır. İskemik olaydan hemen sonra enerji metabolizması hızla

düzeltilse bile, hipoksinin devam etmesi durumunda, etkilenen dokuda birkaç saat içinde enerji yetersizliği ortaya çıkmaktadır. Bu dönemden sonra da nöronal NOS aktivasyonu, artmış reaktif oksijen bileşiklerinin ortaya çıkması ve oksidatif hasar görülmektedir. Gelişen bu süreçte son olarak inflamasyon ve apoptozis görülmekte ve hücre ölümü gerçekleşmektedir (1, 30).

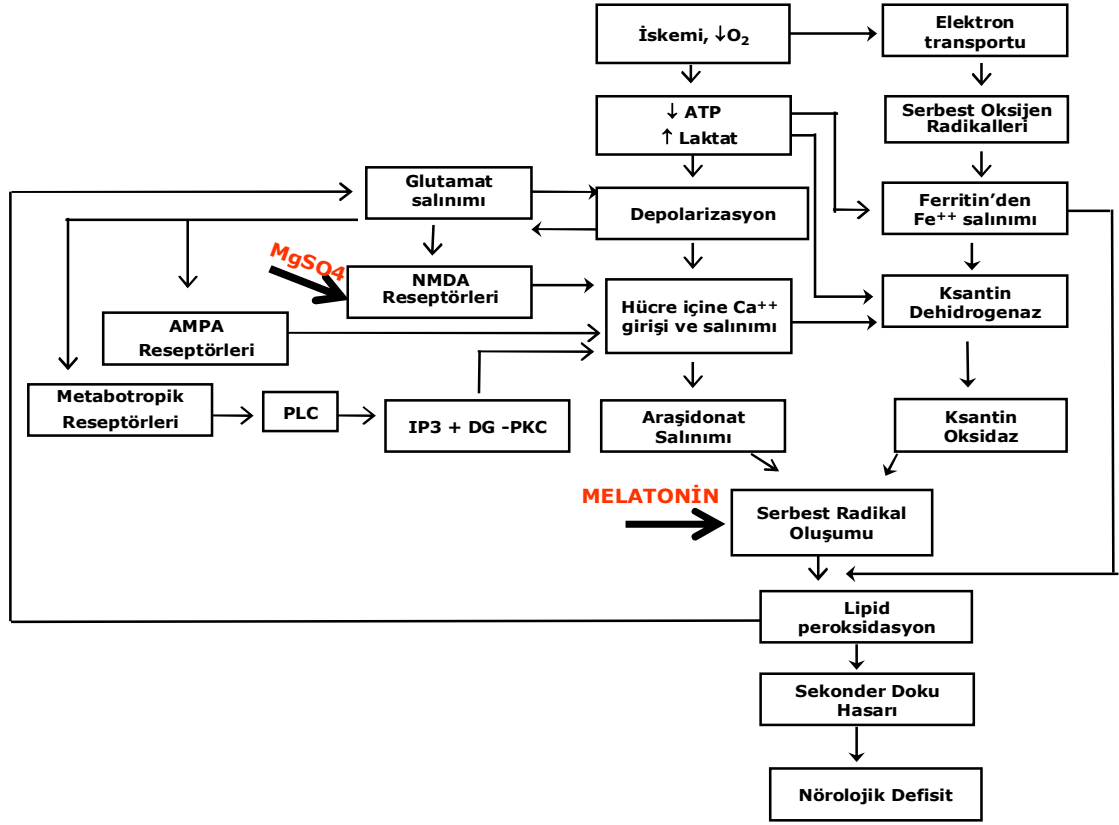
Hİ süreç hipoksi ile başlayan ve nöroprotektif yaklaşımların uygulanabildiği reperfüzyon fazı olarak da adlandırılan düzelme dönemi boyunca devam eden bir olaylar dizisinden oluşmaktadır ve nöronal ölüm iki fazda ortaya çıkmaktadır. Birincil hücre kaybı, yüksek enerji metabolizmasının tükenmesine (birincil enerji yetmezliği) ve hücre depolarizasyona neden olan hücre hipoksi ile ilişkilidir. Birincil enerji yetmezliği sırasında hipoksiye bağlı ortaya çıkan depolarizasyon intrasellüler Ca^{+2} birikimi ile sonuçlanmaktadır. Erken reperfüzyon fazında serbest radikallerin ortaya çıkmasına bağlı olarak hücre membran hasarı ortaya çıkabilir. Bu dönemde in utero ya da postnatal dönemde doğumhanede yapılan resüsitasyonu takiben serebral oksijenizasyon ve perfüzyon tekrar sağlanabilir. Bu düzelme döneminde, fosfor metabolitlerinin konsantrasyonu ile intrasellüler pH bazal düzeylere geri döner. Bu birinci faz sırasında çok sayıda nöron ölümü olmamaktadır. Serebral enerji yetmezliği dönemi ise birincil dönemden sonraki 6-100 saat sonrasında başlamakta ve günlerce devam etmektedir. Bu ikincil dönem; fosfokreatin/inorganik fosfat oranında azalma, değişmeyen intrasellüler pH, stabil kardiyak ve solunum durumu ve sonrasında gelişen beyin hasarı ile karakterizedir. Bu fazda eksitotoksisite, apoptozis ve aktif mikroglia hücrelerinin sitotoksik etkileri, gecikmiş hücre ölümünden sorumlu tutulmaktadır. Bu dönemde artmış nöbetler, hiperemi, sitotoksik ödem, mitokondriyal yetersizlik, NO sentezi, eksitotoksin birikimi, serebral kan hacim ve akımındaki değişikliklere bağlı olarak nöron kaybı görülmektedir (11, 31).

Yapılan klinik ve deneysel çalışmalar sonucunda, bu olaylar dizisinin herhangi bir aşamasını engelleyebilen farmakolojik ajanların nöroproteksiyon sağlayabileceği ön görülmektedir. Klinik olarak, reperfüzyon fazının nöroprotektif tedavilere duyarlı olduğu düşünülmese rağmen, çok az sayıda tedavinin nöroprotektif ajan olarak etkili olduğu ve Hİ olay ile ilişkili serebral palsy insidansını azaltmada başarı sağladığı gösterilmiştir (32).

Yenidoğan beyinde hipoksi sırasında aşırı bir glutamat salınımı ile birlikte azalmış glutamat geri alımı mevcuttur. Artmış glutamat konsantrasyonları, nöronlara aşırı kalsiyum akışını sağlayan NMDA kanallarının açılmasını sağlamaktadır. NMDA-reseptör aracılı bu olay, daha sonrasında kaspazların aktivasyonu ile apoptozis ve geri dönüşümsüz nöron hasarına neden olmaktadır (33, 34). Magnezyum sülfatın en önemli nöroprotektif etkisi,

artmış glutamata karşı NMDA reseptörünün yarışmasız ve voltaj-bağımlı inhibisyonu ile kalsiyuma-bağılı eksitotoksik hasarlanmayı engelleyerek hücreye Ca^{2+} girişini önlemesidir (35). Magnezyum iyonları ayrıca, glikolizis, oksidatif fosforilasyon, protein sentezi ile plazma membran bütünlüğünün sağlanması gibi pek çok anahtar hücreyel olay için gereklidir (36). Magnezyum, $Na^+ - K^+$ ATP bağımlı pompanın yetmezliğinden kaynaklanan uzun süreli membran depolarizasyonunu önleyerek membran stabilizatörü olarak da etki göstermektedir (37). Magnezyumun aynı zamanda Hİ reperfüzyon sırasında oluşturulan proinflamatuvar sitokinleri ve serbest radikalleri azaltarak hücre ölümünü engellediği bildirilmiştir (36, 38). Düşük magnezyum düzeyleri proinflamatuvar bir ortam oluşturarak endotelial hücre fonksiyon bozukluğuna da neden olmaktadır (37). Magnezyum sülfatın nöroprotektif bir ajan olarak kullanılması ile ilgili en önemli avantajlarından birisi de klinik anlamda şiddetli perinatal hipoksisi olan yenidoğanlarda daha önceden güvenli bir şekilde kullanılmış olmasıdır (39-41). Ancak, magnezyumun hem klinik hem de deneysel Hİ modeldeki yararı ile ilgili çelişkili sonuçlar mevcuttur (36, 38-47).

Melatonin epifiz bezinden salınan bir indolamin olup, potent bir serbest radikal temizleyicisidir ve indirekt olarak antioksidan özelliklere sahiptir. Melatonin ve metabolitleri oldukça toksik olan hidroksil radikalleri ile peroksi radikallerini temizlemektedirler. Melatonin aynı zamanda major antioksidan enzimleri (süperoksid dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi) aktive ederek indirekt antioksidan özellik gösterirken, mitokondriyal elektron transport sisteminin etkinliğini de arttırarak oksidatif strese karşı koruyucu özellik taşımaktadır (48, 49). Melatonin NOS'u, siklooksijenaz-2'yi ve nötrofil infiltrasyonunu inhibe ederek anti-inflamatuvar özellikler göstermekte ve aynı zamanda mitokondriyal fonksiyonların korunmasını da sağlamaktadır (50, 51). Deneysel çalışmalarda, melatoninin hipoksi-iskemi sonrası sıçanlarda cAMP üretimini azalttığı, serbest radikal aktivitesini inhibe ettiği, PVL'yi önlediği, mikroglial aktivasyonu azalttığı bildirilmiştir (52, 53). Melatonin, lipofilik özelliği ile tüm morfofizyolojik bariyerleri geçerek beyin dahil olmak üzere tüm doku ve hücre kompartmanlarına dağılabilmektedir. Melatoninin neonatal Hİ modelde nöroprotektif ajan olarak yararlı olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (53-55). Magnezyum sülfata benzer şekilde, melatonin de klinik olarak neonatal sepsis, bronkopulmoner displazi ve neonatal hipoksisi olan yenidoğanların tedavisinde kullanılabilir (56-58). Şekil 4, neonatal Hİ beyin hasarlanması sırasında görülen olaylar dizisi ile magnezyum sülfat ve melatoninin etki ettiği basamakları göstermektedir.



Şekil-4: Hipoksik-İskemik Durumda Beyin Hücrelerinde Görülen Olaylar Kaskadı ve MgSO₄ ile Melatoninin Etki Ettiği Basamaklar (Hall ve ark. (59), 1992 çalışmasından uyarlanmıştır) Fe⁺⁺, demir; PLC, fosfolipaz C; PKC, protein kinaz C

Bu iki nöroprotektif ajanın tekli veya kombine uygulamalarının neonatal Hİ modelinde farklı etkiler sağlayarak yararlı olabileceği hipotez edilmiştir. Bu ajanların son yıllarda yenidoğanlarda klinik olarak uygulanmaları ve kolaylıkla elde edilebilmeleri nedeni ile mevcut çalışmadan elde edilecek olası pozitif bulguların klinikte HİE'si olan yenidoğanların tedavi protokolüne yeni bir bakış açısı sağlayacağı düşünülmektedir.

Tüm bu bilgiler ışığında, bu çalışmanın amacı neonatal Hİ sıçan modelinde NMDA antagonisti olan magnezyum sülfat ile serbest radikal temizleyicisi olan melatoninin hem tekli hem de kombine tedavi olarak uygulamalarının nöroprotektif etkinliklerinin karşılaştırılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Tüm deney protokolleri Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylandı (Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 2008-2/3 sayılı kararı ile). Perinatal Hİ beyin hasarının oluşturulmasında Levine modeli kullanıldı (60). Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme Merkezinden temin edilen gebe Sprague-Dawley cinsi sıçanlar su ve yem kısıtlaması olmaksızın standart koşullar altında ve ayrı ayrı kafeslerde izlendiler. Yavru sıçanların doğdukları gün 1. gün olarak kabul edilerek, toplam 80 yavru sıçan 7 günlük oluncaya dek izlenmeye devam edildiler. Çalışmada ağırlıkları 12 gr ve üzerinde olan 7 günlük sıçanlar kullanıldı.

