

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**YENİDOĞAN SIÇANLARDAKİ HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI  
MODELİNDE L-TİROKSİN VE ERİTROPOİETİN'İN APOPİTOZ ÜZERİNDEKİ  
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Erdem Gönüllü

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI

UZMANLIK TEZİ

2005

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**YENİDOĞAN SIÇANLARDAKİ HİPOKSİK İSKEMİK BEYİN HASARI  
MODELİNDE L-TİROKSİN VE ERİTROPOİETİN'İN APOPİTOZ ÜZERİNDEKİ  
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Erdem Gönüllü

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI  
UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ayşe Sevim Gökalp  
Anabilim Dalı Başkanı: Prof. Dr. Ayşe Sevim Gökalp

Etik Kurul Onayı: AEK 30,11,2004: 123/2  
Proje Desteği: Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi2004/38

2005



## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖNSÖZ	III
KISALTMALAR	IV
ÇİZELGELER	VI
ŞEKİLLER	VII
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	4
GEREÇ VE YÖNTEM	24
BULGULAR	28
TARTIŞMA	49
SONUÇLAR	55
ÖZET	56
İNGİLİZCE ÖZET	58
KAYNAKLAR	60
EK	

## ÖNSÖZ

Tezimin hazırlanmasındaki destekleri ve eğitimim sürecindeki katkılarından dolayı başta Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanımız ve tez danışmanım Prof. Dr. Ayşe Sevim Gökalp olmak üzere, anabilim dalımızın öğretim üyeleri Prof. Dr. Emin Sami Arısoy, Prof. Dr. Şükrü Hatun, Prof. Dr. Ayşe Engin Arısoy, Prof. Dr. Zelal Bircan, Doç. Dr. Nazan Sarper, Yard. Doç. Dr. Metin Aydoğan, Yard. Doç. Dr. Gülcan Türker, Yard. Doç. Dr. Kadir Babaoğlu, Yard. Doç. Dr. Bülent Kara, Yard. Doç. Dr. Ayşen Aydoğan, Yard. Doç. Dr. Funda Özer, Yard. Doç. Dr. Emine Zengin, Yard. Doç. Dr. Demet Toprak, Yard. Doç. Dr. Filiz Çizmecioglu, Uzm. Dr. Gökhan Büyükkale, Uzm. Dr. Sevinç Gültekin'e teşekkür ederim.

Klinikte birlikte çalıştığımız Dr. Çağatay Acar, Dr. Sait Uçan , Dr. Özlem Sarısoy, Dr. Kaan Gülleroğlu, Dr. Dilek Erdönmez, Dr. Hülya Taneri, Dr. Ferda Yapıcı, Dr. Hale Usluer, Dr. Ebru Öney, Dr. Arzu Şengöz, Dr. Aynur Akbulut, Dr. Murat Seringeç, Dr. Fatma Karakuş ve diğer asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tezimin cerrahi işlemlerinde yardımcı olan Doç. Dr. Melih Tugay'a, histolojik preparatların hazırlanması ve incelenmesini yapan Doç. Dr. Melda Yardımoğlu ve Uzm. Dr. Yusufhan Yazır'a, istatistik değerlendirmeyi yapan Yard. Doç. Dr. Nilay Etiler'e teşekkürü borç bilirim.

Son olarak, yetişmemdeki büyük emekleri ve rol modellikleri için sevgili anne ve babama teşekkür ederim.

Dr. Erdem Gönüllü

## KISALTMALAR

ACPD	: 1- aminosiklopentan -15,3 R- dikarboksilik asit
Akt	: Akt - serin-threonin kinaz
AMPA	: Alfa- amino-3- hidroksi- 5- metil-4 izoksazol propiyonik asit
APAF 1	: Apoptotik proteaz – aktive edici faktör-1
Bax	: BCL2-ilişkili X proteini
BCL-2	: B hücre ilişkili lösemi 2:gen ailesi – apoptoz regülatörü
BDNF	: Beyin kaynaklı sinir büyüme faktörü
BFGF	: Bazik fibroblast büyüme faktörü
Caspase	: Apoptoz ilişkili sistein proteaz
CA-1	: Cornu amonis-1
CA-2	: Cornu amonis-2
CA-3	: Cornu amonis-3
CFV	: Cresyl fast violet
dab	: disabled protein
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EAA	: Eksitator Amino Asit
EPO	: Eritropoetin
EPOr	: Eritropoietin reseptörü
f T <sub>3</sub>	: Serbest Triiyodotironin
f T <sub>4</sub>	: Serbest tiroksin
GLUT3	: Glukoz taşıyıcı – 3
GLUT4	: Glukoz taşıyıcı – 4
HİE	: Hipoksik İskemik Ensefalopati
Hif1- $\alpha$	: Hipoksi etkileşimli faktör- $\alpha$
H&E	: Hematoksilen – eozin
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IGFBP	: İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteini
IL-3	: İnterlökin-3
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8
JAK-2	: Janus Kinase -2
kDa	: KiloDalton

<b>NF-<math>\kappa</math><math>\beta</math></b>	<b>: Nükleer Faktör kappa - beta</b>
<b>NGF</b>	<b>: Nörotrofik Büyüme Faktörü</b>
<b>NMDA</b>	<b>: N-Metil-D-Aspartat</b>
<b>NO</b>	<b>: Nitrik Oksit</b>
<b>NOS</b>	<b>: Nitrik Oksit sentetaz</b>
<b>PI3-K</b>	<b>: Fosfatidil inozitol-3 kinaz</b>
<b>PAF</b>	<b>: Trombosit aktive edici faktör</b>
<b>PK</b>	<b>: Paryetal Korteks</b>
<b>PTU</b>	<b>: Propiltiyourasil</b>
<b>reelin</b>	<b>: reler (çıkık) protein</b>
<b>RNA</b>	<b>: Ribonükleik asit</b>
<b>SSS</b>	<b>: Santral Sinir Sistemi</b>
<b>T<sub>3</sub></b>	<b>: Triiyodotironin</b>
<b>T<sub>4</sub></b>	<b>: Tiroksin</b>
<b>TSH</b>	<b>: Tiroid Stimulan Hormon</b>
<b>XIap</b>	<b>: x-geçişli apopitoz inhibitör proteini</b>

---

ÇİZELGE I: PRETERM VE TERM BEBEKLERDE SELEKTİF NÖRON HASARININ GERÇEKLEŞTİĞİ BÖLGELER.	7
ÇİZELGE II: GRUPLAR ARASINDA TEK TARAFLI VENTRİKÜL DİLATASYONU GÖZLENEN SIÇAN SAYISI	28
ÇİZELGE III: GRUPLAR ARASINDA VASKÜLER DİLATASYON VE KANAMA GÖZLENEN SIÇAN SAYISI	28
ÇİZELGE IV: SAĞ VE SOL HİPOKAMPUS UZUNLUK ORTALAMALARININ TEDAVİ GRUPLARINA GÖRE DAĞILIMI.	29
ÇİZELGE V: HEMATOKSİLEN VE EOZİN İLE BOYANAN SOL HEMİSFER BÖLGESİ NEKROTİK HÜCRE ORTALAMALARININ TEDAVİ GRUPLARINA GÖRE DAĞILIMLARI	30
ÇİZELGE VI: HEMATOKSİLEN VE EOZİN İLE BOYANAN SAĞ HEMİSFER BÖLGESİ NEKROTİK HÜCRE ORTALAMALARININ TEDAVİ GRUPLARINA GÖRE DAĞILIMLARI.	31
ÇİZELGE VII: CFV İLE BOYANAN SOL HEMİSFER BÖLGESİ NİSSL ORTALAMALARI	33
ÇİZELGE VIII: CFV İLE BOYANAN SAĞ HEMİSFER BÖLGESİ NİSSL ORTALAMALARI	34
ÇİZELGE IX: CASPASE-3 İLE BOYANAN SOL HEMİSFER BÖLGESİ APOPİTOTİK HÜCRE ORTALAMALARININ TEDAVİ GRUPLARINA GÖRE DAĞILIMLARI	35
ÇİZELGE X: CASPASE-3 İLE BOYANAN SAĞ HEMİSFER BÖLGESİ APOPİTOTİK HÜCRE ORTALAMALARININ TEDAVİ GRUPLARINA GÖRE DAĞILIMLARI	36

ŞEKİL 1:APOPİTOZUN BAŞLAMASINI SAĞLAYAN KASPAZ AKTİVASYONU	15
ŞEKİL 2: EPO’NUN ETKİNLİĞİNİ GÖSTERDİĞİ YERLER	18
ŞEKİL 3: IGF İLİŞKİLİ EKSPRESE EDİLEN NÖRON KORUYUCU SİTOKİN VE HORMONLAR	22
ŞEKİL 4: TEDAVİ GRUPLARINA GÖRE HİPOKAMPUS UZUNLUKLARI	29
ŞEKİL 5: HEMATOKSİLEN-EOSİN İLE BOYANAN KESİTLERDE TEDAVİ GRUPLARINA GÖRE HÜCRE NEKROZU YÜZDE DEĞERLERİ	32
ŞEKİL 6: TEDAVİ GRUPLARINA GÖRE NİSSL ORTALAMASI	34
ŞEKİL 7: TEDAVİ GRUPLARINA GÖRE CASPASE-3 İLE BOYANAN APOPİTOTİK HÜCRE YÜZDE ORTALAMA DEĞERLERİ	37
RESİM 1A: KONTROL GRUBU CA1 BÖLGESİNDE İSKEMİK NÖRONLAR	38
RESİM 1B: KONTROL GRUBU CA1 BÖLGESİNDE NİSSL CİSİMCİKLERİ	38
RESİM 1C: KONTROL GRUBU CASPASE 3(+) BOYANAN HÜCRELER	39
RESİM 1D: KONTROL GRUBU PK’DE İSKEMİK NÖRONLAR	39
RESİM 1E: KONTROL GRUBU PK’DE NİSSL İÇERİĞİ DÜŞÜK NÖRONLAR	40
RESİM 1F: KONTROL GRUBU PK’DE CASPASE 3 (+) NÖRONLAR	40
RESİM 2A: T4 GRUBU CA 1 BÖLGESİNDE İSKEMİK NÖRONLAR	41
RESİM 2B: T4 GRUBU CA 1’DE NİSSL İÇERİĞİ NORMAL VE AZ NÖRONLAR	41
RESİM 2C: T4 GRUBU CA 1’DE CASPASE 3 İLE (+) APOPİTOTİK HÜCRELER	42
RESİM 2D: T4 GRUBU PK’DE İSKEMİK NÖRONLAR.	42
RESİM 2E: T4 GRUBU PK’DE NİSSL İÇERİĞİ NORMAL VE AZ NÖRONLAR	43
RESİM 2F: T4 GRUBU PK’DE CASPASE 3 (+) APOPİTOTİK HÜCRELER	43
RESİM 3A: EPO GRUBU CA 1’DE İSKEMİK NÖRONLAR	44
RESİM 3B: EPO GRUBU CA 1’DE NİSSL İÇERİĞİ NORMAL VE AZ NÖRONLAR	44
RESİM 3C: EPO GRUBU CA 1’DE CASPASE 3 (+) APOPİTOTİK HÜCRELER	45
RESİM 3D: EPO GRUBU PK’DE İSKEMİK NÖRONLAR	45
RESİM 3E: EPO GRUBU PK’DE CASPASE 3 (+)APOPİTOTİK HÜCRELER	46
RESİM 4A: EPO+T4 GRUBU HİPOKAMPUSUN CA 1 BÖLGESİ	46
RESİM 4B: EPO+T4 GRUBU CA1’DE NİSSL NORMAL VE AZ NÖRONLAR	47
RESİM 4C: EPO+T4 GRUBU CA1’DE CASPASE 3 (+) APOPİTOTİK HÜCRELER	47
RESİM 4D: EPO+T4 GRUBU PK’DE İSKEMİK NÖRONLAR	48
RESİM 4E: EPO+T4 GRUBUPK’DE CASPASE 3 (+)APOPİTOTİK HÜCRELER	48

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hipoksik iskemik ensefalopati; santral sinir sistemi hücrelerinde kalıcı hasar bırakarak yenidoğan döneminde ölüm, sonraki dönemde ise serebral felç veya zekâ geriliğinin önemli nedenlerinden biri olagelmıştır (1). Zamanında doğan bebeklerde perinatal asfiksi insidansı 2–4/1000 iken, zamanından önce doğan ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerde %60'a kadar çıkmaktadır (1,2) .

Hipoksi ve ardından gelen iskemi sonrası gelişen hücre içi enerji yetmezliği, oksidatif fosforilasyon yolundan sapma sonucu oluşan hücre içi asidoz, iskeminin ardından yeniden kanlanmaya bağlı oluşan serbest radikallerle hücre zarının lipid bölümünün peroksidasyonu ve hücre içi kalsiyum birikimi beyin hasarında rol oynayan patolojik süreçlerdir ve hasarın oksijenlenme sonrasında da devam ettiğini göstermektedir.

Yeniden kanlanma döneminde, nöronal hücre hasarına IL–6 ve IL–8 gibi artan proinflamatuvar sitokinler, oksijen radikalleri, NO, eksitatör ve inhibitör nörotransmitter sistemler arasındaki dengesizlik katkıda bulunur (3–6). Bu olayların net etkisi ise genellikle apoptoz stimülasyonu ve hücre ölümüdür. Bu olaylar birkaç saat içinde gerçekleştiğinden, sürecin ilk başladığı dönemde süreci geri çevirecek veya önleyecek girişimlerin potansiyel olarak tedavi edici etkinliğinin olabileceği düşünülmektedir (6,7).

HİE'de hücre ölümü apoptotik (programlanmış hücre ölümü) ve nekrotik olmak üzere iki şekilde karşımıza çıkar. Hipoksi ve ardından gelen iskemik olaya ilk yanıt dakikalar içerisinde gelişen nekroz olmakla birlikte apoptoz saatler ve günler içerisinde oluşur (8).

Apoptoza doğru giden patolojik süreci düzeltebilen çeşitli maddelerin deneysel modellerde oluşturulan perinatal hipoksik iskemik hasarın şiddetini kısmen azalttığı gösterilmiştir (7,9). Beyin kaynaklı sinir büyüme faktörü, temel fibroblast büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü ve sinir büyüme faktörünün bu tür koruyucu etkileri hipoksik – iskemik beyin hasarı modellerinde bildirilmiştir (10–13).

İmmatür beyinde hipoksi-iskemiye yanıt olarak apoptoza yol açan kaspaz sisteminin aktive olduğuna dair çeşitli kanıtlar vardır. Hipoksi-iskemiye yanıt olarak

kaspaz-3, -8 ve -9 artmaktadır (14-17). Kaspaz-3 aktivasyonu ile nöronal apoptoza bağlı hipoksik- iskemik beyin hasarı geniş spektrumlu bir apoptoz inhibitörü ile veya endojen kaspaz inhibitörü XIap kullanılarak azaltılabilmektedir (15,18).

Fetal karaciğer ve postnatal dönemde böbrekte hipoksiye yanıt olarak üretilen bir hormon olan Eritropoietin, fetal hayatın 5. haftasından sonra SSS' de ortaya çıkmaktadır (19). Hipoksi yaşamış bebeklerin kord kanı ve amniotik sıvılarında fetal hipoksinin belirteçleri olarak intakt EPO'nun salgılandığı gösterilmiştir. (20,21). Hipoksik-iskemik beyin dokusunda gözlenen belirgin EPO ve EPOr üst-düzenlemesi, EPO'nun potansiyel endojen sinir hücresi koruyucu ajanlardan biri olduğunu düşündürmektedir (22).

HİE'li yenidoğan sıçanlarla yapılmış çalışmalarda EPO'nun in vivo koşullarda beyin hasarını önlediği, sayılan etkisini hipoksi-iskeminin başlattığı DNA parçalanmasını ve apoptozu önleyerek sağladığı gösterilmiştir (23,24). Yine EPO'nun, primer sinir hücresi kültürlerinde NMDA reseptörü aracılıklı glutamat toksisitesini ve NO ile indüklenen hücre ölümünü önlediği gösterilmiştir (25).

T<sub>4</sub>, tiroid bezinden salınan bir hormondur, etkileri arasında termogenezin sağlanması, su ve iyon taşınması, substrat döngüsünün hızlandırılması, aminoasit ve lipid metabolizmasının uyarılması sayılabilir. Tiroid hormonu katekolaminlerin etkilerini de artırır, hipertiroidideki klinik bulguların bir kısmı bu özelliğine bağlanabilir.

Yenidoğan, bebeklik ve çocukluk döneminde tiroid hormonunun etkisi büyümenin ve değişik dokuların gelişiminin uyarılmasıdır, tiroid hormonu özellikle beyin ve iskelet gelişimi üzerinde büyük rol oynar. Yenidoğan döneminde tiroid bezi bozukluğunun ve hipotiroidizmin etkileri klinikte çok iyi bilinmektedir. Yenidoğanlarda tedavisiz bırakılan hipotiroidi kalıcı nörolojik ve entelektüel bozukluklara neden olmaktadır (26). Sayılan etkilerinin yanında, tiroid hormonunun in vitro hipoksi koşullarında fakat hipoksiden bağımsız olarak EPO yapımını artırdığı bilinmektedir (27). Kronik hipoksiye maruz bırakılan sıçanlarda serbest T<sub>4</sub> düzeylerinin anlamlı derecede düştüğü gösterilmiştir (28). Hormon düzeyleri üzerindeki etkisi üzerine yapılmış güncel bir vaka – kontrol çalışmasında, Perinatal asfiksi yaşamış yenidoğanlarda T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub> ve fT<sub>4</sub> düzeylerinin normal yenidoğanlara göre



anlamli derecede düşük olduğu gösterilmiştir. Daha da önemlisi, asfiksiye maruz kalan bebeklerde serbest T<sub>4</sub> düzeyi ile mortalite arasında ilişki gösterilmiştir (29).

Tiroid hormonunun beyin dokusunun gelişimindeki önemi bilinmekle birlikte, hipoksi koşullarında tiroid hormon aksının baskılanması daha güncel bir bilgidir. Beyin gelişiminde tiroid hormonunun geliştirici etkisine ek olarak tiroid hormonunun eksikliğinde programlı hücre ölümü yolu ile de SSS gelişimini etkilediği düşünülmektedir (30,31). Gebelik döneminde kronik hipoksiye maruz bırakılan sıçan yavrularının SSS'nde sinir hücresi tarafından glukoz kullanımını düzenleyen GluT<sub>3</sub>, GluT<sub>4</sub> ile birlikte tiroid hormon reseptörü sentezinin de arttığı gösterilmiştir, bu verinin, oluşumunu devam ettirebilmek için beyin tarafından üretilen bir alternatif olup olmadığı henüz bilinmemektedir (32).

Hem hipoksi sürecinde eksikliği gösterilen, hem de eksikliğinde hipoksi sürecindeki gibi nöronal apoptoza yol açan tiroid hormonu, henüz deneysel de olsa hipoksi iskemi modelinde kullanılmamıştır.

ęalıřmamızda amağlanan, tiroid hormonunun beyin dokusu oluşumunda kanıtlanmış geliştirici etkisinin yanında hipoksi sonrası durumda EPO ilişkili veya EPO' dan bağımsız mekanizmalarla sinir dokusunun hipoksiden korunması ile bir ilişkisi olup olmadığını araştırmaktır. Böyle bir ilişkinin varsa ortaya konulması, tiroid hormonunun görevleri, tiroid ilişkili olmayan hastalık durumu ve hipoksi-iskemi konularında kliniğe daha kolay uyarlanabilen verileri sağlayacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Hipoksi; arterial oksijen yoğunluğunun normalden daha az olması ve iskemi de hücre ve organlara giden kan akımının, hücre veya organın normal işlev görmesine yetmeyecek düzeyde azalması anlamına gelmektedir. HİE; SSS hücrelerinde kalıcı hasar bırakarak yenidoğan döneminde ölüm, sonraki dönemde ise serebral felç veya zekâ geriliğinin önemli nedenlerinden biri olagelmıştır (1).

### 2.1. EPİDEMİYOLOJİ

Zamanında doğan bebeklerde HİE insidansı 2–4/1000 iken, zamanından önce doğan ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerde %60'a kadar çıkmaktadır (1,2).

Yenidoğan döneminde HİE oluşmuş bebeklerin %20-%50'si yaşamın ilk ayında ölmekte, kalanların %25-60'ı serebral felç, nöbetler, zekâda gerilik ve öğrenme güçlüğü gibi kalıcı nöro-gelişimsel engellerle karşılaşmaktadır (33,34). Dünyada her yıl 5 milyon bebek; Türkiye'de ise 35 bin bebek ilk bir ay içinde ölmektedir (35–37). Bu 35 bin bebeğin % 44,3'ü de ilk günde ölmektedir (37). Gelişmekte olan ülkelerde yeni doğan dönemindeki ölümlerin % 33'ü; Türkiye'de ise % 11'i HİE'ye bağlıdır (35–37).

### 2.2. ETİYOLOJİ

HİE, gebelik sırasında, doğum eylemi sırasında, ve doğum sonrasında yaşanan komplikasyonlar sonucunda gelişebilmektedir. Hasarda en çok rol oynayan süreçler ise %90 oranında gebelik sırasında ve doğum eylemi sırasında yaşanan komplikasyonlardır. Doğum sonrası komplikasyonlar yenidoğanın hipoksik iskemik beyin hasarında % 10 oranında rol oynamaktadır. Yenidoğanda hipoksik iskemik beyin hasarına yol açan etmenler aşağıda özetlenmiştir (9):

1. Prepartum- antepartum dönemde:

- Maternal nedenlere bağlı
  - Toksemi (eklampsi)
  - Diabetes mellitus
  - İlaç yan etkisi
  - Kardiyovasküler hastalıklar
  - İnfeksiyon hastalıkları
  - İzoimmünizasyon
  - Bağ dokusu hastalıkları
- Obstetrik komplikasyonlara bağlı
  - Abruption plasenta
  - Umbilikal korda bası
  - Plasenta previa
  - Polihidroamnios
  - Fetal membranların erken yırtılması
  - oğul gebelik

2. İnapartum dönemde:

- Anormal prezentasyon
- Hızlı doğum
- Uzamış doğum
- M¼dahaleli zor doğum
- İnapartum b¼y¼me geriliği
- Uzamış gebelik

3. Neonatal dönemde:

- Premat¼rite
- Respiratuar distres
- Kardiyopulmoner anomaliler
- Enfeksiyon hastalıkları
- Hemolitik hastalıklar
- Septik çok

### 2.3. HİSTO-PATOLOJİK BULGULAR

HİE zamanında doğan yenidoğanlarda özellikle serebral korteks, hipokampus, bazal gangliyonlar, talamus ve serebellar hemisfer gibi gri cevher bölgelerinde görülür. Zamanından önce doğanlarda ise lezyonlar ağırlıklı olarak serebral hemisfer gibi beyaz cevher yapılarında görülmektedir (9).

HİE’de dört ana patoloji görülmektedir :

- I. Seçici nöronal nekroz
- II. Parasagittal serebral zedelenme
- III. Periventriküler lökomalazi
- IV. Fokal / multifokal iskemik beyin nekrozu

Seçici nöronal nekrozun zamanından önce doğan ve zamanında doğan bebeklerde tuttuğu bölgeler Çizelge I’de verilmiştir.

**Çizelge I. Zamanından önce doğan ve zamanında doğan bebeklerde seçici sinir hücreleri hasarının gerçekleştiği bölgeler.**

Bölge	Zamanından önce doğan	Zamanında doğan
Neokorteks		+
Hipokampus		
Sommer's bölgesi		+
Subikulum	+	
Derin çekirdekler		
N. caudatus - putamen		+
Globus pallidus	+	
Talamus	+	+
Beyin sapı		
Kafa çiftleri çekirdekleri	+	+
Pons	+	
N. olivarius inferior	+	
Beyincik		
Purkinje hücreleri		+
İç granüler hücreler	+	
Omurilik		
Ön boynuz hücreleri		+
Yaygın tutulum	+	

## 2.4. PATOGENEZ

### 2.4.1. İSKEMİ VE ETKİLERİ

HİE sırasında erken ve geç olmak üzere iki ayrı grupta incelenebilen önemli serebral dolaşım mekanizmaları devreye girmektedir (38).

Erken değişiklikler:

- Kan akımının yeniden düzenlenmesi
- Beyin kanlanmasında artış
- Beyin damarlarında otoregülasyon kaybı

Geç değişiklikler:

- Hipotansiyon ve beyin kanlanmasında azalma

1. Fetal kanlanmanın yeniden düzenlenmesi: Hipoksik-iskemik olay sonrası kalp, beyin ve adrenaller dışında kalan organların kanlanması azalarak yaşamsal organların iki kat daha fazla kanlanması sağlanır. Bu, deniz memelilerinde dalma sonrası 10–30 dakika solunum işleminin gerçekleşmemesi nedeniyle hipoksiden korunmak amacı ile benzer şekilde kan dağılımını yönlendiren “dalma refleksine” benzemektedir (38).

2. Beyin kanlanmasında artış: Hipoksi ve/veya hiperkarbi ve olasılıkla artmış perivasküler hidrojen iyon yoğunluğuna bağlı olarak beyin damarlarında vazodilatasyon sonucu görülür, K<sup>+</sup>, adozin ve prostoglandinler de bu etkiye eşlik eder. Serebral kanlanma artışının gerçekleşmesinde en önemli rol kan basıncının artmasıdır. Ortalama olarak 60 dakika süren bu artış en fazla beyin sapı ve en az beyaz cevherde (özellikle parasagital alanlarda) görülmektedir (38).

3. Beyin damarlarında otoregülasyon kaybı: Kan basıncındaki geniş oynamalara karşılık serebral kan akımının belli sınırlarda idame edilmesi ile sağlanmaktadır. Erişkinlerdeki otoregülasyon 60–150 mmHg arasındaki kan basıncı değerlerinde etkin çalışmaktadır. Zamanında doğan yenidoğanlarda otoregülasyonun sağlandığı kan basıncı aralığı erişkinin %40'ı ve zamanından önce doğanlarda %20'si şeklindedir. Otoregülasyon hipoksiye duyarlıdır. Çalışmalarda PaO<sub>2</sub>'nin 70 mm Hg'dan 30 mmHg'ya düşmesinin otoregülasyonu bozduğu gösterilmiştir. Yirmi dakika hipoksiye maruz kalma otoregülasyonun kaybolmasına neden olur ve bu olay

hipoksi düzeldikten 7 saat sonra bile etkisini göstermektedir. Asidoz, hipokarbi ve hiperkarbinin de otoregölasyonu bozucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (38).

4. Hipotansiyon ve geç dönemde azalmış beyin kan akımı: Hipoksiye ilk yanıt hipertansiyon iken bunu takip eden süre içinde hipotansiyon gelişmektedir. Bu değişimin hızı hipoksinin süre ve şiddetine bağlıdır. Hipotansiyon hipoksi sırasında miyokardın yetersizliğine ikincil gelişmektedir (38).

