

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

DENEYSEL HİPOKSİK İSKEMİK ENSEFALOPATİ MODELİNDE
NEOTROFİNİN ROLÜ

DR. PINAR GENÇPINAR

UZMANLIK TEZİ

İZMİR -2011

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

DENEYSEL HİPOKSİK İSKEMİK ENSEFALOPATİ MODELİNDE
NEOTROFİNİN ROLÜ

DR. PINAR GENÇPINAR

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ABDULLAH KUMRAL

İZMİR -2011

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgilerini ve deneyimlerini bizlere aktaran, bizleri yetiştiren Dokuz Eylül Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları tez danışmanı hocam Sayın Prof. Dr. Abdullah Kumral'a, Sayın Anabilim Dalı Başkanım Prof.Dr. Hale Ören'e, çok değerli hocalarıma ve uzmanlarıma; uzun, zorlu ve bir o kadar da keyifli geçen uzmanlık eğitimim süresince iyi ve kötü anlarımı paylaştığım ve kendilerinden çok şey öğrendiğim asistan arkadaşlarıma; tüm yaşamım boyunca karşılıksız desteklerini ve sevgilerini her zaman gösteren aileme; asistanlık sürecimde gösterdiği sonsuz özveri, şefkat ve desteği nedeniyle eşim Dr. Tuğra Gençpınar'a;

Sonsuz Teşekkürler...

KISALTMALAR

ADH.....	Antidiüretik hormon
AIT-082.....	Neotrofin
ALT.....	Alanin aminotransferaz
AST.....	Aspartat aminotransferaz
ATP.....	Adenosin trifosfat
BDNF.....	Beyin-derive nörotrofik faktör
BOS.....	Beyin-omurilik sıvısı
BT.....	Bilgisayarlı tomografi
CK.....	Kreatinin kinaz
CKBB.....	Kreatin kinaz beyin izoenzimi
DNA.....	Deoksiribonükleik asit
EEG.....	Elektroensefalografi
GABA.....	Gamma amino butirik asit
HİE.....	Hipoksik İskemik Ensefalopati
LDH.....	Laktat dehidrogenaz
MRG.....	Manyetik rezonans görüntüleme
NGF.....	Sinir büyüme faktörü
NIH.....	National Institutes for Health
NT-3.....	Nörotrofin-3
NT-4.....	Nörotrofin-4
USG.....	Ultrasonografi
Trk.....	Tropomiyozin-ilişkili kinaz

İÇİNDEKİLER

1.ÖZET.....	6
2. SUMMARY.....	7
3. GİRİŞ ve AMAÇ.....	8-9
4. GENEL BİLGİLER.....	9-19
5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	19-24
6. SONUÇLAR.....	24-36
7. TARTIŞMA.....	36-38
8. KAYNAKLAR.....	37-45

ÖZET

DENEYSEL HİPOKSİK İSKEMİK ENSEFALOPATİ MODELİNDE

NEOTROFİNİN ROLÜ

Dr. Pınar Gençpınar, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları

Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye (dr.dmrl@yahoo.com)

Hipoksik iskemik ensefalopati, sistemik hipoksi ve serebral kan akımının azalması ile oluşan beyin hasarıdır. Konvülsiyon, mental retardasyon, serebral palsi ve diğer birçok nörolojik defisite neden olabilir. Tıp dünyasındaki ve teknolojiadaki gelişmelere rağmen günümüzde halen nörolojik morbidite ve mortalitenin en önemli nedeni olmaya devam etmektedir. Sinir dokusunun rejenerasyon yeteneği azdır. Bununla beraber beyin dokusundan salınan ve nörotrofin denilen bir grup maddenin sinir hücrelerinin çoğalmasında ve rejenerasyonunda önemli role sahip olduğu bilinmektedir. Biz de hipoksik iskemik ensefalopati modelinde sinir nörotrofik faktör agonisti olan neotrofinin santral sinir sistemi üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçladık. Bu nedenle postnatal 7. gününde olan 21 tane wistar-albino suşu sıçanda hipoksik iskemik beyin hasarı modeli oluşturuldu ve tedavi grubuna intraperitoneal yol ile neotrofin uygulandı. Çalışmamızın sonucunda neotrofinin, hipokampus, prefrontal ve parietal kortekste hipoksi-iskemi sonucu gelişen nöronal hücre kaybını ve apoptotik hücre indeksini azalttığı saptandı. Bu çalışma, yenidoğan hipoksik iskemik beyin hasarı modelinde yapılmış olan ve neotrofinin nöroprotektif ve antiapoptotik etkisini gösteren ilk çalışmadır. Sonuçlar değerlendirildiğinde neotrofin, mortalitesi ve morbiditesi çok yüksek olan hipoksik iskemik ensefalopatinin tedavisinde umut ışığı olabilir.

Anahtar sözcükler: neotrofin, yenidoğan, hipoksik iskemik beyin hasarı

ABSTRACT

ROLE OF NEOTROFIN IN EXPERIMENTAL HYPOXIC ISCHEMIC ENCEPHALOPATHY MODEL

Dr. Pinar Gencpinar, 9 Eylul University Faculty of Medicine, Department of Pediatrics,
Izmir, Turkey (dr.dmrl@yahoo.com)

Hypoxia-ischemia is a major cause of perinatal brain injury in the newborn, leading to death or lifelong sequel such as cerebral palsy, mental retardation, learning disability and epilepsy. Despite developments in cardiopulmonary resuscitation, nursing and ventilation techniques, it still continues to be the most important cause of neurological morbidity and mortality. Regeneration ability of nerve tissue is limited. However, it is known that a group of agents called as neurotrophin released from brain tissue plays an important role in cell reproduction and regeneration. We also aimed at investigating effects of neotrofin, a nerve neurotrophic factor agonist, on central nervous system in hypoxic-ischemic encephalopathy model. Therefore, hypoxic-ischemic brain injury model was formed in 21 Wistar-albino rat pups at their postnatal 7th day and intraperitoneal neotrofin was applied to treatment group. We found that neotrofin attenuates hypoxia-ischemia induced with neuronal density of hippocampus, prefrontal and parietal cortex, decreased apoptotic cell index in the same regions in this experimental study. These data suggest that a 60 mg/kg single dose of neotrofin can produce neuroprotective and anti-apoptotic effects in the neonatal hypoxic-ischemic brain. This is the first experimental demonstration that has shown the effects of neotrofin in the newborn rat brain. Given our results, neotrofin may be useful in reducing brain injury and possessing clinical relevance for the treatment of hypoxic-ischemic encephalopathy in the newborn.

Key words: : neotrofin, newborn, hypoxic-ischemic brain injury

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Hipoksik iskemik ensefalopati (HİE), fetus ve yenidoğan bebekte, plasental ve pulmoner gaz değişiminin bozulması sonucunda sistemik hipoksi ve serebral kan akımının azalması ile oluşan beyin hasarı olarak tanımlanabilir (1).

Hipoksik iskemik ensefalopati; çocuklarda konvülsiyon, mental retardasyon, serebral palsi ve diğer birçok nörolojik defisite neden olabilen bir durumdur. Tıp dünyasındaki ve teknolojiadaki gelişmelere rağmen günümüzde de nörolojik morbidite ve mortalitenin en önemli nedeni olmaya devam etmektedir (2).

Hipoksik iskemik ensefalopatinin sıklığı term canlı yenidoğanlarda 1-3/1000 olarak bildirilmektedir (3). Etkilenmiş bebeklerin %15-20'si postnatal dönemde kaybedilmekte; %25'inde ise motor-mental retardasyon, görme bozuklukları, hiperaktivite, serebral palsi ve epilepsi gibi ciddi nörolojik sekel oluşmaktadır (4). Prognoz hipoksinin şiddeti, süresi, yenidoğanın gestasyonel yaşı, beyin hasarının yeri, metabolik ve kardiyopulmoner komplikasyonlara bağlıdır (5).

Oksijensizlik durumunda hipoksinin derecesine göre tüm organlar etkilenir ve etkilenen organlar içinde de en duyarlı olanı beyindir. Oksijensizliğe bağlı beyinde gelişen olaylar, hipoksik iskemik ensefalopati olarak adlandırılır. HİE; %50 oranında antepartum, %40 oranında intrapartum ve %10 oranında da postpartum dönemde görülür (6).

Günümüzde yeterli donanım ile başarılı kardiyopulmoner resüsitasyon uygulanması, iyi bakım ve gelişmiş ventilasyon teknikleri ile bile kalıcı hasara ve nöronal dokunun kaybına engel olunamamaktadır. Böylece nöronal dokuda tamir mekanizmalarını harekete geçirebilecek ya da güçlendirebilecek yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç vardır. Sinir dokusunun rejenerasyon yeteneğinin az olduğu bilinmekle beraber, beyin dokusundan salınan nörotrofinler denen bir grup maddenin, sinir hücrelerinin çoğalmasında ve rejenerasyonunda

önemli role sahip olduğu bilinmektedir. Başka bir deyişle hasar görmüş nöron hücrelerinin yaşam süresi nörotrofinlerle ilişkilidir (7).

Son yıllarda plastisiteyi arttırmak, nöronal iyileşmeyi hızlandırmak, hasarın sınırlandırılması ve beyin dokusunun kaybının önlenmesi tedavide esas amaç haline gelmiştir.

Biz de hipoksik iskemik ensefalopati modelinde sinir nörotrofik faktör agonisti olan neotrofinin, hipoksik iskemik ensefalopati modelinde nöroprotektif etkilerini araştırmayı amaçladık.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 Tanımlar

Hipoksi, arteriyel oksijen konsantrasyonunun normalden daha az olmasını ifade eder. İskemi, hücre ve organların normal fonksiyonlarını sürdürebilmesi için gerekli olan kan akımındaki azalmadır. Asfikside temel bozukluk, hipoksi-iskemik hasarlanma ve bunun sonucunda gelişen hiperkapni ve asidozun oluşmasıdır.

Perinatal asfiksi, hipoksi ve iskeminin bir arada görüldüğü bir durumdur. Anne, fetüs ve plasentadan oluşan biyolojik ünitenin veya postpartum pulmoner gaz değişiminin bozukluğuna bağlı olarak fetüs veya yenidoğanda hipoksemi, hiperkapni ve asidoz ile birlikte olan klinik depresyon tablosu olarak tanımlanabilir.

Plastisite: İlk kez 1890 yılında tanımlanmıştır. O dönemde insanların davranışlarının hayatlarındaki anlamlı değişikliklerle biçimlendiği ve değiştiği gözlenmiş ve buna 'Davranışsal Plasitisite' adı verilmiştir. Başka bir deyişle santral sinir sisteminin çevresel uyarılara göre cevap değiştirme yeteneğine plastisite denir. Öğrenme, beynin yüksek dereceli plastisite yeteneğidir ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) gen ekspresyonunun arttırılmasıyla gerçekleşir (8).

Nörotrofinler: Nöronal gelişim, diferansiyasyon, fonksiyon ve plastisitede anahtar rolleri vardır. Beyin kaynaklı nörotrofik faktör, sinir büyüme faktörü (NGF), nörotrofin-3 (NT-3) ve

nörotrofin-4 (NT-4) başlıca nörotrofinler arasında sayılabilir. Etkilerini 2 farklı reseptör üzerinden gösterirler. Tirozin kinaz reseptör ailesinden olan tropomyozin ilişkili kinaz (Trk) reseptörlerine yüksek afinite, tümör nekrozis faktör ailesinden olan p75NTR reseptörüne düşük afinite ile bağlanırlar (9).