Bu çalışma, "108S128" proje numarası ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

Çalışma Protokolü ve Tedavi Grupları

Yedi günlük sıçanlar randomize olarak her bir grupta 20 adet sıçan olacak şekilde 4 gruba ayrıldılar:

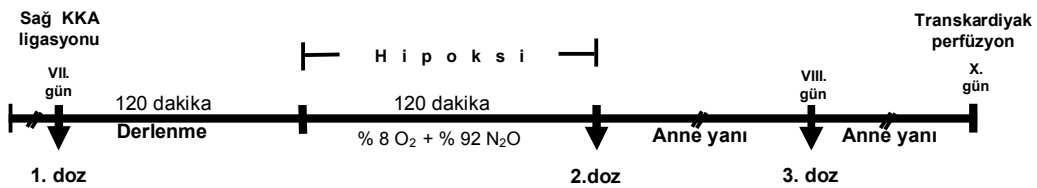
Serum fizyolojik (1ml/kg, intraperitoneal (ip) uygulanan **Kontrol** grubu,

Magnezyum sülfat uygulanan (275mg/kg, ip) **Magnezyum sülfat (MgSO₄)** grubu,

Melatonin uygulanan (20mg/kg, ip) **Melatonin** grubu,

MgSO₄ (275mg/kg, ip) + melatonin (20mg/kg, ip) uygulanan **MgSO₄+melatonin** grubu.

Bu tedavilerin ilki iskemiden hemen önce, ikincisi hipoksiden hemen sonra ve sonuncusu da ikinci dozdan 24 saat sonra olacak şekilde toplam 3 doz olarak uygulandılar. Çalışmanın deney akış şeması Şekil 5'de gösterilmiştir.



Şekil -5: Deneysel Basamakların Şematik Diyagramı (KKA: Kommon karotid arter)

Hipoksik-İskemik Beyin Hasarının Oluşturulması

İnhale İzofloran (Rhodia, Bristol, İngiltere) anestezisi altında 7 günlük sıçanlara operasyon mikroskobu (Opmi 99, Carl Zeiss, Almanya) kullanılarak orta hat boyun insizyonunu takiben 5.0 cerrahi ipek ile sağ kommon karotid arter ligasyonu yapıldı ve arter koterize edildi. İşlem oda sıcaklığında gerçekleştirildi ve toplam cerrahi süresi 3 dakikayı aşmadı. Boyun bölgesi kapatılan sıçanlar, 15 dakikalık derlenme döneminden sonra, annelerinin yanına alındılar. İki saat anne yanında derlenme sürecini takiben 37°C'de su banyosuna (Mammert, Almanya) yerleştirilen 450 ml hacimli gaz giriş ve çıkış sistemi bulunduran cam kapların içine sıçanlar konuldu. Bu kaplara %8 Oksijen - %92 Nitrojen karışımı girişi anestezisi cihazı (Minor 612, AMS Türkiye) aracılığı ile sağlandı. Yüz yirmi dakikalık hipoksik sürecin bitimi ile 72 saat boyunca tekrar anne yanına alınan sıçanlar 10 günlük iken derin dietil-eter anestezisi altında, fosfat tamponlu %4 paraformaldehid solüsyonunun intrakardiyak perfüzyonu uygulanmasını takiben dekapite edildiler. Hipoksik ortamda 120 dakika süre tamamlanmadan solunum duran sıçanlar deney dışı bırakıldı. Dekapitasyon sonrası beyin dokuları hızla çıkarılarak hipoksik hasar değerlendirildi ve kesitler immünohistokimyasal analizler için takibe alındı.

İskemik İnfarktın Ölçümü

İskemik infarkt daha önceki çalışmalarda tanımlandığı şekilde değerlendirildi (61). Sıçanlar 10. günde fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile transkardiyak perfüzyon uygulaması sonrası sakrifiye edildiler (her bir gruptan 6 adet sıçan olacak şekilde), ve beyinler hemen çıkarılıp 5 dakika boyunca buz üzerinde tutulduktan sonra soğutulmuş yenidoğan beyin matriksi (Ted Pella, CA, ABD) kullanılarak koronal kesitler alındı. Sherwood ve Timiras (62) 'ın yenidoğan sıçan atlasındaki koordinatlar kullanılarak bregmanın 2.2mm, 2.84 mm ve 3.43 mm'sinden kesitler alındı. Bu kesitler hipokampusun CA1, CA2, CA3 bölgeleri ile dentat girus (DG) alanlarına karşılık gelmiştir. Elde edilen kesitler 15 dakika boyunca 37°C'de serum fizyolojik içinde çözülmüş olan %2'lik 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) içinde bekletildi. Daha sonra %10 formalin ile fikse edildi ve takiben dijital görüntüleri tarayıcı (Hewlett Packard Scanjet 4850, ABD) yardımı ile elde edildi. TTC ile boyanmayan infarkt alanları belirlenerek, bir görüntü-analiz yazılımı (Scion Corporation versiyon 4.02, Maryland, ABD) kullanılarak infarkt hacim yüzdesi hesaplandı. İnfarkt hacmi

yüzdesinin hesaplanmasında [(İnfarkt alanı A1 + A2+ An) x 2 mm) / (Aynı taraf hemisfer alanı B1+ B2 + Bn) x 2 mm)] X 100 formülü kullanıldı (61).

İmmunohistokimya ve Hücre Sayımı

Apoptozisin değerlendirilmesinde kullanılan TUNEL yönteminde *In situ cell death detection kiti* (Roche Molecular Biochemicals, 11684817910, Almanya) kullanıldı. 60°C’de 1 saat bekletilen preparatlar, ksilol ile deparafinize edilerek alkol serilerinden (etanol; %100 %95, %80, %70, %40) geçirildi. Fosfat tampon çözeltisi (PBS) içerisinde 20µg/ml proteinase K (Roche Applied Sciences, 031158444001, Almanya) ile işleme tabi tutulan preparatlar daha sonra PBS ile yıkandılar ve endojen peroksidaz aktivitesinin bloke etmek amacı ile %2’lik Hidrojen Peroksit (60ml metanol içerisinde 4ml %30’luk H₂O₂) ile 10 dakika işleme tabi tutuldular. PBS ile yıkanan kesitler Triton X (Sigma-Aldrich, T-9284, ABD) ile permeabilize edildiler ve tekrar PBS ile yıkanarak humidity chamber içinde 50 µl TUNEL karışımı eklenip, 37°C’de 60 dakika işleme tabi tutuldular. TUNEL karışımı, 50 µl enzim solüsyonu (saklama tamponu içerisinde terminal deoxynucleotidyl transferase, EC 2.7.7.31, recombinant E. coli) 450 µl işaretleme solüsyonu (reaksiyon tamponu içerisinde nükleotid karışımı) ile karıştırılarak elde edildi ve kullanımdan hemen önce hazırlanarak buz üzerinde bekletildi. PBS ile yıkananarak 50 µl converter-POD ile 30 dakika boyunca 37°C’de işleme tabi tutuldular. Tekrar PBS ile yıkanan preparatlar ışık mikroskopide görüntüleme amacı ile, substrat solüsyonu içerisinde (50 µl 1:9, diaminobenzidine/metal concentrate: peroxidase buffer, Roche Applied Sciences,11718096001, Almanya) oda ısısında 10 dakika işleme tabi tutuldu ve peroksidaz aktivitesi görünür hale getirildi. Preparatlar Hematoxylin (Harris’s hematoxylin,Sigma-Aldrich, HHS16, ABD) ile zıt boyama işlemine tabi tutulup yıkanarak kapatıldı (DPX mountant, Fluka, 44581, ABD). Negatif ve pozitif preperatlar için ayrılan kesitler işaretleme aşamasından hemen önce 35 µl DNase (DNase tamponu içerisinde 200 µg/ml konsantrasyonda DNase I (Roche Applied Sciences, Almanya); DNase tamponu: 40mM Tris HCl, pH 7.6 10mM NaCl, 6mM MgCl₂, 10mM CaCl₂) ile 10 dakika boyunca 37°C etüv ısısında tutularak DNA zincir kırıklarının oluşması sağlandı. İşaretleme aşamasında pozitif kontrol kesitleri 35 µl TUNEL karışımı ile işleme sokulurken, negatif kontrol kesitleri yalnızca işaretleme solüsyonu (35 µl) ile işleme tabi tutuldu. TUNEL yöntemi ile işaretlenen beyin kesitlerinde pozitif olarak işaretlenmiş olan apoptotik hücreler birim alanda (2700 µm²) sayıldı. TUNEL pozitif hücreler apoptotik hücre görünümüne uygun hücre büzüşmesi, kromatin yoğunlaşması ve nükleusun koyu boyanması morfolojik özellikleri

ve kromojen ile boyanma özellikleri dikkate alınarak belirlendi. Sayım işlemi her denek için toplam on kesitte tekrarlandı ve bu sayıların ortalaması o blok için TUNEL pozitif hücre sayısı olarak belirlendi.

Kaspaz-3, bax ve bcl-2 immunohistokimya yöntemlerinde 60°C'de 1 saat bekletilen preparatlar, ksilol ile deparafinize edilerek alkol serilerinden (etanol; %100 %95, %80, %70, %40) geçirildi. Kesitler daha sonra PBS ile yıkandıktan sonra 10 mM sodyum sitrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) tamponu (pH 6.0) içerisinde 10 dakika süreyle mikrodalga fırında (700W) işleme tabi tutuldu ve takiben 20 dakika oda ısısında bekletildi. Distile su ile yıkanan preparatlar %3'lik hidrojen peroksit solüsyonu ile 10 dakika işleme tabi tutuldular. Bu işlemi takiben tekrar distile su ve PBS ile yıkanan preparatlar tris tampon içerisinde % 10'luk keçi serumu (tampon çözeltisi: 0.01 M tris HCl, pH 7.4, 1mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, % 0.1 Triton X-100) ile 30 dakika inkübe edildiler. Kesitler aynı tampon çözeltisi içerisindeki 1:100 dilusyonda olan aktif kaspaz-3 (Chemicon, AB3623-rabbit, ABD) bax ve bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, CA, ABD) antikoları ile (sırasıyla 1:100, 1:100, 1:200) ile gece boyunca 4°C de bekletildi. PBS ile yıkanan kesitlere 50-100 µl sekonder antikor (biotinylated anti-rabbit IgG, Vectastain Elite ABC Kit) 1 saat oda ısısında uygulandı. PBS de yıkanan kesitlere 100 µl Avidin-Biotin Kompleksi (ABC Vectastain Elite ABC Kit, ABD) solüsyonu 30 dakika uygulandı. PBS ile tekrar yıkanan kesitlere 50 µl DAB solüsyonu (Roche Applied Sciences, 11718096001, Almanya) ile işleme tabi tutuldu ve distile su ile yıkanarak hematoksilin ile boyamaya tabi tutuldu. Distile su ile yıkandı ve artan konsantrasyonda etanol serisinde ve ksilen ile dehidrate edilerek lamel ile kapatıldı.

İstatistiksel Analiz

TTC boyamaları ile elde edilen iskemik hacim değerlendirmelerinde, deney grupları arasındaki karşılaştırmalar amacıyla, "Kruskal Wallis testi" ile değerlendirildi ve anlamlı farklılıkların bulunduğu durumlarda "Mann-Whitney U testi" yardımıyla grupların ikili olarak karşılaştırılması sağlandı. TUNEL yöntemiyle pozitif boyanan hücre sayılarının gruplar arası farklılıklar açısından karşılaştırılmasında da "Kruskal Wallis testi" kullanıldı ve bu testin anlamlı farklılık bulunduğu durumlarda "Mann-Whitney U testi" ile gruplar ikili olarak karşılaştırıldı. İstatistik testlerinin uygulanmasında Sigma-Stat 3.0 ve SPSS 16.0 programları kullanıldı ve tüm karşılaştırmalarda $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda kullanılan sıçanlarda (n:80), iskemi ve hipoksiye bağlı olarak mortalite oranı %9 iken, tedavi uygulamaları sonrasında mortalite saptanmadı. Çalışmaya dahil edilen sıçanların kardiyovasküler sistemi ve merkezi sinir sistemlerinin patolojik açıdan değerlendirilmesinde çalışma sonucunu etkileyecek ek anomalilere (abse, vasküler anomali, tümör) rastlanmamıştır.