#### **2.4.2. HİPOKSİ, HÜCRE İÇİ ASİDOZ, KALSİYUM VE EAA TOKSİSİTESİ SONUCU GELİŞEN ERKEN HÜCRE ÖLÜMÜ: NEKROZ**

Hipoksi ve ardından gelen iskemi sonrası gelişen hücre içi enerji yetmezliği ve oksidatif fosforilasyon yolundan sapma sonucu oluşan hücre içi asidoz, iskeminin ardından yeniden kanlanmaya bağlı oluşan serbest radikallerle hücre zarının lipid bölümünün peroksidasyonu ve hücre içi kalsiyum birikimi beyin hasarında rol oynayan patolojik süreçlerdir ve hasarın oksijenlenme sonrasında da devam ettiğini göstermektedir. Hipoksi ve/ veya doku perfüzyonunun azalması ile serebral kan akımının otoregölasyonu bozulduktan sonra beyinde bölgesel hipoksi-iskemi oluşur. İskemi sonucunda sinir hücrelerinde hipereksitasyon yaratarak, başta glutamat olmak üzere eksitator aminoasitlerin oluşumuna yol açar (38,39).

EAA'ler, reseptörlere bağlanarak etkilerini gösterirler. Bu reseptörler 3 ana grupturlar. Bunlardan ilki voltaja bağlı olarak çalışan NMDA reseptörleri olup glutamik asid (glu) bağlanması sonrasında sodyum ve  $Ca^{+2}$ 'un hücre içine girişine, potasyumun ise hücre dışına çıkışına sebep olur. Bu grup reseptörler  $Mg^{+2}$  ile bloke edilebilirler. İkinci EAA reseptörü ise AMPA olup voltaj bağımsız olarak çalışırlar. AMPA aktivasyonu sonucunda sodyum hücre içine  $K^{+}$  hücre dışına doğru çıkar. Bazı AMPA reseptörlerinin de  $Ca^{+2}$  geçirgen olabileceği gösterilmiştir. Bir diğer EAA reseptör grubu da metabotropik EAA reseptörleri olarak adlandırılan gruptur. Bu reseptörler ise aktive olduğunda fosfolipaz-C' yi aktif hale getirerek hücre içinde bağlı olarak bulunan  $Ca^{+2}$ 'un, serbest hale getirilmesini sağlarlar.

Metabotropik bir reseptör olan ACPD fosfoinositid hidrolizi, protein C kinaz aktivasyonu ve endoplazmik retikulumdan kalsiyum mobilizasyonunu sağlar. (38,39) Depolarizasyon öncesi, sinaps aralığındaki kalsiyum miktarı normalken, magnezyum

NMDA reseptörlerine bağlı durumdadır ve hücre içine kalsiyum girişini engellemektedir. Depolarizasyon sonrasında glutamat AMPA reseptörlerine bağlanır, magnezyum NMDA reseptöründen uzaklaşır ve inhibisyon kalkar, kalsiyum hücre içine girer (38–40). Böylece hücre içi olaylar başlar. Kalsiyumun hücre içinde glutamat olmaksızın tek başına yaptığı hasar, glutamat ile birlikte olandan azdır. Kalsiyum hemostatik mekanizmalarda da rol alır. Kalsiyumun hücre içine girişi ile protein kinaz C, proteaz, protein fosfataz, NOS enzim serileri etkinleşir ve fosfolipaz A<sub>2</sub> aktive olur, araşidonik asit ve metabolitleri artarken, trombosit aktive edici faktör etkinleşir. PAF etkisi ile hücre içinde artan kalsiyum, glutamat seviyesini artırır ve süreci yeniden başlatır. Araşidonik asit, NMDA reseptörlerinin uyarılmasını artırırken glutamatın sinir hücreleri ve astrositlere yeniden girmesini inhibe ederken, metabolizması sırasında açığa çıkan serbest oksijen radikalleri fosfolipaz A<sub>2</sub>'nin aktive olmasına yol açar ve pozitif bir geri besleme mekanizması oluşturur. Bu enzim serilerinin net etkisi ise protein yıkımı, lipid peroksidasyonu ve serbest oksijen radikalleri oluşumu sonucu gelişen hücre ölümüdür (39).

Yenidoğan ve fetüs beyinde EAA reseptörleri daha aktiftir. Uyarım ile erişkine göre daha fazla kalsiyum hücre içine giriş yapar. Glisin ile EAA'ler daha kolay aktive olurlar. Glutamat reseptörleri hızlı nöronal nekrozu başlatır. Glutamat reseptörleri aktive olunca sodyum; NMDA, AMPA, Quisqualate A ve Quisqualate B, Kainate kanallarından hücre içine girerken pasif olarak da klor iyonunun girmesine ve elektrokimyasal gradiyent farkının oluşmasına yol açar. Gradiyent farkından dolayı su bu iyonları takip eder. Hücre içi ödem olur ve sonunda lizis gelişir. Böylece erken nöronal hücre ölümü gerçekleşir (39,40).

Yeniden-kanlanma döneminde, nöronal hücre hasarına IL–6 ve IL–8 gibi artan proinflamatuvar sitokinler, oksijen radikalleri, NO, eksitator ve inhibitör nörotransmitter sistemler arasındaki dengesizlik katkıda bulunur (3–6). Bu olayların net etkisi ise apoptoz stimülasyonu ve hücre ölümüdür. Bu olaylar birkaç saat içinde gerçekleştiğinden, sürecin ilk başladığı dönemde süreci geri çevirecek veya önleyecek girişimlerin potansiyel olarak tedavi edici etkinliğinin olabileceği düşünülmektedir (7).



### 2.4.3. APOPTOZ

HİE'de hücre ölümü apoptotik ve nekrotik olmak üzere iki şekilde karşımıza çıkar. Hipoksi ve ardından gelen iskemik olaya ilk yanıt dakikalar içerisinde gelişen nekroz olmakla birlikte apoptoz saatler ve günler içerisinde oluşur. (8).

Programlanmış hücre ölümü, fizyolojik koşullarda hücre seleksiyonunu sağlayan, hem fizyolojik hem de patolojik olayların doku düzeyindeki kontrolünden sorumlu bir olaydır. Programlanmış hücre ölümü morfolojik olarak apoptoz adını alır. Bu "özgün" hücre ölümü, gelişim döneminde birçok organda ve dokuda fizyolojik ya da patolojik uyaranlara bağlı olarak görülebilir: İnsan vücudundaki hemen her hücre apoptoz oluşturabilecek özelliğe sahiptir ve apoptoz sırasında bir takım yapısal değişiklikler gösterirler. Çekirdeğin içerisinde çekirdekçiği oluşturan fibriller yapı, çevresindeki osmofilik kompleksten ayrılır ve DNA' da çekirdek içi parçalanma gözlenir. İleri evrelerde sitoplazma, yapısal organeller içeren parçalara ayrılarak herhangi bir inflamatuvar reaksiyon oluşturmadan etrafına yerleşmiş fagositer hücreler tarafından ortadan kaldırılır.

Hücre, dezmozom ya da mikrovillus gibi özelleşmiş yapıları ortadan kalkarak, çevresindeki hücrelerden ayrılır. Ardından, hücre membranında tomurcuklanma ve bu tomurcuklarda rezorpsiyon olur. Bir sonraki aşamada ise hücrenin büzüşmesi, sitoplazmik organellerde ve nükleer kromatin yoğunluğunda artma ve bunların çekirdek zarının etrafında granüler yapılara dönüşümü izlenir.

Işık mikroskobu düzeyinde apoptoz gösteren hücre ile normal hücrelerin ayırımı her zaman mümkün olmaz. Apoptozda gözlenen hücresel değişiklikler başladıktan birkaç dakika sonra son bulmakta ve oluşan bazı inklüzyon cisimleri ise birkaç saat içinde fagosite edilmektedir. Ancak apoptoz oluşturacak hücrelerde çekirdek içi DNA yıkımı, morfolojik değişiklikler başlamadan önce de görülmektedir(44).

#### 2.4.4. SİNİR SİSTEMİNDE APOPİTOZ:

Sinir sisteminin gelişiminde de, oluşan dokudaki sinir hücresi sayısını, programlanmış sinir hücresi ölümü belirler. Genellikle erken gelişim döneminde ve spesifik evrelerde rastlanan bu olayı, aksonların ulaşacağı dokudan salgılanan trofik faktörler düzenler. Bu faktörler, doku ile bağlantı kuran sinir hücrelerinin aksonlarının distalinde bulunan reseptörlere bağlanırlar ve retrograd olarak akson aracılığıyla sinir hücresinin gövdesine sinyaller göndererek hücrenin yaşamını sürdürecektir olayları başlatırlar. Sinir hücresinin bağlanacağı hedef doku tarafından sentezlenen bu faktörler, dokunun büyüklüğüne bağlı olarak belli yoğunluklarda olduğu için, gelişmekte olan sinir hücreleri bu faktörler için yarışa girmekte, büyüme faktörlerine ulaşamayan sinir hücrelerinde ise apoptoz görülmektedir. Bu nörotrofik teoriyi doğrulayan bulgu sıçan superior servikal gangliyonunda gözlenmiştir. Burada bulunan hücrelerin yaklaşık %40'ı postnatal dönemde ölmelerine rağmen bu dokuya dışardan verilen NGF'nin bu hücre ölümünü engellediği görülmüştür.

Son yıllarda yapılan çalışmaların sonucunda apoptozun genetik bir temele dayandığı ve birçok genin ürünü olan enzim yapısındaki maddelerin apoptotik süreci başlatabilme ve sonlandırabilme özelliğinde olduğu belirlenmiştir. Apoptoz sırasında bütün hücrelerde ortak olan genetik ve enzimatik yollar etkinleşerek “sonlandırıcı etkide olaylar” gerçekleşmekte ve morfolojik değişimi başlatmaktadır. Bu süreçte iki ayrı genin ürünü olan bcl-2 ve bax adlı proteinler apoptozda önemli rol oynamaktadır(44).

Bcl-2 geni, 25-25 kDa ağırlığında olan bir protein sentezlemektedir. Yapısal özelliği bu proteinin apoptozu nasıl düzenlediğini tam olarak ortaya koymamakla birlikte C ucundaki 21 aminoasitlik hidrofobik dizi proteinlerinin hücre membranına ve mitokondrilerinin dış membranı, çekirdek membranı ve endoplazmik retikuluma yapışmasını sağlamaktadır ki bu tutunma apoptoz için gereklidir. Bcl-2 geni ortadan kaldırılmış fareler üzerinde yapılan çalışmalarda bunların embriyonal dönemde timus ve dalakta yaygın hücre ölümü gösterdikleri ve böbreklerinde polikistik böbrek hastalığı ile uyumlu bulguların olduğu saptanmıştır. Bcl-2 ile homolog bir gen olan

bcl-x delesyonu yapılan farelerde ise embriyonik dönemde hematopoietik ve sinir sistemlerinde masif hücre ölümü gözlenmiştir. Bcl-2'nin 9 farklı tipi belirlenmiştir. Tanımlanan ilk bcl-2 homologu genlerden birisi bax'tır. bcl-2 ile %45 oranında homolog olan bu genin ürününün tam tersi bir etki ile apoptozu uyardığı belirlenmiştir. Hücre içinde bax/bcl-2 heterodimerlerinin oranının apoptozu yönettiği belirlenmiştir(44).

#### **2.4.5 HİE'DE APOPTOZUN YERİ:**

HİE'de apoptotik hücre ölümü, aktive olan NMDA reseptörlerinden hücre içine giren kalsiyum ve sodyum iyonları ile başlatılır. Hücre içinde kalsiyum NOS enzimini aktive ederek NO salınmasına neden olur. Normal koşullar altında da kalsiyum NO sentezini sağlar (39-42). NOS enzimi beyinde endotel, sinir hücresi ve astrositlerde bulunurlar. Nöronal NOS nöromodülatördür. Sinaptogenezis ve yeniden yapılanmada düzenleyici olarak hareket eder. Endotelial NOS vazodilatasyon yaparak damar duvarı tonusunu düzenler. Her iki NOS enzimi de kalsiyum ile aktive olur. İndüklenebilir NOS enzimi makrofajlarda, astrosit ve mikroglia da bulunur. Hipoksi-iskemi ve sonrasında yeniden-kanlanma/yeniden-oksijenlenme boyunca NOS enzimi artar. Damar duvarı tonusunu düzenlerken nörotoksik etkileri de olur. Mitokondriye giren kalsiyum iyonları diğer yandan serbest oksijen radikallerinin sentezini başlatır (42,43).

Açığa çıkan serbest radikaller ve NO çekirdekte DNA parçalanması aşamasında görevi olan kaspaz enzim sisteminin aktivasyonu ile biyokimyasal olayların apoptotik hücre ölümüne kadar ilerlemesine neden olur.

Bcl-2 protoonkogeni apoptozu başlatan biyolojik ve çevresel etkenlere karşı koruyucudur. Bcl-2'nin hücreleri apoptozdan koruma mekanizması, mitokondri zarını stabilize etmek, serbest radikallerin oluşmasını/etkilerini engellemek, çekirdeğe apoptoz düzenleyici moleküllerin seçici olarak girmesini önlemektir. Bu etkiler bax adı verilen bir proteinin bcl-2'ye bağlanmasıyla ortaya çıkar. Bcl-2'nin tersine hücre içinde yüksek miktarlarda bax proteini birikimi apoptozu başlatır. Bax proteini mitokondri zarında delikler oluşturarak sitokrom-c'nin mitokondriden kaçmasına, bu kaçışında proapoptotik kaspazları (kaspaz ailesi) aktive ederek

apoptozu başlatması şeklinde yapar. Böylece, Bcl-2'nin apoptozu engellemesi bax proteinini bağlayıp homodimer ve porlar oluşmasını önlemesiyle gerçekleşir. (43).

Apoptoza doğru giden patolojik süreci düzeltebilen çeşitli maddelerin deneysel modellerde oluşturulan perinatal hipoksik iskemik hasarın şiddetini kısmen azalttığı gösterilmiştir (9). BDNF, BFGF, IGF ve NGF'nin bu tür koruyucu etkileri hipoksik – iskemik beyin hasarı modellerinde bildirilmiştir (10–13)

İmmatür beyinde hipoksi-iskemiye yanıt olarak kaspaz sisteminin aktive olduğuna dair çeşitli kanıtlar vardır. Hipoksi-iskemiye yanıt olarak kaspaz-3, -8 ve -9 artmaktadır.

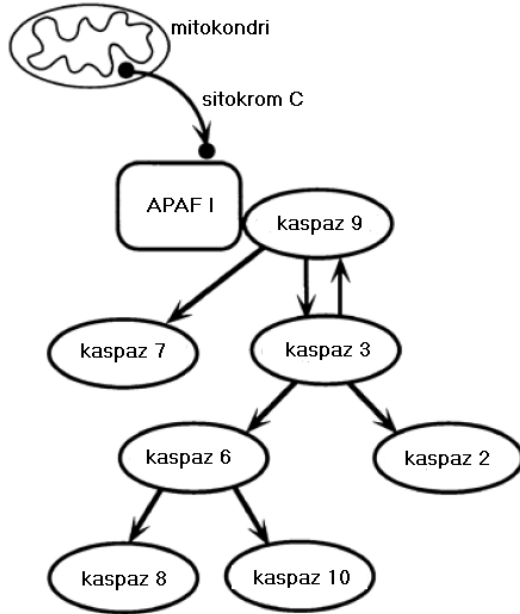
Programlı hücre ölümünün yürütülmesi, kaspazlar olarak adlandırılan sistemin proteaz ailesince koordine edilir. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir kaskada (şelale tarzı reaksiyon dizisi) neden olurlar. Bazıları (Kaspaz -2, -8, -9, -10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken bazıları da (Kaspaz-3, -6, -7) efektör kaspazlar olarak adlandırılır. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri (örneğin, hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nükleer membran proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan poli ADP-riboz polimeraz) parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. İnaktif (zimojen) formdaki kaspazlar kırılarak aktifleşirler ve dimerize olurlar. Kaspaz aktivasyonu (dimerizasyonu), ya hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, ya da kaspaz-9 bağlayıcı protein olan Apaf-1'in oligomerize olmak üzere indüklenmesi ile gerçekleşir(14–16).

Mitokondrinin aktivasyonuna yol açan en önemli faktör bcl-2 ailesidir. Hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri olan bu ailenin üyelerinin mitokondri üzerindeki etkileriyle, ya sitokrom-c'nin sitoplazmaya salınması gerçekleşir (apoptozun başlaması) veya sitokrom c'nin sitoplazmaya salınmaması baskılanır (apoptozun inhibisyonu). Kaspaz Aktivasyonunun başlaması için mitokondrinin devreye girmesi gereklidir. Apaf-1 latent sitozolik bir protein olup, mitokondri tarafından salınan sitokrom-c ile kompleks oluşturur. Bu da inaktif prekürsör haldeki kaspaz-9'u aktive eder(14–16).

Normal hücre mitokondrisinin dış membranında Bcl-2 proteini yer alır. Bcl-2, Apaf-1 proteininin bir molekülünü bağlar. Bcl-2 neden olduğu iç hasarla

mitokondride çatlaklar oluşturarak Apaf-1 ve Sitokrom-C salınımına yol açar. Bu iki protein kaspaz-9 moleküllerine bağlanır. Bu proteolitik aktivitenin kaskadı kan pıhtılaşması ve kompleman aktivasyonuna benzer. Terminal uç kaspaz-3'dür. Bu proteolitik aktivite ile sitoplazmada yapısal proteinlerin sindirimi, kromozomal DNA'nın parçalanması ve hücrenin fagositozu sağlanır(Şekil:1)(16).

Kaspaz-3 aktivitesinin ve dolayısıyla hipoksik- iskemik beyin hasarının geniş spektrumlu bir inhibitör ile veya endojen kaspaz inhibitörü XIap kullanılarak azaltılabildiği daha önce gösterilmiştir (15,18). Çalışmamızda, apoptozu, onun anahtar bileşenlerinden olan kaspaz – 3 enziminin boyasını kullanarak göstermeyi planladık.



ŞEKİL 1: Apoptozun başlamasını sağlayan kaspaz aktivasyonu

### 3.1 ERİTROPOİETİNİN HİE MODELİNDE APOPİTOZ ÜZERİNE ETKİSİ:

EPO, fetal gelişim sırasında insan beyinde EPO ve EPOr'nin sentezlendiği anlaşılan kadar, sadece hipoksiye yanıt olarak fetal hayatta karaciğer ve erişkin hayatta böbrekten salınarak eritropoiezisi uyaran bir sitokin – hormon olarak bilinmekteydi ve diyaliz uygulanan kronik böbrek hastalarında ve zamanından önce doğan bebeklerde anemiye düzeltmek için kullanılmaktaydı (45).

EPO, SSS'de fetal hayatın 5. haftasından sonra ortaya çıkmaktadır (19). EPO ve reseptörünün fetal hayatta bulunduğu ispatlandıktan sonra, astrositlerin hipoksiye yanıt olarak EPO ürettiği saptanmıştır. Astrositler, beyinde hipoksiye yanıt olarak Hipoksi etkileşimli faktör-1- $\alpha$  (Hif1- $\alpha$ ) üretmekte ve bu da EPO ekspresyonuna yol açmaktadır (46,47). Hipoksi yaşamış bebeklerin kord kanı ve amniotik sıvılarında fetal hipoksinin belirteçleri olarak intakt EPO'nun salgılandığı gösterilmiştir. (20,21). Hipoksik-iskemik beyin dokusunda gözlenen belirgin EPO ve EPOr üst - düzenlemesi, EPO'nun potansiyel endojen sinir hücresi koruyucu ajanlardan biri olduğunu düşündürmektedir (22).

EPO'nun, deneysel hipoksik-iskemik ensefalopati, mekanik incinme, inflamasyon ve kainat toksisitesi durumlarında sistemik olarak uygulandığında kan-beyin bariyerini geçerek SSS'de sinir hücresi koruyucu etki yaptığı gösterilmiştir. (48)

Global ve fokal serebral iskeminin erişkin hayvanlarda oluşturulan deneysel modellerde EPO tedavisinin sinir hücresi hasarını önlediği ve öğrenme deneylerinde öğrenme güçlüklerini azalttığı saptanmıştır (25,49).

HİE'li yenidoğan sıçanlarla yapılmış çalışmalarda EPO'nun in vivo koşullarda beyin hasarını önlediği, sayılan etkisini hipoksi-iskeminin başlattığı DNA parçalanmasını, yani apoptozu önleyerek sağladığı gösterilmiştir (23,24). Yine EPO'nun, primer sinir hücresi kültürlerinde N-Metil-D-Aspartat (NMDA) reseptörü aracılıklı glutamat toksisitesini ve NO ile indüklenen hücre ölümünü önlediği gösterilmiştir (25).

Hipoksi ve iskemi uygulanmış gerbil'lerde EPO'nun sinir hücresi koruyucu etki gösterdiği ve hayvanlara çözünmüş EPOr verildiğinde bu etkilerin geriye

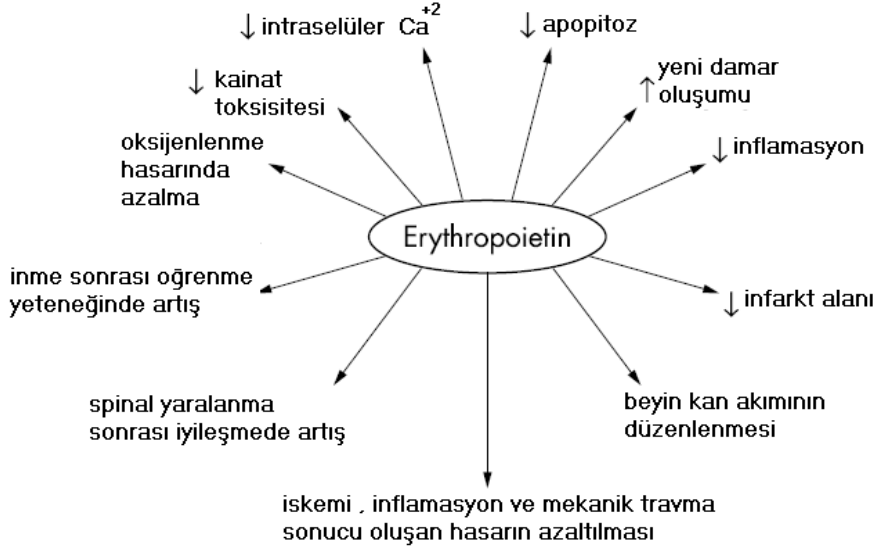
döndüğü gösterilmiştir (25). Deneysel olarak serebral iskemi-ensefalomyelit oluşturulan sıçanlarda verilen sistemik EPO tedavisinin, iskemik olayın zararlarından sorumlu tutulan inflamatuvar infiltratı azalttığı ve proinflamatuvar sitokinlerin yapımını azalttığı gösterilmiştir (50).

EPO, sayılan sinir hücresi koruyucu etkilerini iskemik olaydan 6 saat öncesinden, 6 saat sonrasına kadar verildiği dönem içinde gösterebilmektedir.(51) Bazı yazarlar ise EPO'nun sinir hücresi koruyucu etkinliğinin 3 güne kadar uzayabildiğini belirtmişlerdir (52,53).

EPO anti apopitotik etkilerini fosfatidilinozitol-3 fosfat'ı (PI3-K) aktive ederek başlatmaktadır. Daha sonrasında bir serin-threonin kinaz ailesi üyesi olan Akt sitokini aracılığı ile Bcl-2 ailesini ve XIap proteinini harekete geçirerek kaspazların inhibisyonuna neden olmakta ve apopitozu önlemektedir PI3-k ve Akt ile bcl2 ve XIap'ın aktivasyon yolu, aynı zamanda anti apopitotik özellikleri gösterilmiş olan IGF-1'in de kullandığı yoldur (52).

Nöronal hasarla ilgili değişik çalışmalardan elde edilen verilere dayanarak, EPO beyin dokusundaki etkilerini birkaç mekanizmanın birleşimiyle meydana getirmektedir(Şekil 2)(48):

1. Hücre yaşamının devamını sağlayan Jak-2 ve NF- $\kappa$ B sinyal kaskadlarını destekleyerek (apopitoz sinyallerini engelleyerek) (53-54)
2. Hücre içi kalsiyum düzeyini azaltarak (55)
3. Damar duvarı tonusunu düzenleyen NO üretimini değiştirerek (56)
4. Anti oksidatif mekanizmalar yolu ile yeniden-kanlanma fazı sonrasında oluşan hidroksil radikallerinin hücre zarına zarar vermesini engelleyerek (57)
5. Anti inflamatuvar etkileri yolu ile hasar alanında polimorfonükleer lökosit infiltrasyonunu ve inflamatuvar sitokinlerin düzeyini azaltarak (58)
6. Yeni damar oluşumunu destekleyerek (59,60)



Şekil 2: EPO'nun etkinliğini gösterdiği yerler

### 3.1.2 L- TİROKSİN'İN ETKİNLİĞİ

Tiroid hormonlarının başlıcaları olan Triiyodotironin (T<sub>3</sub>) ve L-Tiroksin (T<sub>4</sub>), yapılarında iyot bulunan biyolojik etkili bileşimlerdir. İnsan yavrusu ve tüm memelilerin farklılaşmaları için gerekli olan bu hormonlar aynı zamanda metabolik işlevleri düzenleyici olarak görev yaparlar.

Tiroid hormonlarının sentez aşamaları şu şekildedir:

1. Plazmadan inorganik iyodun tiroid hücrelerine taşınması
2. Tirozin bağlı tiroglobulin sentezi
3. Serbest iyodun iyodotirozine organifikasyonu, MIT (mono iyodo tirozin) ve DIT (di iyodo tirozin) oluşumu
4. MIT ve DIT'lerin birleşerek, iyodotironin, T<sub>3</sub> ve T<sub>4</sub>'ü oluşturması
5. Tiroglobulinin endositozu ve proteolizisi ile MIT, DIT, T<sub>3</sub> ve T<sub>4</sub> serbestlenmesi
6. İyodun tekrar kullanımı için tiroid hücrelerinde iyodotirozinlerin deiyodinizasyonu.

Tiroid bezi tarafından en fazla salgılanan hormon T<sub>4</sub>'tür, etkileri arasında termogenezin sağlanması, su ve iyon transportu, substrat döngüsünün hızlandırılması, aminoasit ve lipid metabolizması stimülasyonu sayılabilir. Erişkinde dolaşımdaki T<sub>4</sub>'ün tek kaynağı tiroid bezi iken, dolaşımdaki T<sub>3</sub>'ün %20'si tiroid



tarafından sekrete edilir, geri kalan T<sub>4</sub>'ün karaciğer, böbrek ve diğer çevre dokularda tip 1,5' deiodinaz ile deiyodinasyonu ile oluşur. Erişkinlerde T<sub>3</sub>/ T<sub>4</sub> oranı 1/50'dir. T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>'den hemen dört misli daha fazla etkilidir fakat tiroksine oranla çok daha ufak miktarda bulunur ve çok daha kısa ömürlüdür (61).