Tropomyozin ilişkili kinaz reseptör ailesinde TrkA, TrkB ve TrkC bulunur. Örneğin NGF TrkA reseptörüne, BDNF ve NT-4 TrkB reseptörüne, NT-3 TrkC reseptörüne daha özgül bağlanır. Bununla beraber her nörotrofin p57NTR reseptörüne bağlanabilir. Nörotrofinler reseptörlere direkt bağlanırlar ve Trk reseptörlerini dimerize ederler. Bu işlem sitoplazmik tirozin rezidülerinde fosforilasyonla sonuçlanır. Bu aşamadan sonra 3 sinyal kaskadı tanımlanmıştır. Bunlar; Ras/ERK (ekstraselüler sinyal-ayarlı kinaz) yolu, PI-3(fosfatidilinositol-3) yolu ve PLC-gama (fosfolipaz c) yoludur (10).

AIT-082 diğer adıyla neotrofin, bir hipoksantin derivesidir ve sinir büyüme faktörü agonistidir. Beyin kaynaklı nörotrofik faktör, nörotrofin-3, glial nörotrofik faktör, fibroblast nörotrofik faktör gibi faktörlerin astrositlerde hem sentezini hem salgılanmasını artırır ve etkilerini güçlendirir (11,12). 1994 yılından bu yana yapılan çalışmalarda sıçanlarda kognitif fonksiyonları arttırdığı, uzun ve yakın dönem bellek üzerine olumlu etkilerinin olduğu saptanmıştır. İn vitro çalışmalarda PC12 hücreleri ve hipokampal nöronlarda hücre çoğalmasını stimüle ettikleri kanıtlanmıştır. Yine in vitro çalışmalarda, glutamatın hipokampal nöronlardaki toksik etkisine karşı nöroprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir (13). Deneysel spinal kord hasarı oluşturularak yapılan bir çalışmada da neotrofinin; glial hücre aktivasyonunu azalttığı, daha az doku nekrozu ve kavitasyon oluşturduğu ve hücre sayılarında artışa neden olduğu görülmüştür. Başka bir çalışmada, arekolin ile tremor oluşturulmuş sıçanlarda neotrofinin yedi gün süreyle kullanılması sonucunda patolojik değişikliklerde gerileme olduğu, özellikle dopaminerjik ve hipokampal nöronların korunduğu saptanmıştır (14). Benzer nöroprotektif etki 'kainat' ile oluşturulan beyin hasarında da gösterilmiştir (15).

Son yıllarda Alzheimer gibi özellikli bir hastalık grubunda, öğrenme ve hafıza fonksiyonlarını iyileştirmede gelecek vadeden tedavi yaklaşımları içine girmiştir. Faz 2 çalışmalarında oral olarak iyi tolere edildiği, kan-beyin bariyerini hızlıca ve metabolize olmadan geçtiği ve ılımlı-hafif Alzheimer hastalarında belleği güçlendirdiği gözlemlenmiştir (16).

4.2 İnsidans

Perinatal asfiksi sıklığı toplumlarda değişiklik göstermektedir. Genel olarak insidans 1000 canlı doğumda 1-6 olarak bildirilmektedir (17). Sağlık bakanlığı verilerine göre her yıl doğan 1000 bebekten 1'i asfiksi nedeniyle kaybedilmektedir. Hayatta kalan ancak asfiksiye maruz kalan bebek sayısı net değildir bu nedenle gerçek insidansın daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Dünya sağlık örgütü geliştirmekte olan ülkelerdeki insidansını 8-10/1000 olarak bildirmektedir. Ülkemizde çok merkezli yapılan bir çalışmada hipoksik iskemik ensefalopati sıklığı 1000 canlı doğumda 2,3 olarak saptanmıştır (18). Ancak bu çalışma üniversite hastanelerinde yapıldığı ve devlet hastanelerini kapsamadığı için gerçek insidansı yansıtmamaktadır. Hastane dışı doğumların sık olduğu Güneydoğu Anadolu Bölgemizde ise bu oran %14,5'a çıkmaktadır (19). Kanada'da yapılan bir çalışmada ise insidans, 1000 canlı doğumda 15 olarak bildirilmiştir (20).

4.3 Etiyoloji

Perinatal asfiksi antepartum, intrapartum ve postpartum dönemde gelişebilir. Yapılan çalışmalarda farklı veriler olmasına karşın yaklaşık %90'ı antepartum ve intrapartum dönemde görülmektedir. Neonatal asfiksi ile ilgili faktörler çok değişken olabilir. Maternal diyabet, maternal enfeksiyon, kronik hipertansiyon, hızlı doğum eylemi, uzamış doğum ve erken membran rüptürü en sık görülen antepartum ve intrapartum nedenlerdir.

4.4 Patofizyoloji

Perinatal asfiksi fizyopatolojisindeki primer olay, plasentadaki yetersiz gaz değişimi sonucunda pulmoner yatakta ventilasyonun bozulmasıdır (21). Hipoksi sırasında beyindeki kan akımı, serebral vasküler direncin düşmesi sonucunda artar. Ancak hipoksi uzarsa sistemik hipotansiyon gelişeceği için serebral kan akımı azalır. Otoregölasyon sonucunda normal bir beyinde serebral kanlanma azalırsa serebral kan akımını korumak amacıyla arteriyoller hızla dilate olur. Hipoksiye maruz kalan beyin hücreleri, ortama uyum sağlayabilmek amacıyla inhibitör mediatörler [gamma amino butirik asit (GABA), glisin] salgılayarak metabolizmayı yavaşlatır.

Santral sinir sisteminde asfiksiye bağlı hücre ölümünde iki farklı faz tanımlanmıştır. İlk fazda hipoksiye sekonder olarak sitotoksik ödem oluşur ve primer hücre ölümü gerçekleşir. İkinci faz ise reperfüzyon-reoksijenizasyon fazıdır. Hipoksiye sekonder anaerobik glikoliz ön plandadır ve laktik asidoz oluşur. Bunun sonucunda adenosin trifosfat (ATP) üretimi düşer. Böylece hücre membranlarındaki Na/K pompası görevini yerine getiremez ve nöronal membranlarda depolarizasyon oluşur.

Eğer hipoksi devam ederse bütün hücreler hızlı ve belirgin bir depolarizasyona uğrarlar ve membran potansiyeli tamamen kaybolur. Nöronal membran potansiyeli kaybolduğu anda iyon dengesi bozulur. Bunlar hücre içine Na^+ , Cl^- ve Ca^{++} girişı ve hücreden K^+ çıkışıdır. Hücre içi Ca^{++} yükselir, ekstrasellüler K^+ önemli miktarda artar ve ekstrasellüler Ca^{++} , Na^+ ve Cl^- azalır. Ekstrasellüler alanda glutamat konsantrasyonunda önemli miktarda artış olur. Sonuç olarak nöronal eksitatör reseptörleri aşırı uyarılır. Glutamatın aşırı yapımı ve reseptörlerinin aşırı uyarılması hücre ölümüne katkıda bulunur (22). Hücre içi Ca artması nekrozun yol açtığı apoptozisin son aşamasıdır. İkinci faz uygunsuz laktik asidozun oluştuğu fazdır ve klinik olarak konvülsiyonların görülmesiyle tanı konur.

4.5 Nöropatoloji

Neonatal iskemik ensefalopatide görülen nöropatolojik bulgular; hipoksinin şiddetine ve süresine, infantın gestasyonel yaşına, vücut sıcaklığı ve metabolik durumuna bağlıdır (23).

Gestasyonel yaşı 36 hafta ve büyük olanlarda serebral korteks ve subkortikal gri madde etkilenirken, 36 haftadan küçük olanlarda periventriküler beyaz cevher hasarı oluşur (24).

Matür yenidoğanlarda hipoksi sonucu görülen en sık lezyon, selektif nöronal nekrozdur. İskeminin başlamasından 5-30 dakika sonra hücrelerde sitoplazmik vakuolizasyon ve mitokondriyal şişme görülür. Santral sinir sisteminde en çok etkilenen bölgeler; hipokampusun CA1 ve dentat girus bölgesindeki nöronlar, serebral korteksin derin katmanları, putamen, talamus ve serebellar purkinje hücreleridir. İskemi oluşuktan hemen sonra nöroprotektif mekanizmalar harekete geçer ve serebral ısı 2-3 derece düşer (25,26).

Nöronal ölüm iki fazda gerçekleşir. Primer hücre kaybı, hücre hipoksi sonucunda gerekli olan yüksek enerji metabolizmasının sağlanamaması ve hücre depolarizasyonu ile olur. İkincil hasar reperfüzyonun sağlanmasıyla başlar. Sekonder nöronal ölüm, hipereksitabilite ve sitotoksik ödem ile ilişkilidir ve hipoksik hasardan 6-100 saat sonra görülür. Bu dönemde sık görülen konvulsiyonlar hücre ölümüne katkıda bulunur. Bugün biliyoruz ki en önemli hasar ikinci fazda oluşur. Hücre ölümü gerçekleştikten sonra mikroglyal hücreler aktive olur ve glializasyon başlar.

Matür yenidoğanlarda sık görülen lezyonlar; selektif nöronal nekroz (en sık), parasaggital serebral hasar, status marmoratus ve fokal veya multifokal iskemik serebral nekroz olarak gösterilebilir.

Prematüre yenidoğanlarda daha sık görülen lezyonlar, hipoksiye daha duyarlı olan periventriküler beyaz cevherde oluşur. Daha büyük prematürelere ise gri cevher lezyonları da görülebilir. En sık görülen klinik durumlar; periventriküler lökomalazi, periventriküler

hemorajik lezyonlar, selektif nöronal nekroz, fokal veya multifokal iskemik serebral nekrozdur (27,28).

4.6 Klinik

Perinatal asfikside klinik oldukça değişkendir. Yukarıda da anlatıldığı gibi birçok faktörle ilişkilidir.

Bebeğin klinik durumunu hızlı bir şekilde değerlendirmemize olanak sağlayan ve ilk kez 1952 yılında tanımlanmış olan APGAR skorlama sistemi, bilim dünyasında ve klinisyenler arasında ortak dil olması bakımından önem taşımaktadır. Apgar skorlaması doğumu takiben 1, 5 ve daha nadir olarak 10 ve 20.dakikalarda değerlendirilir. Beşinci dakika Apgar skoru, nörolojik prognozun daha iyi bir göstergesidir (29). Doğum sırasında amniyon sıvısının ya da bebeğin mekonyum boyalı olması bulguları destekler. Yenidoğan tamamen normal olabilir. Ancak genellikle spontan solunum yapamaz ve hipotoniktir. Sıklıkla müdahale gerektirecek kadar siyanotik ve bradikardiktir. Beyin ödemi bulguları gelişir. Bu dönemde konvülsiyonlar başlayabilir ve genellikle tedaviye dirençlidir (30).

Klinik ilk 72 saatte çok değişken olabilir;

- İlk 12 saatlik dönemde: Bebek hipotonik ve depresedir. Solunum hareketleri düzenli ve kuvvetli değildir. Işık refleksi ve okülosefalik refleks alınır. Ciddi asfiksi gelişmiş yenidoğanlarda bu dönemde bile konvülsiyonlar görülebilir.
- 12-24 saatlik dönemde: Asfiksi çok şiddetliyse hipotonisite ve koma hali görülebilir. Ancak genellikle bu dönemde hipotonisite değil hipertonisite beklenir. Uyarılara yanıt abartılıdır. Konvülsiyonlar bu dönemde başlar. Status epileptikus gelişebilir. Apne, etkilenmiş bebeklerin yaklaşık olarak yarısında görülür.
- 24-72 saatlik dönemde: Ağır asfiktik bebekler bu dönemde daha da kötüleşir. Beyin sapı fonksiyonları azalır. Pupil ve okülosefalik refleks alınamaz. Ölüm

genelde bu dönemde görülür. Eğer bebek prematüre ise intraventriküler kanama yine bu dönemde olur ve kliniğin hızlı kötüleşmesinden sorumludur.