TTC boyamaları ile elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, kontrol grubunda 41.38 ± 3.6 olarak hesaplanan “infarkt hacmi yüzdesi”, melatonin verilen grupta 20.60 ± 2.6 , MgSO₄ verilen grupta 23.53 ± 4.6 , ve melatonin+MgSO₄ verilen grupta 17.34 ± 3.5 olarak hesaplanmış olup, her 3 ilaç uygulamasına bağlı olarak ortaya çıkan infarkt hacmi yüzdesindeki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.01$, $p<0.001$). En fazla infarkt alanı azalması kombinasyon grubunda görülmüş olsa da, tedavi grupları arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 6-11, Tablo 1).

Tablo-1: TTC Boyaması ile Hesaplanan İpsilateral Hemisferdeki İnfarkt Hacim Yüzdeleri

	İnfarkt Hacim Yüzdesi \pmSEM
Kontrol	41.38 \pm 3.6
Melatonin	20.60 \pm 2.6*
Magnezyum Sülfat	23.53 \pm 4.6**
Melatonin + Magnezyum Sülfat	17.34 \pm 3.5*

* $p<0.001$, ** $p<0.01$, kontrole göre

TUNEL boyamalarında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, melatonin, MgSO₄ ve melatonin+MgSO₄ verilen grupta hipokampusun CA1, CA3 ve DG alanlarındaki TUNEL pozitif hücre sayısının anlamlı olarak azaldığı saptandı. Kontrol grubunda CA1, CA3 ve DG alanlarında birim alanda sayılan ortalama TUNEL pozitif hücre sayıları sırasıyla 32.48 ± 3.00 , 26.05 ± 2.10 , 20.43 ± 2.00 ; Melatonin grubunda; 3.14 ± 1.00 , 1.43 ± 1.00 , 6.14 ± 0.20 , MgSO₄ grubunda; 1.12 ± 1.00 , 1.33 ± 1.00 , 6.20 ± 1.00 , melatonin+MgSO₄ grubunda ise 1.20 ± 1.00 , 1.14 ± 1.00 , 5.83 ± 1.00 olarak bulundu (Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.001$) (Şekil 7-10,12, Tablo 2).

Tablo-2: Hipokampusun CA1, CA3 ve DG Bölgelerindeki Birim Alan Başına Düşen TUNEL Pozitif Hücre Sayıları (Ort±SEM)

	CA1	CA3	DG
Kontrol	32.48±3.00	26.05±2.12	20.43± 2.00
Melatonin	3.14±1.00*	1.43±1.00*	6.14±0.20*
Magnezyum Sülfat	1.12±1.00*	1.33±1.00*	6.20±1.00*
Melatonin + Magnezyum Sülfat	1.20±1.00*	1.14±1.00*	5.83±1.00*

*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0.001

Kortekste de benzer şekilde melatonin, MgSO₄ ve melatonin+MgSO₄ verilen grupta kontrol grubuna göre daha az sayıda nöronun pozitif boyandığı saptanmıştır. Kontrol grubundaki iskemik sıçanlarda birim alan başına 33.78 ± 1.25 nöron pozitif boyanırken, melatonin, MgSO₄ ve melatonin+MgSO₄ verilen grupta sırası ile 4.91 ±0.44, 2.19 ± 0.13 ve 2.15 ±0.25 nöron pozitif boyanmış olup, her 3 grupta da istatistiksel olarak daha düşük idi (kontrole göre, p<0.001) (Şekil 13-15, Tablo 3). Ancak, her 3 grup kendi içinde karşılaştırıldığında, aralarında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı.

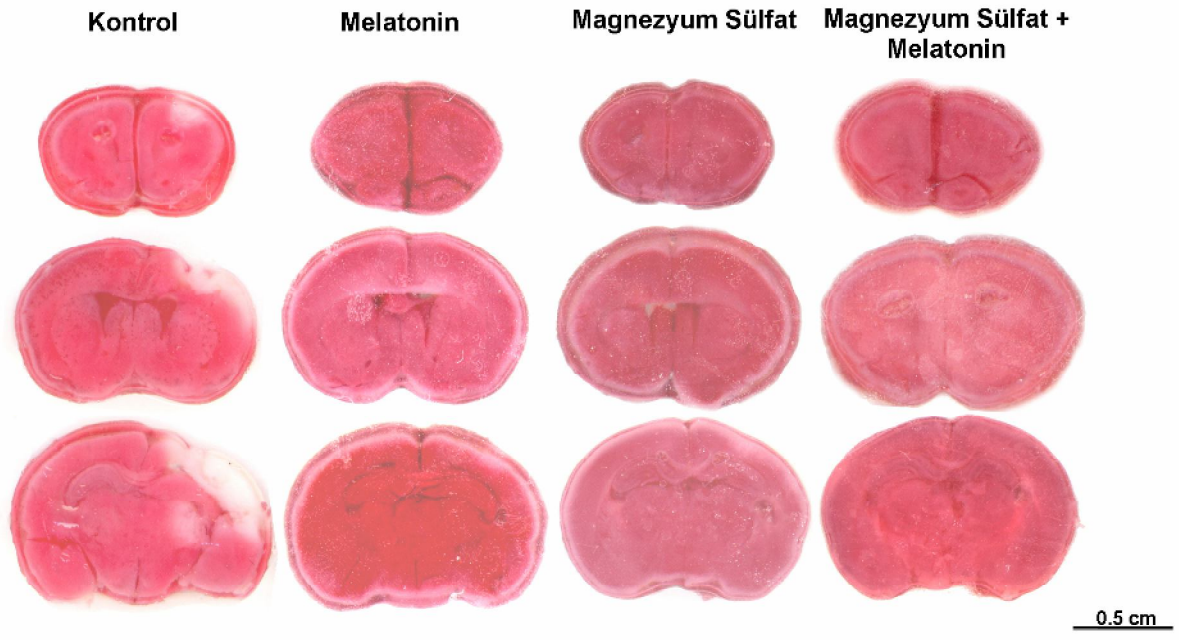
Tablo- 3: Korteks Bölgesindeki Birim Alan Başına Düşen TUNEL Pozitif Hücre Sayıları (Ort±SEM)

	TUNEL pozitif hücre sayıları (ort±SEM)
Kontrol	33.78±1.75
Melatonin	4.91±0.44*
Magnezyum Sülfat	2.19±0.13*
Melatonin + Magnezyum Sülfat	2.15±0.25*

* kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0.001

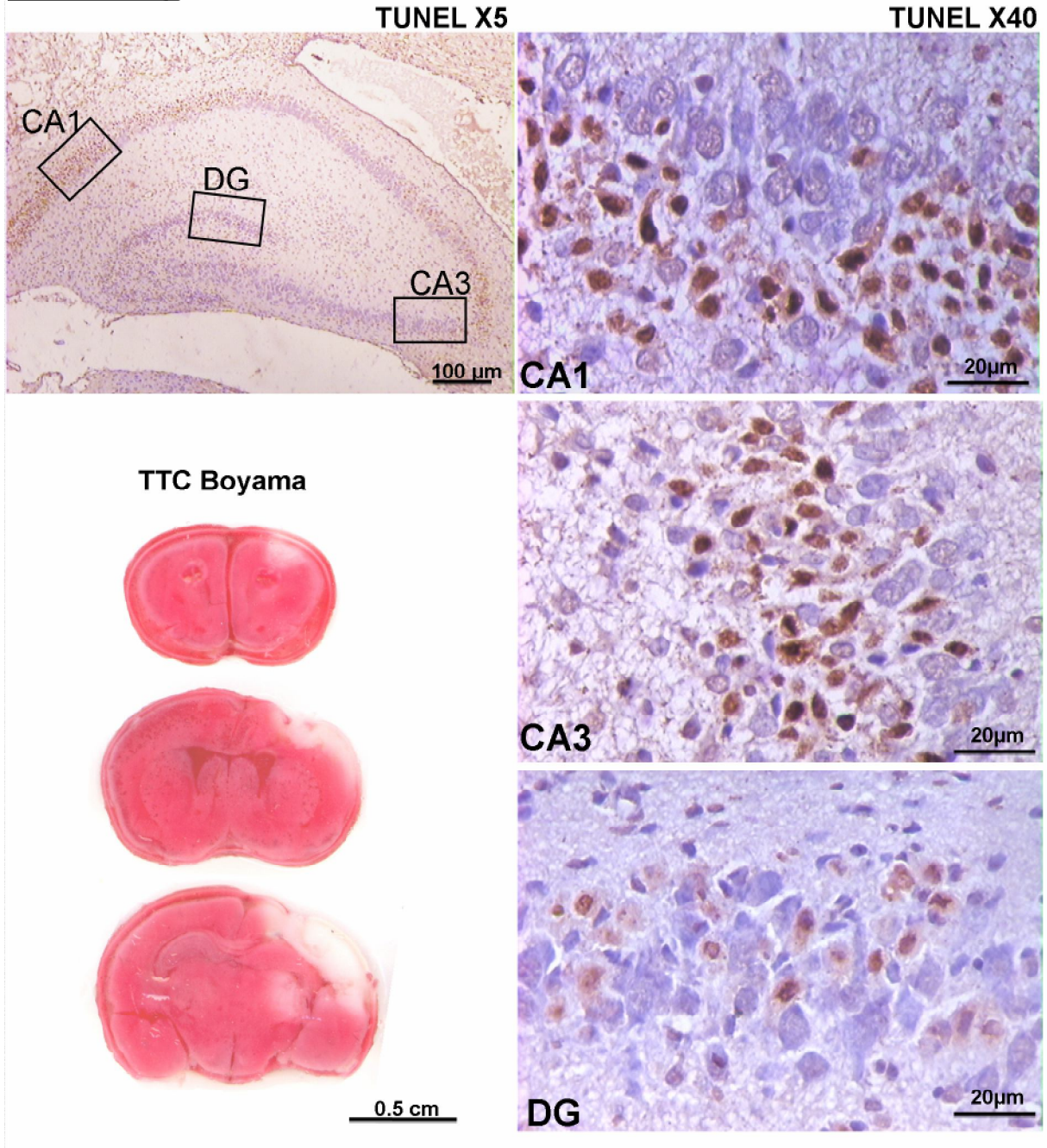
TUNEL pozitif olan hücrelerin apoptozis açısından tekrar değerlendirilip, mevcut sonuçların doğrulanması amacı ile yapılan bcl-2, bax ve kaspaz-3 boyamalarının kalitatif değerlendirmesinde de TUNEL immünohistokimyası ile uyumlu sonuçlar saptandı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, magnezyum sülfat, melatonin ve melatonin+magnezyum sülfat tedavileri uygulanan gruplarda immunoreaktivitenin daha az olduğu tespit edildi.

Çalışmamızda, aynı zamanda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, mitokondriyal fonksiyonları etkileyen Bcl-2 gen ailesinden proapoptotik bax ve antiapoptotik bcl-2'nin, kaspaz-3'ü de içeren programlı hücre ölümünü azalttığı görüldü (Şekil 15).