Deiyodinasyon iyodotirozinlerin ana metabolizma yoludur. Tiroksinin dış halka deiyodinasyon ürünü hücrel nükleer reseptörlerin ilgisinin yüksek olduğu aktif tiroid hormonu olan T<sub>3</sub>'dür. Tiroksinin iç halka mono deiyodinasyonu yolu ile inaktif bir metabolit olan r T<sub>3</sub> üretilir.

T<sub>3</sub> ve r T<sub>3</sub>, hızlıca tironin'in hiçbir biyolojik aktivitesi olmayan diiyodo, mono iyodo ve iyotsuz formlarına dönüştürülerek metabolize edilir.

Kandaki T<sub>3</sub> ve T<sub>4</sub>; TBG, tiroksin bağlayıcı prealbumin (transtiretin) ve albümin gibi proteinlerle ilişki içindedir. T<sub>3</sub> ve T<sub>4</sub>'ün primer taşıyıcı proteini TBG'dir; total T<sub>4</sub>'ün % 70'i, T<sub>3</sub>'ün % 40-60'ı TBG'e bağlanır. Geriye kalan serbest T<sub>4</sub> tiroksin bağlayıcı prealbumin ve albümin ile taşınır. T<sub>3</sub> tiroksin bağlayan globülin ve albümine bağlanır fakat tiroksin bağlayan prealbumine bağlanamaz. (61-63).

TBG, tiroksin bağlayıcı prealbumin ve albümin karaciğerde sentezlenir ve gebeliğin son haftalarında sentez miktarlarında artış olur. Hepatik TBG üretimi, östrojen tarafından artırılır. Gebeliğin son dönemlerinde östrojen artışına paralel olarak gebeliğin ortasından 34 – 35. haftalara kadar T<sub>4</sub> yoğunluğunda artış saptanır. Bununla beraber fT<sub>4</sub> düzeyinde de artış görülür. T<sub>3</sub> düzeyi de 30. gebelik haftasından önce ölçülemeyecek düzeyde iken zamanında doğan fetüste 50 ng/dl olacak şekilde artar, f T<sub>3</sub> düzeyi de buna eşlik eder. (64).

Plazma proteinlerinin tiroksine olan ilgisi T<sub>3</sub>'e olandan 10 misli daha fazladır. T<sub>4</sub>'ün ancak %0,1 kadarı kanda serbest şekilde iken T<sub>3</sub>'ün %1 kadarı serbest şekilde bulunur(63).

Yenidoğan, bebeklik ve çocukluk döneminde tiroid hormonunun etkisi büyümenin ve değişik dokuların gelişiminin uyarılmasıdır, tiroid hormonu özellikle beyin ve iskelet gelişimi üzerinde büyük rol oynar. Yenidoğan döneminde tiroid bezi disfonksiyonunun ve hipotiroidizmin etkileri klinikte çok iyi bilinmektedir. Maternal T<sub>4</sub> plasenta yoluyla fetüse geçer ve fetal gelişimde rol oynar. Hipotiroidili anne bebeği nörolojik hasar açısından risklidir ve fetüsü doğuma kadar maternal T<sub>4</sub> ile korunabilir (63). Bu bebeklerde serum TSH düzeyi yüksektir, kemik gelişiminde 3-6

haftalık gerileme saptanır. Arka fontanel geniştir, yenidoğanın fizyolojik hiperbilirubinemişi belirgin ve uzamıştır. Yenidoğanlarda tedavisiz bırakılan hipotiroidi kalıcı nörolojik ve entelektüel bozukluklara neden olmaktadır (26)

### **3.2.2. SİNİRSEL APOPİTOZ VE TİROİD HORMONU İLİŞKİSİ; IGF SİSTEMİNİN SİNİRSEL APOPİTOZDAKİ ROLÜ**

Güncel çalışmalarda, doğumsal hipotiroidi koşullarını taklit eden hayvan modellerinde, PTU verilerek hipotiroid durumda bırakılan sıçanların neokorteks bölgelerinde glia ve nöral yapıların azaldığı, T<sub>4</sub> tedavisi verilen grupta bu değişikliklerin oluşmadığı gösterilmiştir (68). Yine PTU verilerek hipotiroid yapılan sıçanların, hipokampal CA 1 sinir hücrelerinde normal sıçanlara göre sinaptik ileti gecikmesi gözlemlendiği bulgulanmıştır Hipotiroidizmde gözlenen öğrenme güçlüklerinin nedenlerinden biri bu değişikliklerle açıklanabilmektedir (69).

Reelin ve dab gibi, nöral göç ve tabakalanmayı kontrol eden genlerin ekspresyonu tiroid hormonuna bağımlıdır. Hipotiroid sıçanların 1,5 ve 6. korteks tabakalarında, özellikle hipokampus ve beyincik granüler sinir hücrelerinde reelin RNA ve proteinini daha az eksprese ettiği gösterilmiştir. Tiroid hormonu tedavisi sonrası, yine reelin geni ürünleri olan reelin RNA ve proteininin arttığı gösterilmiştir (70).

Erken beyin gelişimi döneminde doğumsal hipotiroidi koşullarını taklit eden hayvan modellerinde, PTU verilerek hipotiroid durumda bırakılan yenidoğan sıçanların hipokampus bölgesindeki sinir hücrelerinde apoptozun fT<sub>4</sub> ve fT<sub>3</sub> düzeyleri ile ters orantılı olarak arttığı saptanmıştır. Tiroid hormonlarının apoptozu engellediği, hipotiroidizmin ise anti- apoptotik bcl-2 gen ürünlerini azalttığı, pro – apoptotik bax gen ürünlerini ise yüksek düzeylerde tutarak nöronal apoptozu yol açtığı gösterilmiştir (71).

IGF-1'in beyin gelişiminde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Anne karnından başlayarak, IGF-1, IGF-II, tip IIGF reseptör (Hücre zarı tirozin kinaz reseptörü) ve IGF bağlayıcı proteinler SSS'nde eksprese edilmektedir. Beyin gelişimi boyunca IGF sistem proteinlerinin ekspresyon paternleri gelişimsel olarak sinir hücre

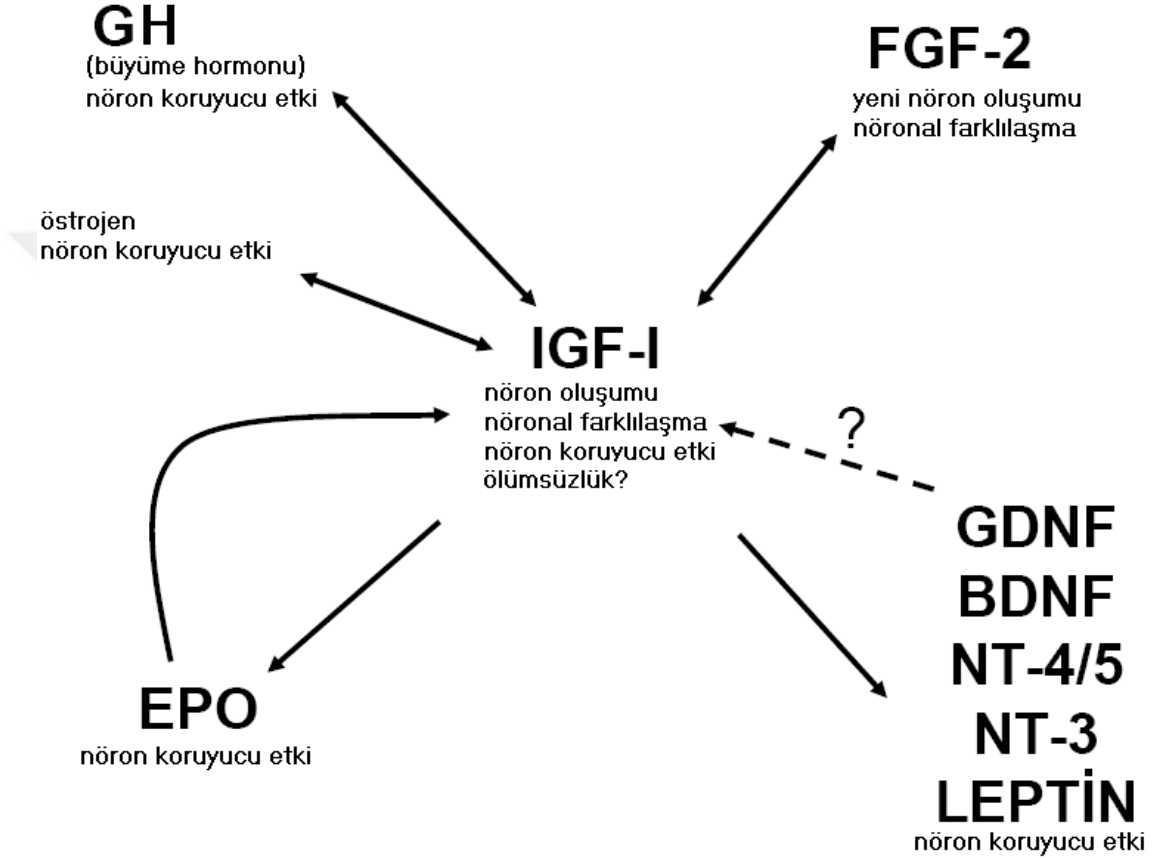
topluluklarına zamanlanmış özellikli IGF etkinliklerinin olduğunu düşündürmektedir(72).

IGF-I ekspresyonu büyük çoğunlukta sinir hücrelerinde gerçekleşmekte ve çoğu beyin bölgesinde sinir hücresi öncüllerinin gelişimi ve/veya sinir hücresi büyümesinin olduğu zamanlarla pik düzeyine ulaşmaktadır. Buna karşın, IGF-II ekspresyonu mezenşimal ve nöral krista hücrelerinde olmaktadır. IGF-II reseptör ekspresyonunun rolü henüz anlaşılamamakla birlikte IGF bağlayıcı proteinlerin ekspresyonu beyin bölgelerine ve gelişimine özgüdür ve genellikle IGF piklerini izlemektedir. IGF'nin in vitro koşullarda sinir hücresi öncüllerinin gelişimini sağladığı ve oligodendrositler ve sinir hücrelerinin yaşamını devam ettirmesini sağladığı gösterilmiştir. IGF-1'i normalden fazla eksprese eden transgenik farelerin beyin ağırlıkları %25–80 oranında daha fazla bulunmuştur. Buna karşın, IGF inhibitörü olan IGFBP1'i fazla eksprese eden transgenik farede postnatal beyin büyümesinde gerilik gözlenmiştir, Bu bulgulardan IGF-1'in beyin gelişiminde etkinlik gösterdiği, serebral korteks ve beyinciğin IGF–1 etkinliğine özellikle duyarlı olduğu sonucu çıkarılmıştır. Bu bulgular, tiroid hormonunun beyindeki etkilerinin IGF-I aracılığı ile yürütüldüğünü düşündürmektedir (72).

Hipotiroidizmin gelişmemiş sıçan beyinde IGF sentezini azalttığı gösterilmiştir(73). IGF-I, hipoksi ve iskemiye maruz kalan beyin dokusunda ise olası bir anti-apoptotik ajan gibi davranmaktadır. IGF-I hipokampus ve kortikal sinir hücrelerinde NMDA ve NO ilişkili apoptozu engellemektedir, in vitro koşullarda IGF-I'in hipokampal ve hipotalamik sinir hücrelerinin sağ kalımını artırdığı gösterilmiştir(74).

Beyindeki EPO ekspresyonunun astrositlerden salınan Hif1- $\alpha$  aracılığı ile gerçekleştiği bilinmektedir. Hipoksik koşullarda hücre kültüründe yapılan araştırmalar, IGF–1 aracılıklı hücre sağ kalımı ile hücrelerden salınan Hif1- $\alpha$  düzeyi arasında doğru orantılı bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur (74). Sıçan paryetal korteks sinir hücrelerinin Hif1- $\alpha$  transkripsiyonu ile IGF–1 düzeyleri arasında gösterilen ilişki, IGF-1'in beyindeki bazı etkilerini Hif1- $\alpha$  aracılığı ile gösterebileceğini düşündürmüştür (74). IGF'nin astrositlerde EPO ekspresyonuna neden olduğu da gösterilmiş, bu bilgiden yola çıkılarak EPO ve IGF-1'in akut nöronal hasardan sonra sinir hücresi koruyucu olarak birlikte kullanıldığı bir güncel

bir araştırma da yayınlanmıştır (52). IGF, sadece EPO ekspresyonuyla değil, aynı zamanda JAK–2 yolunu kullanan büyüme hormonu (GH), leptin, östrojen, fibroblast büyüme faktörü, glia kaynaklı sinir büyüme faktörü (GDNF), BDNF, nörotrofin 3,4 ve5 (NT 3.4.5) ekspresyonu ile de sinir hücresi koruyucu ve nöronal farklılaştırıcı etkilere aracılık etmektedir (Şekil 3)(74).



ŞEKİL 3: IGF ilişkili eksprese edilen nöron koruyucu sitokin ve hormonlar

Tiroid hormonunun in vitro hipoksi koşullarında fakat hipoksiden bağımsız olarak EPO yapımını artırdığı bilinmektedir (27).

#### 4.1. HİE ve tiroid hormonu ilişkisi.

Kronik hipoksiye maruz bırakılan sıçanlarda serbest T<sub>4</sub> düzeylerinin anlamlı derecede düştüğü gösterilmiştir (28). Perinatal asfiksinin TSH ve tiroid hormon düzeyleri üzerindeki etkisi üzerine yapılmış güncel bir vaka – kontrol çalışmasında, perinatal asfiksi yaşamış yenidoğanlarda T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub> ve fT<sub>4</sub> düzeylerinin

normal yenidoğanlara göre anlamlı derecede düşük olduğu gösterilmiştir. Daha da önemlisi, asfiksiye maruz kalan bebeklerde serbest T<sub>4</sub> düzeyi ile mortalite arasında ilişki gösterilmiştir (29).

Tiroid hormonunun beyin dokusunun gelişimindeki önemi bilinmekle birlikte, hipoksi koşullarında tiroid hormon aksının baskılanması daha güncel bir bilgidir. Beyin gelişiminde tiroid hormonunun geliştirici etkisine ek olarak NGF ekspresyonu ve anti apoptotik bcl-2 ekspresyonunu desteklemesi, tiroid hormon eksikliğinde ise serebellar granüler sinir hücrelerinde yaygın apoptoza yol açabilen Bax gibi proapoptotik moleküllerin ekspresyonunda artış olması, tiroid hormonunun programlı hücre ölümü yolu ile de SSS gelişiminde rolü olduğunu düşündürmektedir (30,31). Kronik gestasyonel hipoksiye maruz bırakılan anne sıçanların yavrularının SSS'nde sinir hücreleri tarafından glukoz kullanımını düzenleyen glukoz transporter reseptörü 3 ve 4 (GluT<sub>3</sub>, GluT<sub>4</sub>) ile birlikte tiroid hormon reseptörü sentezinin de arttığı gösterilmiştir, bu verinin gelişimini devam ettirebilmek için beyin tarafından üretilen bir alternatif olup olmadığı henüz bilinmemektedir (32).

Hem hipoksi sürecinde eksikliği gösterilen, hem de eksikliğinde hipoksi sürecindeki gibi nöronal apoptoza yol açan tiroid hormonu, henüz deneysel de olsa hipoksi iskemide kullanılmamıştır. Salt ön beyin iskemisi modelinde tiroksinin etkinliğini araştıran bir çalışmada, iskemiden etkilenen hipokampus CA1 piramidal sinir hücrelerinin, tek doz bolus tiroksin tedavisi ile kurtarılamadığı, ancak tekrar eden günler içinde verilen tiroksin ile nöronal hasarın azaltıldığı bildirilmiştir(75).

## **GEREÇ ve YÖNTEM**

### **Deney Hayvanları**

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma Bölümünde yetiştirilen 7 günlük 6 yavru Sprague-Dawley sıçan EPO çalışma grubu, 6 yavru Sprague-Dawley sıçan EPO+ T<sub>4</sub> çalışma grubu, 6 yavru sıçan T<sub>4</sub> çalışma grubu, 6 yavru sıçan ise kontrol grubu olarak kullanıldı. Çalışmada Levine'in tarif ettiği hipoksi-iskemi modelinin değiştirilmiş biçimi uygulandı (62,63).

### **Hipoksik-iskemik ensefalopati modelinin oluşturulması**

Eter ile yapılan genel anestezi altında, boyunda orta çizgide kesi sonrası deney hayvanlarının sol karotis arterleri ortaya çıkarıldı ve komşu yapılardan ayrıldı. Naylon ipek (5.0) ile iki kez sıkıca bağlandı. Bu işlem hiçbir zaman 3 dakikayı aşmadı. İşlem sırasında kanama gelişen veya anesteziye bağlı olarak solunumu duran sıçanlar çalışmadan çıkarıldı. Kesi yeri eter anestezi altında iken dikildikten sonra sıçanlar 15 dakika süreyle iyileşme dönemine bırakıldı. Bu sürenin sonunda % 8 oksijen ve % 92 azot karışımını soluyacakları 400 ml hacimde cam kaplara konulan hayvanlar 1 saat süreyle bu ortamda tutuldu. Bu süre içinde hipotermiye girmeleri önlendi.

### **EPO ve tiroksin Enjeksiyonu**

Hipoksi uygulamasının hemen ardından kısa süreli eter anestezi altında bağlı olan sol karotis arter açılarak iskemi işlemine son verildi. Derhal EPO grubuna daha önceden hazırlanmış EPO 1000 u/kg dozunda periton içine (i.p.), EPO+ T<sub>4</sub> grubuna EPO 1000 u/kg ve L-tiroksin 3,6 mcg/100 g dozunda i.p. , T<sub>4</sub> grubuna ise L-tiroksin 3,6 mcg/100 g dozunda PPD enjektörleri ile enjekte edildi. Uygulanan miktar hiçbir zaman 0,1 ml'yi geçmedi. EPO'nun sistemik dolaşımdan kan beyin bariyerine geçtiğinin gösterilmesi ve HİE modellerinde tek doz kullanılmasının

apopitozu önlediği rapor edildiği için tek doz bolus i.p. enjeksiyon 1000 u/kg dozu yeterli görüldü. (23–25.51.76) Kullanılan T<sub>4</sub> dozu, hipotiroid durumdaki neonatal sıçanların ötiroid olmasına yetecek dozda seçildi, yine başka bir çalışmada gösterilen, tiroidektomize edilmiş sıçanların IGF ve IGFP salgılamasını restore edecek doz olan 3 mcg/100 g dozuna da çok yakındı. (77,78). T<sub>4</sub> verilen hayvanlarda enjekte edilen sıvı hacmi 0,2 ml'yi geçmedi. Benzer koşullarda kontrol grubu sıçanlara ise aynı hacimde serum fizyolojik verildi. Enjeksiyon işleminden sonra bütün deney hayvanları annelerinin yanına konuldu. Sıçanlar nöbet ve solunum depresyonu yönünden izlendi. EPO grubundaki sıçan yavrularına bolus verilen EPO dozundan sonra ek doz EPO verilmedi. T<sub>4</sub> ve EPO+T<sub>4</sub> grubundaki sıçan yavrularına dekapite edilene kadar 7 gün boyunca her gün aynı saatte günlük 3,6 mcg/100 g dozunda L-Tiroksin i.p. uygulandı. Normalde EPO ve L-Tiroksinin kan beyin bariyerini geçerek beyin omurilik sıvısında yeterli düzey oluşturduğu gösterildiğinden ve asfiksi sonrası tedavilerin intravenöz verilmesi gerçeğine uyabileceği için çalışmada EPO ve L- Tiroksinin bolus şeklinde periton içine verilmesi uygun görüldü

### **Histopatolojik değerlendirme için dokunun hazırlanması**

Modelin oluşturulmasının ardından postnatal 14, hasarın oluşturulmasından 7 gün sonra hayvanların tümü eter anestezisi altında öldürüldü ve beyinleri çıkarıldı.

#### **a) Histolojik kesitlerin hazırlanması, boyanması ve değerlendirme işlemleri:**

**Histolojik kesitlerin hazırlanması, boyanması ve değerlendirme işlemleri:** Çıkarılan beyinler % 10 formalin ile fikse edildi ve doku takip işlemlerinden geçirildikten sonra parafin bloklara gömüldü. Leica marka mikrotom ile 5 um kalınlığında koronal kesitleri alınarak H&E ve Cresyl Fast Violet (CFV) ile boyandı (79). Sinir hücrelerindeki iskemi H&E ile ve Nissl miktarı Cresyl Fast (CFV) ile boyanan kesitlerde Kluever-Barrera'ya göre değerlendirildi (80).

**H&E ile boyanmış kesitlerde, nöronal iskeminin kıstasları olarak;** hücre büzüşmesi, nükleer piknozis, sitoplazmik eosinofili ve sitolojik deformite ele alındı.

Chan ve arkadaşları tarafından kullanılan histolojik değerlendirme metodundan yararlandı (79). Etkilenen alandaki nöronal hasarın yüzdesi, nöronal hasarın tipine göre sınıflandırıldı. İskemik beyin hasarının skorlanmasında karakteristik özelliklere bakıldı. Akut hasarda ödem ile şişmiş veya büzülmüş sinir hücreleri; geciken hasarda piknotik çekirdekli eosinofilik sitoplazmalı sinir hücreleri; nekrozda hematoksilen boyanma affinitesinde azalma ve kavitasyonda köpük hücreleriyle beraber kavitasyon olup olmadığına bakılarak skorlama yapıldı.

Akut hasar: 1,2, 3

Geciken hasar: 4, 5, 6

Nekroz: 7, 8, 9 ve

Kavitasyon: 10,11, 12 ölçütleri kullanıldı.

CFV ile boyanmış kesitlerde, nöronal morfolojilerin değerlendirmesinde (40X objektif ile) sitoplazmik büzüşme, vakuollerin oluşumu ve destruksiyon olmaksızın Nissl cisimciklerinin miktarına göre 3 grupta skorlandı;

**Grade 1:** intakt Nissl cisimcikleri içermeyenler,

**Grade 2:** sitoplazmanın çevresinde intakt Nissl cisimcikleriyle kromatolizis gösterenler,

**Grade 3:** Sitoplazmada bol miktarda Nissl içerenler.

Apopitotik hücrelerin gösterilmesi için seri alman parafin kesitlerine Caspase 3 Ab-4 (neoMarkers) immunohistokimya protokolü uygulandı. Apopitotik hücreler, 40 X objektif kullanılarak her kesitte 0.145 mm<sup>2</sup>'lik alanda ve her sıçanda.6 koronal beyin kesitinde 2 histolog tarafından sayıldı. (81,82). Bir mikroskobik görüntü alanı: S<sup>^</sup> J1.r2; r=0.09mm. S-3.1416 . (0.215)<sup>2</sup>; 8=0.145 mm<sup>2</sup> idi. Boyanan tüm kesitlerde bulgular, fotoğraf ataçmanlı Olympus marka mikroskop ile incelendi ve fotoğrafları çekildi.



### **b) Işık Mikroskopik Ölçümler ve Sayımlar:**

İncelemeler, koronal planda ve seri olarak alınmış beyin kesitleri Palkovits ve Brownstein ile Paxinos ve Watson sıçan beyin atlasları referans alınarak yapıldı (83,84). Tüm gruplara ait 36 sıçanın 8'er kesitinde hipokampus uzunlukları her iki hemisferde 4X objektif ile mikrometrik oküler (Olympus, Japan) yardımıyla ölçüldü. İskemik ve Apoptotik sinir hücresi sayımı ise 40X objektif ile bir görüntü alanında (0.145 mm<sup>2</sup>)'de hipokampus (CA 1–3) ve paryetal kortekste yapıldı. CFV ile boyanmış kesitlerde aynı objektif ile aynı bölgelerdeki sinir hücrelerinin Nissl miktarı skorlandı ve ortalamaları alındı

### **c) İstatistik Değerlendirmeler:**

İstatistik değerlendirme için Windows ortamında çalışan Sosyal bilimler için istatistik (SPSS) paket programının 11,5 sürümü kullanıldı. Kontrol ve tedavi gruplarındaki Hipokampus uzunluk ortalamaları, sayılan 100 hücre içinde iskemik ve apoptotik hücre skor ortalamaları ve sinir hücrelerinin Nissl skor ortalamaları, Kruskal-Wallis varyans analizi testleri kullanılarak karşılaştırıldı. Gruplar arasında anlamlı farklılık çıktığı durumlarda farklılığın hangi gruptan oluştuğunu anlayabilmek için Mann-Whitney-U testi uygulandı. Her testte, veri gruplarının ortalama ve standart sapması hesaplandı,  $p < 0,05$  anlamlı olarak kabul edildi.

## BULGULAR

Çalışmaya toplam 24 sıçan (Kontrol grubu:6, EPO grubu:6, T<sub>4</sub> grubu:6, EPO+ T<sub>4</sub> grubu:6) alındı. Kontrol, T<sub>4</sub>, EPO ve EPO+T<sub>4</sub> gruplarındaki sıçanların ortalama ağırlık ve standart sapmaları sırası ile: 8,0±1,0 gr, 7,3±1,0 gr, 9,3±1,5 gr ve 9,4±0,9 gr. idi. Çalışmaya alınan hayvanların hiçbiri ölmedi ve nöbet geçirmedi.

Tüm gruplarda morfometrik değerlendirmeler, Paxinos ve Watson'un sıçan stereotaksik beyin atlasındaki koordinatlar üzerinde Bregma -2.80 ile -4.80 arasında gösterildi (84). Tek taraflı ventrikül dilatasyonu kontrol grubunda 2 sıçanda, T<sub>4</sub> grubunda 4 sıçanda, EPO grubunda 1 sıçanda ve EPO+T<sub>4</sub> grubunda 1 sıçanda gözlemlendi. Gruplar arasında anlamlı farklılık yoktu (Çizelge II).

ÇİZELGE II: Gruplar arasında tek taraflı lateral ventrikül dilatasyonu gözlenen sıçan sayısı

Tek Taraflı Dilatasyon	Gruplar				
	Kontrol	EPO	T <sub>4</sub>	EPO+ T <sub>4</sub>	Toplam*
Var	2	1	4	1	8
Yok	4	5	2	5	16
Toplam	6	6	6	6	24

\* $\chi^2$ :4,50, p=0,21

H&E ve CFV ile boyanan kesitlerde vasküler dilatasyon ve kanama bölgeleri gözlemlendi (Resim 1a, d; 2a; 4a). Tek taraflı vasküler dilatasyon ve kanama kontrol grubunda 6 sıçanda, T<sub>4</sub> grubunda 6 sıçanda, EPO+ T<sub>4</sub> grubunda 2 sıçanda gözlemlendi. EPO grubunda tek taraflı vasküler dilatasyon ve kanama gözlenmedi. Tüm gruptaki vasküler dilatasyon farkı kontrole göre istatistiksel olarak anlamlıydı, farkı yaratan ise sadece EPO grubuydu. Hiçbir sıçanda çift taraflı vasküler dilatasyon ve kanama gözlenmedi (Çizelge III).