- 72. saatten sonraki dönemde: İlk 72 saati geçiren bebeklerde hızlı bir iyileşme gözlenir. Klinik tablo hasarın yeri ve şiddeti ile ilgili olarak değişkendir. Eğer etkilenmiş bebeğin ilk bir haftadan sonra nörolojik muayeneleri normal ise prognozunun iyi olacağı söylenebilir.

4.7 Tanı

Temel olan detaylı hikâye ve fizik muayenedir. Hipoksinin erken tanısı prognoz açısından çok önemlidir. Metabolik asidoz gelişmişse asfiksi oluşmuş demektir ve santral sinir sisteminde ve diğer organlarda geri dönüşümsüz sekeller bırakabilir. Fetus hipoksiye intrapartum maruz kalmışsa; umbilikal kord kanında pH <7.00, 5. Dakika Apgar skoru <6, fetal distress belirtileri, doğumdan sonraki ilk 24 saat içinde konvülsiyon gibi klinik bulgular ortaya çıkabilir (31). Santral sinir sistemi dışında oluşabilecek klinik durumlar; akut tübüler nekroz, hepatik nekroz, kardiyomiyopati, nekrotizan enterokolit, mekonyum aspirasyon sendromu, persistan fetal sirkülasyon, uygunsuz ADH (Antidiüretik hormon) sendromu ve adrenal yetmezliktir. Yukarıda sayılan klinik durumlar için hasta takip edilmelidir. Etkilenmenin şiddetine göre klinik bulgular ve laboratuvar bulguları değişiklik gösterebilir. Asidoz gelişmeyen; ancak etkilenmiş bebeklerde kliniğin şiddetini ve prognozu belirlemede beyin-omurilik sıvısı (BOS) incelemesi, elektroensefalografi (EEG), transfontanel ultrasonografi incelemesi, kraniyal bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG) yardımcı olur.

Asfiksili bir yenidoğanda mutlaka yapılması gerekli tetkikler ise şunlardır: Tam kan sayımı, idrar tetkiki, kan şekeri ölçümü, kan üre azotu, kreatinin, kalsiyum, fosfor, magnezyum, karaciğer fonksiyon testleri, aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), kreatinin kinaz (CK), laktat dehidrogenaz (LDH) seviyeleri,

arteriyel veya kapiller kan gazları değerlendirmeleri, kan kültürü, BOS kültürü, göğüs grafisi, USG, bilgisayarlı tomografi (BT) veya MRG ve EEG'dir.

- a. Lomber Ponksiyon: Hipoksik iskemik ensefalopatinin tanısında olmasa da ayırıcı tanı için gerekli olabilir.
- b. EEG (Elektroensefalografi): Hipoksik iskemik ensefalopati düşünülen prematür veya term yenidoğanlara nöbet aktivitesi olsun olmasın yapılması gereklidir. Hem tanısıl hem prognostik önemi vardır. Zemin aktivitesindeki burst supresyon, düşük voltaj ve elektroserebral inaktivite gibi bozukluklar, yüksek risk nörolojik sekel açısından sensitiftir (32,33).
- c. Transfontanel USG: Kolay uygulanabilmesi, ucuz ve non-invaziv olması, erken dönemde BT'den daha üstün olması nedeniyle perinatal asfikside sıklıkla kullanılır. Dezavantajları ise uygulayan kişiye bağımlı olması, parankim ve beyin sapını değerlendirmede yetersiz kalmasıdır. Akut dönemde etkilenen bölgede doppler USG ile azalmış akım saptanması tanıyı destekler. Tekrarlayan USG incelemelerinde bu bölgede tam düzelme, kısmı düzelme, hipoekojen alan, kistik değişiklikler ve proensefalik alan görülebilir (34).
- d. Kraniyal BT: Yenidoğan beyninde su içeriği fazladır ve BOS yüksek protein içerir. Bu nedenle BT'nin hipoksik iskemik ensefalopati tanısındaki yeri kısıtlıdır ve düşük sensitiviteye sahiptir. BT, hemoraji düşünülüyorsa sedasyona gerek olmadan en kısa sürede tarama yapabilmemizi sağlar. Ağır nöronal nekrozda görülen diffüz kortikal hasar, bazal ganglion ve talamus hasarı, periventriküler lökomalazi, fokal ve multifokal iskemik beyin nekrozu hakkında önemli tanısal bilgiler verir (34).
- e. Kraniyal MRG: Hipoksik iskemik hasarın görüntülenmesinde en iyi yöntemdir. Lezyonlar her evrede görüntülenebilir. Özellikle intravasküler alanda yani gri ve beyaz cevheri ayıran sınır zonundaki hasarlanmayı saptamada duyarlıdır (35). Etkilenen

alanın büyüklüğüne göre ılımlı, orta ve derin etkilenme olarak tanımlanır. Lateral talamus, posterior putamen, hipokampus ve kortikospinal traktus etkilenmişse derin etkilenmeden söz edilir.

Tanıda yardımcı olabilecek diğer belirteçler ise; astrositlerden salınan kan beyin bariyerini geçerek dolaşıma katılan Protein S100B ve kreatin kinaz beyin izoenzimi (CKBB) rahatlıkla tesbit edilebilir ve tanıda kritik önemleri vardır (36).

4.8 Evreleme

Hastalığın prognozunu belirleyebilmek için şiddetinin belirlenmesi önem taşımaktadır. Günümüzde evreleme için Sarnat ve Thompson skorlama sistemleri kullanılmaktadır (37, 38). Bu skorlama sistemlerinde genel olarak bebeğin bilinç durumu, postürü, tonusu, solunumu, moro refleksi, nöbet geçirip geçirmediği, EEG bulguları gibi bilgiler değerlendirilmektedir.

4.9 Ayırıcı tanı

Hipoksik iskemik ensefalopatili hastaların ayırıcı tanısında; sepsis, menenjit ve menengoensefalit gibi santral sinir sistemi enfeksiyonları, konjenital kalp hastalıkları, nörometabolik hastalıklar, konjenital anomaliler akla gelmelidir.

4.10 Tedavi

Obstetri ve yenidoğan alanındaki tüm bilimsel gelişmelere rağmen ilk yaklaşım her zaman hipoksiden korunmak olmalıdır. Hipoksik iskemik ensefalopati günümüz teknolojik olanakları ile bile halen önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir.

Tedavi rejimi, destekleyici ve organ sistem tutuluşlarına yönelik olarak belirlenmelidir. Destek tedavide yeterli ventilasyon ve perfüzyon, vücut ısısı, serum glikozu, kalsiyum ve asit-baz dengesinin sağlanması ana hedef olmalıdır.

Perfüzyon-ventilasyon dengesi nöronal hasarın sınırlandırılması açısından önemlidir. Hiperoksijenizasyon, hipoksi kadar zararlı olabilir. Hiperokside de serebral kan akımının azaldığı ve nöronal hasarlanmanın arttığı bilinmektedir. Hiperkarbide serebrovasküler

otoregölasyon bozulur ve parankimde hemoraji görölabilir. Hipokarbide ise serebral kan akımı azalır ve santral sinir sistemi deprese olur. Böylece nöronal hasarlanma artar. Amaç tam bir denge sağlamak olmalıdır.

Beyin hücrelerinin ana enerji kaynağı glikozdur. Hasta normoglisemik olmalıdır. Hipoglisemi serebral kan akımını azaltır. Hiperglisemi beyin ödemi artırır. Öncelikli amaç hipoglisemiye karşı korumak, gerektiğinde insülin desteği ile normoglisemi sağlamaktır.

Yararı kanıtlanmış tek tedavi yöntemi hipotermi uygulamasıdır. Westin ve arkadaşları 1955 yılında hipotermi'nin perinatal asfiksida yararlı olduğunu, parasagittal nöronal hasarı azalttığını saptamışlardır. Orta veya ağır asfiksiye maruz kalmış seçilmiş infantlarda ilk 6 saatte başlayıp 72 saat süreyle orta dereceli (33,5°C) baş ve vücut soğutma uygulamasının mortaliteyi ve nörogelişimsel bozuklukları azalttığı gösterilmiştir (39,40,41,42). Çok merkezli yapılmış bir çalışmada (n:234) baş soğutulması yapılan bebeklerde nörolojik sekel ve ölüm oranı %55, kontrol grupta ise %66 bulunmuştur (43). Başka bir çalışmada da tüm vücut soğutması yapılan orta-ağır HİE'li 208 hastada nörolojik sekel ve mortalite oranlarında kontrol grubuna göre anlamlı azalma olduğu görölmüştür (44). Bu çalışma sonuçlarına göre Higgins ve arkadaşları 2006 yılında bir bildiri yayınlamışlar ve hipotermi tedavisinin uzun dönem güvenlik ve etkinliğinin belirlenmesi gereken bir tedavi olduğuna karar vermişlerdir (45). Günümüzde ise hipotermi ile kombine tedavilerin etkilerine yönelinmiştir.

Bu hastalarda beyin ödemi sıklıkla görülür. Ne mannitolün ne de kortikosteroidin yararı kanıtlanamamıştır. Bu durumda uygunsuz ADH sendromundan da korunmak amacıyla sıvı yüklemekten kaçınmak en doğru yaklaşımdır. Günlük sıvı ihtiyacı, idame sıvı ve insensible kayıpları göz önüne alınarak hesaplanmalıdır. Henüz kanıtlanmış olmasa da kalsiyum kanal blokörleri, serbest radikal inhibitörleri, glutamat ve aspartat reseptör blokerleri, lipid peroksidasyon inhibitörleri, allopurinol, magnezyum sülfat gibi ajanlar ile

çalışmalar sürmektedir (46,47,48). Hasta nekrotizan enterokolit yönünden riskli olduğu için enteral beslenme geciktirilmelidir.

Bu dönemdeki konvülsiyonlara beklenmeden müdahale edilmesi nöronal hasarın artmaması açısından önemlidir (49). İlk seçenek, GABA inhibisyonunu arttırıp glutamat eksitasyonunu azaltan fenobarbital olmalıdır. Fenobarbital tedavisine rağmen nöbetler sürüyorsa voltaj bağımlı Na kanal blokeri olan fenitoin tedaviye eklenir. Persiste eden konvülsiyonlarda barbitürat grubundan olan lorezepam ve midazolam infüzyonu başlanabilir. Kontrol altına alınmayan konvülsiyonlarda ise 100 mg intravenöz pridoksin denenebilir.

4.11 Prognoz

Prognoz, bebeğin hipoksi ile karşılaştığında nöronal gelişim evresinin neresinde olduğuna ve ne kadar süre etkilendiğine göre değişir. Tam iyileşmeden ölüme kadar geniş bir yelpazede karşımıza çıkabilir.

Hipoksik iskemik ensefalopati tanısı konulan bebeklerde yaklaşık olarak %10 eksitus, %30 nörolojik sekel ve %60 oranında normal gelişim beklenir. Preterm bebeklerde ise bu sıralama %30 eksitus, %20 nörolojik sekel ve %50 oranında normal gelişim şeklindedir (50). Apgar skoru nörolojik morbiditeyi belirlemede önemlidir. 5.dakika Apgar skoru yedinin altında olan bebeklerde nörolojik sekel riskinin üç kat arttığı, 10. dakika Apgar skorunun 4'ün altında olan bebeklerde ise hayatın ilk yılında mortalite riskinin yüksek olduğu görülmüştür. EEG ve MRG bulguları bize prognoz hakkında bilgi verir. Normal EEG ve MRG iyi prognoz ile ilişkiliyken patolojik EEG ve MRG bulguları ise kötü prognozu gösterir (51).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamıza Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Birimi'nden (DEÜTFAB) temin edilen postnatal 7. gününde olan, ağırlıkları 9-11 gram arasında değişen Wistar cinsi 21 adet yavru sıçan alındı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında Wistar Albino suşunun bulunması ve literatürle uyumlu olması

nedeniyle denek olarak bu tür tercih edildi. Deneklerin çalışma süresince barındırılması ve bakımları bu ünite tarafından yapıldı. Denekler araştırma başlangıcına kadar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ oda sıcaklığında barındırıldı ve standart pellet yem, musluk suyu ile beslendi. Bu yavru sıçanlara, annelerinin emzirdikleri göz önüne alınarak, kanibalizmi önlemek amacıyla el ve eldivenle yapılacak manipülasyonlarda mümkün olduğu kadar pamukla dokunuldu.