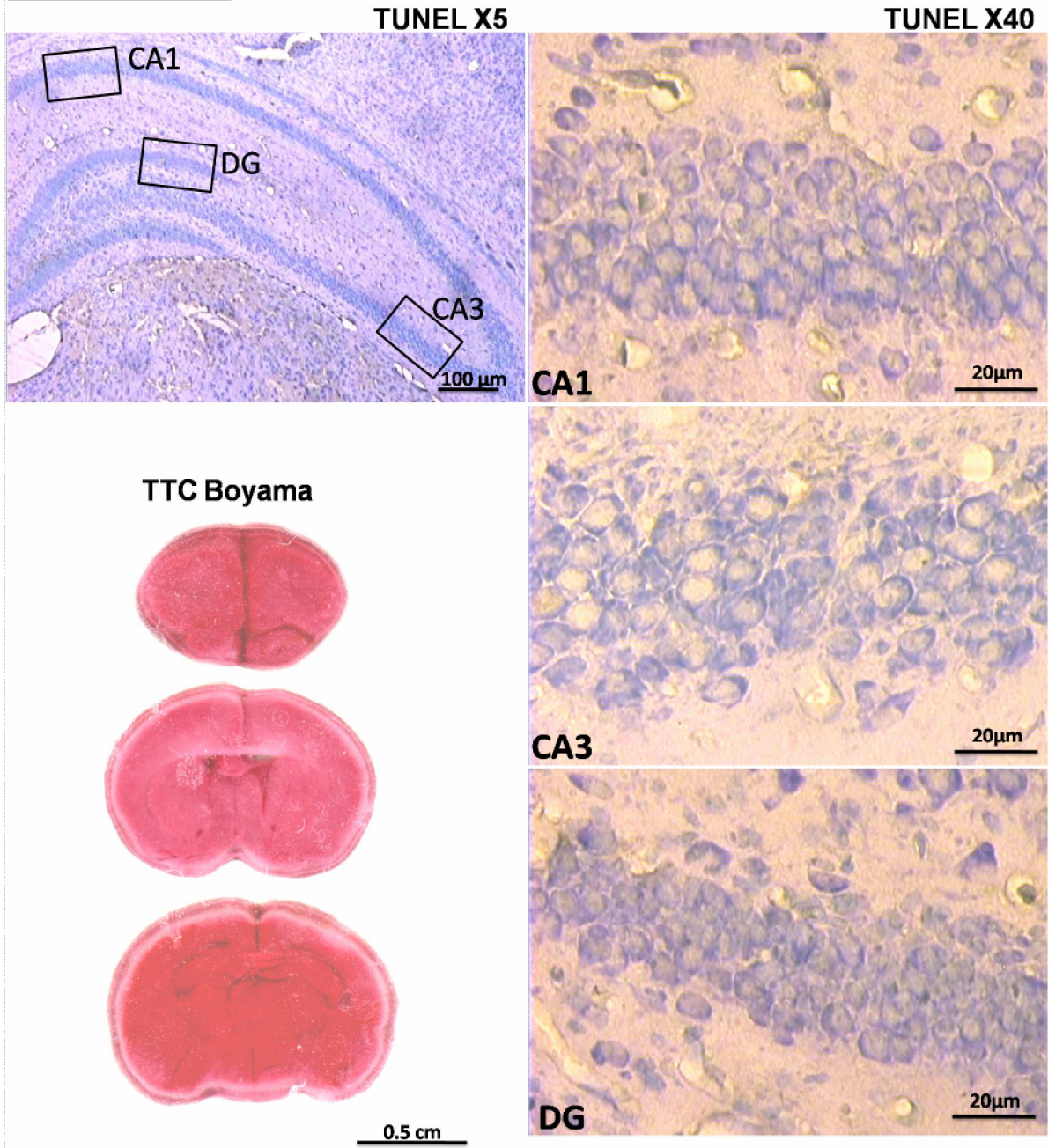
Şekil -6: Grupların Koronal Beyin Kesitlerinin TTC Boyama Görüntüleri.

Kontrol Grup



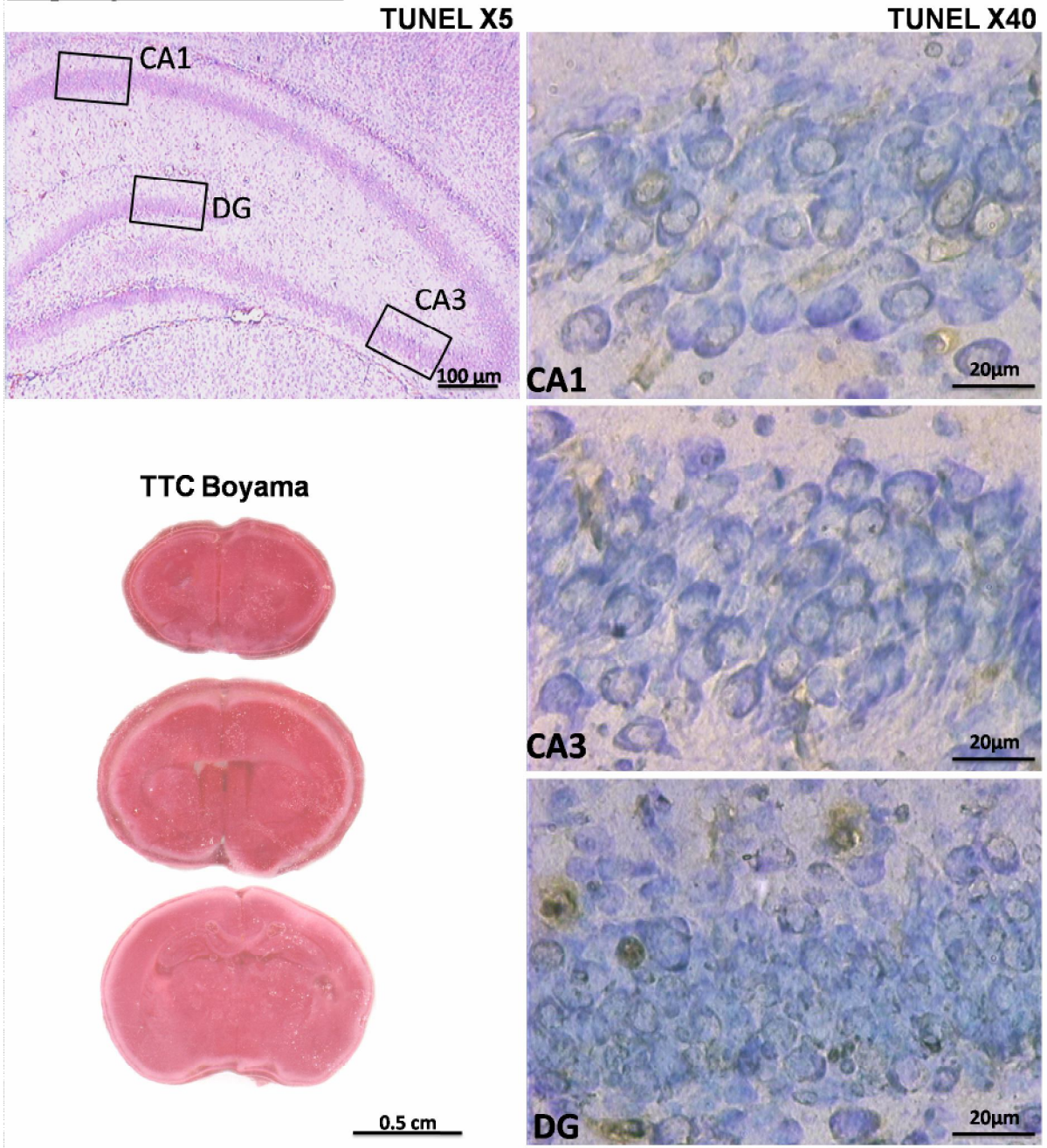
Şekil-7: Kontrol grup: TUNEL ve TTC Boyama Görüntüleri

Melatonin Grubu



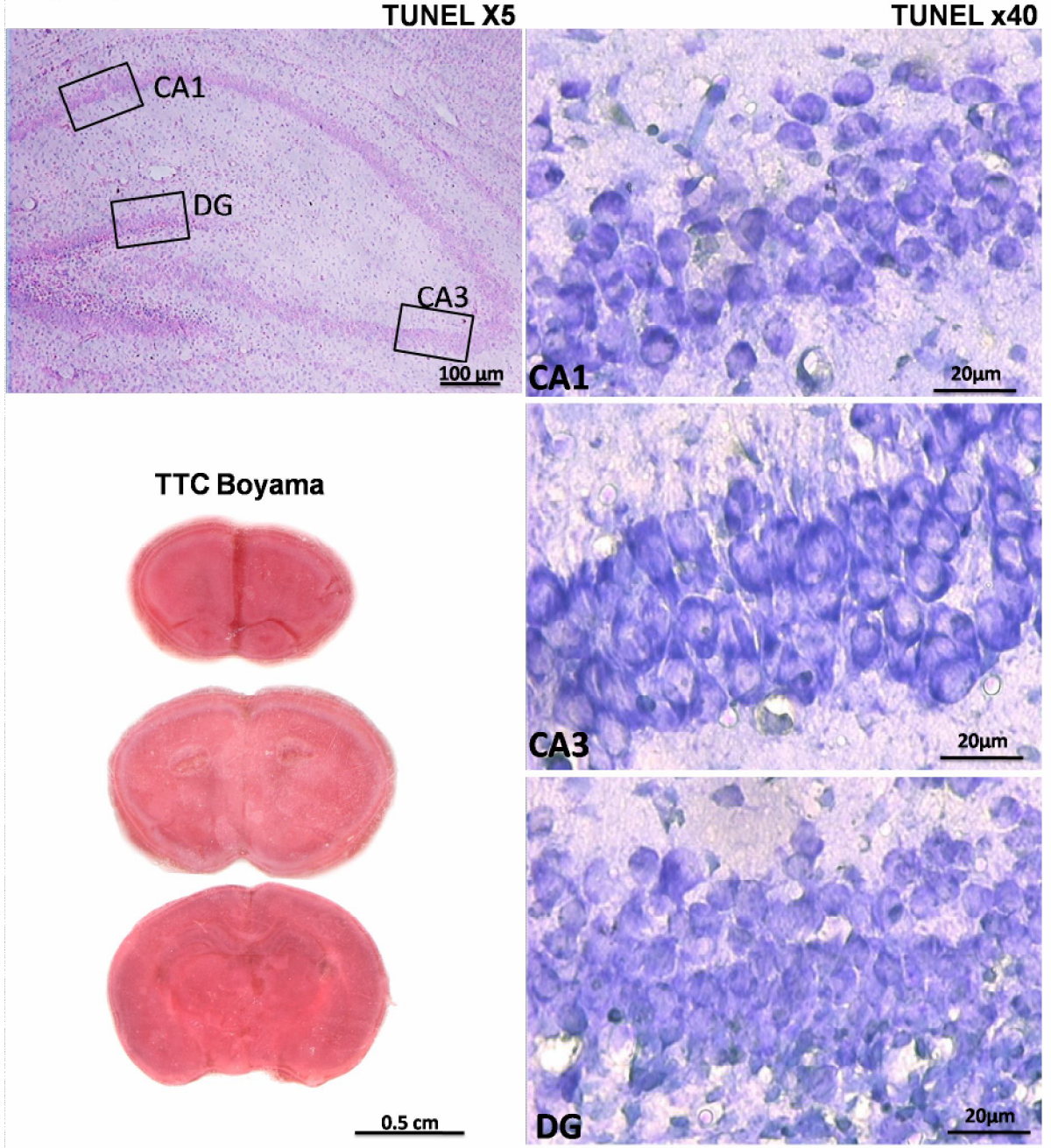
Şekil-8: Melatonin Grubu: TUNEL ve TTC Boyama Görüntüleri