ÇİZELGE III: Gruplar arasında vasküler dilatasyon ve kanama gözlenen sıçan sayısı

Vasküler dilatasyon ve kanama	Gruplar				
	Kontrol	EPO*	T <sub>4</sub>	EPO+ T <sub>4</sub>	Toplam
Var	6	0	6	2	14
Yok	0	6	0	4	10
Toplam	6	6	6	6	24

\* $\chi^2$ .18, p=0,0006

Tedavi gruplarına göre hipokampus uzunlukları ortalamaları farkı Kruskal Wallis testi kullanılarak değerlendirildi. Tüm tedavi gruplarının hipokampus uzunlukları ortalamaları kontrol grubuna göre anlamlı derecede büyüktü. Sol hipokampus uzunluk farkı T<sub>4</sub> ve EPO+ T<sub>4</sub> alan grup arasında anlamlı değildi (Çizelge IV). Tüm gruplarda sol hipokampus boyutu sağa göre daha kısaydı, çünkü sıçanların sol karotis arterleri bağlanmıştı (Şekil 4).

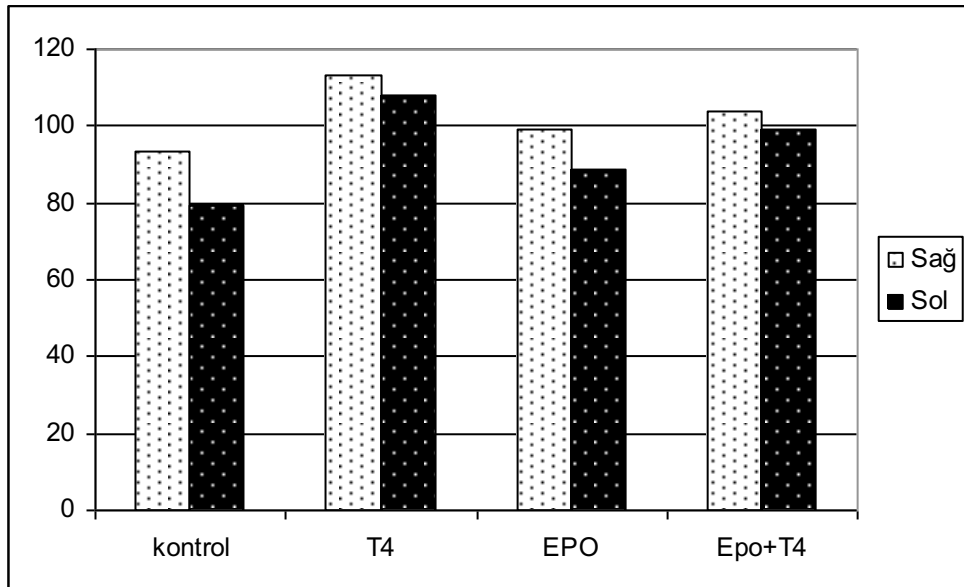
ÇİZELGE IV: Sağ ve sol Hipokampus uzunluk ortalamalarının tedavi gruplarına göre dağılımı.

Bölge	Kontrol		T <sub>4</sub>		EPO		EPO+ T <sub>4</sub>		P*
	ORT	SS	ORT	SS	ORT	SS	ORT	SS	
Sağ	93,2879	11,49	113,2530	18,71	99,3784	8,52	103,6829	7,37	0,000(a)
Sol	79,3788	7,34	107,7590	21,11	88,7973	5,42	99,0732	5,83	0,000(b)

\*Kruskal-Wallis varyans analizi. Sayısal sonuçlar birim cinsinden ifade edilmiştir. 1 birim=0,025 mm

(a): Tüm gruplar arasında anlamlı fark vardır.

(b): T<sub>4</sub> grubu ile EPO+ T<sub>4</sub> grubu arasında anlamlı fark yoktur, diğer bütün gruplar arasında anlamlı fark vardır.



Şekil 4: Tedavi Gruplarına göre Hipokampus uzunlukları

Hematoksilen-Eosin boyası ile boyanan kesitlerde hipokampusta ve serebral (pariyetal) kortekste iskemik sinir hücreleri büzülmüş biçimde izlendi; iskemik sinir hücreleri, hematoksisilen ile boyanma affinitesinde azalma ile beraber asidofilik sitoplazmaya ve piknotik çekirdeğe sahipti (Resim 1a, 1d).

Hematoksilen-Eosin boyası ile sol hemisfer beyin bölgelerinde gözlenen nekrotik hücre ortalaması yüzdeleri arasındaki fark Kruskal Wallis testi ile hesaplandı. CA1 bölgesinde nekrotik hücre ortalaması yüzdeleri farkı, tedavi grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı değildi, CA2 ve pariyetal korteks bölgelerinde T<sub>4</sub> ile kontrol grubu dışında tüm tedavi gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşüktü, yani T<sub>4</sub> dışındaki tedavi gruplarında nekroza giden hücre sayısı azalmıştı. CA3 bölgesinde ise sadece T<sub>4</sub> ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık saptandı (Çizelge V).

ÇİZELGE V: Hematoksisilen ve Eosin ile boyanan sol hemisfer bölgesi nekrotik hücre ortalamalarının tedavi gruplarına göre dağılımları

Bölge	Kontrol		T <sub>4</sub>		EPO		EPO+ T <sub>4</sub>		P*
	ORT	SS	ORT	SS	ORT	SS	ORT	SS	
(Sol)									
CA1	3,46	0,98	3,22	0,93	2,98	0,45	2,77	0,81	0,134(a)
CA2	3,47	1,06	3,42	0,97	2,80	0,46	2,63	0,78	0,007(b)
CA3	3,08	0,87	2,51	0,71	2,75	0,53	2,49	0,79	0,057(c)
Pariyetal korteks	3,87	0,94	4,13	0,85	2,87	0,52	3,04	0,98	0,000(d)

\*Kruskal-Wallis varyans analizi

(a) Gruplar arasındaki fark anlamlı değildir.

(b) Kontrol grubu ile T<sub>4</sub> grubu arasında anlamlı fark yoktur, EPO ve EPO+ T<sub>4</sub> grupları arasında anlamlı fark yoktur.

(c) Kontrol grubu ile T<sub>4</sub> grubu arasındaki fark anlamlıdır (p=0,015, Mann-Whitney-U test), diğer gruplar arasındaki farklar anlamlı değildir.

(d) Kontrol grubu ile T<sub>4</sub> grubu arasında anlamlı fark yoktur, EPO ve EPO+ T<sub>4</sub> grupları arasında anlamlı fark yoktur.

Hematoksilen-Eosin boyası ile sağ hemisfer beyin bölgelerinde gözlenen nekrotik hücre ortalaması yüzdeleri arasındaki fark Kruskal Wallis testi ile hesaplandı. CA1 bölgesinde nekrotik hücre ortalaması yüzdeleri farkı, T<sub>4</sub> grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı derecede farklıydı, diğer bölgelerde T<sub>4</sub> grubu ile Kontrol grubu hücre nekroz ortalama yüzdeleri farkı anlamlı değildi. Yine EPO ve EPO+ T<sub>4</sub> grubu arasında hiçbir bölgede anlamlı bir fark saptanmadı. EPO ve EPO+ T<sub>4</sub> tedavi grubundaki sıçanların nekroz ortalama yüzdeleri kontrole göre anlamlı derecede düşüktü (Çizelge VI),(Şekil 5).

ÇİZELGE VI: Hematoksilen ve Eosin ile boyanan sağ hemisfer bölgesi nekrotik hücre ortalamalarının tedavi gruplarına göre dağılımları

Bölge (Sağ)	Kontrol		T <sub>4</sub>		EPO		EPO+ T <sub>4</sub>		P*
	ORT	SS	ORT	SS	ORT	SS	ORT	SS	
CA1	3,24	0,82	3,73	0,99	2,92	0,45	2,80	0,79	0,003(a)
CA2	3,51	0,77	3,62	0,73	2,65	0,46	2,64	0,99	0,000(b)
CA3	3,36	0,93	3,02	0,87	2,73	0,56	2,55	0,81	0,037(c)
Paryetal korteks	4,17	0,73	3,99	0,77	2,68	0,52	2,71	0,90	0,000(d)

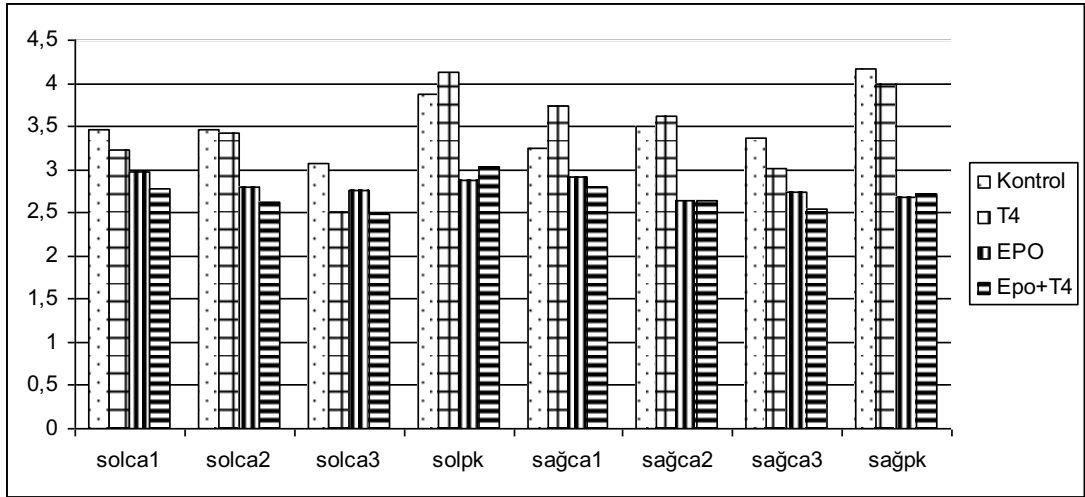
\*Kruskal-Wallis varyans analizi

(a) Kontrol grubu ile T<sub>4</sub> grubu arasındaki fark anlamlıdır (p=0,049), kontrol grubuyla diğer gruplar arasındaki farklar anlamlı değildir.

(b) Kontrol grubu ile T<sub>4</sub> grubu arasında anlamlı fark yoktur, EPO ve EPO+ T<sub>4</sub> grupları arasında anlamlı fark yoktur.

(c) Kontrol grubu ile T<sub>4</sub> grubu arasında anlamlı fark yoktur. EPO ve EPO+ T<sub>4</sub> grupları arasında anlamlı fark yoktur. EPO ve EPO+ T<sub>4</sub> grubu ile kontrol grubu arasındaki fark anlamlıdır.

(d) Kontrol grubu ile T<sub>4</sub> grubu arasında anlamlı fark yoktur, EPO ve EPO+ T<sub>4</sub> grupları arasında anlamlı fark yoktur.



Şekil 5: Hematoksilen-Eosin ile boyanan kesitlerde tedavi gruplarına göre hücre nekrozu yüzde değerleri.

Ayrıca, tiroksin'in CA3 bölgesinde her iki hemisferde CA3 bölgesinde T<sub>4</sub> ve kontrol grubu arasındaki fark da incelenmiştir, T<sub>4</sub> grubu CA3 bölgesi için ortalaması 2,76±0,62, Kontrol grubu CA3 bölgesi için ortalaması 3,22±0,76 bulunmuştur, fark anlamlıdır.(P=0,03, Mann-Whitney-U test.)

CFV ile boyanma metodu ile aynı beyin bölgelerindeki sinir hücreleri, Nissl içeriğine göre skorlandı. Hipoksi kontrol ve tedavi gruplarındaki sinir hücreleri arasındaki farklılık şöyleydi: İskemik sinir hücrelerinin sitoplazması, daha düşük Nissl skorlarına sahipti ve dendritler daha kısalmış ve parçalanmıştı (Resim 1b, 1e). Buna karşın, normal morfolojiye yakın sinir hücreleri, Nissl (+) boyanmış uzun dendritlere sahipti ve tedavi gruplarında rastlandı (Resim-2b, 2e; 3b; 4b).

Sol hemisfer beyin bölgelerinde gözlenen Nissl skoru CA2 bölgesinde EPO ile kontrol grubu dışında tüm tedavi gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti, yani nöronal bütünlük korunuyordu. Hiçbir bölgede T<sub>4</sub> grubu ile EPO+ T<sub>4</sub> arasında Nissl skoru açısından anlamlı fark yoktu. CA1 bölgesinde EPO ve T<sub>4</sub> grupları arasında Nissl skoru açısından fark anlamlı değildi (Çizelge VII).

ÇİZELGE VII: CFV ile boyanan sol hemisfer bölgesi Nissl ortalamaları

Bölge	Kontrol		T <sub>4</sub>		EPO		EPO+ T <sub>4</sub>		P*
	ORT	SS	ORT	SS	ORT	SS	ORT	SS	
(Sol)									
CA1	1,61	0,07	2,01	0,29	1,89	0,21	2,28	0,09	0,002(a)
CA2	1,80	0,22	2,30	0,20	1,83	0,04	2,35	0,10	0,001(b)
CA3	2,04	0,10	2,53	0,27	2,13	0,13	2,52	0,16	0,002(c)
Paryetal korteks	1,69	0,14	2,32	0,03	2,12	0,25	2,38	0,04	0,001(d)

\*Kruskal-Wallis varyans analizi

(a): Bütün tedavi gruplarının Nissl skorları kontrol grubuna göre anlamlıdır. EPO ve EPO+ T<sub>4</sub> arasındaki fark anlamlıdır.

(b) EPO ve kontrol arasındaki fark anlamlı değildir, T<sub>4</sub> ve EPO+ T<sub>4</sub> arasındaki fark dışında diğer bütün gruplar arasındaki fark birbirine göre anlamlıdır.

(c,d) Bütün tedavi gruplarının Nissl skorları kontrol grubuna göre anlamlıdır. T<sub>4</sub> ve EPO+ T<sub>4</sub> arasındaki fark dışında diğer bütün gruplar arasındaki fark birbirine göre anlamlıdır.

Sağ hemisfer beyin bölgelerinde gözlenen Nissl skoru CA2 bölgesinde EPO ile kontrol grubu dışında tüm tedavi gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti, yani nöronal bütünlük korunuyordu. Hiçbir bölgede T<sub>4</sub> grubu ile EPO+ T<sub>4</sub> arasında Nissl skoru açısından anlamlı fark yoktu. CA1 ve CA2 bölgesinde EPO ve T<sub>4</sub> grupları arasında Nissl skoru açısından fark anlamlı değildi (Çizelge VIII),(Şekil 6).

ÇİZELGE VIII: CFV ile boyanan sağ hemisfer bölgesi Nissl ortalamaları

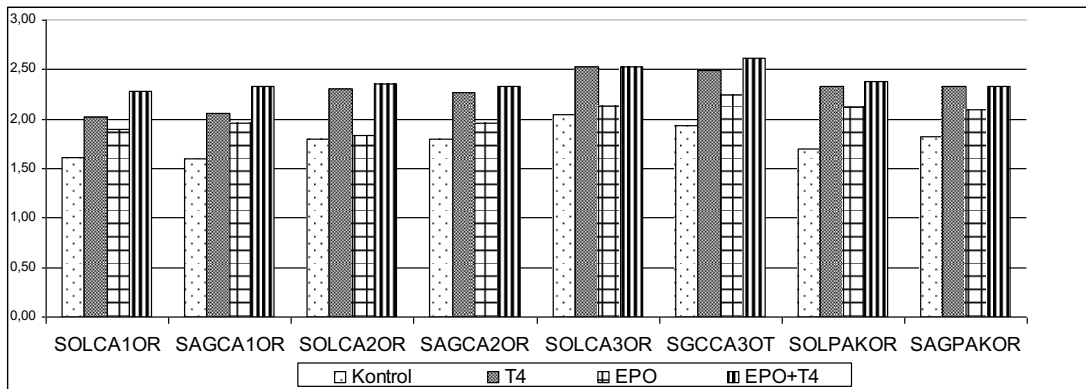
Bölge	Kontrol		T <sub>4</sub>		EPO		EPO+ T <sub>4</sub>		P*
	ORT	SS	ORT	SS	ORT	SS	ORT	SS	
(Sağ)									
CA1	1,59	0,06	2,05	0,30	1,95	0,22	2,33	0,08	0,001(a)
CA2	1,79	0,16	2,26	0,28	1,96	0,16	2,32	0,10	0,003(b)
CA3	1,93	0,18	2,49	0,21	2,24	0,08	2,61	0,15	0,000(c)
Paryetal korteks	1,82	0,12	2,33	0,09	2,10	0,18	2,32	0,13	0,001(d)

\*Kruskal-Wallis varyans analizi

(a) Bütün tedavi gruplarının Nissl skorları kontrol grubuna göre anlamlıdır. EPO ve EPO+ T<sub>4</sub> arasındaki fark anlamlıdır.

(b) Bütün tedavi gruplarının Nissl skorları kontrol grubuna göre anlamlıdır. Tedavi grupları arasında anlamlı fark yoktur.

(c,d) Bütün tedavi gruplarının Nissl skorları kontrol grubuna göre anlamlıdır. T<sub>4</sub> ve EPO+ T<sub>4</sub> arasındaki fark dışında diğer bütün gruplar arasındaki fark birbirine göre anlamlıdır.



Şekil 6: Tedavi Gruplarına göre Nissl ortalaması



Apoptoz kiti Kaspaz 3 ile (+) boyanmış hücrelerde tipik DNA hasarı saptandı (Resim 1c, 1f). Apoptotik hücre sayımında bu bölgelerde, 100 hücre içinde sayım yapıldı. Kaspaz 3 ile gruplar arasında şöyle bir farklılık dikkati çekiyordu Hipoksi kontrol ve tedavi gruplarında, incelenen beyin bölgelerinde apoptotik hücrelerin fotoğrafları çekildi (Şekil-1c, f; 2c,f; 3c, e; 4c, e).

Kaspaz-3 boyası ile sol hemisfer beyin bölgelerinde gözlenen apoptotik hücre ortalaması yüzdeleri arasındaki fark Kruskal Wallis testi ile hesaplandı. Tüm tedavi gruplarında CA1,CA3 ve paryetal korteks bölgelerinde apoptotik hücre yüzdeleri ortalaması kontrol grubuna göre düşük bulundu (Çizelge IX).

ÇİZELGE IX: Kaspaz-3 ile boyanan sol hemisfer bölgesi apoptotik hücre ortalamalarının tedavi gruplarına göre dağılımları

Bölge	Kontrol		T <sub>4</sub>		EPO		EPO+ T <sub>4</sub>		P*
	ORT	SS	ORT	SS	ORT	SS	ORT	SS	
(Sol)									
CA1	2,87	0,43	2,62	0,31	2,42	0,22	2,45	0,22	0,000(a)
CA2	2,80	0,35	2,48	0,33	2,26	0,33	2,41	0,30	0,000(b)
CA3	2,67	0,47	2,45	0,36	2,35	0,29	2,43	0,28	0,080(c)
Paryetal korteks	2,98	0,50	2,68	0,42	2,53	0,45	2,61	0,36	0,005(d)

\*Kruskal-Wallis varyans analizi

(a) Kontrol grubu ile tedavi grupları arasındaki fark anlamlıdır. EPO+ T<sub>4</sub> ve EPO grupları arasında anlamlı fark yoktur.

(b) Kontrol grubu ile tedavi grupları arasındaki fark anlamlıdır. Tedavi grupları arasında anlamlı fark yoktur.

(c) T<sub>4</sub> ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık yoktur. EPO, EPO+ T<sub>4</sub> ve kontrol grubu arasındaki fark anlamlıdır.

(d) Kontrol grubu ile tedavi grupları arasındaki fark anlamlıdır. T<sub>4</sub> ile EPO+ T<sub>4</sub> grubu arasındaki fark anlamlı değildir.

Kaspaz-3 boyası ile sağ hemisfer beyin bölgelerinde gözlenen apoptotik hücre ortalaması yüzdeleri arasındaki fark Kruskal Wallis testi ile hesaplandı. Tüm tedavi gruplarında CA1 ve CA2 bölgelerinde apoptotik hücre yüzdeleri ortalaması kontrol grubuna göre düşük bulundu. EPO tedavi grubunda tüm bölgelerdeki apoptotik hücre yüzde ortalamaları düşük bulunurken, EPO+ T<sub>4</sub> grubundaki apoptotik hücre yüzde ortalaması CA1,CA2 ve paryetal korteks bölgesinde kontrole göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Çizelge X),(Şekil 7).

ÇİZELGE X: Kaspaz-3 ile boyanan sağ hemisfer bölgesi apoptotik hücre ortalamalarının tedavi gruplarına göre dağılımları

Bölge	Kontrol		T <sub>4</sub>		EPO		EPO+ T <sub>4</sub>		P*
	ORT	SS	ORT	SS	ORT	SS	ORT	SS	
(Sağ)									
CA1	2,85	0,56	2,42	0,48	2,38	0,35	2,44	0,40	0,003(a)
CA2	2,65	0,50	2,29	0,30	2,29	0,31	2,29	0,35	0,008(b)
CA3	2,57	0,53	2,29	0,37	2,21	0,28	2,34	0,32	0,051(c)
Paryetal korteks	2,55	0,35	2,50	0,34	2,31	0,40	2,38	0,29	0,014(d)

\*Kruskal-Wallis varyans analizi

(a) Kontrol grubu ile tedavi grupları arasındaki fark anlamlıdır. T<sub>4</sub> ile EPO ve EPO+ T<sub>4</sub> grupları arasında anlamlı fark yoktur.

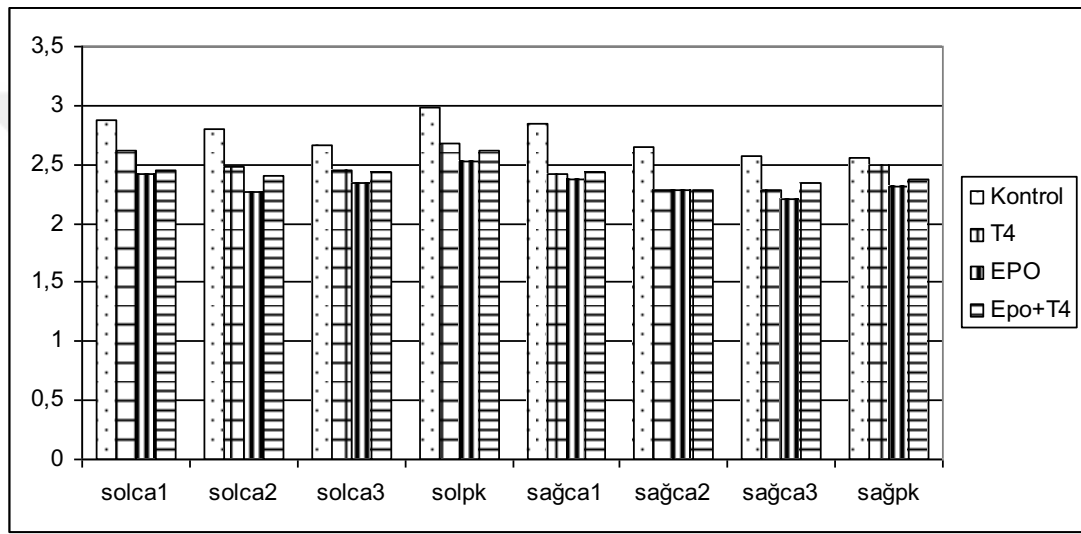
(b) Kontrol grubu ile tedavi grupları arasındaki fark anlamlıdır. T<sub>4</sub> ile EPO ve EPO+ T<sub>4</sub> grupları arasında anlamlı fark yoktur.

(c) EPO ve kontrol grubu arasındaki fark anlamlıdır. T<sub>4</sub>,EPO+ T<sub>4</sub> ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık yoktur.

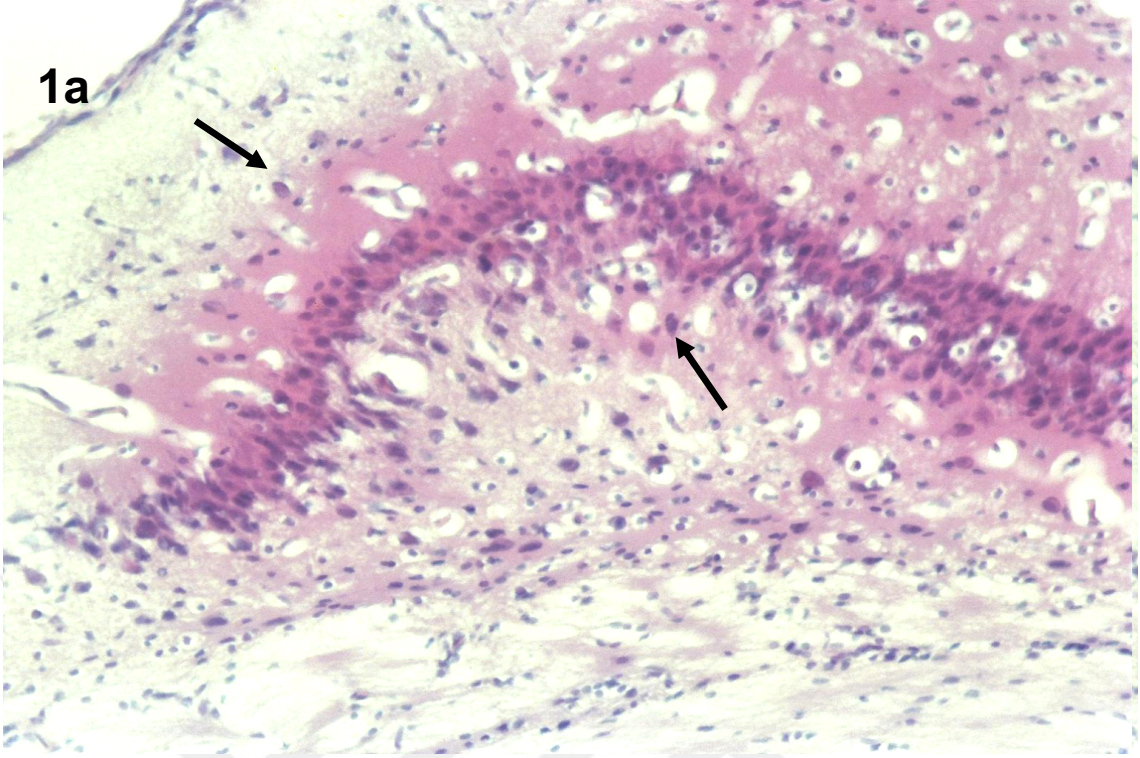
(d) T<sub>4</sub> ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık yoktur. . EPO, EPO+ T<sub>4</sub> ve kontrol grubu arasındaki fark anlamlıdır.