5.1 Hipoksik-İskemik Beyin hasarının Oluşturulması

- a. Anestezi başlangıcı: Anestezi uygulaması için denekler, anestezi gazının giriş ve çıkış yapabileceği bölümleri bulunan cam fanusa yerleştirildi ve sisteme %100 O_2 içinde halotanın %2,5 konsantrasyonu verilerek anestezi uygulaması gerçekleştirildi. Halotan vaporizatöründen gelen gaz karışımı, anestezi gaz monitöründen (Anesthesia Gas Monitoring 1304, Denmark) izlenerek sabit tutuldu. Cerrahi işlem için deney hayvanı cam fanustan çıkarıldığında anestezi idamesi, deneğin ağız ve burnuna adapte olan bir maske ve konnektör yardımıyla sağlandı. Oksijen ve halotan düzeyleri anestezi gaz monitöründen izlenerek sabit tutuldu.
- b. Cerrahi işlem: Deney hayvanlarının boyunları hiperekstansiyona getirilerek orta hattan vertikal olarak 0,5-1 cm'lik cilt, ciltaltı insizyonu yapıldı. Trakea bulunarak sol kommon karotid arter mikroskop altında 6/0 ipek ile askıya alındı, aynı ipek ile kalıcı olarak bağlandı. Mikroskop altında karotid arterde pulsasyon olmadığı doğrulandıktan sonra, insizyon yeri dikildi. Anestezi gaz girişi durdurulup deney hayvanının uyanması sağlandı.
- c. Beslenme: Deney hayvanı derlenmesi ve beslenmesi için annesinin yanına 2 saat süreyle bırakıldı.
- d. Hipoksi düzeneği: Her deney hayvanı için ayrı olmak üzere 450 ml hacimli gaz giriş ve çıkış sistemi bulunan cam kavanozlar kullanıldı. Cam kavanozlara nemlendirilmiş

%92 saf nitrojen ve %8 oksijen girişi sağlandı. Hipoksik karışımın monitorizasyonu, ortak giriş hattına bağlanan anestejik gaz monitörü ile izlenerek sabit tutuldu. Kavanoz çıkışlarında gaz çıkış basıncı 3 - 4 cm H₂O olacak şekilde sabit tutuldu. Tüm kavanozlar 37°C sabit sıcaklıkta su banyosuna yerleştirildi. Deney hayvanları 2,5 saat süre ile, bu kavanozlarda hipoksik karışımı soludular (52).

5.2 Tedavi grupları;

Grup I, n=7, HİE modeli geliştirilen ve intraperitoneal neutrofin verilen grup

Grup II, n=7, HİE modeli geliştirilen ve intraperitoneal serum fizyolojik verilen grup

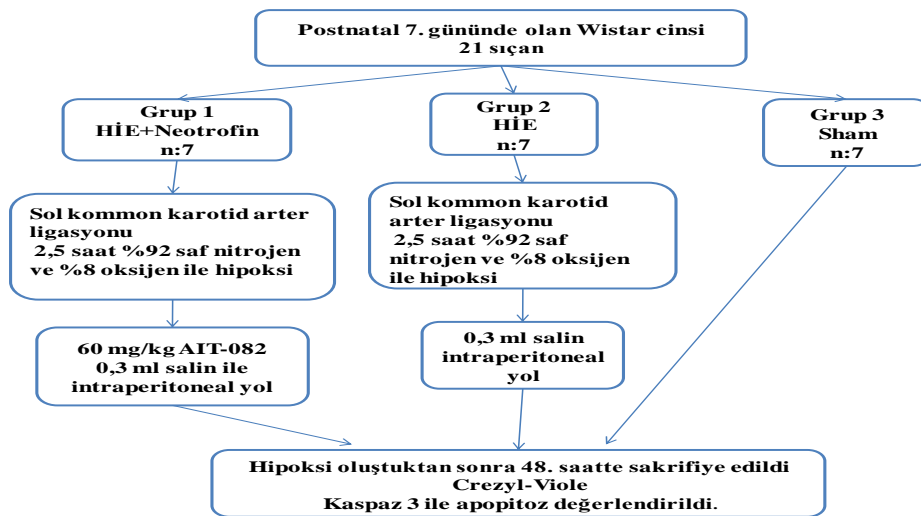
Grup III, n=7, Sham

5.3 Neutrofin uygulanması;

Yedi günlük hipoksik iskemik ensefalopati oluşturulmuş sıçanlara 60 mg/kg AIT-082 0,3 ml salin içinde çözünmüş halde intraperitoneal yol ile uygulandı. Kontrol grubuna ise aynı gestasyon günlerinde sadece 0,3 ml normal salin intraperitoneal yol ile uygulandı.

5.4. Hayvan yaşamını sonlandırma zamanı ve yöntemi

Hayvanlar; hipoksi uygulamasından 48 saat sonra, eter anestezisi altında dekapitasyon uygulanarak sakrifiye edildi. Sıçanlar sakrifiye edildikten sonra beyin dokuları çıkartıldı ve % 10' luk tamponlanmış nötral formaldehid içinde fikse edildi.



5.5. Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü

Beyin dokuları %10' luk tamponlanmış nötral formalin içerisinde 3 gün süreyle tespit edilerek rutin doku takip işlemine başlatıldı. Tespit maddesinin uzaklaştırılmaları için 1 gece akarsu altında yıkandıktan sonra, 60°C de etüvde 20' şer dakika sırasıyla %70, %80, %96' ya artan etil alkol serilerinden geçirildi. Daha sonra 60°C de etüvde 20' şer dakika dört değişim asetonda dehidrate edildi. Ardından şeffaflandırma amacıyla 60°C de etüvde 30' ar dakika iki değişim ksilolde bekletildi. 60°C' lik etüvde iki değişim halinde 1'er saat parafin ile immersiyonu sağlanarak ince doku dilimleri parafin bloklar içerisine gömüldü. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 5 µ' luk koronal kesitler alındı. Kesitler rat beyin atlasına (Paxinos ve Watson rat atlası) göre prefrontal korteks için 9, 11. düzlemler, hipokampus için 21, 23, 25. düzlemler, parietal korteks için 21. düzlemlerden alındı.

Kesitlerin bir kısmı doku histolojisini incelemek amacıyla crezyl-violet ile boyandı, diğer kesitler polilizinli lamlara yerleştirilerek apoptotik hücreleri işaretlemek amacıyla aktive kaspaz-3 immunhistokimya uygulandı.

5.5.1. Crezyl-violet boyaması

Alınan parafin kesitler 3 gün 37° de etüvde bekletildi. 20 dakika 60°C de etüvde, 20 dakika da iki değişim halinde oda ısısında olmak üzere üç değişim ksilolde bekletildi. Ardından %96' dan %60' a azalan alkol serilerinden geçirilerek hidrate edildi. Distile suda yıkandıktan sonra 0,2 gr Crezyl-violet boyası (61123 Fluka, Chemika) 150 ml. distile suda çözülerek STOK solusyon yapıldı. 30 ml STOK solusyon 100 ml 0,1M, pH 3,5 asetat tampon ile sulandırılarak %30 luk çalışma solusyonu hazırlandı. Kesitler çalışma solusyonu içerisinde 20-30 dakika bekletildikten sonra %96'luk alkolle çalkalandı. 3 kez 20 dakika ksilol ile şeffaflandırma yapıp entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı.

5.5.2. Hücre sayımı

Crezyl-violet ile boyanan kesitlerin görüntüleri, ışık mikroskobu (Olympus BH-2 Tokyo, Japonya) ve yüksek rezolüsyon video kamera (JVC TK-890E, Japonya) içeren bilgisayar destekli görüntü analiz sistemi kullanılarak elde edildi. Prefrontal korteks, parietal korteks ve hipokampal nöron sayıları 20x Olympus lensle görüntülenen monitörde 15800 μm^2 lik sayım çerçevesi yardımıyla sayıldı. Sayım çerçevesi görüntü analiz sistem monitörü üzerine randomize olarak 3 kez yerleştirildi. Prefrontal korteks, parietal korteks ve hipokampal nöronlar sağ ve sol hemisferde sayıldı, elde edilen sonuçların ortalamaları alındı ve istatistiksel olarak değerlendirildi.

5.5.3. Aktive Kaspaz-3 İmmunreaktivitesi

Aktive kaspaz-3, immunreaktivitelerinin gösterilmesi amacıyla kullanıldı. İmmunohistokimyasal inceleme için 60°C lik etüvde 1 gece ve de 3 değişim 20'şer dakika deparafinize edilen doku kesitleri, azalan alkol serilerinde rehidrate edildikten sonra 10 dakika distile su ile yıkandı. Dokuya zarar vermeden kurulanıp dakopen (Dako, Glostrup, Denmark) ile çevreleri sınırlandı. Kaspaz-3 boyanmasında sitrat buffer (pH:6) içerisinde ısıtıldıktan sonra soğumaya bırakıldı. Daha sonra kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük Hidrojen peroksit uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler 1 saat oda ısısında bloklama solüsyonu ile enkübe edildi ve ardından yıkama yapılmadan kaspaz-3 antikorunu ile +4°C'de enkübe edildi. Ardından fosfatlı tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder antikor (ile 30 dk enkübe edildi. PBS solüsyonu ile yıkama yapıldıktan sonra enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) 30 dakika uygulandı. Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için Diaminobenzidin (DAB) kullanıldı. Zemin boyaması Mayer hematoksilen ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı. Apoptotik indeksi hesaplamak için prefrontal korteks, hipokampus ve parietal korteksde her ik hemisferde 1000 hücre sayıldı. Apoptotik morfoloji gösteren hücreler % olarak hesaplandı.

5.6. İstatistiksel Analizler

Deneyde elde edilen değerler Windows için SPSS 15.0 programı kullanılarak analiz edildi. Parametrik veriler arasındaki fark analizi için Anova analizi kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırma amacıyla ise Mann-Whitney U-testi uygulandı ve $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. SONUÇLAR

6.1. Crezyl-violet boyaması

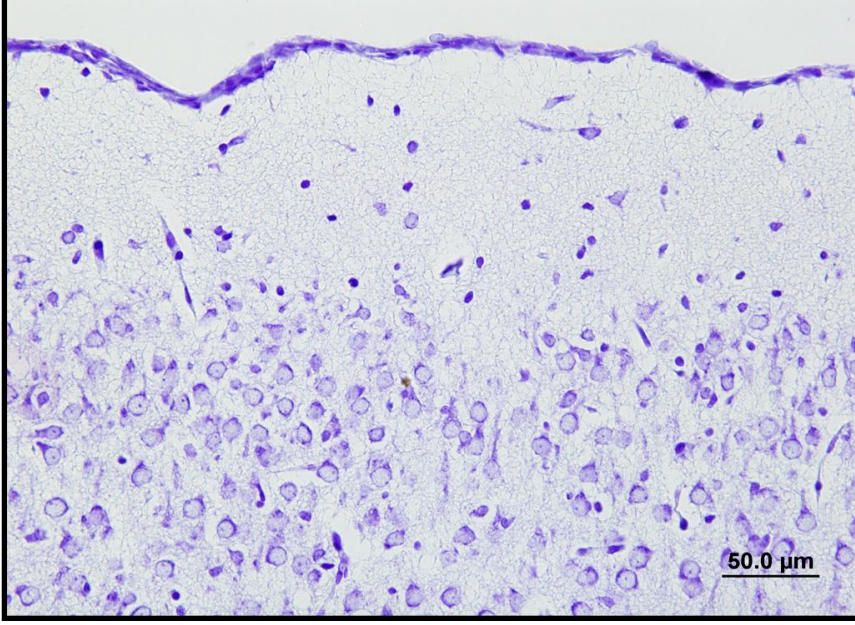
Sham grubunda (grup III), prefrontal korteks, hipokampus ve parietal korteks doku örneklerinden alınan kesitlerde normal histolojik yapı gözlemlendi. Nöronlar normal görünümdeydi, sınırları belirgin hücre zarı bütünlüğü korunmuştu. Çekirdek sınırları düzenli, kromatin dağılımı normal ve çekirdekçik belirgin olarak gözlemlendi. Kapiller endotel bütünlüğü ve kapillerlerin perifer doku ile bütünlüğü normaldi (Resim 1,4,7).