Magnezyum Sülfat Grubu



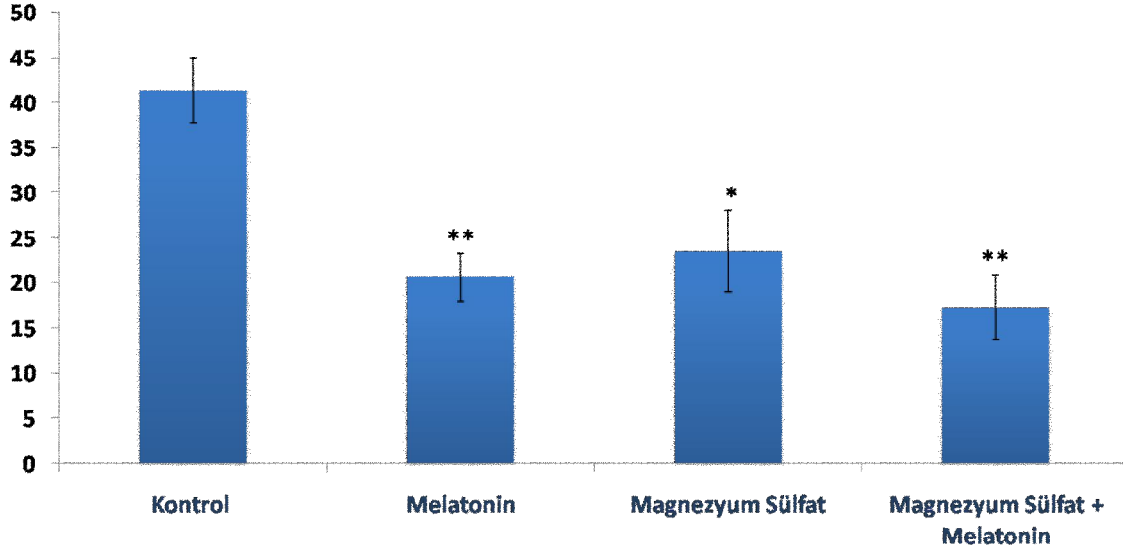
Şekil-9: MgSO₄ Grubu: TUNEL ve TTC Boyama Görüntüleri

Magnezyum Sülfat + Melatonin Grubu



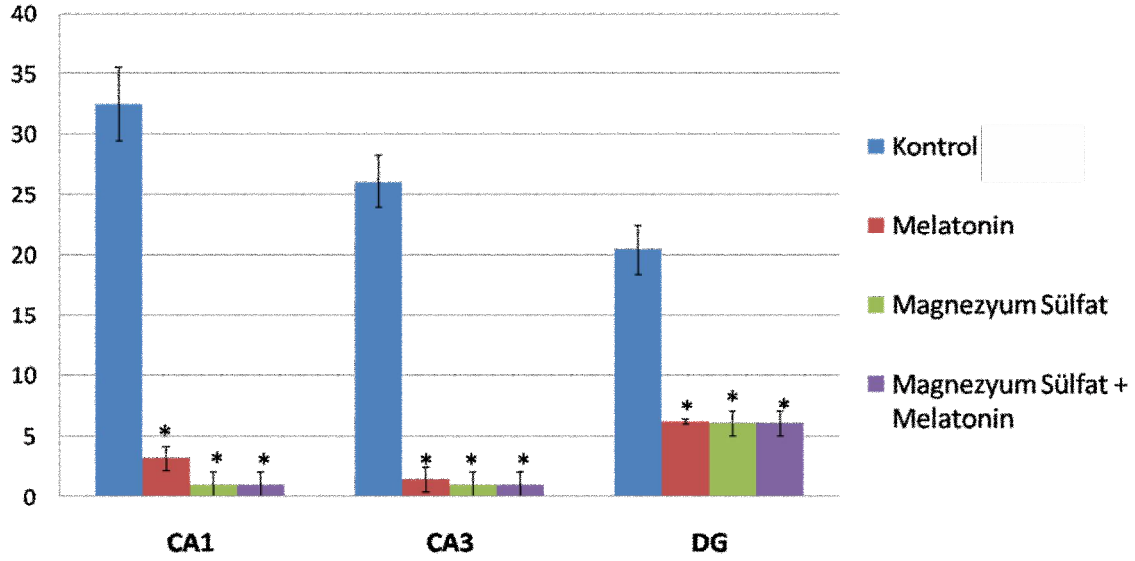
Şekil-10: Magnezyum sülfat + Melatonin Grubu: TUNEL ve TTC Boyama Görüntüleri

İnfarkt Hacim Yüzdesi (TTC)



Şekil-11: TTC Boyaması ile Belirlenen İpsilateral Hemisferdeki Yüzde İnfarkt Hacmi Grafiği
* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

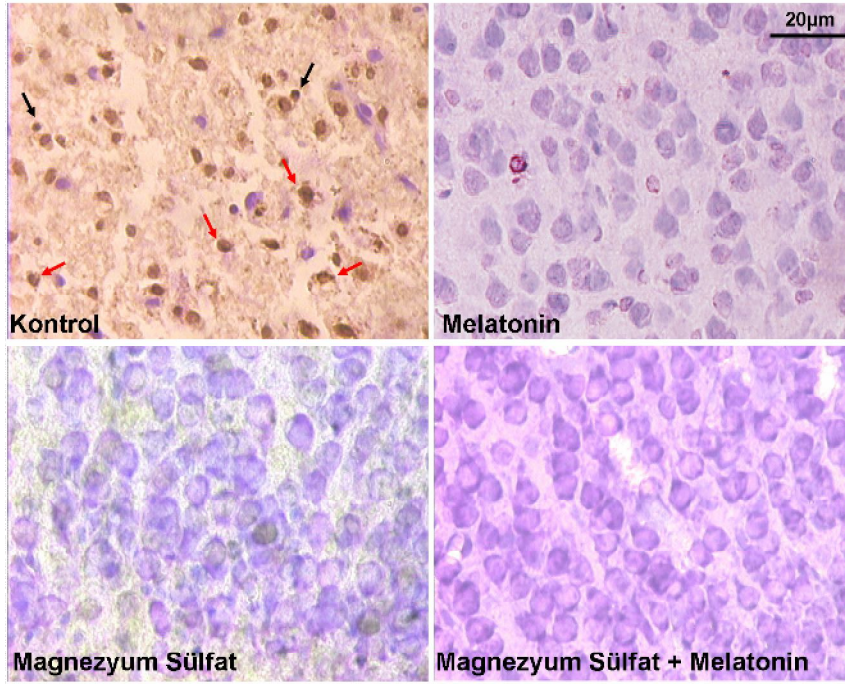
TUNEL



Şekil-12: CA1, CA3, DG Alanlarında, Birim Alanda Sayılan TUNEL ile Pozitif Boyanan Ortalama Hücre Sayıları

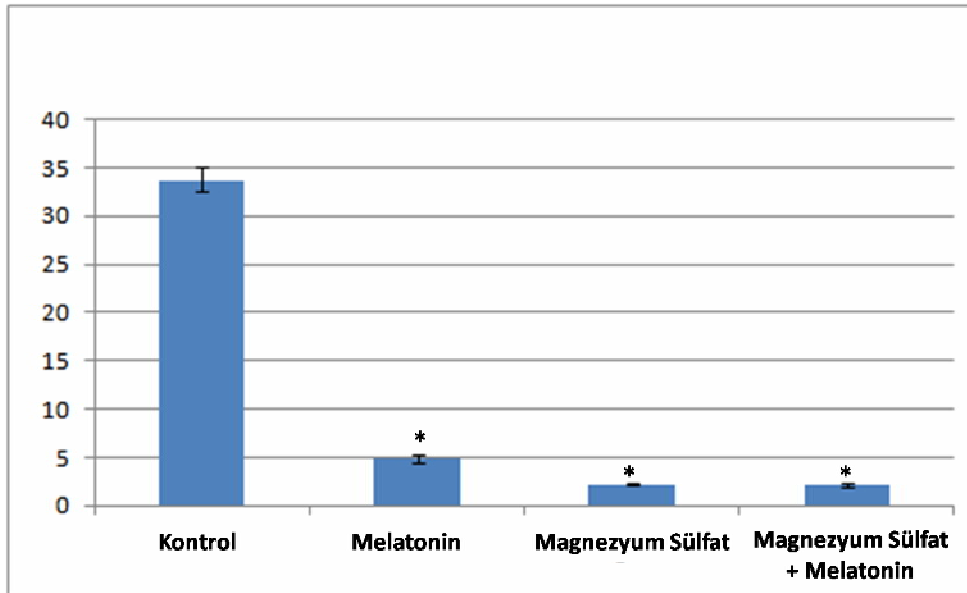
* $p < 0.001$, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

Korteks TUNEL Boyama x40



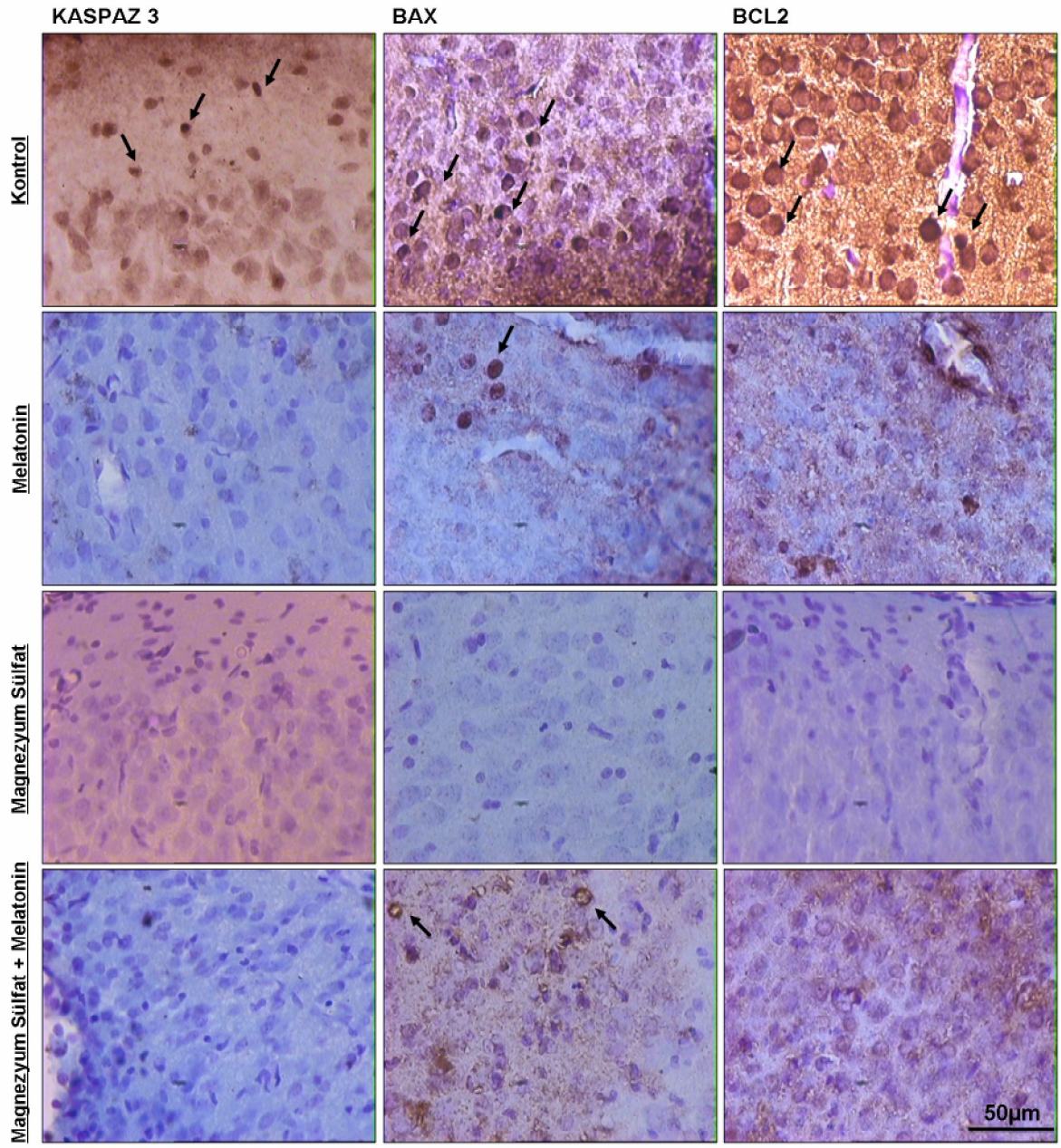
Şekil-13: Grupların Korteksteki TUNEL Boyama Görüntüleri

→; TUNEL pozitif + piknotik →; TUNEL pozitif + kromatin yoğunlaşması olan hücreler



Şekil-14: Kortekste Birim Alanda Sayılan TUNEL Pozitif Ortalama Hücre Sayıları

* $p < 0.001$, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında



Şekil-15: Grupların Korteks Bölgesindeki Kaspaz 3, Bax ve Bcl2 İmmunohistokimyası.
→; kaspaz, bcl-2 ve bax pozitif hücreler

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, neonatal Hİ sıçan modelinde, etki mekanizmaları farklı olan ve Hİ kaskadın farklı noktalarına etki eden magnezyum sülfat ile melatonin tedavilerinin tekli ve kombine uygulamalarının apoptozisi ve sonrasındaki beyin hasarını anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir. Aynı zamanda, bu ilaçların kombine uygulamasının infarkt hacmini daha fazla azalttığı ancak bunun istatistiksel anlamlı düzeye çıkmadığı saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde melatonin, magnezyum sülfat ve magnezyum sülfat+melatonin uygulamalarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında “infarkt hacmi yüzdesini” anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir.