Sol ve sağ hemisfer CA2 bölgesindeki hücrelerde T<sub>4</sub> ve kontrol grubu karşılaştırıldığında anlamlı bir fark ortaya çıkmazken, her iki hemisferdeki apoptotik hücreler birlikte hesaplandığında, T<sub>4</sub> grubundaki apoptotik hücreler, kontrole göre anlamlı derecede düşük bulundu. (Şekil 7)

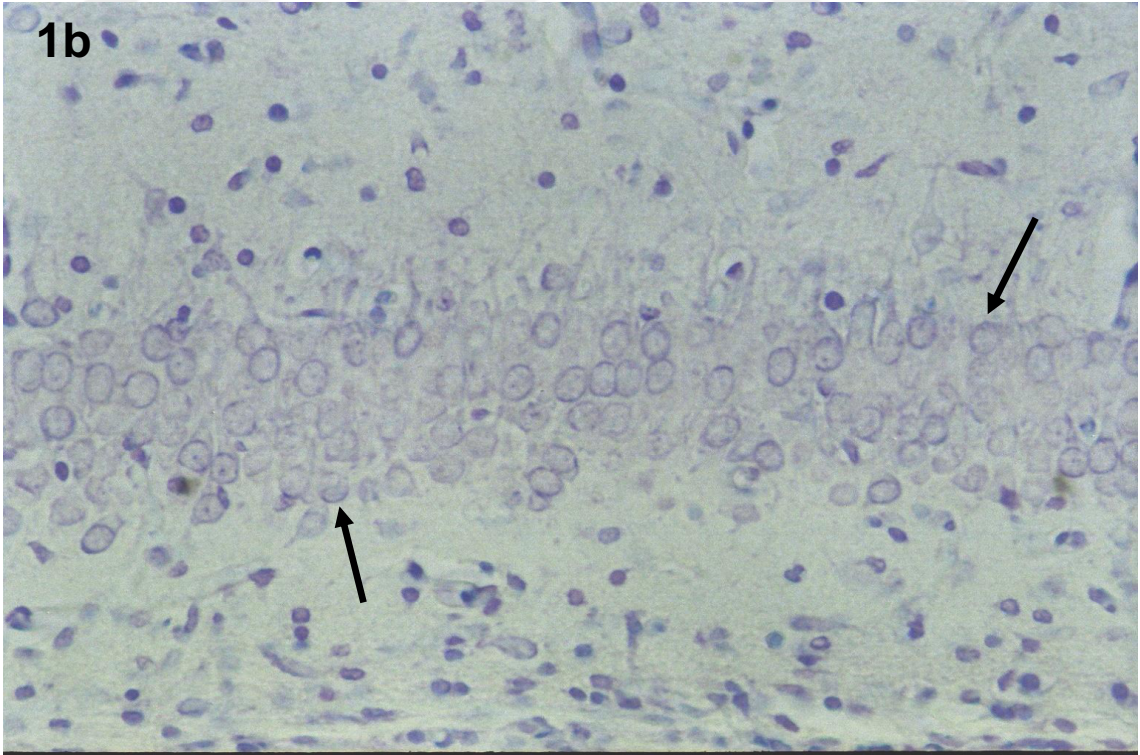
Her iki hemisferde CA3 bölgesinde T<sub>4</sub> ve kontrol grubu arasındaki fark da incelenmiştir, T<sub>4</sub> grubu CA3 bölgesi için ortalaması  $2,37 \pm 0,28$ , Kontrol grubu CA3 bölgesi için ortalaması  $2,62 \pm 0,40$  bulunmuştur, fark anlamlıdır. (P=0,01, Mann-Whitney-U test.)



Şekil 7: Tedavi Gruplarına göre Kaspaz-3 ile boyanan apoptotik hücre yüzde ortalama değerleri

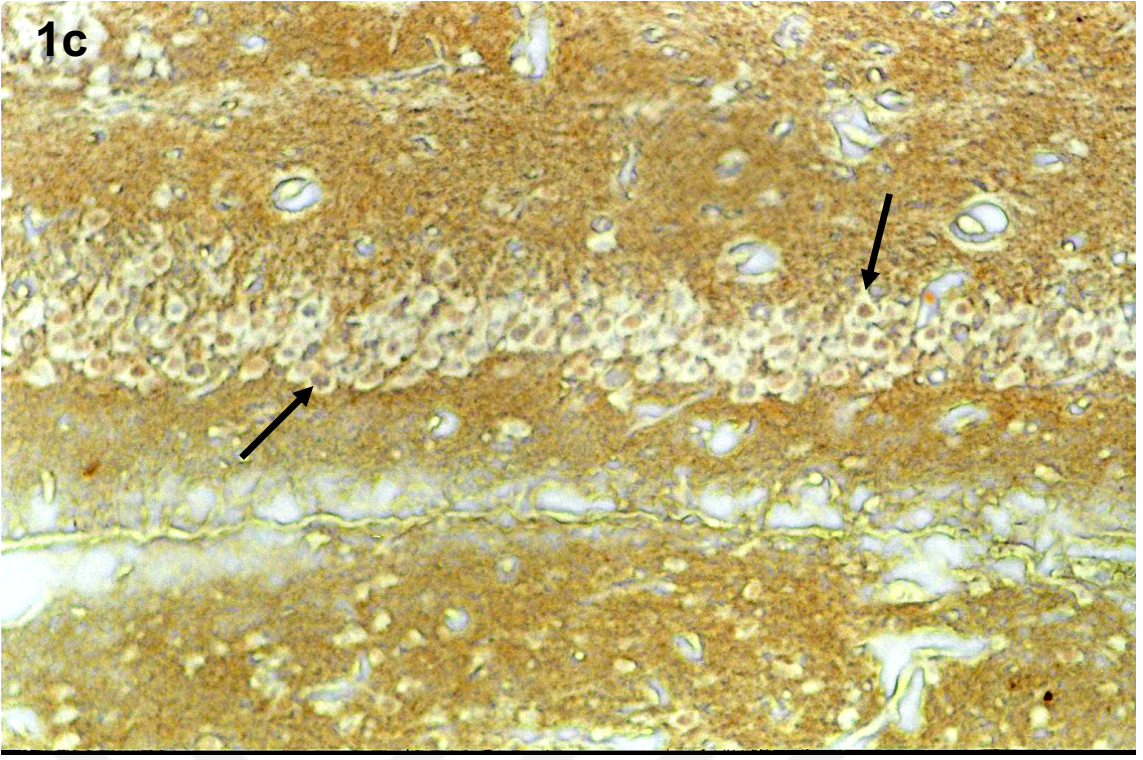


Resim 1a: Hipoksi kontrol grubunda hipokampusun CA 1 bölgesinde iskemik sinir hücreleri (ok) görülüyor. 10X20. H&E.

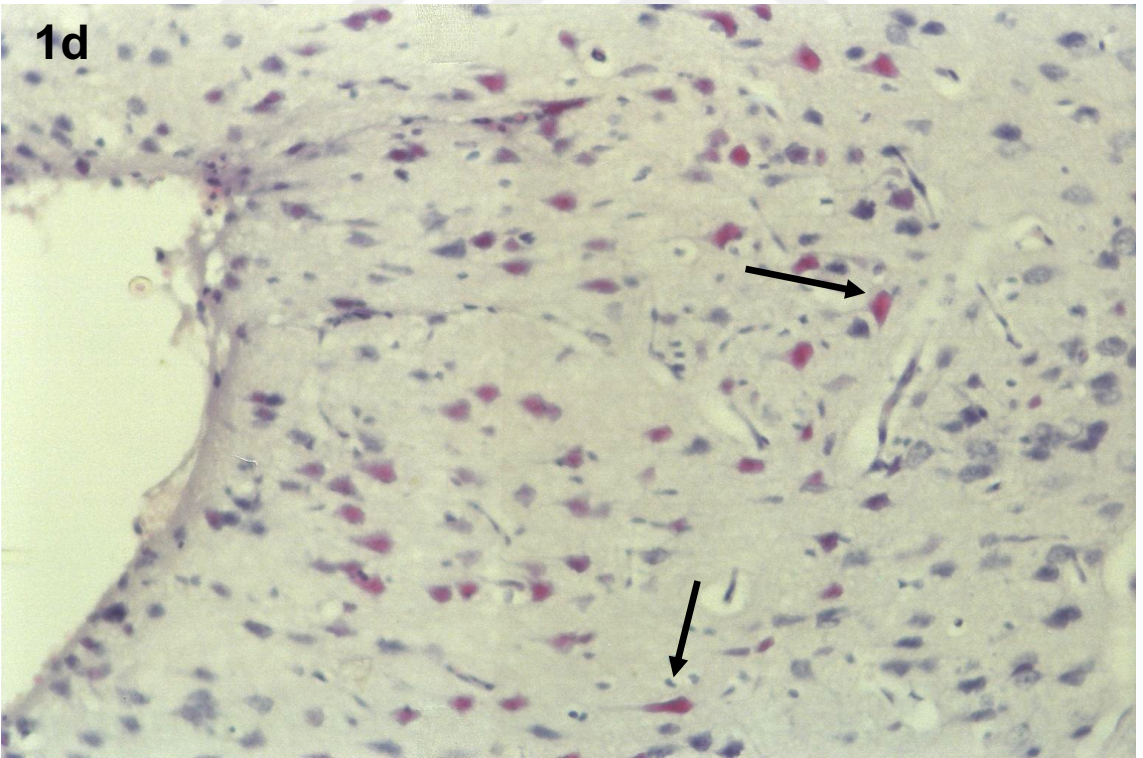


Resim 1b: Hipoksi kontrol grubunda hipokampusun CA 1 bölgesinde Nissl içeriği düşük sinir hücreleri (ok) görülüyor. 10X20. CFV.



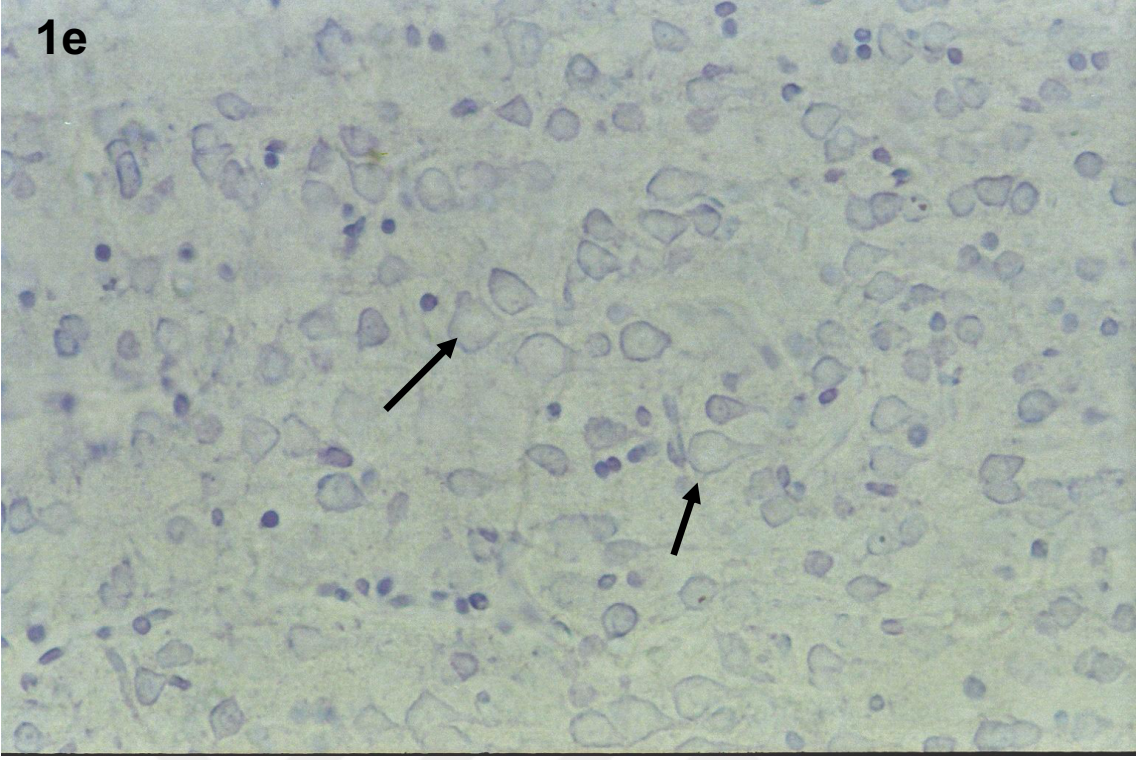


Resim 1c: Hipoksi kontrol grubunda hipokampusun CA 1 bölgesinde Kaspaz 3 ile (+) reaksiyon veren apoptotik hücreler (ok) görülüyor. 10X20.



Resim 1d: Hipoksi kontrol grubunda pariyetal kortekste iskemik sinir hücreleri (ok) görülüyor. 10X20. H&E.



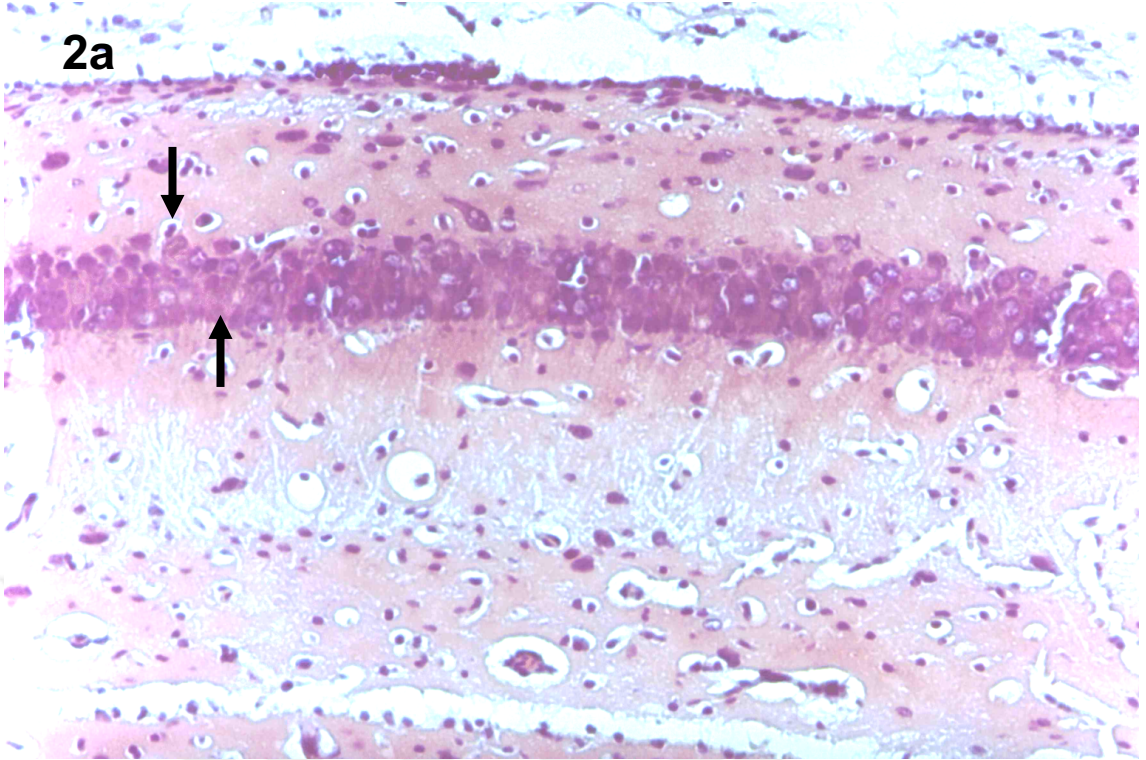


Resim 1e: Hipoksi kontrol grubunda paryetal kortekste nissl içeriği düşük sinir hücreleri (ok) görölüyor. 10X20. CFV.

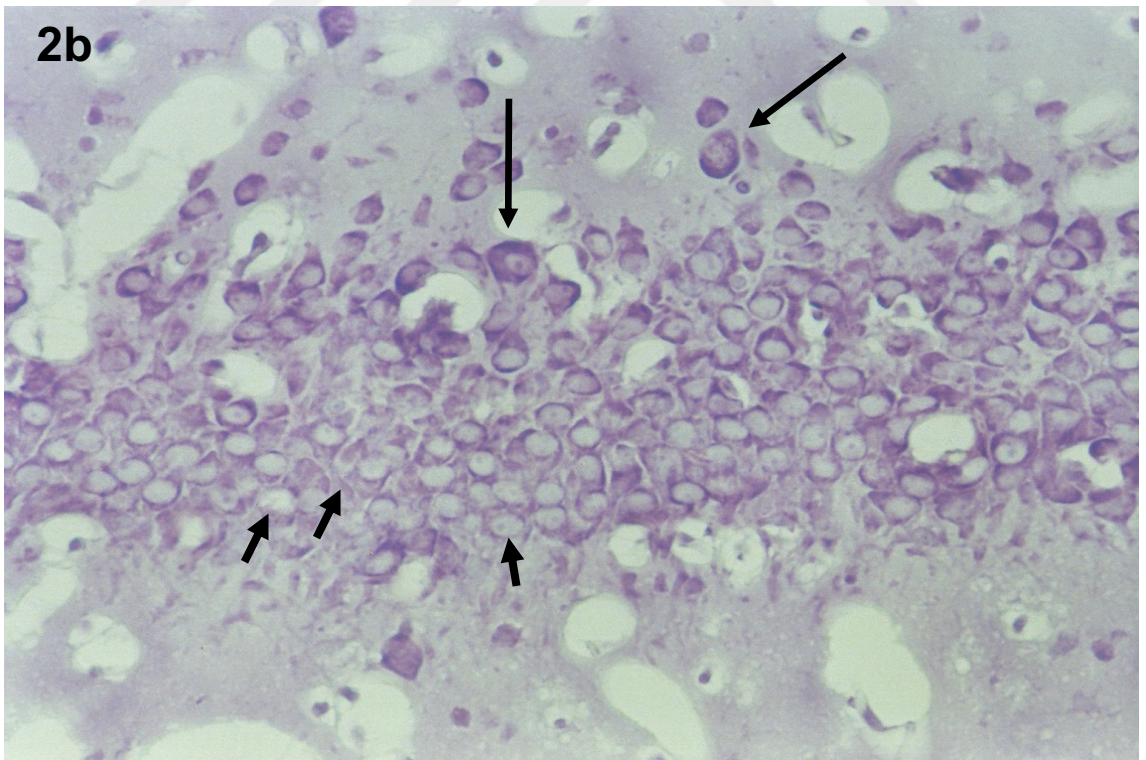


Resim 1f: Hipoksi kontrol grubunda paryetal kortekste Kaspaz 3 ile (+) reaksiyon veren apoptotik hücreler (ok) görölüyor. 10X20.



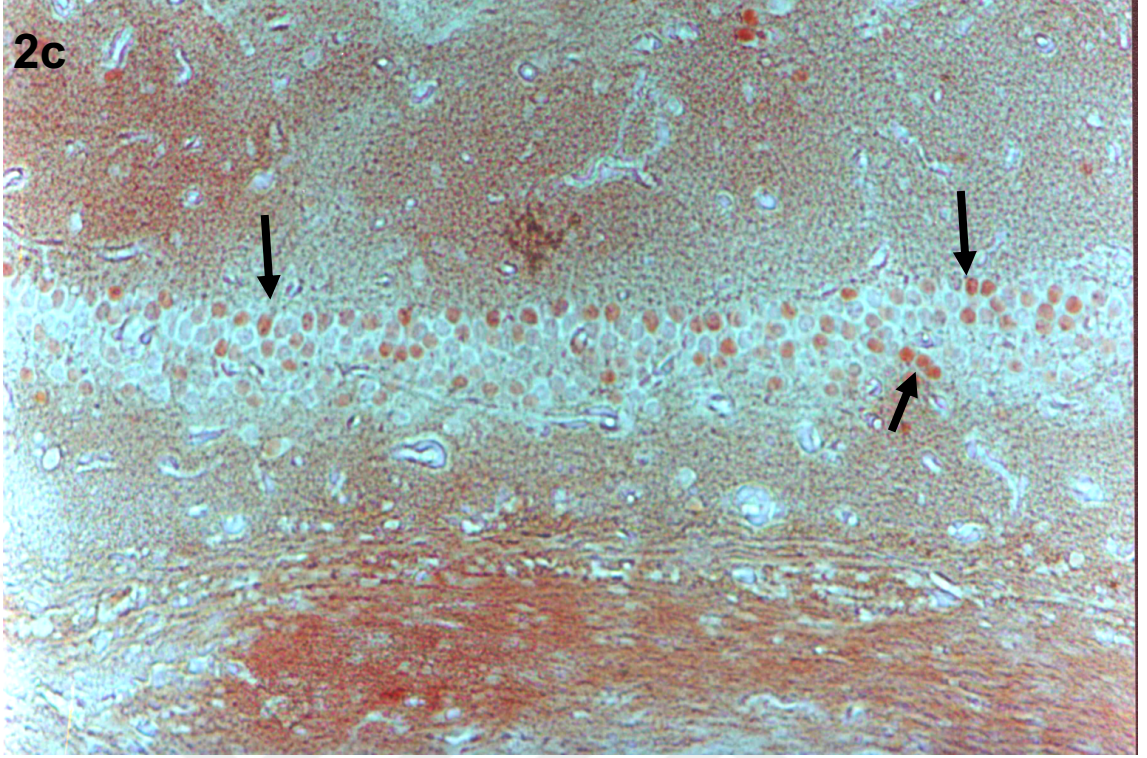


Resim 2a: T<sub>4</sub> grubunda hippocampusun CA 1 bölgesinde iskemik sinir hücreleri (ok) görülüyor. 10X20. H&E.

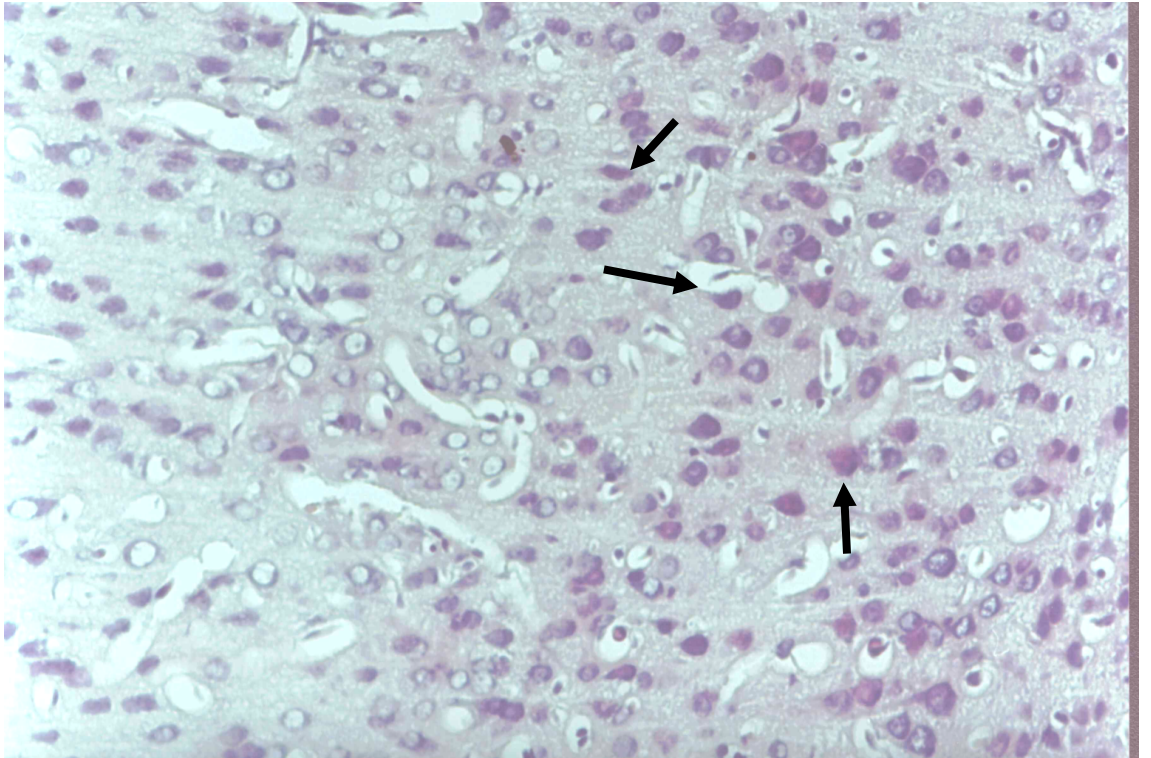


Resim 2b: T<sub>4</sub> grubunda hippocampusun CA 1 bölgesinde nissl içeriği normal (uzun ok) ve düşük olan sinir hücreleri (kısa ok) görülüyor. 10X20. CFV.



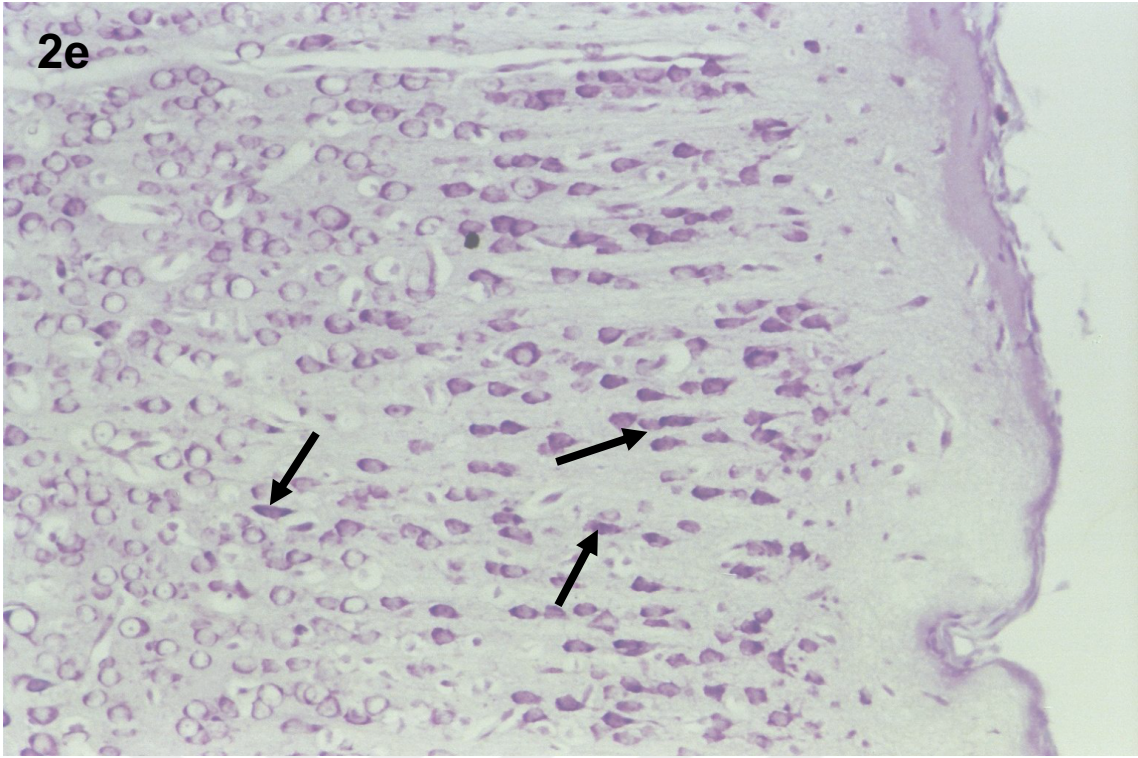


Resim 2c: T<sub>4</sub> grubunda hippocampusun CA 1 bölgesinde Kaspaz 3 ile (+) reaksiyon veren apoptotik hücreler (ok) görülüyor. 10X20.