Hipoksik iskemi modeli oluşturulan grupta (grup II) deneklerin, prefrontal korteks, parietal korteks ve hipokampus doku örneklerinden alınan kesitler crezyl-violet ile boyanarak incelendiğinde hipoksik iskemi uygulanan grup ile tedavi grupları arasında ışık mikroskopik olarak belirgin farklılık gözlemlendi.

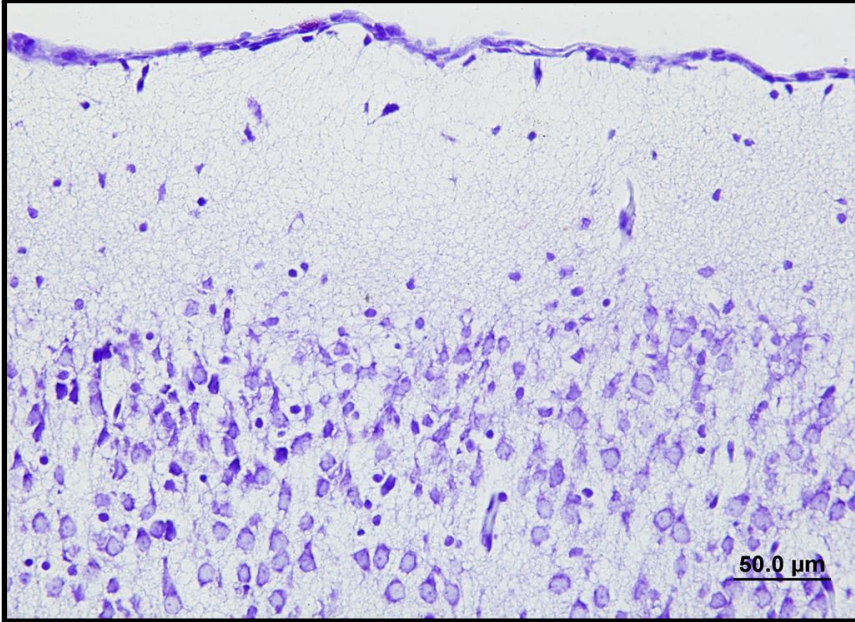
Hipoksik iskemi grubunda, prefrontal korteks ve parietal korteks piramidal nöronlarda belirgin büzülme, hücre ve çekirdek sınırlarında düzensizlik, bazı hücrelerde çekirdek kromatininde yoğunluk, nöron sitoplazmalarında dansite artışı izlendi (Resim 2,5). Hipokampal doku kesitlerinde ise hipokampusun tipik çok sıralı hücre dizilimi bozulmuş, hücreler seyrekleşmişti. Daha büyük büyütmede sham grubuna göre nöronların büzüldüğü ve sayıca azaldığı, birbirinden uzak, seyrek dizilimli yerleştiği saptandı. Hücre ve çekirdek sınırlarında düzensizlik gözlemlendi (Resim 8).

Hipoksik iskemi+Neotrofin verilen grupta (grup I), prefrontal ve parietal korteksin izlenen tabakaları alışılmış yapıdaydı. Nöronlar normal yapıda, çekirdek ve çekirdekçik

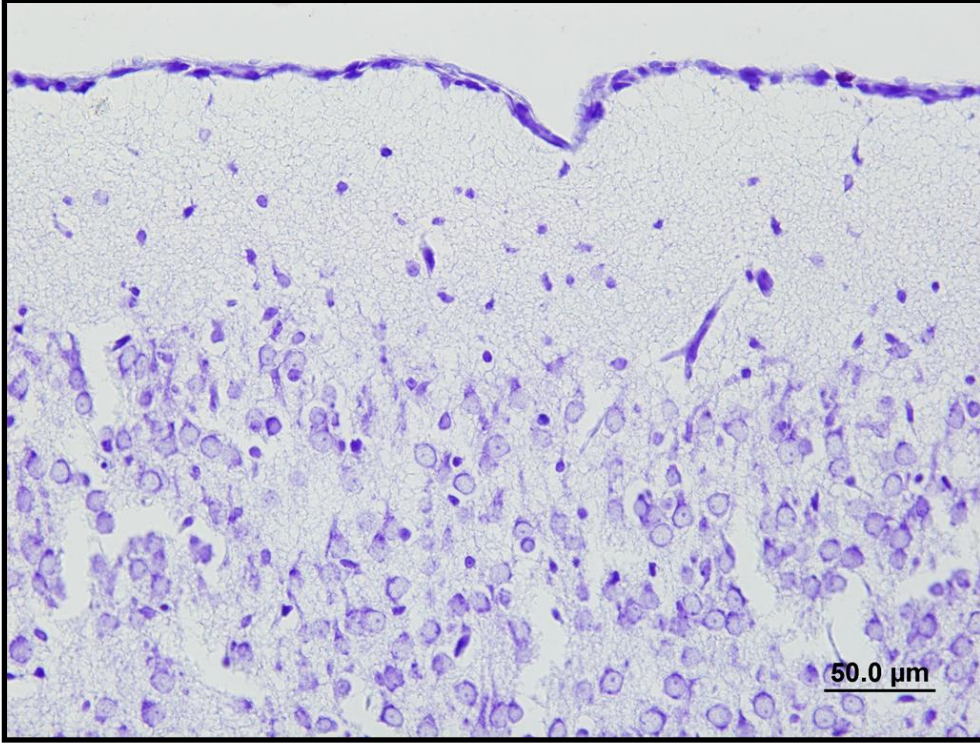
belirgindi. Grup II'de bulunan nöronlarda büzölmeler oldukça seyrek olarak izlendi. Perinöronal ve perikapiller ödem gözlenmedi (Resim 3,6). Hipokampus kesitlerinde ise hipokampusun yeniden çok sıralı görünümde ve olağan yapıdaydı. Hücreler birbiriyle yakın komşuluktaydı. Nöronlarda çekirdek ve çekirdekçik belirgindi (Resim 9).



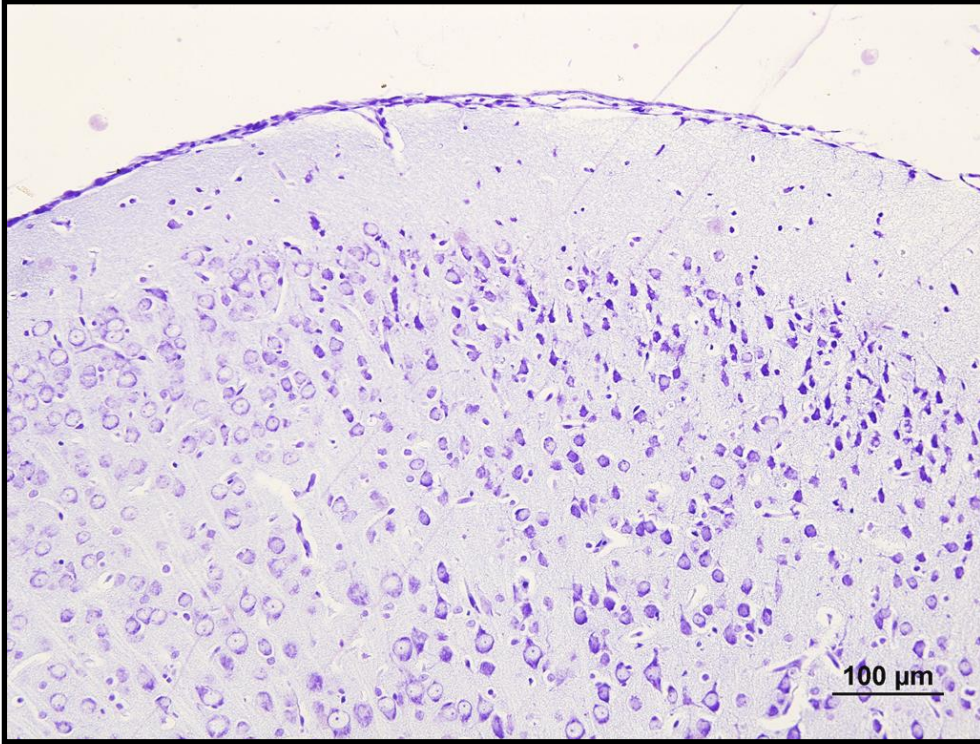
Resim 1: Sham grubu prefrontal korteks genel görünüm Creyl-violet



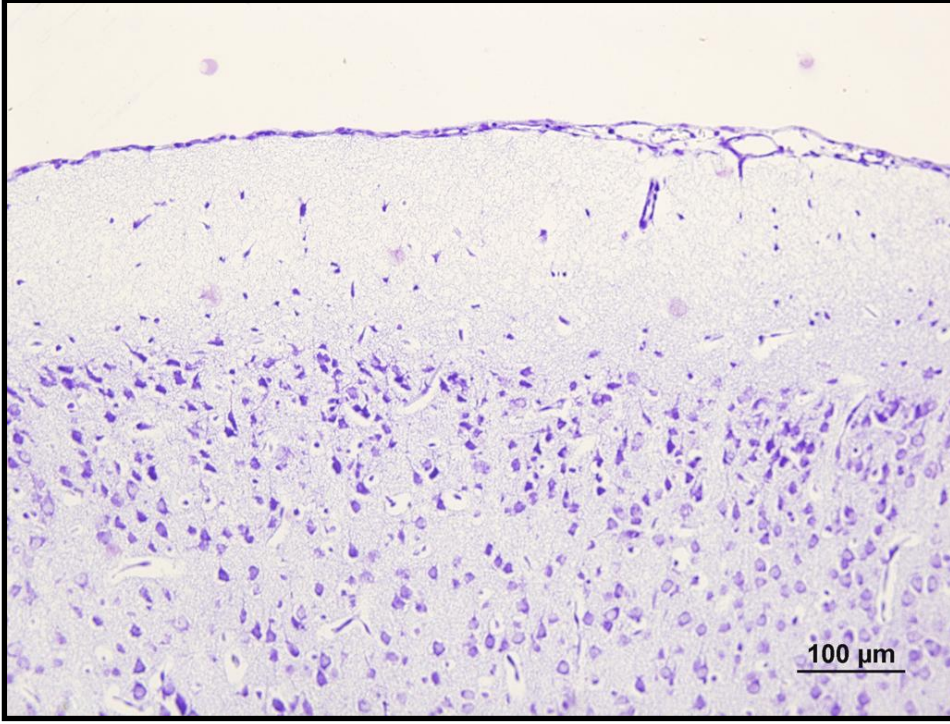
Resim 2: HİE grubu prefrontal korteks nöronlarda büzölme, hücre ve çekirdek sınırlarında düzensizlik Creyl-violet