Deneysel çalışmaların ışığında neonatal Hİ sıçan modelinde 7 günlük sıçanlarda tek taraflı common carotis arter ligasyonunu takiben %8 oksijen ve %92’lik azot karışımının kullanıldığı modifiye Levine modeli kullanıldığı için çalışmamızda bu model kullanıldı. Burada oluşturulan hasar ligasyonun gerçekleştirildiği hemisferle sınırlıdır ve esas olarak da serebral korteks, subkortikal ve periventriküler beyaz cevher, striatum/talamus ile hipokampusta gözlenmektedir. Burada karşı hemisferde hasar görülme olasılığı çok düşüktür (1). Daha önce yapılmış çalışmalarda serebral korteks ile hipokampusun CA1, CA3, DG bölgelerinin Hİ hasara en fazla hassas oldukları ve en çok NMDA reseptörlerinin bu bölgelerde olduğu bildirildiği için (11), çalışmamızda da serebral korteks, CA1, CA3 ve DG alanlarından elde edilen kesitler değerlendirildi. Literatürde apoptozis döneminin hipoksi-iskemiden sonraki 48-72 saat boyunca devam edebildiği belirtildiği ve yenidoğan Hİ sıçan modelinde apoptozis 72. saatte değerlendirildiği için (63,64), çalışmamızda sıçanlara 10. günde dekapitasyon uygulandı.

Magnezyum, perinatal dönemde nöroprotektif özellikleri nedeni ile çeşitli deneysel ve klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. Magnezyum iyonları, glikoliz, oksidatif fosforilasyon, protein sentezi, DNA agregasyonu ile plazma membran bütünlüğünün sağlanması gibi anahtar hücresel olaylar için gereklidirler. Magnezyum aynı zamanda proinflamatuvar sitokinleri ya da Hİ reperfüzyon esnasında oluşturulan serbest radikalleri azaltarak hücre ölümünü ya da hücre fonksiyon bozukluğunu da azaltmaktadır. Hipoksi-iskemideki esas etki mekanizmasının eksitotoksik kalsiyuma bağlı hasarlanmayı önlemesi olduğu bilinmektedir. Magnezyum bu etkisini glutamatın NMDA reseptörünün yarışmasız voltaj bağımlı inhibisyonunu sağlamak yolu ile hücreye Ca^{2+} girişini önleyerek göstermektedir (35). Hİ olay sırasında ekstrasellüler magnezyum konsantrasyonlarının artırılması durumunda, bu blokajın tekrar sağlanabileceği öngörülmektedir (65).

Magnezyumun serebral kan akımını arttırdığı, kalsiyuma bağımlı proteaz, lipaz ve endonükleazları etkisiz hale getirdiği, hücre metabolizmasını azalttığı ve antikonvülzan etkisi ile serebral iskemi sırasında ortaya çıkan epileptiform aktiviteyi azalttığı ve bu mekanizmalar aracılığı ile nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir (66-68). Magnezyumun tüm bu etkilerine rağmen, yapılan deneysel ve klinik çalışmalarda nöroproteksiyondaki etkinliği ile ilgili çelişkili sonuçlar elde edilmiştir (36, 38-47).

Magnezyum sülfat için 275mg/kg'lık doz, nöroproteksiyon bildirilen daha önceki deneysel ve klinik çalışmalara göre belirlenmiş ve uygulanmıştır (38-40, 69). Penrice ve arkadaşları (44), deneysel neonatal Hİ modelde, hipoksiden 1 saat sonra 400 mg/kg dozunda uygulanan ve 12 ile 24. saatlerde de 200 mg/kg dozunda tekrarlanan magnezyum sülfat tedavisinin nöroprotektif olmadığını göstermişlerdir. Greenwood ve arkadaşları (45), benzer bir modelde aynı dozlarda ve aynı zamanlarda uygulanan magnezyum sülfatın farklı beyin bölgelerinde nöroprotektif etki göstermediğini bildirmişlerdir. Bu çalışmaların tersine, magnezyum sülfatın nöroprotektif olduğunu bildiren çok sayıda çalışmalar da mevcuttur (36, 38-41). Türkyılmaz ve arkadaşları (38), 7 günlük sıçanlardaki hipoksi-iskemi modelinde, Hİ hasar öncesinde 200 mg/ kg/ doz uygulanan magnezyum sülfat tedavisinin TUNEL yöntemi ile değerlendirilen apoptozisi azalttığını ancak hipoksi sonrası uygulamanın apoptozis üzerine etkisinin olmadığını göstermişlerdir. Ravishankar ve arkadaşları (70), yenidoğan domuzlarda hipoksi öncesi 600 mg/kg yükleme dozunu takiben 300 mg/kg dozunda 1 saatlik infüzyonla verilen magnezyum sülfat tedavisinin apoptozisi önleyici protein olan Bcl-2 ekspresyonu arttırarak ve apoptozisi arttıran Bax protein ekspresyonunu azaltarak hipoksi-iskeminin indüklediği programlı hücre ölümünü azalttığını bildirmişlerdir. Sameshima ve arkadaşları (69) da, 7 günlük sıçanların kullanıldığı bir Hİ modelde, hipoksiden sonra 270 mg/kg/doz bolus olarak verilen ve sonraki 72 saat boyunca da sürekli infüzyon şeklinde uygulanan magnezyum sülfat tedavisinin serebral korteks ve hipokampustaki nöron kaybı ile nekroza bağlı kist oluşumunu belirgin olarak azalttığını ancak idame tedavisi olmadan tek başına bolus uygulamanın benzer etkiyi oluşturmadığını bildirmişlerdir. Pazaiti ve arkadaşları (71), hipoksiye maruz bırakılan ve 2g/kg magnezyum sülfat uygulanan sıçanları, 42 günlük iken sensoriomotor test kullanarak ve sonrasında beyinlerini histopatolojik inceleyerek değerlendirilmişler ve magnezyum sülfat uygulamasının hipoksi-iskemi sonucunda gelişen nöronal hasarı sınırladığını ve sensorimotor defisitleri azalttığını belirtmişlerdir.

Çalışmamızda, 275 mg/kg/doz şeklinde hipoksi öncesi bir ve sonrası iki olmak üzere toplam 3 dozda uygulanan magnezyum sülfat tedavisinin hem beyin infarkt hacmini hem de TUNEL boyama ile gösterilen apoptotik hücre sayısını anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir.

Bu çalışmalarda elde edilen farklı sonuçların deney düzeneklerindeki, ilaç uygulama zamanlarındaki, ilaç dozlarındaki ve değerlendirme yöntemlerindeki farklılığa bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Magnezyum sülfatın nöroprotektif etkisi aynı zamanda HİE'si olan yenidoğan bebekler üzerinde değerlendirilmiştir. Gronendaal ve arkadaşları (43), magnezyum sülfatın hipoksik yenidoğanlarda elektroensefalografide (EEG) düzelmeye yol açabileceğini hipotez etmişler ancak çalışmada 2 yenidoğanda şiddetli hipotansiyon ve ölüm saptanması üzerine çalışmayı sonlandırmışlar ve o ana kadar çalışmaya alınan bebeklerin EEG'lerini değerlendirerek, magnezyum sülfatın nöroprotektif olmadığı sonucuna varmışlardır. Ancak, sonrasında, Ichiba ve arkadaşları (39), hipoksik yenidoğanlara ilk dozu yaşamın ilk 6 saati içinde, tekrar dozları da 24 ve 48. saatlerde 250mg/kg/doz olacak şekilde toplam 3 gün boyunca magnezyum sülfat infüzyonu uygulamışlar ve uygulanan magnezyum sülfatın hipoksiye bağlı ölümü ve nörolojik hasarı azalttığını saptayarak, magnezyum sülfatın HİE'si olan yenidoğanlarda nöroprotektif olduğunu bildirmişlerdir. Ichiba ve arkadaşları (40) izlemde, 30 tane bebeği içeren bir başka çalışmada, magnezyum sülfat tedavisi uygulanan asfiktik bebekleri nörogelişimsel durum açısından 18 aylık iken tekrar değerlendirmişler ve bebeklerin %73'ünün normal nörogelişim gösterdiklerini, ve bu bebeklerdeki ölüm ile şiddetli nörolojik sekel insidansının da anlamlı olarak düşük olduğunu belirtmişlerdir. Bhat ve arkadaşları (41), randomize ve plasebo kontrollü bir çalışmada, aynı dozda ve aynı sürede uygulanan magnezyum sülfat tedavisinin hipoksik yenidoğanlarda nörolojik bozuklukları azalttığını bildirmişlerdir. Sonuç olarak, çalışmamızda, 275 mg/kg/doz olarak uygulanan 3 dozluk magnezyum sülfat tedavisinin hem beyin infarkt hakim yüzdesini hem apoptozisi azaltarak nöroprotektif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Hİ sürecinde, sadece bir yolağın inhibe edilmesi ile nöronal hücrelere olan aşırı kalsiyum girişinin tam olarak önlenemeyeceği ve bu nedenle de süreçteki farklı basamaklara etki eden ilaç kombinasyonlarının kullanılması ile daha fazla nöroproteksiyon elde edilebileceği öne sürülmüştür (8). Bu nedenle, magnezyum sülfatın başka ajanlarla kombine edilebileceği ve bu şekilde daha fazla nöroprotektif etki elde edilebileceği bildirilmiştir (72-75). Yapılan bir çalışmada, tek başına magnezyum tedavisinin nöroprotektif olmadığı saptanmış olmasına rağmen, aynı grup tarafından daha sonrasında yapılan diğer bir çalışmada iskemi sonrası hafif hipotermi ile kombine uygulanan magnezyum tedavisinin nöroprotektif olduğu bildirilmiştir (72-74). Zausinger ve arkadaşları (75) ise, magnezyum ve trilazad tedavilerinin, hipotermi ile kombine edilmesi durumunda nöroproteksiyon sağladığı bildirilmiştir. Çalışmamızda, NMDA antagonisti olan magnezyum sülfatın, kaskadın daha ileri aşamalarına etki eden anti-

inflamatuvar ve serbest radikal temizleyicisi olan melatonin ile kombine uygulanması durumunda da nöroproteksiyon sağladığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, infarkt alan yüzdesindeki azalma, en fazla kombine magnezyum sülfat ve melatonin uygulanan sıçanlarda belirgin olmasına rağmen, tekli tedavilere göre istatistiksel anlamlılık saptanamamıştır.