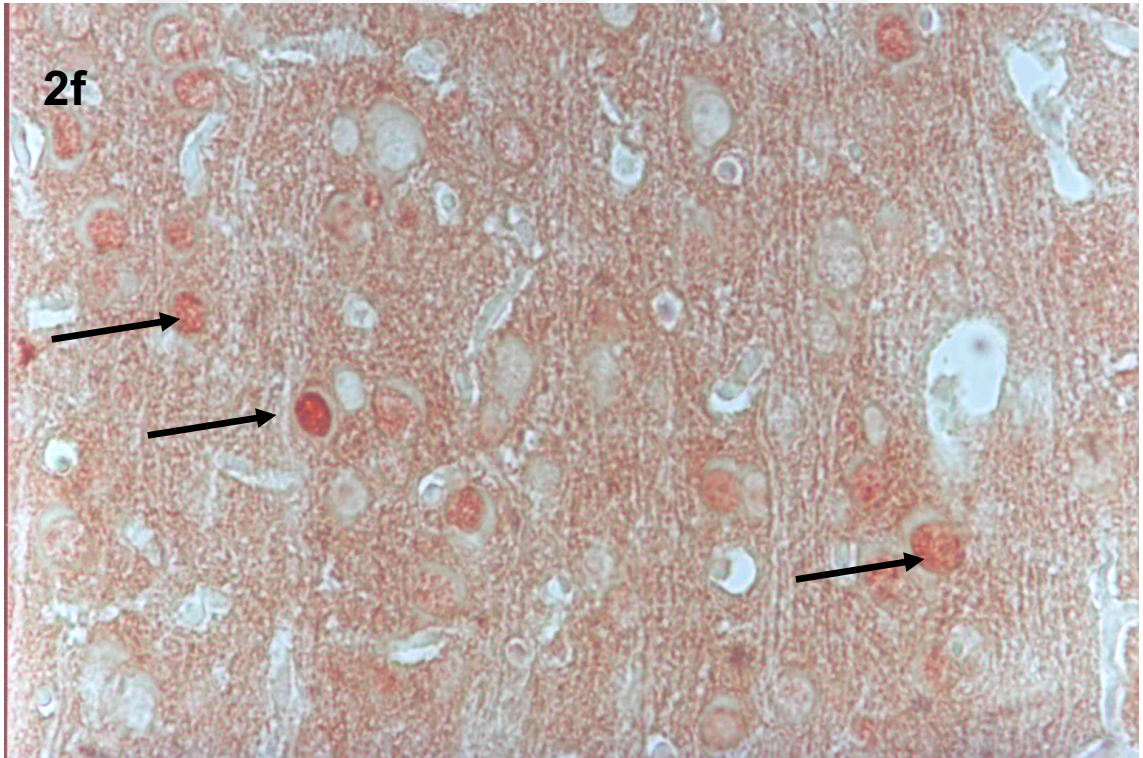


Resim 2d: T<sub>4</sub> grubunda pariyetal kortekste iskemik sinir hücreleri. 10X20. H&E.



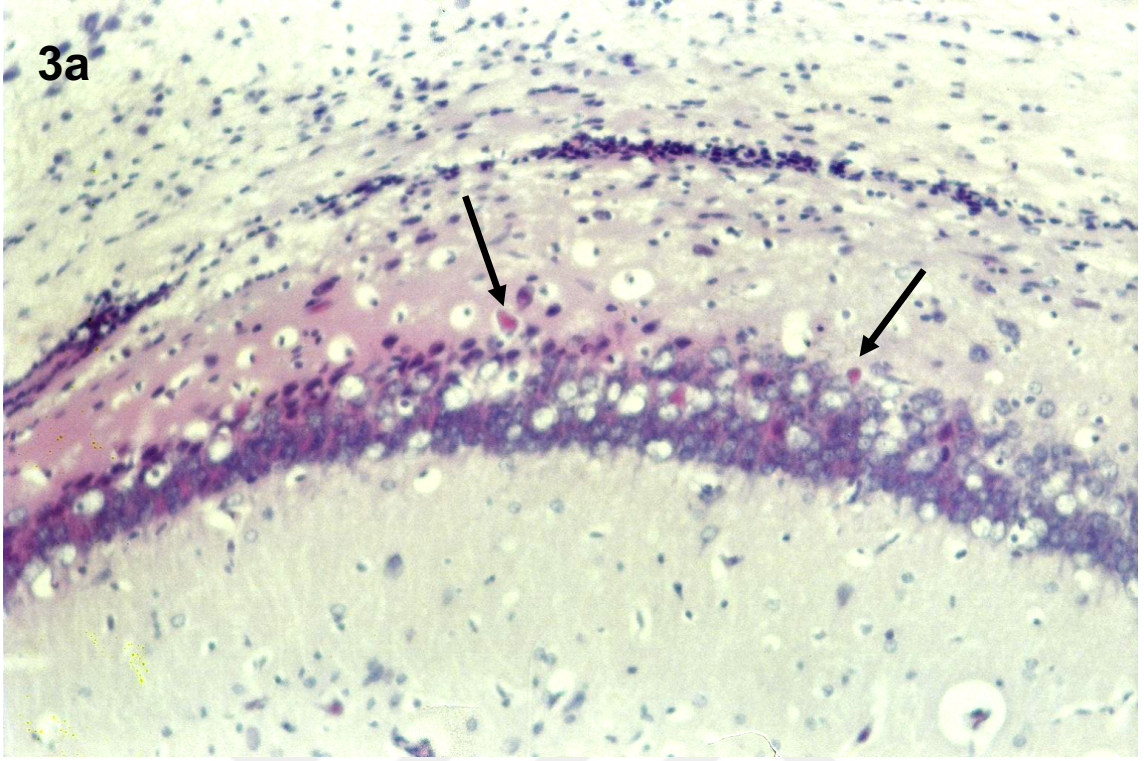


Resim 2e: T<sub>4</sub> grubunda pariyetal kortekste nissl içeriği düşük ve normal olan sinir hücreleri (ok) görülüyor. 10X20. CFV.

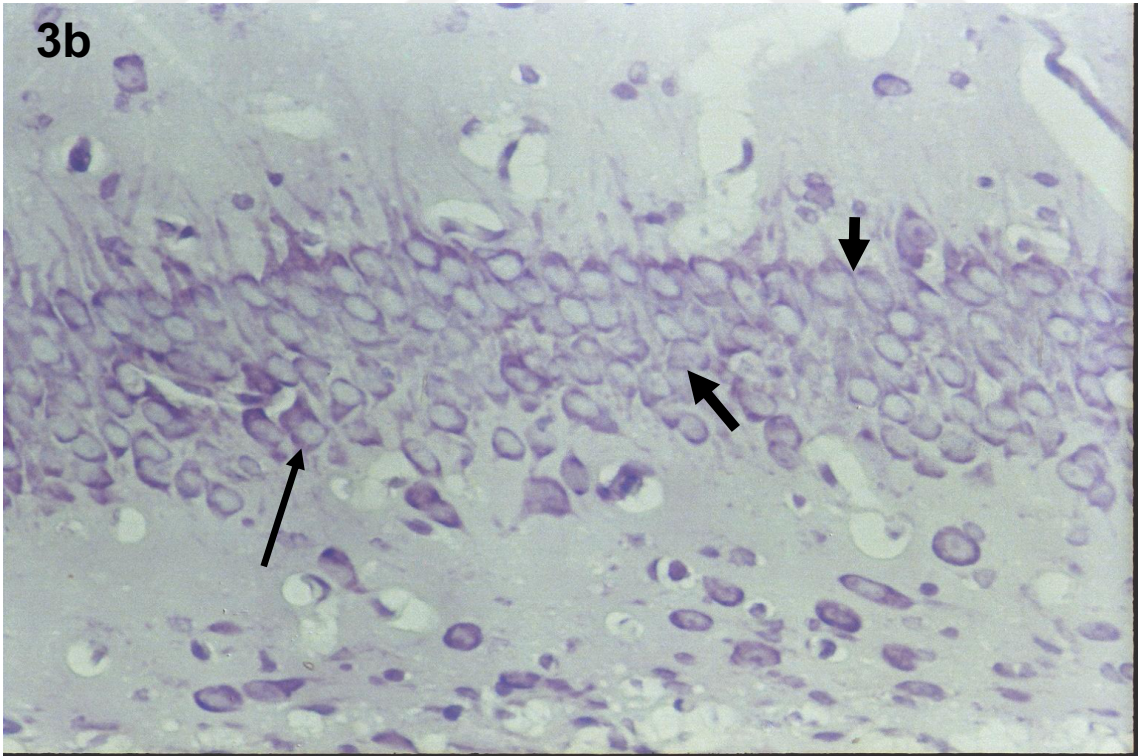


Resim 2f: T<sub>4</sub> grubunda pariyetal kortekste Kaspaz 3 ile (+) reaksiyon veren apoptotik hücreler (ok) görülüyor. 10X20.



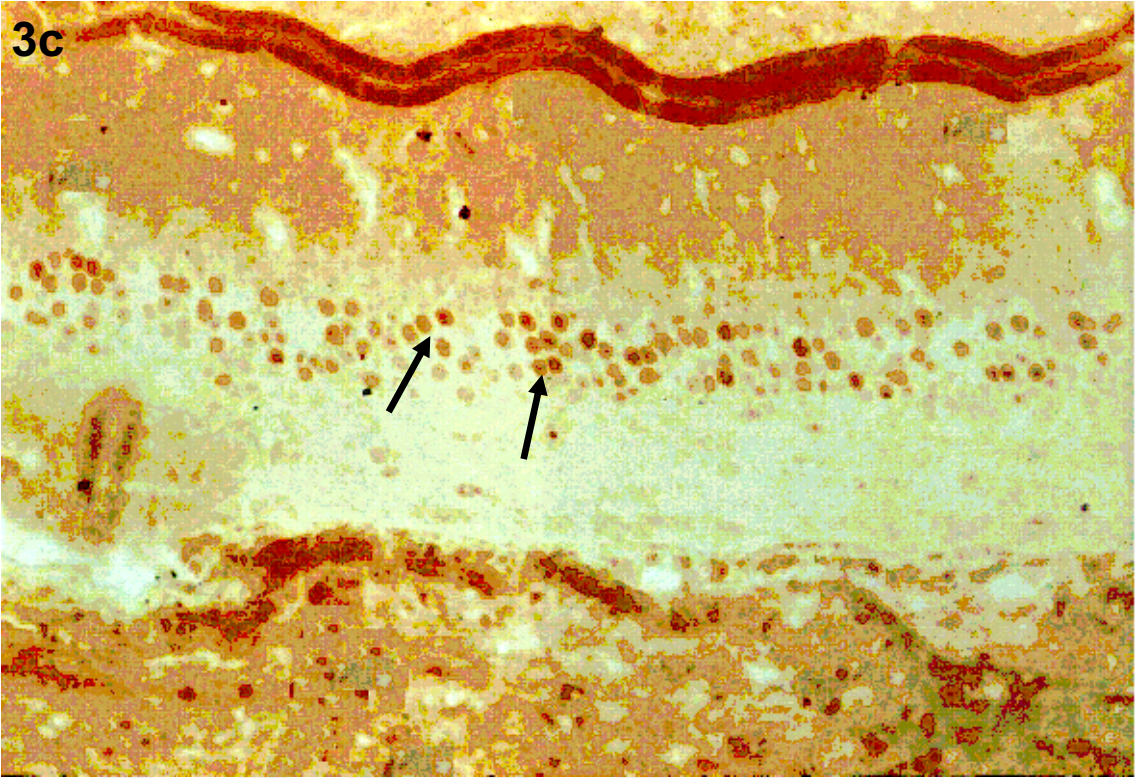


Resim 3a: Eritropoetin grubunda hippocampusun CA 1 bölgesinde iskemik sınır hücreleri (ok) görülüyor. 10X20. H&E.

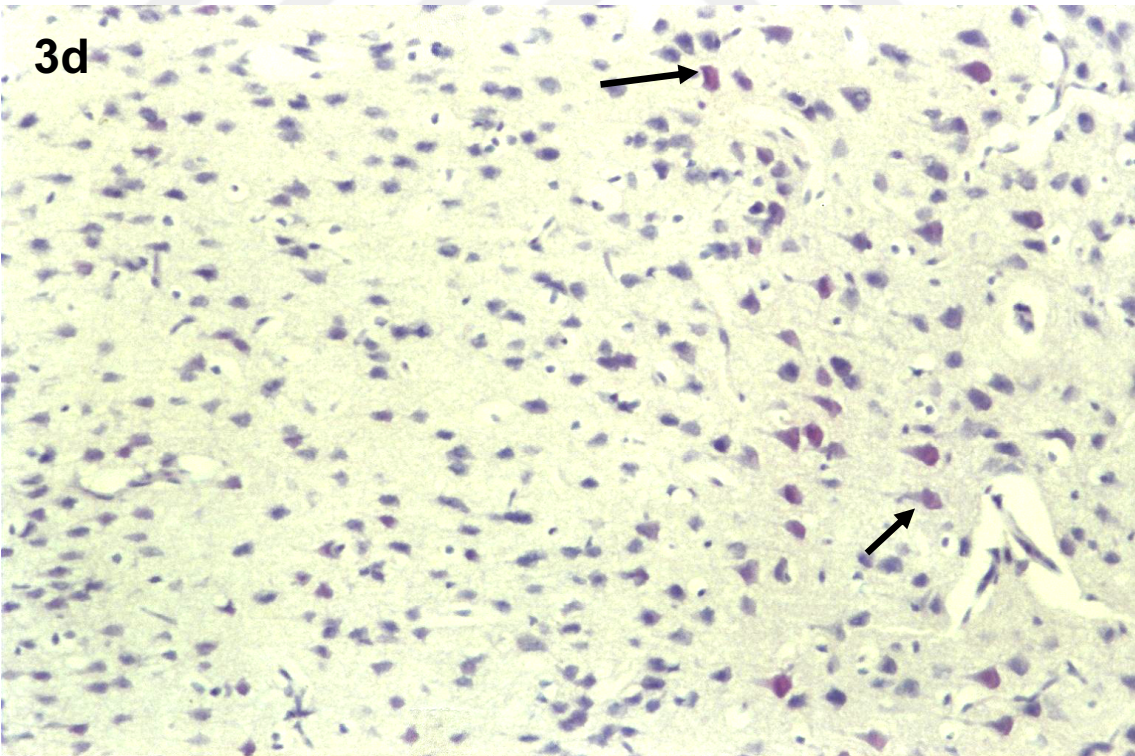


Resim 3b: Eritropoetin grubunda hippocampusun CA 1 bölgesinde nissl içeriği normal (uzun ok) ve düşük (kısa ok) olan sinir hücreleri görülüyor. 10X20. CFV.



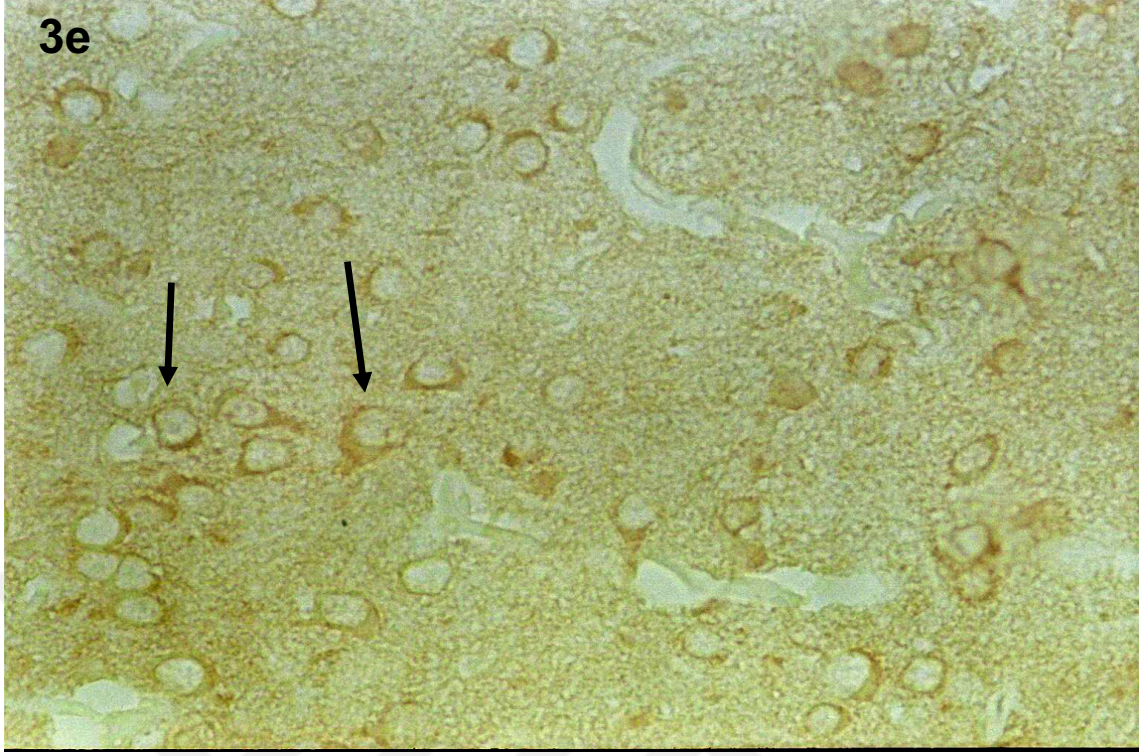


Resim 3c: Eritropoetin grubunda hippocampusun CA 1 bölgesinde Kaspaz 3 ile (+) reaksiyon veren apoptotik hücreler (ok) görülüyor. 10X20.

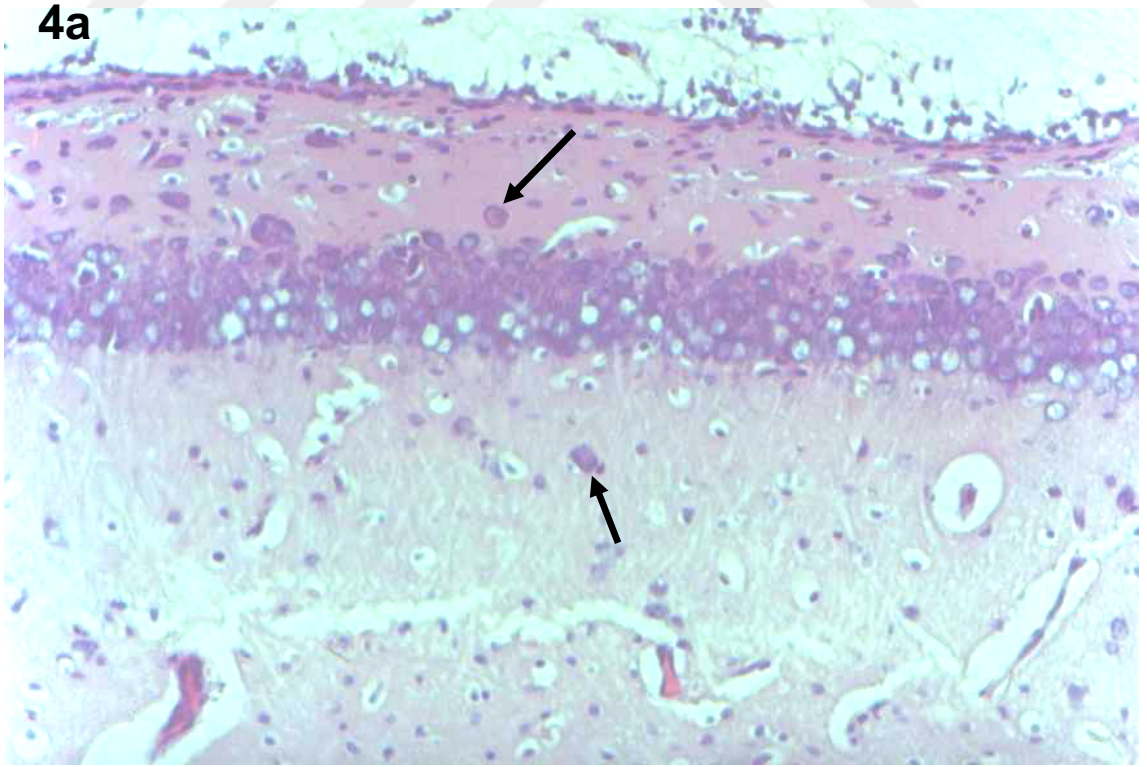


Resim 3d: Eritropoetin grubunda pariyetal kortekste iskemik sinir hücreleri (ok) görülüyor. 10X20. H&E.



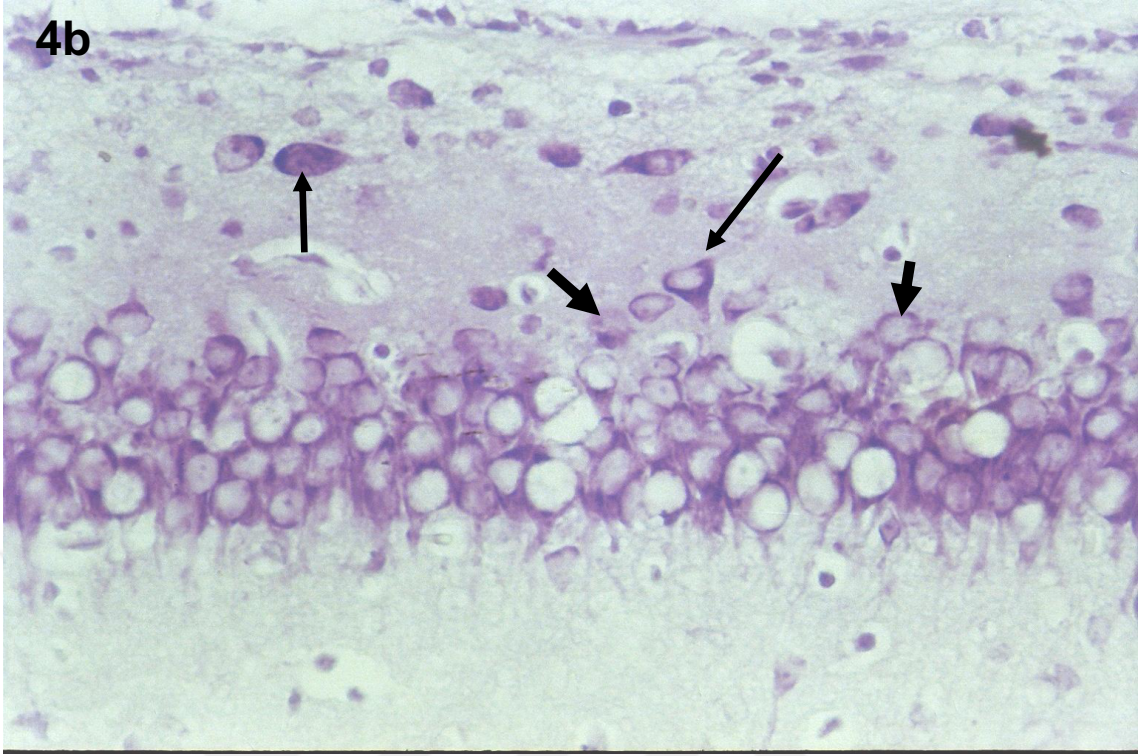


Resim 3e: Eritropoetin grubunda paryetal kortekte Kaspaz 3 ile (+) reaksiyon veren apoptotik hücreler (ok) görülüyor. 10X20.

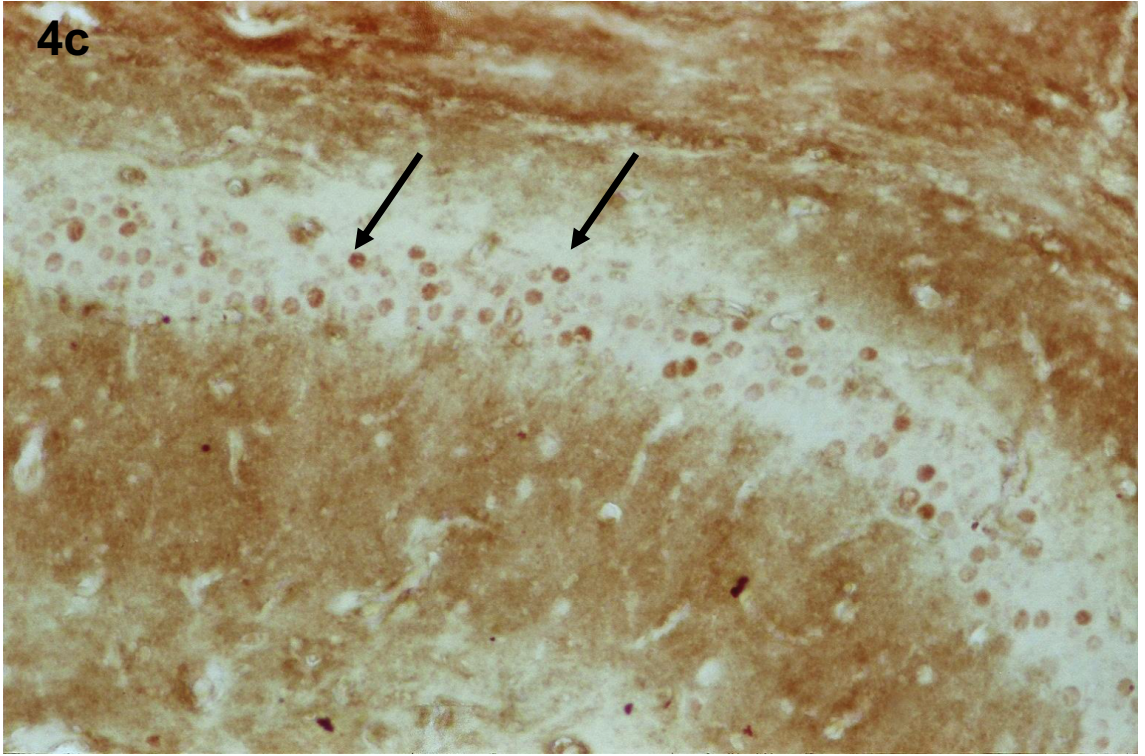


Resim 4a: EPO+T<sub>4</sub> grubunda hippocampusun CA 1 bölgesi. 10X20. H&E.