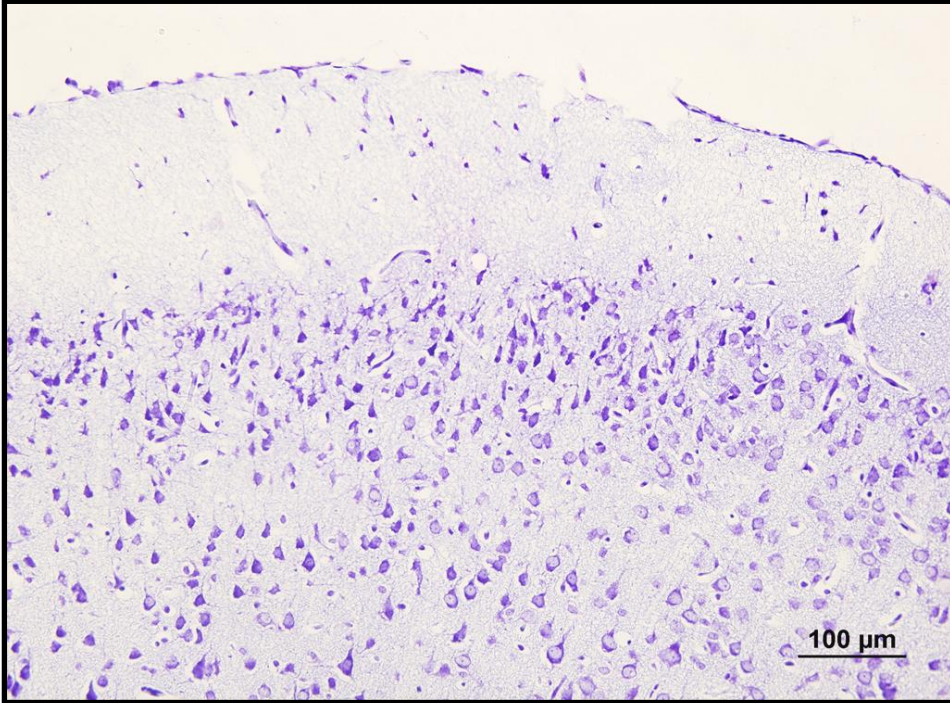
Resim 3: H1E+Neotrofin grubu prefrontal korteks genel görünüm Creyl-violet



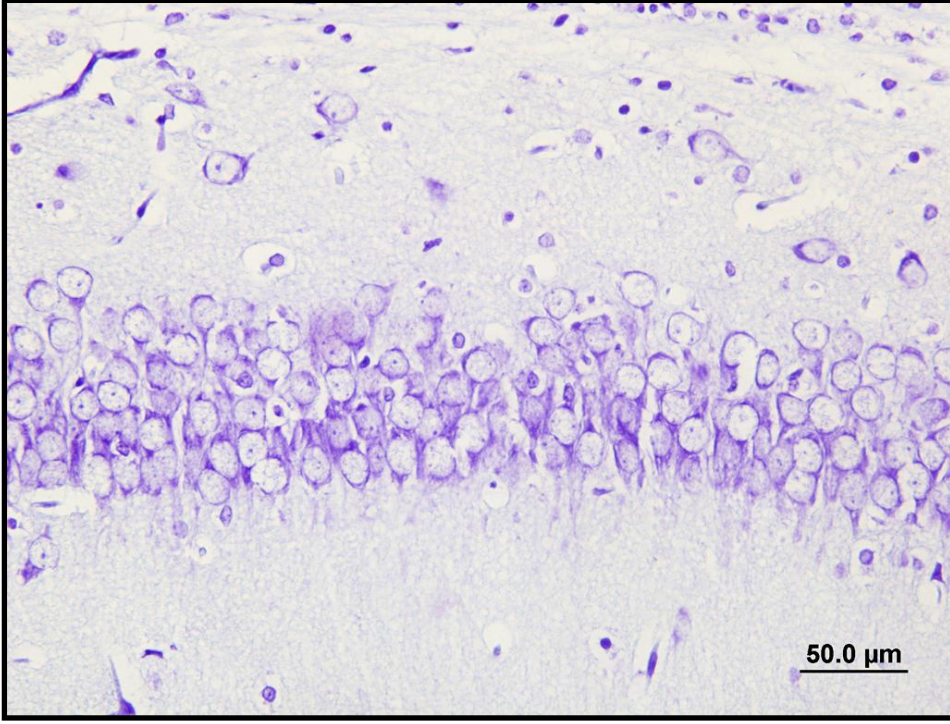
Resim 4: Sham grubu parietal korteks genel görünüm Creyl-violet



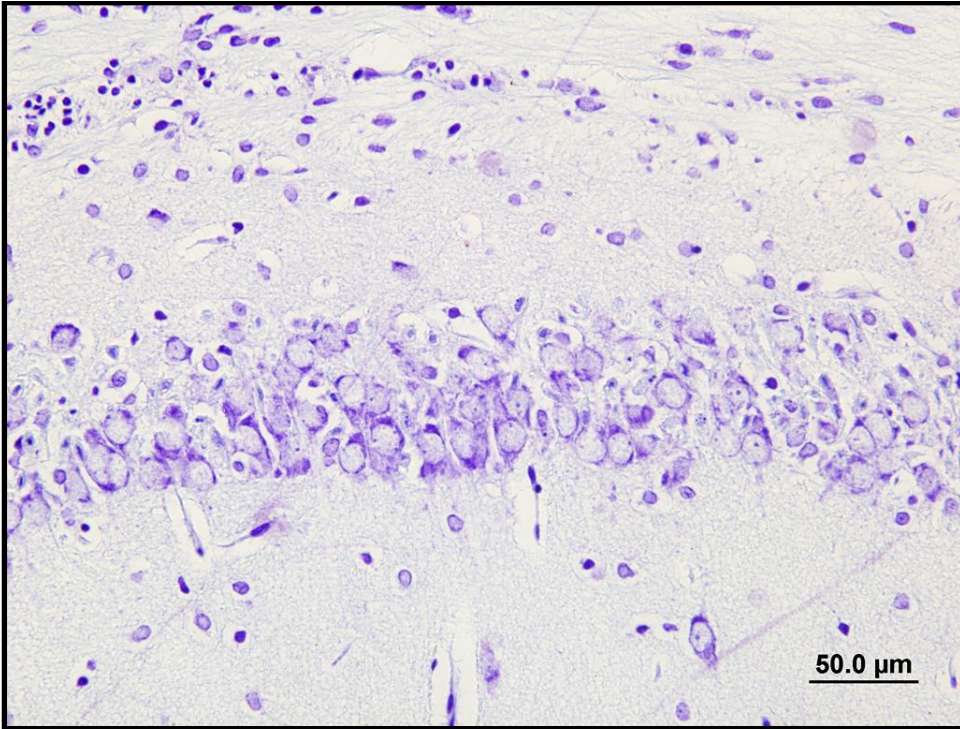
Resim 5: H1E grubu parietal korteks nöronlarda büzülme, hücre ve çekirdek sınırlarında düzensizlik Cresyl-violet



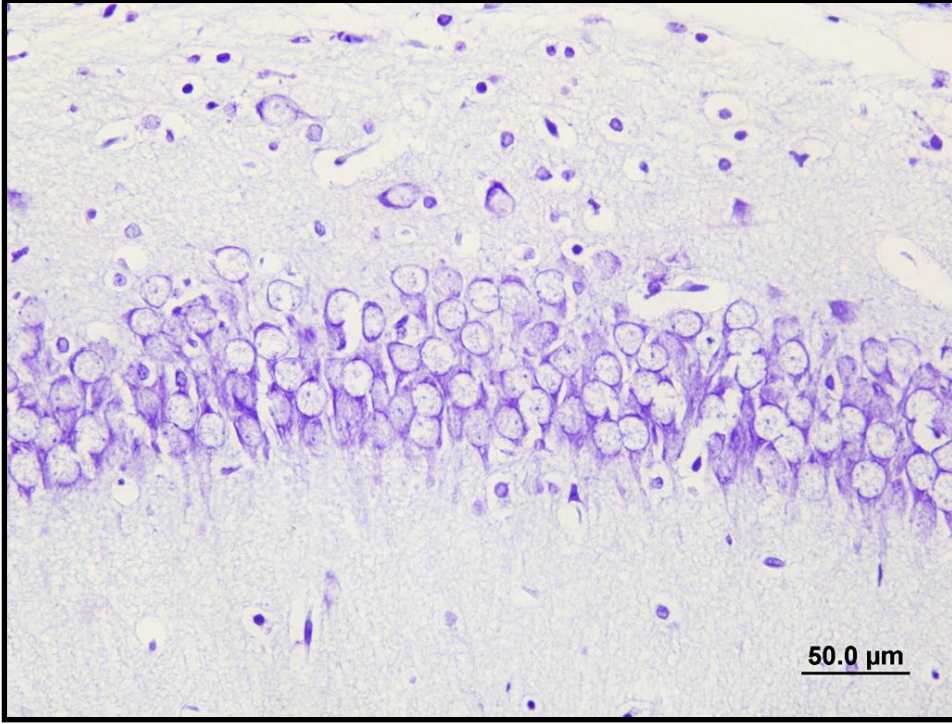
Resim 6: H1E+Neotrofin grubu parietal korteks genel görünüm Cresyl-violet



Resim 7: Sham grubu hipokampus genel görünüm Creyl-violet



Resim 8: HİE grubu hipokampus, nöronlarda büzülme ve sayıca azalma,
Creyl-violet



Resim 9: HİE+Neotrofin grubu hipokampus genel görünüm Crezyl-violet

6. 2. Hücre Sayımı Sonuçları

Hipoksik iskemi oluşturulan tedavisiz grupta hipokampus, prefrontal korteks ve parietal korteks bölgesindeki hücre sayıları, sham grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı olarak azalma saptandı.

Neotrofin verilen grupta her iki hemisferde özellikle hipoksik hasara daha duyarlı olduğu bilinen hipokampusun, CA1 ve dentat girus bölgesine ek olarak CA2 ve CA3 bölgesinde de hücre sayıları yüksek bulundu. Karotis arter ligasyonu yapılan ve neotrofin verilen grubun sol hipokampusunun CA1, CA3 dentat girus bölgelerindeki hücre sayılarında, tedavisiz gruba göre istatistiksel olarak anlamlı yükseklik saptandı ($p<0,05$) (Tablo1,2). Karotis arter ligasyonu yapılmayan; ancak hipoksiye maruz bırakılan sağ hemisferde ise prefrontal korteks dışındaki tüm bölgelerde hücre sayıları normal salin verilen grupla karşılaştırıldığında yüksek bulundu ve bu sonucun istatistiksel olarak da anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$).