Perinatal hipoksi-iskemide, hücre içi kalsiyum düzeylerindeki artışı takiben ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri, etyopatogeneizde önemlidirler (76). Serbest radikal temizleyicisi olmasının yanı sıra anti-oksidan, anti-inflamatuvar özellikleri ile birlikte tüm fizyolojik bariyerleri geçebilme özelliği olan melatoninin, potansiyel etkinliği ve düşük toksisitesi ile perinatal hipoksik-iskemide nöroprotektif bir ajan olarak kullanılabilmesi öne sürülmüştür. Melatonin aynı zamanda cAMP üretimini bloke ederek, mikrogial aktivasyonunda azalmaya neden olarak, immunomodulator etkiler göstererek ve Bax ile Bcl-2 protein ekspresyonunda azalma şeklinde antiapoptotik etki göstererek de nöroproteksiyon sağlamaktadır (52, 53, 76, 77). Daha önceki çalışmalarda melatonin 5 ile 20mg/kg arasındaki dozlarda uygulanmış olup, en iyi nöroprotektif etkinin daha yüksek dozlardaki uygulamalarda elde edilmesi nedeni ile çalışmamız için 20mg/kg'lık doz seçilmiştir (53-55). Tütüncüler ve arkadaşları (54), hipoksi öncesinde 10mg/kg ve 20mg/kg dozlarında uygulanan melatonin tedavisinin, doz-bağımlı olmaksızın, lipid peroksidasyonunu belirgin olarak azalttığını göstermişler ve melatoninin tek başına ya da diğer tedavilerle kombine olarak kullanılması durumunda nöroprotektif etki gösterebileceği sonucuna varmışlardır. Welin ve arkadaşları (53), melatonin tedavisinin umbilikal kord oklüzyonu uygulanan fetal koyunlarda beyaz cevherdeki inflamatuvar reaksiyonu ve hücre ölümünü azalttığını göstermişlerdir. Carloni ve arkadaşları (55) da, hipoksiden önce ve 24 ile 48 saat sonrasında 15mg/kg/doz olarak 3 dozda uygulanan melatonin tedavisinin önemli bir nöroprotektif etki sağladığını ve izlemde Hİ olayın neden olduğu davranış bozuklukları ile öğrenme güçlüklerini belirgin olarak azalttığını, bu şekilde hem kısa hem de uzun süreli bir nöroproteksiyon sağladığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda da, 20mg/kg/doz olarak verilen melatonin tedavisinin nöroproteksiyon sağladığı gösterilmiştir. Melatonin tedavisinin neonatal sepsis, bronkopulmoner displazi ve perinatal hipoksi gibi klinik durumlarda yarar sağladığı ve yenidoğanlarda güvenle kullanılabilmesi daha önceki çalışmalarda da bildirilmiştir (56-58).

Literatürde deneysel perinatal Hİ modellerinde melatoninin başka bir ajanla kombine edildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, melatonin tedavisinin kombine tedavideki nöroprotektif etkinliği ile ilgili bilgiler mevcut değildir. Ancak çalışmamızda, magnezyum sülfat ile kombine olarak uygulanan melatonin tedavisinin beyin infarkt hacim yüzdesini tekli

tedavilere göre daha fazla azalttığı ve yine tekli tedavilerdekine eşdeğer ve/veya daha üstün nöroprotektif etki gösterdiği gösterilmiştir.

Sonuç olarak, perinatal Hİ sıçan modelinde, Hİ kaskadın farklı basamaklarına etki eden magnezyum sülfat ve melatonin tedavileri, hem tekli hem de kombine uygulanmaları durumunda, beyin infarkt yüzde hacmini azaltarak ve aynı zamanda apoptozisi önleyerek nöroprotektif etki göstermişlerdir. Aynı zamanda kombine uygulamanın istatistiksel anlamlı düzeye ulaşmasa da, hem infarkt yüzde hacmini hem de apoptotik hücre sayısını azaltmada tekli tedavilere eşdeğer yada daha üstün nöroprotektif etki gösterdiği saptanmıştır. Bu nedenle, özellikle kombine tedavinin başarısının artırılması amacı ile, her 2 ilacın farklı uygulama zamanı ve farklı dozlarda uygulanmaları ile ilgili yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmadan elde edilen bir diğer önemli bulgu da, yenidoğan bebeklerde klinik olarak farklı endikasyonlarla uygulanabilen bu iki ajanın tekli ya da kombine uygulamalarının bu çalışmadan elde edilen pozitif bulgular ışığında, neonatal HİE tanı ve tedavisi başlığı altında klinik uygulamada kendisine yer bulabileceği ön görülmektedir.

KAYNAKLAR

1. VANUCCI SJ, HAGBERG H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *The Journal of Experimental Biology*, 207: 3149-3154, 2004.
2. VOLPE JJ. Hypoxic-ischemic encephalopathy. Editor: VOLPE JJ, *Neurology of the Newborn*, Philadelphia, WB Saunders, page 400-481, 2001.
3. VANUCCI RC. Hypoxic-ischemic encephalopathy. *American Journal of Perinatology*, 17: 113-120, 2000.
4. ROBERTSON CM, FINER NN, GRACE MG. School performance of survivors of neonatal encephalopathy associated with birth asphyxia at term. *The Journal of Pediatrics*, 114: 753-760, 1989.
5. McLEAN C, FERRIERO D. Mechanisms of the hypoxic-ischemic injury in the term infant. *Seminars in Perinatology*, 28: 425-432, 2004.
6. PALMER C. Hypoxic-ischemic encephalopathy: Therapeutic approaches against microvascular injury and role of neutrophils, PAF and free radicals. *Clinics in Perinatology*, 22: 481-517, 1995.
7. DE KEYSER J, SULTER G, LUITEN PG. Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischaemic stroke: Are we doing the right thing? *Trends in Neurosciences*, 22: 525-540, 1999.
8. PEETERS C, VAN BEL F. Pharmacotherapeutical reduction of the post-hypoxic-ischemic-brain injury in the newborn. *Biology Neonate*, 79: 274-280, 2001.
9. VOLPE JJ. Perinatal brain injury: from pathogenesis to neuroprotection. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 7: 56-64, 2001.
10. BERGER R, GARNIER Y. Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 30:107-134, 1999.
11. INDER TE, VOLPE JJ. Mechanisms of perinatal brain injury. *Seminars in Neonatology*, 5: 3-16, 2000.
12. DIRNAGL U, IADECOLA C, MOSKOWITZ MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated review. *Trends in Neurosciences*, 22: 391-397, 1999.
13. DELIVORIA-PAPADOPOULOS M, MISHRA OP. Mechanisms of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategies for prevention. *Journal of Pediatrics*, 132: 30-34, 1998.
14. FELLMAN V, RAIVIO KO. Reperfusion injury as the mechanism of brain damage after perinatal asphyxia. *Pediatric Research*, 41: 599-606, 1997.
15. LIPTON P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological Reviews*, 79: 1431-1568, 1999.
16. VANUCCI RC. Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia: relation to perinatal brain damage. *Pediatric Research*, 27: 317-326, 1990.
17. TYMIANSKI M, TAYOR CH. Normal and abnormal calcium homeostasis in neurons: A basis of the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury. *Neurosurgery*, 38:1176-1195, 1996.
18. SIMPSON PB, CHALLISS RA, NAHORSKI SR. Neuronal Ca²⁺ stores: activation and function. *Trends in Neurosciences*, 18: 299-306, 1995.
19. GÖRGÜLÜ A, KIRIŞ T. Eksitator aminoasidler ve Eksitotoksisite Bölüm 1. *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 15: 33-38, 2005.
20. SCHNEGGENBURGER R, ZHOU Z, KONNERTH A, NEHER E. Fractional contribution of calcium to the calcium current through glutamate receptor channels. *Neuron*, 11: 133-143, 1993.

21. KANDEL ER, SCHWARTZ JH, JESSELL TM. Principles of neuroscience, 3rd edition, Elsevier Publishing Co., New York, 1991.
22. MELDRUM BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *The Journal of Nutrition*, 130: 1007-1015, 2000.
23. DENG W, ROSENBERG PA, VOLPE JJ, JENSEN FE. Calcium-permeable AMPA/kainate receptors mediate toxicity and preconditioning by oxygen-glucose deprivation in oligodendrocyte precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 6801-6806, 2003.
24. TEKKOK SB, GOLDBERG MP. Ampa/kainate receptor activation mediates hypoxic oligodendrocyte death and axonal injury in cerebral white matter. *The Journal of Neuroscience*, 21: 4237-4248, 2001.
25. NOH MR, KIM SK, SUN W, PARK SK, CHOI HC, LIM JH, KIM IH, KIM HJ, KIM H, EUN BL. Neuroprotective effect of topiramate on hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Experimental Neurology*, 201:470-478, 2006.
26. BUONOCORE G, PERRONE S, BRACCI R. Free radicals and brain damage in the newborn. *Biology Neonate*, 79:180-186, 2001.
27. SASTRY PS, RAO KS. Apoptosis and the nervous system. *Journal of Neurochemistry*, 74:1-20, 2000.
28. NORTHINGTON FJ, GRAHAM EM, MARTIN LJ. Apoptosis in perinatal hypoxic-ischemic brain injury: how important is it and should it be inhibited? *Brain Research. Brain Research Reviews*, 50:244-257, 2005.
29. PADOSCH SA, VOGEL P, BOTTIGER BW. Neuronal apoptosis following cerebral ischemia. Basis, physiopathology and treatment strategies. *Anaesthesist*, 50: 905-920, 2001.
30. JENSEN A, GARNIER Y, MIDDELANIS J, BERGER R. Perinatal brain damage—from pathophysiology to prevention. *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology*, 110: 70-79, 2003.
31. SHALAK L, PERLMAN JM. Hypoxic-ischemic brain injury in the term infant—current concepts. *Early Human Development*, 80:125-141, 2004.
32. NELSON KB. Can we prevent cerebral palsy? *New England Journal of Medicine*, 349: 1765-1769, 2003.
33. MISHRA OP, DELIVORIA-PAPADOPOULOS M. Cellular mechanisms of hypoxic injury in the developing brain. *Brain Research Bulletin*, 48:233-238, 1999.
34. CHOI DW, HARTLEY DM. Calcium and glutamate induced cortical neuronal death. Editor: WAXMAN SG, *Molecular and Cellular Approaches to the Treatment of Neurological Disease*, New York, NY: Raven Press, page 23-24, 1993.
35. OVBIAGELE B, KIDWELL CS, STARKMAN S, SAVER JL. Neuroprotective agents for the treatment of acute ischemic stroke. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 3: 9-20, 2003.
36. HOFFMAN DJ, MARRO PJ, MCGOWAN JE, MISHRA OP, DELIVORIA-PAPADOPOULOS M. Protective effect of MgSO₄ infusion on NMDA receptor binding characteristics during cerebral cortical hypoxia in the newborn piglet. *Brain Research*, 644: 144-149, 1994.
37. MARRET S, DOYLE LW, CROWTHER CA, MIDDLETON P. Antenatal magnesium sulphate neuroprotection in the preterm infant. *Seminars in Fetal&Neonatal Medicine*, 12: 311-317, 2007.
38. TURKYILMAZ C, TURKYILMAZ Z, ATALAY Y, SOYLEMEZOGLU F, CELASUN B. Magnesium pre-treatment reduces neuronal apoptosis in newborn rats in hypoxia-ischemia. *Brain Research*, 955:133-137, 2002.