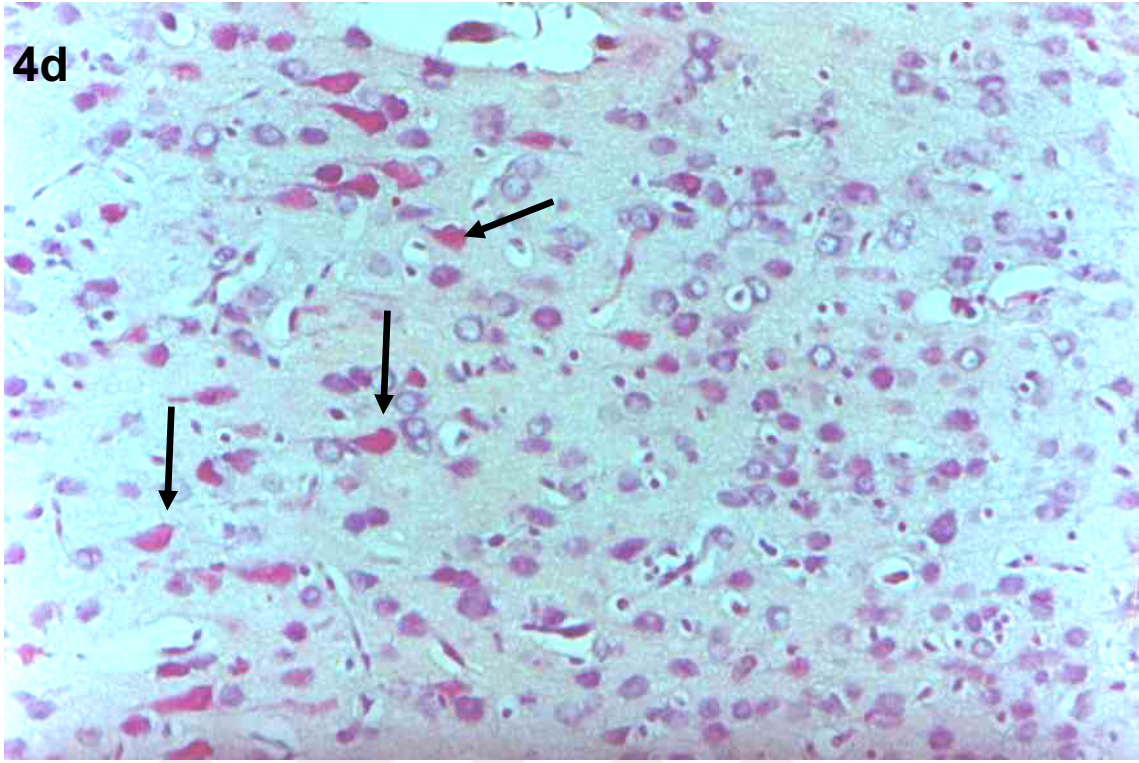


Resim 4b: EPO+T<sub>4</sub> grubunda hippocampusun CA 1 bölgesinde nissl miktarı normal (uzun ok) ve düşük olan (kısa ok) sinir hücreleri görülüyor . 10X20. CFV.

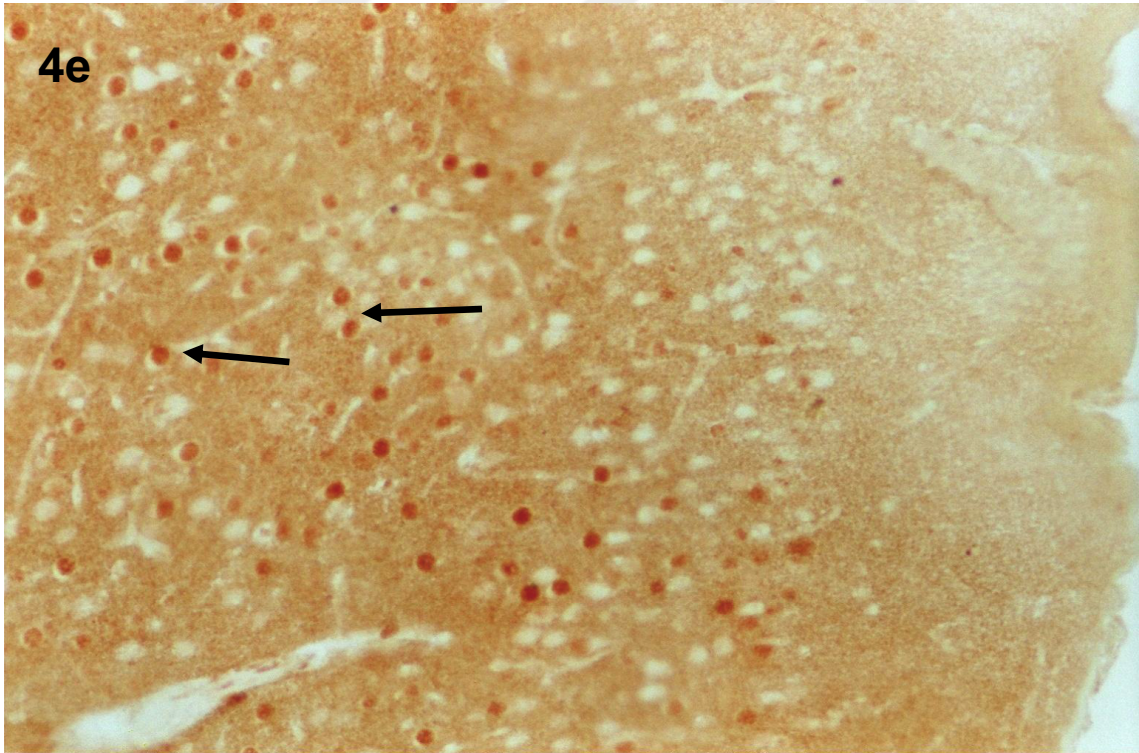


Resim 4c: EPO+T<sub>4</sub> grubunda hippocampusun CA 1 bölgesinde Kaspaz 3 ile (+) reaksiyon veren apoptotik hücreler (ok) görülüyor. 10X20.





Resim 4d: EPO+T<sub>4</sub> grubunda paryetal kortekste iskemik sinir hücreleri (ok) görülüyor. 10X20. H&E.



Resim 4e: EPO+T<sub>4</sub> grubunda paryetal kortekste Kaspaz 3 ile (+) reaksiyon veren apoptotik hücreler (ok) görülüyor. 10X20.

## TARTIŞMA

HİE, gelişmiş ve gelişmemiş ülkelerde önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olmaya devam etmektedir. Zamanında doğan bebeklerde HİE insidansı 2–4/1000 iken, zamanından önce doğan ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerde %60'a kadar çıkmaktadır. (1,2) Gelişmekte olan ülkelerde yeni doğan dönemindeki ölümlerin % 33'ü; Türkiye'de ise % 11'i HİE'ye bağlıdır (35–37). Hasarda en çok rol oynayan süreçler ise %90 oranında gebelik sırasında ve doğum eylemi sırasında yaşanan komplikasyonlardır. Doğum sonrası komplikasyonlar HİE'de % 10 oranında rol oynamaktadır (9). Bu nedenle, öncelikle HİE'yi tedavi etmek yerine, özellikle sağlığa ayrılan kaynakları kısıtlanan ülkemizde;

- Eşit, ulaşılabilir ve ücretsiz bir koruyucu sağlık hizmetiyle doğurgan çağıdaki kadınların ve bebeklerin düzenli izlemine yapmak,
- Doğum kontrolü önerileri ile riskli gebelikleri engellemek
- Düzenli gebe takibini yapmak
- Riskli gebelik izlemine uzmanlaşmış merkezlerde gerçekleştirmek
- Her bebeğin yeterli eğitim almış sağlık bakım ekiplerince ve sağlık merkezlerinde doğmasını sağlamak daha akılcı bir strateji olacaktır.

Birden fazla hücre hasarı sürecinin etkili olduğu HİE'de, şimdilik kayda değer bir klinik tedavi yöntemi bulunamamıştır. Canlandırmada %100 oksijen kullanılmıyorsa %21 oksijen içeren oda havası kullanmanın seçilmiş gruplarda daha yararlı olduğuna ve mortaliteyi azalttığına dair bir sistematik derleme olsa da, henüz bu konudaki çalışmalar kliniğe aktarılabilir kadar çok ve güvenilir değildir (85). Zamanında doğan bebeklerde tedaviye yönelik hipotermi yöntemi ilk 6 saatte uygulanırsa umut vermektedir, fakat ek çalışmalara ihtiyaç vardır (86). Bu yöntem ile hafif etkilenmiş zamanında doğan bebeklerde 18. ayda ölüm ve ağır zekâ geriliğinin önlenilebileceği geniş bir randomize çalışma ile gösterilmiştir (87). Zamanında doğan yenidoğanlarda HİE'den sonra verilecek magnezyum sülfat infüzyonununun 14. günde

sağ kalımı ve EEG sonuçlarını etkilediği gösterilmiştir (88). HİE'nin temel mekanizmaları daha iyi anlaşıldıkça, hasarın olduğu süreçlere özgü tedavi yaklaşımının da gelişeceği umut edilebilir. Karmaşık bir patofizyolojiye sahip olan HİE'de deneysel modellerle hasarın temel mekanizmalarını ortaya çıkarmak, olası tedavi edici çalışmaları da bu deneysel modellerde yapmak ve umut verenleri kliniğe uygulamak uygun olacaktır.

Çalışmamızda kullandığımız sıçan modeli, HİE'nin araştırılmasında kabul görmüş ve sık kullanılan bir modeldir. 7 günlük sıçan yavruları gelişimsel olarak yeni doğmuş insan beyni ile aynı özellikleri taşımaktadır. Tek taraflı karotis arter bağlanması ve ardından %8 Oksijen ve %92 azot karışımı içeren kaplarda 1 saatlik hipoksi uygulaması ile sıçanlarda hipoksemi ve hipokapni gelişmekte, hipokapni laktik asidozu kompanse etmekte, sistemik pH aynı kalmaktadır (89).

Hipoksi koşullarında sistemik kan basıncı normalin %25-30'una inmekte ve karotis arteri bağlanan beyin hemisferinin kan akımı ise karşı tarafın %40-60'ı oranında azalmaktadır (90). Hipoksi-iskemi ve yeniden kanlanmaya bağlı hasar çoğunlukla bağlı olan taraf beyin hemisferinde gözlenirken, karşı tarafta da etkili olabilmektedir (91,92).

Sonuçta bu model yenidoğanlarınkine benzer ılımlı hücre ölümünü sağlamaktadır ve deney sonrası hayvan ölümleri fazla olmadığından değerlendirmek mümkün olmaktadır(2,8). Bu modeli kullanan çoğu araştırma gibi sıçan beyinleri postnatal 7. günde hipoksi-iskeminin beyindeki etkileri gözlenmek için incelenmeye alınmıştır, bu süre beyindeki hipoksiye bağlı oluşan apoptoz ve nekrozun izlenmesi için yeterlidir (23.24.48.76).

EPO ve reseptörü memeli beyin dokularında eksprese edilmektedir (45–47). Endojen ve eksojen EPO hayvan deneylerinde hipoksi-iskemi, spinal hasar ve nörodejeneratif hastalık modellerinde başarılı bulunmuştur (23,93–95). EPO'nun inme sonucu oluşan hasarı azalttığı erişkin insanlarda yapılmış bir faz 2 çalışması ile de gösterilmiştir (96). EPO, astrositlerden salınan hif-1 $\alpha$  aracılığı ile eksprese edilmekte ve anti apoptotik etkilerini Akt ve PI3-K isimli threonin kinazları aktive ederek BCL2 ve XIap'yi düzenleyip apoptozu baskılayarak göstermektedir (47-52). Güncel bir çalışmada, EPO ile birlikte kullanılan IGF-1'in nöronal apoptozu azalttığı da gösterilmiştir (52).



Margaill ve arkadaşları, geçici fokal iskemi yaratılan sıçan astrositlerinde iskemiye izleyen 6 saat içinde striatum ve serebral kortekste belirgin bir tip -2 iyodotironin deiyodinaz aktivitesinin başladığını ve bu aktivitenin en az 72 saat sürdüğünü bulmuşlardır. Tip 2 deiyodinaz, beyin hücrelerinde T<sub>4</sub>'ün daha aktif formu olan 3,5,3'-triiyodotironine dönüşmesini katalize etmektedir (97).

Hipotiroid sıçanların hipokampus sinir hücrelerinde apopitozun fT<sub>4</sub> ve fT<sub>3</sub> düzeyleri ile ters orantılı olarak arttığı saptanmıştır. Tiroid hormonlarının apopitozu engellediği, hipotiroidizmin ise anti- apopitotik bcl-2 geninin düzenlenmesini azalttığı, pro – apopitotik bax geninin düzenlenmesini yüksek düzeylerde tutarak nöronal apopitoza yol açtığı gösterilmiştir (71). Doğumsal hipotiroidizmi taklit eden bir sıçan modelinde hipotiroidizmin gelişmemiş beyinde IGF sentezini azalttığı gösterilmiştir(73). IGF-I, hipoksi ve iskemiye maruz kalan beyin dokusunda ise olası bir anti-apopitotik ajan gibi davranmaktadır. (74). Deneysel HİE' modelinde T<sub>4</sub>'ü EPO ile birlikte hem apopitozdaki bcl/bax gen ekspresyonundaki ortak yollarından hem de IGF1 ile ortak ilişkilerinden dolayı kullanmayı düşündük.

Çalışmamızda deneysel HİE modelinde, daha önce değişik çalışmalarda sinir hücresi koruyucu etkisi kanıtlanmış EPO ile birlikte T<sub>4</sub> hormonunu kullanarak değişik beyin bölgelerindeki nöronal yapılardaki hücre morfolojisini gösteren Nissl miktarını, nekrotik ölüm cevabını, hipokampus uzunluğunu ve kaspaz-3 boyaması ile apopitozu inceledik. Yine vasküler dilatasyon, ventriküler dilatasyon gibi morfolojik değişiklikleri de kaydettik.

Tek taraflı ventrikül dilatasyonu açısından tedavi grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulamadık. Vasküler dilatasyon açısından sadece EPO almış tedavi grubunda kontrole göre anlamlı derecede düşüklük vardı. Vasküler dilatasyonun bu grupta daha az olmasının nedeni EPO'nun daha önce bulunmuş olan damar duvarı tonus düzenleyici ve anti-inflamatuar özelliklerine bağlanabilir. Bir çalışmada Genç ve arkadaşları, hipoksi-iskemi yarattıkları ve EPO tedavisi uyguladıkları farede NO yapım artışına bağlı olarak nöronal hasarın azaldığını göstermişlerdir(56). Yine, Kristal ve arkadaşları, EPO tedavisi alan hemodiyaliz hastalarında EPO'nun polimorfonükleer lökositlerce ortaya çıkan inflamasyon

yanıtını değiştirebildiğini göstermişlerdir (58). Kombine tedavi grubunda da bu etkinin görülmesi beklenebilir.

CFV boyaması ile hipokampusun CA1,CA2,CA3 bölgeleri ile birlikte paryetal kortekste Nissl oranlarını inceledik. Nöronal morfolojinin bir göstergesi olan Nissl skorunun T<sub>4</sub> ve EPO+ T<sub>4</sub> grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek çıkması, T<sub>4</sub>'n hipokampus ve paryetal kortekste sinir hücresi koruyucu özelliği olduğunu düşündürmektedir. Kombine tedavi ile T<sub>4</sub> grubu arasında anlamlı fark bulunmaması, bu sinir hücresi koruyucu özelliğin hem EPO hem de T<sub>4</sub> tarafından etkilenen IGF-1 kaynaklı mı yoksa henüz incelenmemiş başka bir mekanizma aracılığı ile mi olduğu sorusunu akla getirmektedir (73,74). Bulgularımız, T<sub>4</sub> tedavisini sıçan iskemi modelinde uygulayan ve hipokampus bölgesinde sinir hücresi koruyucu özelliğini gösteren Rami ve arkadaşlarının sonuçları ile uyumludur (75) .

HE boyaması ile hipokampusun CA1,CA2,CA3 bölgeleri ile birlikte paryetal kortekste nekrotik hücre yüzde ortalamalarını inceledik.

Sol CA1 bölgesinde nekrotik hücre ortalaması yüzdeleri farkı, tedavi grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı değildi, sağ CA1 bölgesinde ise T<sub>4</sub> grubundaki nekroz yüzdesi, kontrole göre anlamlı derecede artmıştı. CA2 ve paryetal korteks'te ise T<sub>4</sub> dışındaki tedavi gruplarında nekroza giden hücre sayısı azalmıştı, kontrol grubu ile T<sub>4</sub> grubu arasında fark yoktu. Sol CA3 bölgesinde ise sadece T<sub>4</sub> grubundaki nekroz oranı kontrole göre azalmıştı. Sağ CA3 bölgesinde T<sub>4</sub> dışındaki tedavi gruplarında nekroza giden hücre sayısı azalmıştı, kontrol grubu ile T<sub>4</sub> grubu arasında fark yoktu. Sonuçta, EPO ve kombine tedavi grubunda birkaç bölge haricindeki sinir hücresi koruyucu etki, EPO'nun nöronal hasar modellerinde gösterilmiş olan etkisinden başka sahip olduğu anti-inflamatuar etkilere ve özellikle yeniden- kanlanma hasarını önleyici etkisine bağlanabilir. Assandri ve arkadaşları, EPO'nun nöronal intraselüler kalsiyumu azalttığını göstermişlerdir (55). Chattopadhyay ve arkadaşları ise EPO'nun serbest radikal hasarı önleyici özelliği olduğunu bildirmişlerdir(57).

Sağ CA1 bölgesindeki sinir hücrelerinde T<sub>4</sub> grubunda görülen nekrotik hücre yüzdesinin artışı ve diğer bölgelerde de (Sol CA1, sağ CA3, her iki taraf CA2 ve paryetal korteks) T<sub>4</sub> grubunda kontrol grubuna benzer oranda nekrotik hücre saptanması, kullandığımız dozda T<sub>4</sub> tedavisinin nöronal nekrozu önlemekte yetersiz kaldığını göstermektedir. Shuaib ve arkadaşları, gerbillerde yaptıkları bir deneyde,

hipotiroidizmin beyinde enerji harcanmasını düşürdüğünü, beyindeki iskemi sonrası yeniden- kanlanma hasarının da bu düşük metabolik hıza bağlı olarak azalacağını düşünmüş, ve hipotiroidizmin geçici beyin iskemisi sonrası gerbillerde sinir hücresi koruyucu etkisini test etmek üzere tiroidektomi yapılmış ve yapılmamış hayvanlara geçici iskemi uyguladıktan 7 gün sonra beyinlerini incelemişlerdir. Tiroidektomili hayvanların beyin kesitlerinde hipokampus CA1,CA2, CA3, CA4 ve serebral kortekste kontrole göre anlamlı derecede düşük nekrotik hasar gözlemişlerdir. Nekrotik hücre yüzdesi ortalamalarının sonuçları, bizim modelimizde sağ CA1 bölgesi için bu çalışma ile uyumlu bulunmuştur (98). Sonuçlarımız, Rami ve arkadaşlarının tiroksin tedavisi sonucu iskemik beyin hasarından korunan deney gurubu ile benzerlik göstermemektedir (75).

Tedavi gruplarına göre hipokampus uzunlukları ortalamaları farkı değerlendirildiğinde, tüm tedavi gruplarının hipokampus uzunlukları ortalamaları kontrol grubuna göre anlamlı derecede büyüktü. T<sub>4</sub> grubunun hipokampus uzunluğu diğer tüm gruplardan yüksekti ve bu fark sol hipokampustaki EPO+ T<sub>4</sub> grubunun ölçümü dışında anlamlıydı. Memelilerde hipokampustaki dentat girus ve lateral ventriküllerdeki subventriküler zondaki progenitor hücrelerden yaşam boyunca yeni sinir hücreleri oluşmaktadır. Beyindeki iskemi de bu progenitor hücrelerin sayısını artırmaktadır. Dempsey ve arkadaşları, geçici beyin iskemisi uyguladıkları bir grup sıçanda IGF-1'in bu progenitor hücreler üzerine etkisini araştırmışlar. IGF-1 ile tedavi edilmiş grupta dentat girus bölgesindeki progenitor hücrelerin kontrole göre 4 kat, subventriküler zondaki progenitor hücrelerin de 2 kat fazla olduğunu ve bu farkın anlamlı olduğunu saptamışlar (99). Mudrick ve arkadaşları ise sıçanlardaki serebral iskeminin uzun dönemde en çok hipokampus CA1 bölgesinde hücre kaybına yol açarak morfolojik değişiklikleri yarattığını göstermişler (100). Bizim modelimizdeki beyin değişiklikleri, EPO ve T<sub>4</sub>'ün IGF-1 aracılıklı etkilerine bağlanabilir fakat uzun dönemli izlem yapmadığımız için bu morfolojik farkın tedavi gruplarının iskemik hasardan korunmasına mı yoksa geliştirici faktörlere mi bağlı olduğunu kestirmek güçtür.

Kaspaz-3 boyaması ile hipokampusun CA1,CA2,CA3 bölgeleri ile birlikte paryetal kortekste apoptotik hücre yüzde ortalamalarını inceledik. Tüm tedavi gruplarında CA1,CA2 ve paryetal korteks bölgelerinde apoptotik hücre yüzdeleri

ortalaması kontrol grubuna göre düşük bulundu. EPO ve EPO+ T<sub>4</sub> tedavi grubunda tüm bölgelerdeki apoptotik hücre yüzde ortalamaları düşük bulundu. CA3 bölgesinde her iki hemisferdeki apoptotik hücreler birlikte hesaplandığında, T<sub>4</sub> grubundaki apoptotik hücreler, kontrole göre anlamlı derecede düşük bulundu. Sağ Paryetal kortekste T<sub>4</sub> grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanamadı. Kaspaz-3 boyaması sonuçları, HİE' modelinde EPO tedavisinin apoptozu azalttığını bildiren yayınlarla uyumludur (24.52.53.76). Kaspaz-3 boyaması sonuçları, tiroksin tedavisinin HİE modelinde apoptozu azaltabileceği ve bu değişikliğin Kaspaz-3 enzimi boyası ile gösterilebileceği yönündeki hipotezimizle uyumludur. EPO+ T<sub>4</sub> grubunda, diğer gruplardan anlamlı derecede ayrı apoptotik hücre ortalaması saptanamamıştır. Dığıçaylıoğlu ve arkadaşları, IGF-1 ve EPO tedavisinin sinerjistik etki ile nöronal apoptozu önleyebildiğini göstermişlerdir (52). Bu çalışmada benzeri bir sinerjistik etkiyi gösterememiş olmamız, böylesi bir ilişkinin olmadığı anlamına gelmemektedir. Escobar-Morreale ve arkadaşları tüm dokularda, özellikle beyin dokusunda ötiroid bir durum yaratabilmek için tiroidektomize edilen sıçanlarda hem T<sub>4</sub> hem de T<sub>3</sub> verilmesi gerektiğini göstermişlerdir (101). Apoptozun gösterilmesi için kullanılan yöntemimiz ışık mikroskopunda morfometrik çalışmaya dayanmaktadır, Türkyılmaz ve arkadaşları HİE modelini uyguladıktan sonra magnezyum tedavisinin apoptoz üzerine etkisini değerlendirmek üzere bilgisayarlı görüntü analizini kullanmışlar ve sayısal olarak tüm kesit yüzeyindeki hücreleri sayısal olarak değerlendirmişlerdir, bu yöntemi bizim kesitlerimize de uygulamak mümkündür (102).

Tiroksin hipoksik iskemik ensefalopati oluşturulmuş sıçan beyinlerinde kontrollere göre sağlıklı nöron sayısının artmasına, apoptotik hücre sayısının da azalmasına yol açmaktadır. Eritropoetin hipoksik iskemik ensefalopati oluşturulmuş sıçan beyinlerinde kontrollere göre sağlıklı nöron sayısının artmasına, nekrotik ve apoptotik hücre sayısının da azalmasına yol açmaktadır. Tiroksin ve eritropoetin birlikte kullanıldığında hipoksik iskemik ensefalopati oluşturulmuş sıçan beyinlerinde kontrollere göre sağlıklı nöron sayısının artmasına, nekrotik ve apoptotik hücre sayısının da azalmasına yol açmaktadır. Tiroksin ve eritropoetin tedavide kullanılacak yeni bir seçenek olarak umut vermektedir ve ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

## SONUÇLAR:

Çalışmada hipoksi ve iskemi uygulanmış sıçanlarda hipoksi sonrası verilen EPO, T<sub>4</sub> ve EPO+ T<sub>4</sub> tedavilerinin sinir hücresi koruyucu etkileri araştırılmıştır.

1. EPO, incelenen tüm beyin bölgelerinde sağlıklı sinir hücresi morfolojisini gösteren Nissl skorunu kontrol grubuna göre artırmış, HE boyası ile gösterilen nekrotik hücre yüzde ortalamalarını kontrol grubuna göre azaltmış, Kaspaz-3 boyası ile gösterilen apoptotik hücre yüzde ortalamalarını kontrol grubuna göre azaltmıştır. Hipokampus boyutu bu grupta kontrole göre anlamlı derecede büyüktür.
2. T<sub>4</sub> tedavisi, incelenen tüm beyin bölgelerinde sağlıklı sinir hücresi morfolojisini gösteren Nissl skorunu kontrol grubuna göre artırmış, HE boyası ile gösterilen nekrotik hücre yüzde ortalamalarını sağ CA1 bölgesinde artırırken, sol CA3 bölgesi dışındaki bölgelerde kontrole göre azaltamamış, Kaspaz-3 boyası ile gösterilen apoptotik hücre yüzde ortalamalarını sağ paryetal korteks dışındaki tüm bölgelerde kontrol grubuna göre azaltmıştır. Hipokampus boyutu bu grupta kontrole göre anlamlı derecede büyüktür.
3. EPO+T<sub>4</sub>, incelenen tüm beyin bölgelerinde sağlıklı sinir hücresi morfolojisini gösteren Nissl skorunu kontrol grubuna göre artırmış, HE boyası ile gösterilen nekrotik hücre yüzde ortalamalarını kontrol grubuna göre azaltmış, Kaspaz-3 boyası ile gösterilen apoptotik hücre yüzde ortalamalarını kontrol grubuna göre azaltmıştır. Bu etkilerin hiç biri diğer tedavi gruplarından anlamlı derecede farklı değildir. Hipokampus boyutu bu grupta kontrole göre anlamlı derecede büyüktür.