Tablo1: Neotrofinin hipoksik-iskemik beyin hasarı oluşturulan yenidoğan rat hipokampus bölgesindeki etkisi (Sol hemisfer)

	Nöron sayısı (n/15800 μ^2)					
	CA1	CA2	CA3	Dentat girus	Prefrontal korteks	Parietal korteks
1. Sham (n:7)	57.56±0.62	38.54±1.37	26.86±1.22	66.70±1.68	23,22±1,09	33,02 ± 0.87
2. Neotrofin (n:7)	53.01±1.21	32.48±1.47	23.07±0.83	62.48±1.62	19,71± 1,72	29± 2
3. Salin (n:7)	34.16±1.61	30.3±2.18	19.66±1.96	53.42±1.37	18,28 ± 1,33	24,16 ±1,36
p değeri						
1 ve 3	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
2 ve 3	0,002	0,063	0,006	0,002	0,096	0,002

Değerler ortalama±standart deviasyon olarak verilmiştir

Tablo2: Neotrofinin hipoksik-iskemik beyin hasarı oluşturulan yenidoğan rat hipokampus bölgesindeki etkisi (Sağ hemisfer)

	Nöron sayısı (n/15800 μ^2)					
	CA1	CA2	CA3	Dentat girus	Prefrontal korteks	Parietal korteks
1. Sham (n:7)	58.22±1.24	38.28±1.46	27.10±0.98	67.68±1.24	23,36±0.89	34,08±0.95
2. Neotrofin (n:7)	57.10±1.88	37.81±1.44	26.10±1.38	66.52±1.27	23,18±1,13	33,10±0,9
3. Salin (n:7)	47.16±0.94	33.48±1.14	22.96±1.76	59.50±1.23	22,02±1,37	30,08±2,03
p değeri						
1 vs 3	0,002	0,002	0,002	0,002	0,084	0,002
2 vs 3	0,002	0,002	0,003	0,002	0,128	0,003

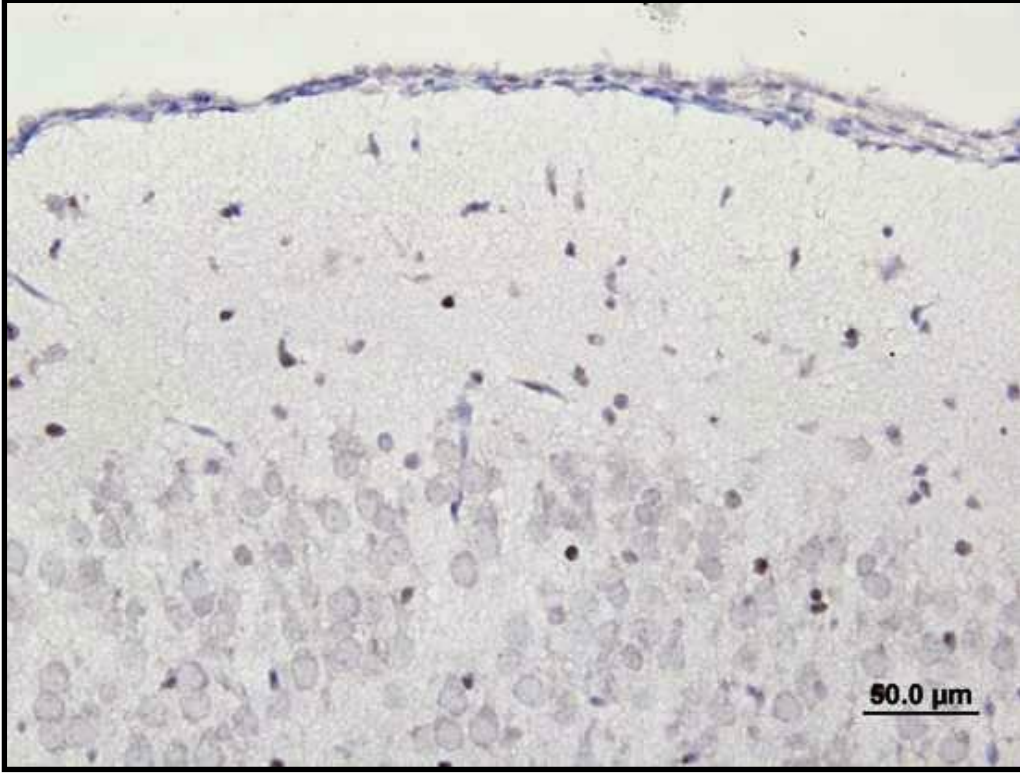
Değerler ortalama±standart deviasyon olarak verilmiştir

6.3. İmmunohistokimyasal Bulgular

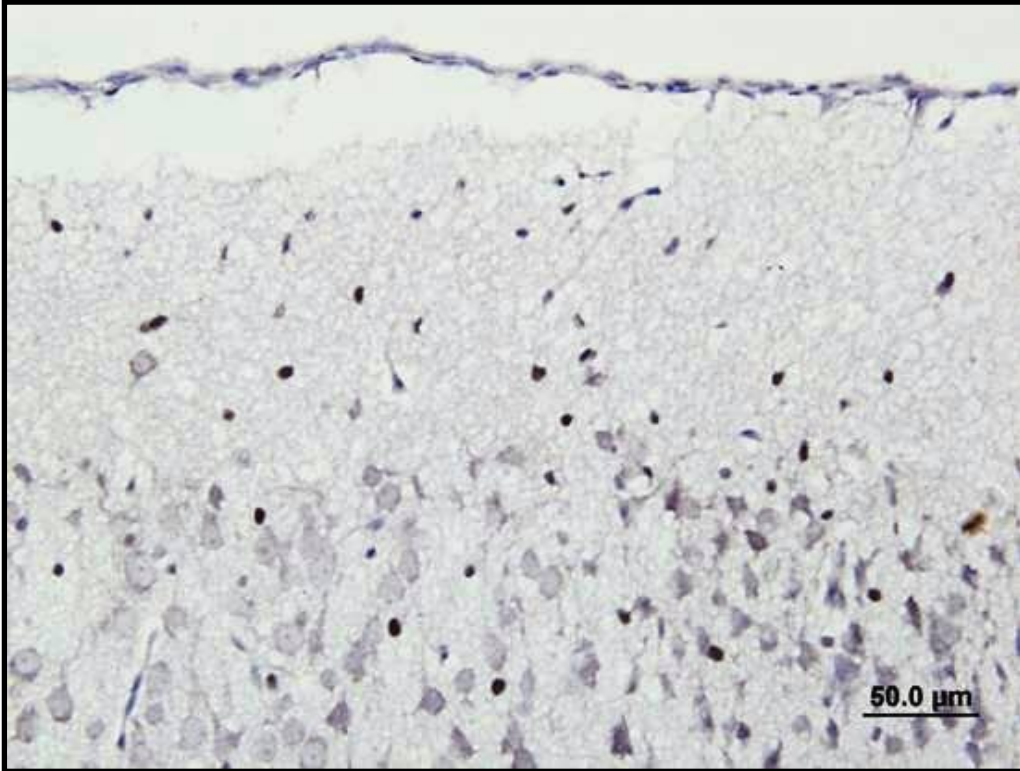
Sham grubunda, aktive kaspaz-3 ile boyanan prefrontal korteks, parietal korteks ve hipokampus kesitlerinde belirgin bir tutulum gözlenmedi ve normal histolojik yapı izlendi (Resim 10,13,16).

HİE modelinde deneklerden alınan ve aktive kaspaz-3 ile boyanan prefrontal korteks, parietal korteks ve hipokampus kesitlerinde ise, HİE uygulanan grup ile tedavi grupları arasında fark vardı. HİE grubunda, aktive kaspaz-3 ile boyanan kesitlerde apoptoza giden nöronlar çok sayıda ve belirgin olarak işaretlenmişti (Resim 11,14,17).

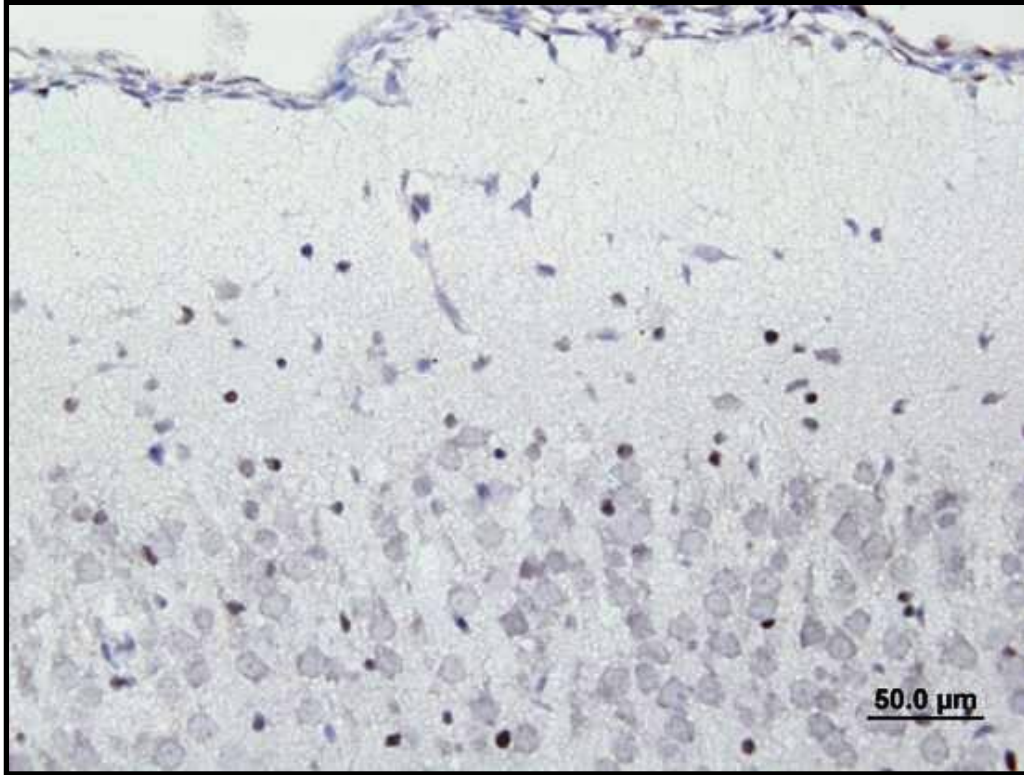
Tedavi grubunda ise kaspaz-3 ile pozitif boyanan hücrelerde azalma olduğu görüldü (Resim 12,15,18).



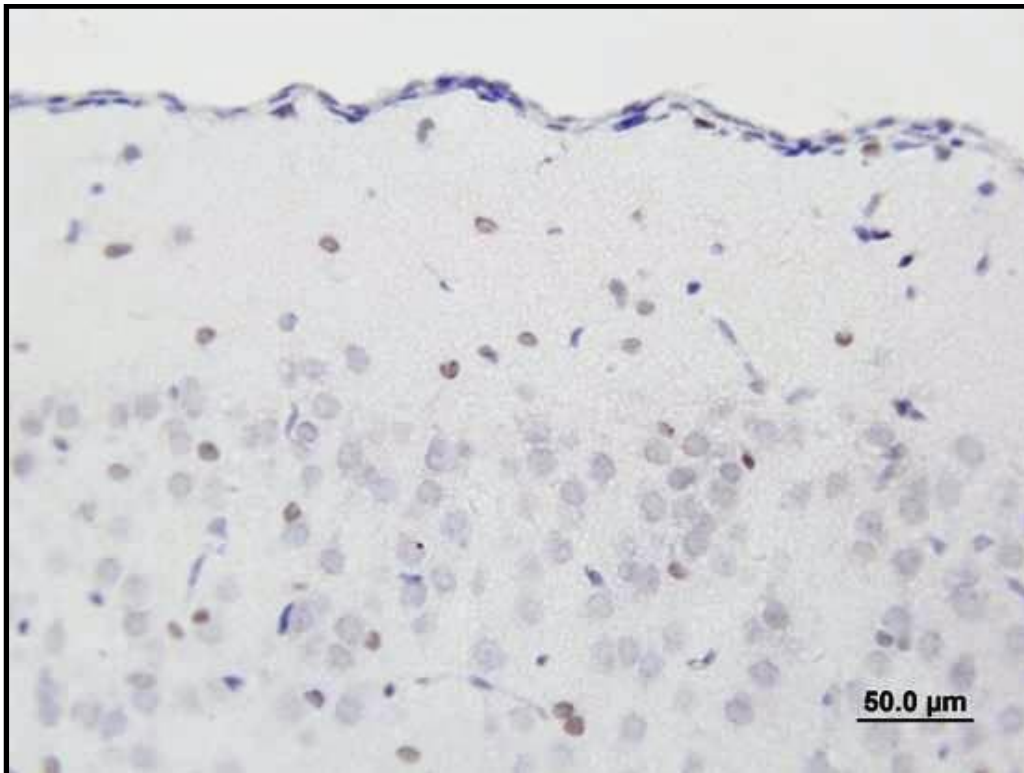
Resim 10: Sham grubu prefrontal korteks genel görünüm Aktive Kaspaz-3