39. ICHIBA H, TAMAI H, NEGISHI H, UEDA T, KIM TJ, SUMIDA Y, TAKAHASHI Y, FUJINAGA H, MINAMI H; KANSAI MAGNESIUM STUDY GROUP. Randomized controlled trial of magnesium sulfate infusion for severe birth asphyxia. *Pediatrics International*, 44: 505-509, 2002.
40. ICHIBA H, YOKOI T, TAMAI H, UEDA T, KIM TJ, YAMANO T. Neurodevelopmental outcome of infants with birth asphyxia treated with magnesium sulfate. *Pediatrics International*, 48: 70-75, 2006.
41. BHAT MA, CHAROO BA, BHAT JI, AHMAD SM, ALI SW. Magnesium sulfate in severe perinatal asphyxia: a randomized, placebo-controlled trial. *Pediatrics*, 123: 764-769, 2009.
42. McDONALD JW, SILVERSTEIN FS, JOHNSTON MV. Magnesium reduces N-methyl-D-aspartate (NMDA)-mediated brain injury in perinatal rats. *Neuroscience Letters*, 109: 234-238, 1990.
43. GROENENDAAL F, RADEMAKER CMA, TOET MC, DE VRIES LS. Effects of magnesium sulfate on amplitude-integrated continuous EEG in asphyxiated term neonates. *Acta Paediatrica*, 91:1073-1077, 2002.
44. PENRICE J, AMESS PN, PUNWANI S, PUNWANI S, WYLEZINSKA M, TYSZCZUK L, D'SOUZA P, EDWARDS AD, CADY EB, WYATT JS, REYNOLDS EO. Magnesium sulfate after transient hypoxia-ischemia fails to prevent delayed cerebral energy failure in the newborn piglet. *Pediatric Research*, 41: 443-447, 1997.
45. GREENWOOD K, COX P, MEHMET H, PENRICE J, AMESS PN, CADY EB, WYATT JS, EDWARDS AD. Magnesium sulfate after transient hypoxia-ischemia in the newborn piglet does not protect against cerebral damage. *Pediatric Research*, 48: 346-350, 2000.
46. SPANDOU E, SOUBASI V, PAPOUTSOPOULOU S, AUGOUSTIDES-SAVVOPOULOU P, LOIZIDIS T, PAZAITI A, KARKAVELAS G, GUIBATZIAMPURI O. Neuroprotective effect of long term MgSO₄ administration after cerebral hypoxia-ischemia in newborn rats is related to the severity of brain damage. *Reproductive Sciences*, 14: 667-677, 2007.
47. SAMESHIMA H, OTA A, IKENOUE T. Pretreatment with magnesium sulfate protects against hypoxic-ischemic brain injury but postasphyxial treatment worsens brain damage in seven-day-old rats. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 180: 725-730, 1999.
48. TAN DX, MANCHESTER LC, TERRON MP, FLORES LJ, REITER RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *Journal of Pineal Research*, 42: 28-42, 2007.
49. TOMAS-ZAPICO C, COTO-MONTES A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *Journal of Pineal Research*, 39: 99-104, 2005.
50. DENG WG, TANG ST, TSENG HP, WU KK. Melatonin suppresses macrophage cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting p52 acetylation and binding. *Blood*, 108: 518-524, 2006.
51. LEON J, ACUNA-CASTROVIEJO D, ESCAMES G, TAN DX, REITER RJ. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *Journal of Pineal Research*, 38:1-9, 2005.
52. HUSSON I, MESPLES B, BAC P, VAMECQ J, EVRAND P, GRESSENS P. Melatonergic neuroprotection of the murine periventricular white matter against neonatal excitotoxic challenge. *Annals of Neurology*, 51: 82-92, 2002.
53. WELIN AK, SVEDIN P, LAPATTO R, SULTAN B, HAGBERG H, GRESSENS P, KJELLMER I, MALLARD C. Melatonin reduces inflammation and cell death in

- white matter in the mid-gestation fetal sheep following umbilical cord occlusion. *Pediatric Research*, 61:153–158, 2007.
54. TUTUNCULER F, ESKIOCAK S, BASARAN UN, EKUKLU G, AYVAZ S, VATANSEVER U. The protective role of melatonin in experimental hypoxic brain damage. *Pediatrics International*, 47: 434-439, 2005.
 55. CARLONI S, PERRONE S, BUONOCORE G, LONGINI M, PROIETTI F, BALDUINI W. Melatonin protects from the long-term consequences of a neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *Journal of Pineal Research*, 44: 157-164, 2008.
 56. GITTO E, KARBOWNIK M, REITER RJ, TAN DX, CUZZOCREA S, CHIURAZZI P, CORDARO S, CORONA G, TRIMARCHI G, BARBERI I. Effects of melatonin treatment in septic newborns. *Pediatric Research*, 50:756-760, 2001.
 57. GITTO E, REITER RJ, AMODIO A, ROMEO C, CUZZOCREA E, SABATINO G, BUONOCORE G, CORDARO V, TRIMARCHI G, BARBERI I. Early indicators of chronic lung disease in preterm infants with respiratory distress syndrome and their inhibition by melatonin. *Journal of Pineal Research*, 36:250-255, 2004.
 58. FULIA F, GITTO E, CUZZOCREA S, REITER RJ, DUGO L, GITTO P, BARBERI S, CORDARO S, BARBERI I. Increased levels of malondialdehyde and nitrite/nitrate in the blood of asphyxiated newborns: reduction by melatonin. *Journal of Pineal Research*, 31: 343-349, 2001.
 59. HALL ED. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *Journal of Neurosurgery*, 76: 13-22, 1992.
 60. VANNUCCI RC, VANUCCI SJ. A model of perinatal hypoxic–ischemic brain damage. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 835: 234–249, 1997.
 61. VANNUCCI RC, CONNOR JR, MAUGER DT, PALMER C, SMITH MB, TOWFIGHI J, VANNUCCI SJ. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Journal of Neuroscience Research*, 55:158-163, 1999.
 62. SHERWOOD MN, TIMIRAS PS. A stereotaxic atlas of the developing rat brain. University of California Press, Los Angeles, page 78-139, 1970.
 63. KUMRAL A, OZER E, YILMAZ O, AKHISAROĞLU M, GOKMEN N, DUMAN N, ULUKUS C, GENÇ S, OZKAN H. Neuroprotective effect of erythropoietin on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Biology Neonate*, 83: 224-228, 2003.
 64. KUMRAL A, YESİLIRMAK DC, SONMEZ U, BASKIN H, TUGYAN K, YILMAZ O, GENÇ S, GOKMEN N, GENÇ K, DUMAN N, OZKAN H. Neuroprotective effects of the peptides ADNF and NAP on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Research*, 1115:169-178, 2006.
 65. HENNEBERRY RC, NOVELLI A, COX JA, LYSKO PG. Neurotoxicity at the *N*-methyl-D-aspartate receptor in energy-compromised neurons: a hypothesis for cell death in aging and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 568: 225-233, 1989.
 66. McDONALD RL, CURRY DJ, AIHARA Y, ZHANG ZD, JAHROMI BS, YASSARI R. Magnesium and experimental vasospasm. *Journal of Neurosurgery*, 100: 106-110, 2004.
 67. REGAN RF, JASPER E, GUO YP, PANTER SS. The effect of magnesium on oxidative neuronal injury in vitro. *Journal of Neurochemistry*, 70: 77-83, 1998.
 68. ZIPURSKY A, JOHNSTON MV, ISHIDA A, NAKAJIMA W. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatric Research*, 49: 735-741, 2001.
 69. SAMESHIMA H, IKENOUE T. Long term magnesium sulfate treatment as protection against hypoxic-ischemic brain injury in seven-day old rats. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 184:185-190, 2001.

70. RAVISHANKAR S, ASHRAF QM, FRITZ K, MISHRA OP, DELIVORIA-PAPADOPOULOS M. Expression of Bax and Bcl-2 proteins during hypoxia in cerebral cortical neuronal nuclei of newborn piglets: effect of administration of magnesium sulfate. *Brain Research*, 901: 23-29, 2001.
71. PAZAITI A, SOUBASI V, SPANDOU E, KARKAVELAS G, GEORGIU T, KARALIS P, GUIBA-TZIAMPURI O. Evaluation of long-lasting sensorimotor consequences following neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats: the neuroprotective role of MgSO₄. *Neonatology*, 95: 33-40, 2009.
72. ZHU H, MELONI BP, MOORE SR, MAJDA BT, KNUCKEY NW. Intravenous administration of magnesium is only neuroprotective following transient global ischemia when present with post-ischemic mild hypothermia. *Brain Research*, 1014: 53-60, 2004.
73. ZHU H, MARTIN RL, MELONI BP, OLVFLGYI CG, MOORE SR, MAJDA BT, KNUCKEY NW. Magnesium sulfate fails to reduce infarct volume following transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience Research*, 49: 347-353, 2004.
74. ZHU H, MELONI BP, BOJARSKI C, KNUCKEY MW, KNUCKEY NW. Post-ischemic modest hypothermia (35 degrees C) combined with intravenous magnesium is more effective at reducing CA1 neuronal death than either treatment used alone following global cerebral ischemia in rats. *Experimental Neurology*, 193: 361-368, 2005.
75. ZAUSINGER S, SCHFLER K, PLESNILA N, SCHMID-ELSAESSER R. Combination drug therapy and mild hypothermia after transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 34: 2246-2251, 2003.
76. WOLFBERG AJ, DAMMANN O, GRESSENS P. Anti-inflammatory and immunomodulatory strategies to protect the perinatal brain. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 12: 296-302, 2007.
77. BAYDAS G, REITER RJ, AKBULUT M, TUZCU M, TAMER S. Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome c translocation and caspase-3 activation and by regulating pro- and anti-apoptotic protein levels. *Neuroscience*, 135: 879-886, 2005

TEŞEKKÜR

Eğitim ve öğretim hayatımda önemli bir yer tutan uzmanlık sonrası doktora programının oluşturulması, geliştirilmesi, yürütülmesi ve devamlılığının sağlanmasında büyük emekleri olan, hem Sağlık Bilimleri Enstitüsü müdürü, hem de doktora yaptığım Fizyoloji Anabilim Dalı başkanı olarak hiç bir zaman desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Kasım Özlük'e çok teşekkür ederim. Doktora programına başladığım günden itibaren tezin sonuna kadar geçen dönemde danışman hocam olarak bana her zaman destek olan Doç. Dr. Fadıl Özyener'e de sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Fizyoloji doktora tez konumun belirlenmesinden, tüm deneylerin başlangıcından sonuna kadar gerçekleştirilmesinden, tezin yazımını da içerecek şekilde tezin tüm aşamalarına kadar hafta içi-hafta sonu, gece-gündüz demeden bana yardımcı olan, başarıyı ve başarısızlığı da birlikte yaşadığımız Doç. Dr. Tülin Alkan'a da çok teşekkür ederim. Yine deneylerin gerçekleştirilmesi esnasında deneyimlerini benimle paylaşan, tezin yazımı ve sunumu sırasında da katkılarını benden esirgemeyen Yard. Doç. Dr. Bülent Gören'e de teşekkürlerimi sunarım. Bunun yanı sıra doktora programı boyunca bize her zaman destek olan Fizyoloji Anabilim Dalındaki tüm hocalarımıza ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında göreve başladığım dönemden itibaren bugünlere gelmemde büyük emekleri olan, uzmanlık sonrasında başladığım Yenidoğan Yan Dal İhtisası sırasında da her zaman beni destekleyen, benim doktora programına başlamam ve sonrasında da bitirmem için hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen, her zaman arkamda olan değerli hocam Prof. Dr. Nilgün Köksal'a teşekkürlerimi sunarım. Aynı şekilde, doktora programı boyunca klinik ve poliklinikten uzak kaldığım dönemlerde iş yükümü paylaşan, bana her zaman destek olan, Neonatoloji Bilim Dalı'ndan Uzm. Dr. Hilal Özkan'a da çok teşekkür ederim.

İmmünohistokimyasal analizlerin gerçekleştirilmesi ve değerlendirilmesinde çok yardımları olan Anatomi Anabilim Dalı'ndan Uzm.Dr.İlker Mustafa Kafa ve Doç. Dr.Ayberk Kurt'a teşekkür ederim.Tezin sunum aşamaları ve sonuç döneminde beni destekleyen sevgili arkadaşım Doç. Dr. Mehmet Cansev'e de teşekkür ederim.

Doğduğum günden bu günlere gelmemde büyük emeği olan aileme teşekkürler.

ÖZGEÇMİŞ

16 Eylül 1975 yılında Diyarbakır'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi sırası ile Konya Hazım Uluşahin İlkokulu ve Nazilli Anadolu Lisesinde tamamladım. 1993-1999 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde tıp eğitimimi tamamladıktan sonra, 2000-2005 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında Tıpta Uzmanlık Eğitimimi tamamladım.

2005 yılından itibaren Uzman Doktor olarak Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında Neonatoloji yan dal ihtisasına devam etmekte olup, 2006 yılından itibaren Fizyoloji Anabilim Dalında doktora yapmaktayım.