## **ÖZET:**

### **GİRİŞ VE AMAÇ:**

HİE'nin temel mekanizmaları anlaşıldıkça tedavi yöntemleri de deneysel modellerden öğrenilerek uygulamaya geçirilecektir. Bu çalışmada tiroid hormonunun beyin dokusu oluşumunda kanıtlanmış geliştirici etkisinin yanında hipoksi sonrası durumda EPO ilişkili veya EPO' dan bağımsız mekanizmalarla sinir dokusunun hipoksiden korunması ile bir ilişkisi olup olmadığı araştırılmıştır.

### **GEREÇ VE YÖNTEM:**

7 günlük toplam 24 sıçan çalışmaya alındı ve sırayla kontrol grubu (n:6), T<sub>4</sub> (n:6), EPO (n:6), EPO+ T<sub>4</sub> (n:6) olarak ayrıldı. Tüm sıçanların sol karotis arterleri bağlandıktan sonra 1 saat boyunca %8 oksijen, %92 azot karışımı bulunan kapta hipoksiye uğrattıldı. Hipoksi oluşumundan 30 dakika sonra EPO grubuna EPO 1000 u/kg i.p. EPO+ T<sub>4</sub> grubuna EPO 1000 u/kg ve L-tiroksin 3 µg/100 g. i.p. , T<sub>4</sub> grubuna L-tiroksin 3,6 µg/100 g i.p. uygulandı. Kontrol Grubuna 0,2 ml %0,9 NaCl serum fizyolojik verildi. Postnatal 7. günde hayvanlar öldürülerek beyinleri HE, Nissl ve Kaspaz-3 boyamaları ile incelendi. Histolojik inceleme Hipokampus CA1, CA2, CA3 ve paryetal korteks bölgelerinde yapıldı. Bütün incelemeler 40X objektifle her sıçan için 6 ayrı kesit kullanılarak yapıldı.

### **BULGULAR:**

EPO, incelenen tüm beyin bölgelerinde Nissl skorunu kontrol grubuna göre artırdı, HE boyası ile gösterilen nekrotik hücre yüzde ortalamalarını azalttı, Kaspaz-3 boyası ile gösterilen apoptotik hücre yüzde ortalamalarını kontrol grubuna göre azalttı. EPO grubunda hipokampus boyutu kontrole göre anlamlı derecede büyüktü.

T<sub>4</sub> tedavisi, incelenen tüm beyin bölgelerinde sağlıklı sinir hücresi morfolojisini gösteren Nissl skorunu kontrol grubuna göre artırdı, HE boyası ile gösterilen nekrotik hücre yüzde ortalamaları sağ CA1 bölgesinde yüksek, sol CA3 bölgesinde düşük, diğer bölgelerde farksızdı. Kaspaz-3 ile gösterilen apoptotik hücre yüzde ortalamaları sağ paryetal kortekste kontrole göre farksız, diğer bölgelerde kontrol grubuna göre az bulundu. T<sub>4</sub> grubunda hipokampus boyutu kontrole göre anlamlı derecede büyüktü.

EPO+ T<sub>4</sub>, incelenen tüm beyin bölgelerinde Nissl skorunu kontrol grubuna göre artırdı, HE boyası ile gösterilen nekrotik hücre yüzde ortalamalarını kontrol grubuna göre azalttı, Kaspaz-3 boyası ile gösterilen apoptotik hücre yüzde ortalamalarını kontrol grubuna göre azalttı. Bu etkilerin hiç biri diğer tedavi gruplarından anlamlı derecede farklı değildi. EPO+ T<sub>4</sub> grubunda hipokampus boyutu kontrole göre anlamlı derecede büyüktü.

#### SONUÇLAR:

Tiroksin hipoksik iskemik ensefalopati oluşturulmuş sıçan beyinlerinde kontrollere göre sağlıklı nöron sayısının artmasına, apoptotik hücre sayısının da azalmasına yol açmaktadır.

Eritropoetin hipoksik iskemik ensefalopati oluşturulmuş sıçan beyinlerinde kontrollere göre sağlıklı nöron sayısının artmasına, nekrotik ve apoptotik hücre sayısının da azalmasına yol açmaktadır..

Tiroksin ve eritropoetin birlikte kullanıldığında hipoksik iskemik ensefalopati oluşturulmuş sıçan beyinlerinde kontrollere göre sağlıklı nöron sayısının artmasına, nekrotik ve apoptotik hücre sayısının da azalmasına yol açmaktadır. Tiroksin ve eritropoetin tedavide kullanılabilir yeni bir seçenek olarak umut vermektedir ve ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

## **ABSTRACT:**

### Introduction:

Treatment modalities will be applied to the clinic use with better understanding of cell injury mechanisms derived from experimental models of hypoxic ischemic encephalopathy. In our study we examined the neuroprotective and antiapoptotic effects of thyroxine, erythropoietin and both thyroxine and erythropoietin treatment in hypoxic-ischemic rat brains.

### Material and methods

Postnatal seven-day-old rats are taken to four groups (control:6, epo:6, t4: 6, epo+t4:6). One hour of hypoxia with 92%nitrogen and 8%Oxygen mixture immediately following unilateral left carotid artery ligation was done. After one hour of hypoxia, rHuEpo one bolus dose (1000 U/kg) was given to EPO group intraperitoneally (i.p.), l-thyroxine (3,6 mcg/100g/day, daily) given to t4 group i.p. and rHuEpo one bolus dose (1000 U/kg) and l-thyroxine (3,6 mcg/100g/day) daily were given to t4+EPO group intraperitoneally (i.p.). At postnatal day 14, rat brains were taken out and embedded to parafine blocks. Hematoxylen – Eosin stain, Nissl stain and caspase-3 ab marker immunochemistry stain was performed all brain slides. Necrotic cells are identified and counted from H&E stained brain slides, Nissl quantity of neurons are demonstrated from Nissl stained brain slides and apoptotic cell counts made from caspase-3 antibody immunohistochemistry stained slides. Parietal cortex and hippocampus CA1, CA2,CA3 areas were examined. Necrotic cells,Nissl scores and apoptotic cells were examined at 6 crosscuts in right and left hemispheres for each rat with 40X objective. Four groups were compared with Kruskal-Wallis and Mann Whitney-U tests.



## Results:

In EPO group, Nissl scores were increased, necrotic cell average scores were reduced and apoptotic cell counts were reduced in all areas of the brain, compared with the control group.

T4 treatment augmented Nissl scores in all areas of the brain, compared with the control group. T4 treatment reduced apoptotic cells in all areas of the brain except right parietal cortex area, compared with the control group. Thyroxin therapy reduced necrotic cell average scores only in left CA3 area compared with the control group. Thyroxin therapy was augmented necrotic cell average scores of right hippocampus CA1 area compared with the control group.

EPO+T4 treatment augmented Nissl scores, reduced necrotic cell average scores and apoptotic cell counts in all areas of the brain, compared with the control group.

Both EPO, T4 and EPO+T4 treatments were augmented hippocampal length, compared with control group.

## Conclusion:

Both EPO, T4 and EPO+T4 treatment were reduced apoptotic cell count, and augmented neural Nissl score of hypoxic-ischemic rat brains.

## KAYNAKLAR

1. Stoll BJ, Kliegman RM. Hypoxia – ischemia. In: Behrman R, Kliegman R, Jenson H (eds) *Nelson Textbook of Pediatrics*, (17th ed.) Philadelphia : WB Saunders Co. 2004:566-8.
2. Vanucci RC, Perlman JM. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 1997;**100**:1004-14
3. Yoon BH, Romero R, Yang SH, Jun JK, Kim IO, Choi JH, Syn HC. Interleukin-6 concentrations in umbilical cord plasma are elevated in neonates with white matter lesions associated with periventricular leukomalacia. *Am J Obstet Gynecol.* 1996 ;**174**:1433-40.
4. Schultz C, Temming P, Gembruch U, Strunk T, Bucszy P. Polyclonal intravenous immunoglobulin to prevent brain injury in preterm infants. *Lancet* 2002;**359**:522–3.
5. Schultz C, Rott C, Temming P, Schlenke P, Moller JC, Bucszy P. Enhanced interleukin-6 and interleukin-8 synthesis in term and preterm infants. *Pediatr Res* 2002;**51**:317–22
6. Dammann O, Leviton A. Brain damage in preterm newborns: biological response modification as a strategy to reduce disabilities. *J Pediatr* 2000;**136**:433–8.
7. Juul S. Erythropoietin in the central nervous system, and its use to prevent hypoxic--ischemic brain damage. *Acta Paediatr Suppl* 2002;**438**:36–42
8. Vannucci SJ, Hagberg H. Hypoxia–ischemia in the immature brain, *J Exp Biol*; 2004; **207**:3149-3154
9. Vanucci RC, Palmer C. Hypoxia-ischemia: Neuropathology, pathogenesis and management. In: Fanaroff AA, Martin RJ (eds) *Neonatal Perinatal Medicine* (9th ed) Philadelphia. Mosby Year Book,1997;847-867
10. Cheng Y, Gidday JM, Yan Q, Shah AR, Holtzman DM. Marked age-dependent neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor against neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Ann Neurol.* 1997; **41**:521-9
11. Gluckman P, Klempt N, Guan J, Mallard C, Sirimanne E, Dragunow M, Klempt M, Singh K, Williams C, Nikolics K. A role for IGF-1 in the rescue of

- CNS neurons following hypoxic-ischemic injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; **182**:593-9.
12. Holtzman DM, Sheldon RA, Jaffe W, Cheng Y, Ferriero DM. Nerve growth factor protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Ann Neurol.* 1996 **39**:114-22
  13. Nozaki K, Finklestein SP, Beal MF. Basic fibroblast growth factor protects against hypoxia-ischemia and NMDA neurotoxicity in neonatal rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1993 ;**13**:221-8.
  14. Blomgren K, Zhu C, Wang X, Karlsson JO, Leverin AL, Bahr BA, Mallard C, Hagberg H. Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"? *J Biol Chem.* 2001 **276**:10191-8.
  15. Cheng Y, Deshmukh M, D'Costa A, Demaro JA, Gidday JM, Shah A, Sun Y, Jacquin MF, Johnson EM, Holtzman DM. Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *J Clin Invest.* 1998 **101**:1992-9
  16. Quinn L. Deveraux, Henning R. Stennicke, Guy S. Salvesen, John C. Reed, Endogenous Inhibitors of Caspases, *J Clin Immun* ;1999;**19**, :388 - 398
  17. Zhu C, Qiu L, Wang X, Hallin U, Cande C, Kroemer G, Hagberg H, Blomgren K. Involvement of apoptosis-inducing factor in neuronal death after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *J Neurochem.* 2003 ;**86**:306-17.
  18. Wang X, Zhu C, Wang X, Hagberg H, Korhonen L, Sandberg M, Lindholm D, Blomgren K. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) protein protects against caspase activation and tissue loss after neonatal hypoxia-ischemia. *Neurobiol Dis.* 2004 ;**16**:179-89.
  19. Juul SE, Anderson DK, Li Y, Christensen RD. Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res.* 1998;**43**:40-9.
  20. Maier RF, Bohme K, Dudenhausen JW, Obladen M. Cord blood erythropoietin in relation to different markers of fetal hypoxia. *Obstet Gynecol* 1993; **81**:575–80

21. Buescher U, Hertwig K, Wolf C, Dudenhausen JW. Erythropoietin in amniotic fluid as a marker of chronic fetal hypoxia. *Int J Gynaecol Obstet* 1998;**60**:257–63
22. Siren AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Bruck W, Ehrenreich H. Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol* 2001;**101**:271–6.
23. Aydin A, Genc K, Akhisaroglu M, Yorukoglu K, Gokmen N, Gonullu E. Erythropoietin exerts neuroprotective effect in neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Dev.* 2003 ;**25**:494-8.
24. Spandou E, Soubasi V, Papoutsopoulou S, Karkavelas G, Simeonidou C, Kaiki-Astara A, Guiba-Tziampiri O. Erythropoietin prevents hypoxia/ischemia-induced DNA fragmentation in an experimental model of perinatal asphyxia. *Neurosci Lett.* 2004;**366**:24-8.
25. Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 14;**95**:4635-40.
26. Brown RS: The thyroid gland. In: Brook CGD, Hindmarsh PC (eds.): *Clinical Pediatric Endocrinology*, 4th ed, Oxford, Blackwell Science Ltd.; 2001:288-321.
27. Fandrey J, Pagel H, Frede S, Wolff M, Jelkmann W: Thyroid hormones enhance hypoxia-induced erythropoietin production in vitro. *Exp Hematol.* 1994; **22**:272-7.
28. Zayour D, Azar ST, Azar N, Nasser M, Obeid M, Mroueh S, Dbaibo GS, Bitar FF. Endocrine changes in a rat model of chronic hypoxia mimicking cyanotic heart disease. *Endocr Res.* 2003;**29**:191-200.
29. Pereira DN, Procianoy RS: Effect of perinatal asphyxia on thyroid-stimulating hormone and thyroid hormone levels. *Acta Paediatr.* 2003;**92**:339-45.
30. Muller Y, Rocchi E, Lazaro JB, Clos J. Thyroid hormone promotes BCL-2 expression and prevents apoptosis of early differentiating cerebellar granule neurons. *Int J Dev Neurosci.* 1995;**13**:871-85.

31. Singh R, Upadhyay G, Godbole MM Hypothyroidism alters mitochondrial morphology and induces release of apoptogenic proteins during rat cerebellar development. *Endocrinol.* 2003;**176**:321-9
32. Royer C, Lachuer J, Crouzoulon G, Roux J, Peyronnet J, Mamet J, Pequignot J, Dalmaz Y. Effects of gestational hypoxia on mRNA levels of GluT3 and GluT4 transporters, hypoxia inducible factor-1 and thyroid hormone receptors in developing rat brain. *Brain Res.* 2000 **856**:119-28.
33. Wood NS, Marlow N, Costeloe K, Gibson AT, Wilkinson AR. Neurologic and developmental disability after extremely preterm birth.. *N Engl J Med* 2000;**343**:378–84.
34. Vannucci RC. Hypoxic-ischemic encephalopathy. *Am J Perinatol* 2000;**17**:113–20.
35. World Health Organization:Perinatal mortality:A listing of available information, FRH / MSM 96-7; 1996
36. World Health Organization:Mother-baby package:implementing safe motherhood in countries. Maternal health and safe motherhood programme. WHO, FHE / MSM/ 94-11;1994
37. T.C. Sağlık Bakanlığı AÇS-AP Genel Müdürlüğü:Üçüncü bin yıla başlarken anne ve çocukların durumu, 2000
38. Berger R, Garnier Y. Perinatal brain injury. *J Perinatol Med* 2000;**28**:261-85
39. Barks JD, Silverstein FS. Excitatory aminoacids contribute to the pathogenesis of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Pathol* 1992;**2**:235-43
40. Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory aminoacids as a final common pathway for neurologic disorders damage after perinatal asphyxia. *New Eng J Med* 1994; **330**:613-22
41. Felmann V, Raivio KO. Reperfusion injury as the mechanism of brain damage after perinatal asphyxia. *Pediatr Res* 1997;**41**:599-606
42. Zipursky A, Johnston MV, Ishida A, Nakajima W. Neurobiology of hypoxic ischemic injury in the developing brain. *Pediatr Res* 2001;**49**:735-41
43. Taylor DL, Edwards AD, Mehmet H. Oxidative methabolism, apoptosis and perinatal brain injury. *Brain Pathology* 1999;**9**:93-117

44. Apak R, Anlar B. Santral sinir sistemi gelişimi ve programlanmış hücre ölümü (apoptoz). *Anadolu Tıp Dergisi* 1999;**2**:118-123
45. Nagai A, Nakagawa E, Choi HB, Hatori K, Kobayashi S, Kim SU. Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;**60**:386–92
46. Digicaylioglu M, Bichet S, Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Bauer C, Gassmann M. Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;**92**:3717-20.
47. Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R. A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem.* 1994;**269**:88-93.
48. Strunk T, Haertel C, Schultz C, Does erythropoietin protect the preterm brain? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004;**89**:F364
49. Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, Sato K, Otsuka H, Sakaki S, Masuda S, Sasaki R. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;**253**(1):26-32
50. Agnello D, Bigini P, Villa P, Mennini T, Cerami A, Brines ML, Ghezzi P. Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res* 2002;**952**:128–34.
51. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:10526–31
52. Digicaylioglu M, Garden G, Timberlake S, Fletcher L, Lipton SA. Acute neuroprotective synergy of erythropoietin and insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 ;**101**:9855-60. Epub 2004 Jun 21.
53. Siren AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P. Erythropoietin prevents neuronal

- apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;**98**:4044–9.
54. Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF- $\kappa$ B signalling cascades. *Nature* 2001;**412**:641–3.
55. Assandri R, Egger M, Gassmann M, Niggli E, Bauer C, Forster I, Gorlach A. Erythropoietin modulates intracellular calcium in a human neuroblastoma cell line. *J Physiol* 1999;**516**:343–52
56. Genc S, Kuralay F, Genc K, Akhisaroglu M, Fadiloglu S, Yorukoglu K, Fadiloglu M, Gure A. Erythropoietin exerts neuroprotection in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated C57/BL mice via increasing nitric oxide production. *Neurosci Lett* 2001;**298**:139–41
57. Chattopadhyay A, Choudhury TD, Bandyopadhyay D, Datta AG. Protective effect of erythropoietin on the oxidative damage of erythrocyte membrane by hydroxyl radical. *Biochem Pharmacol* 2000;**59**:419–25.
58. Kristal B, Shurtz-Swirski R, Shasha SM, Manaster J, Shapiro G, Furmanov M, Hassan K, Weissman I, Sela S. Interaction between erythropoietin and peripheral polymorphonuclear leukocytes in hemodialysis patients. *Nephron* 1999;**81**:406–13
59. Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, Nico B, Roncali L, Dammacco F. Human erythropoietin induces a proangiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood* 1999;**93**:2627–36
60. Yamaji R, Okada T, Moriya M, Naito M, Tsuruo T, Miyatake K, Nakano Y. Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA. *Eur J Biochem* 1996;**239**:494–500
61. Brook CGD: The Thyroid Gland. *Clinical Paediatric Endocrinology*. Third Edition, 1985;397-435
62. Adams LM, Emery JR, Clark SJ, Carlton EI, Nelson JC. Reference range for newer thyroid function tests in premature infants. *J Pediatr* 1995;126:122-7.

63. LaFranchi S. Disorders of the thyroid gland.. In: Behrman R, Kliegman R, Jenson H (eds) *Nelson Textbook of Pediatrics*, (17th ed.) Philadelphia : WB Saunders Co. 2004: 1870-1890.
64. Klein AH, Oddie TH, Parslow M, Foley TP Jr, Fisher DA. Developmental changes in pituitary-thyroid function in the human fetus and newborn. *Early Human Dev* 1982; 6:321
65. Fischer DA. Euthyroid low thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) states in prematures and sick neonates. *Pediatr Clin North Am* 1990;37:1297-312.
66. Kodama S, Mori Y, Miyoshi M, Kobayashi K, Komatsu M, Nakao H, Sakurai T. Thyroid function in premature infants. *Kobe J Med Sci* 1992 38: 109-16
67. Chen JY: Thyroid function in healthy and sick neonates. *Chung Hua I Tsa Chih* 1994 **54**:51-6
68. Behnam-Rassoli M, Herbert LC, Howard V, Pharoah PO, Stanisstreet M. Effect of propylthiouracil treatment during prenatal and early postnatal development on the neocortex of rat pups. *Neuroendocrinology*. 1991;**53**:321-7.
69. Sui L, Gilbert ME. Pre- and postnatal propylthiouracil-induced hypothyroidism impairs synaptic transmission and plasticity in area CA1 of the neonatal rat hippocampus. *Endocrinology*. 2003 ;**144**:4195-203.
70. Alvarez-Dolado M, Ruiz M, Del Rio JA, Alcantara S, Burgaya F, Sheldon M, Nakajima K, Bernal J, Howell BW, Curran T, Soriano E, Munoz A. Thyroid hormone regulates reelin and dab1 expression during brain development. *J Neurosci*. 1999;**19**:6979-93.
71. Huang XW, Zhao ZY, Ji C. Effects of hypothyroidism on apoptosis and the expression of Bcl-2 and Bax gene in the neonatal rat hippocampus neurons. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2005; **43**:48-52.
72. D'Ercole AJ, Ye P, Calikoglu AS, Gutierrez-Ospina G. The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system. *Mol Neurobiol*. 1996 ;**13**:227-55.



73. Elder DA, Karayal AF, D'Ercole AJ, Calikoglu AS. Effects of hypothyroidism on insulin-like growth factor-I expression during brain development in mice. *Neurosci Lett.* 2000 ;**293**:99-102.
74. Russo VC, Gluckman P, Feldman EL, Werther GA. The Insulin – like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. *Endocr Rev.* 2005 **30**; epub.
75. Rami A, Krieglstein J. Thyroxine attenuates hippocampal neuronal damage caused by ischemia in the rat. *Life Sci.* 1992;**50**:645-50.
76. Wen TC, Sadamoto Y, Tanaka J, Zhu PX, Nakata K, Ma YJ, Hata R, Sakanaka M. Erythropoietin protects neurons against chemical hypoxia and cerebral ischemic injury by up-regulating Bcl-xL expression. *J Neurosci Res.* 2002;**67**:795-803.
77. Nolan LA, Thomas CK, Levy A. Permissive effects of thyroid hormones on rat anterior pituitary mitotic activity. *J Endocrinol.* 2004;**180**:35-43.
78. Ramos S, Goya L, Alvarez C, Martin MA, Pascual-Leone AM. Effect of thyroxine administration on the IGF/IGF binding protein system in neonatal and adult thyroidectomized rats. *J Endocrinol.* 2001;**169**:111-22.
79. Chan K and Lowe J: Techniques in neuropathology. Chapter: 18, Edited by: Bancroft JD and Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques.*(5 th ed). Churchill Livingstone. New York, Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, San Francisco, Tokyo.2002; 374-75.
80. Nogami M, Takatsu A, Endo N, Ishiyama I. Immunohistochemistry of neuron-specific enolase in neurons of the medulla oblongata from human autopsies, *Acta Histochem*, **100**, 371-382; 1998
81. Kon Y, Endoh D, Yamashita T, Watanabe T. Expression of renin in the rat liver. *Anat Histol Embryol.* 1998;**27**:111-8
82. Manesse M, Delverdier M, Abella-Bourges N, Sautet J, Cabanie P, Schelcher F. An immunohistochemical study of bovine palatine and pharyngeal tonsils at 21, 60 and 300 days of age. *Anat Histol Embryol.* 1998 ;**27**:179-85.
83. Palkovits M and Brownstein M: Maps and Guide to microdissection of the rat brain. New York, Amsterdam, London. Elsevier Science Publishing Co., Inc. 1988

84. Paxinos G and Watson C: The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego, Boston, New York, London, Sydney, Tokyo, Toronto, 1994.
85. Tan A, Schulze A, O'Donnell CP, Davis PG. Air versus oxygen for resuscitation of infants at birth. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005 Apr 18; CD002273
86. Thoresen M, Whitelaw A. Therapeutic hypothermia for hypoxic-ischaemic encephalopathy in the newborn infant. *Curr Opin Neurol*. 2005; **18**: 111- 6.
87. Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, Ballard R, Edwards AD, Ferriero DM, Polin RA, Robertson CM, Thoresen M, Whitelaw A, Gunn AJ. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet*. 2005; **365**: 663- 70.
88. 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. *Pediatr Int*. 2002;**44**: 505- 9.
89. Vannucci, R. C., Towfighi, J., Heitjan, D. F. ,Brucklacher, R. M.. Carbon dioxide protects the perinatal brain from hypoxic-ischemic damage: an experimental study in the immature rat. *Pediatrics* 1995; **95**, 868- 874
90. Vannucci, R. C., Lyons, D. T. Vasta, F. Regional cerebral blood flow during hypoxia-ischemia in immature rats. *Stroke* 1988;**19**, 245- 250
91. Towfighi, J., Zec, N., Yager, J., Housman, C. Vannucci, R. C.. Temporal evolution of neuropathologic changes in an immature rat model of cerebral hypoxia: a light microscopic study. *Acta Neuropathol*. 1995;**90**, 375- 386.
92. Vannucci, R. C. ,Vannucci, S. J. A model of perinatal hypoxic ischemic brain damage. *Ann. NY Acad. Sci*. 1997;**835**, 234-249.
93. Ruscher K, Freyer D, Karsch M, Isaev N, Megow D, Sawitzki B, Priller J, Dirnagl U, Meisel A. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *J Neurosci*. 2002;**22**:10291-301
94. Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S, Akhisaroglu M, Konakc S, Ulukus C, Genc S, Genc K, Sagiroglu E, Cerami A, Brines M. Erythropoietin prevents

- motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 ;**99**:2258-63
95. Junk AK, Mammis A, Savitz SI, Singh M, Roth S, Malhotra S, Rosenbaum PS, Cerami A, Brines M, Rosenbaum DM. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 ;**99**:10659-64. Epub 2002 Jul 18
96. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, Ruther E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Siren AL. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med.* 2002 **8**:495-505.
97. Margaille I, Royer J, Lerouet D, Ramauge M, Le Goascogne C, Li WW, Plotkine M, Pierre M, Courtin F. Induction of type 2 iodothyronine deiodinase in astrocytes after transient focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005;**25**:468-76
98. Shuaib A, Ijaz S, Mazagri R, Kalra J, Hemmings S, Senthilsvivan A, Crosby N. Hypothyroidism protects the brain during transient forebrain ischemia in gerbils. *Exp Neurol.* 1994 ;**127**:119-25.
99. Dempsey RJ, Sailor KA, Bowen KK, Tureyen K, Vemuganti R. Stroke-induced progenitor cell proliferation in adult spontaneously hypertensive rat brain: effect of exogenous IGF-1 and GDNF. *J Neurochem.* 2003 ;**87**:586-97.
100. Mudrick LA, Baimbridge KG. Long-term structural changes in the rat hippocampal formation following cerebral ischemia. *Brain Res.* 1989 **493**:179-84.
101. Escobar-Morreale HF, del Rey FE, Obregon MJ, de Escobar GM. Only the combined treatment with thyroxine and triiodothyronine ensures euthyroidism in all tissues of the thyroidectomized rat. *Endocrinology.* 1996 ;**137**:2490-502.
102. Turkyilmaz C, Turkyilmaz Z, Atalay Y, Soylemezoglu F, Celasun B. Magnesium pre-treatment reduces neuronal apoptosis in newborn rats in hypoxia-ischemia. *Brain Res.* 2002 ;**955**:133-7