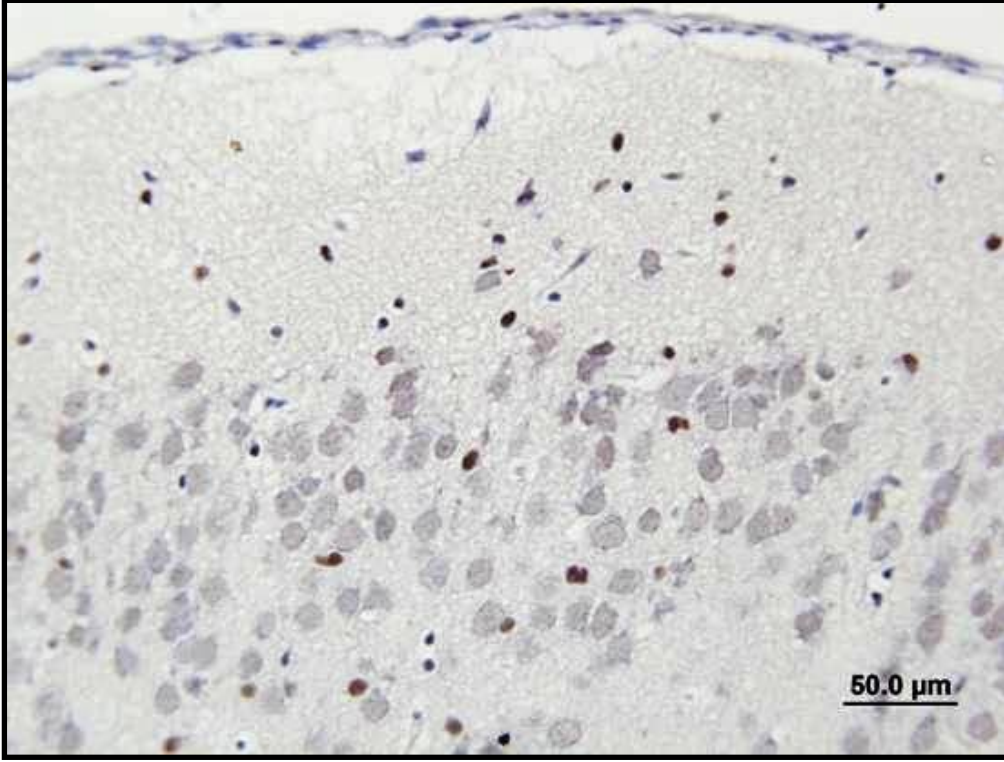
Resim 11:HİE grubu prefrontal korteks Aktive Kaspaz-3 (+) hücrelerde artış



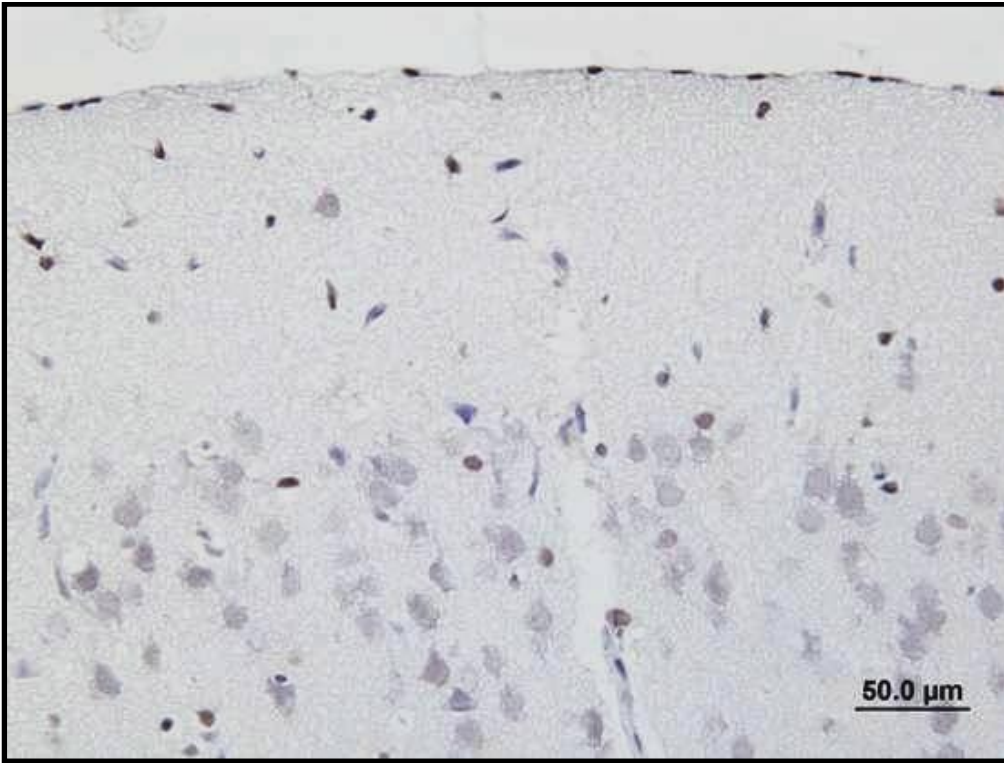
Resim 12: H1E+Neotrofin grubu prefrontal korteks Aktive Kaspaz-3



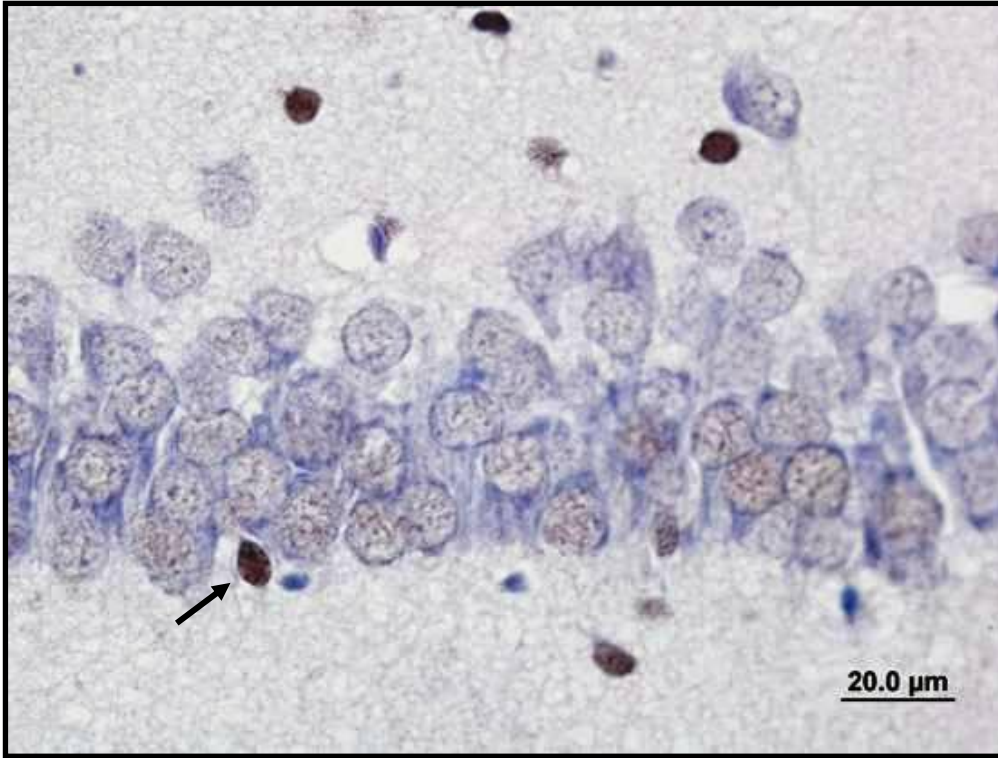
Resim 13: Sham grubu parietal korteks Aktive Kaspaz-3



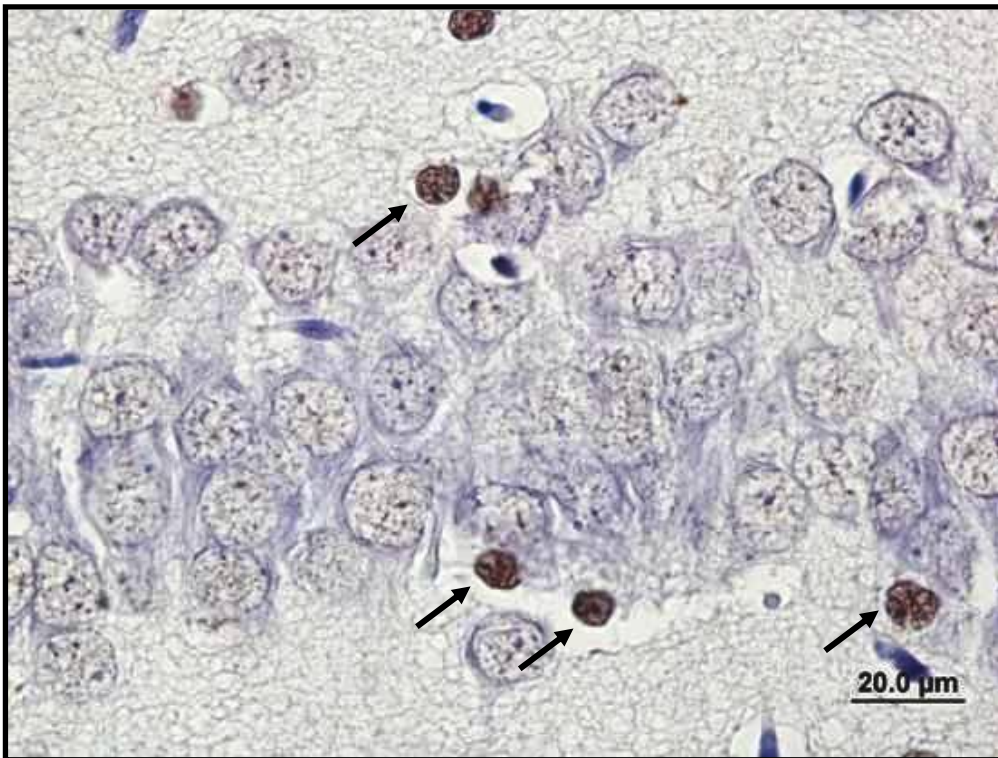
Resim 14: HİE grubu parietal korteks Aktive Kaspaz-3



Resim 15: HİE+Neotrofin grubu parietal korteks Aktive Kaspaz-3



Resim 16: Sham grubu hipokampus Aktive Kaspaz-3



Resim 17: HIIE grubu hipokampus Aktive Kaspaz-3



Resim 18: HI-E+Neotrofin grubu hipokampus Aktive Kaspaz-3

6.1 Neotrofinin apoptoz üzerine etkisi:

Hipokampus (CA1, CA2, CA3, dentat girus), prefrontal korteks ve parietal kortekste aktif kaspaz-3 immunhistokimya kullanılarak apoptoz değerlendirildi. Neotrofin uygulanan grupta her iki hemisferde de hipokampusun CA1, CA2, CA3, dentat girus bölgelerinde, prefrontal ve parietal kortekste apoptotik hücrelerde sayıca azalma saptandı. Gruplar birbirleriyle karşılaştırıldıklarında tüm bölgelerdeki sonuçların istatistiksel olarak da anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,05$) (Tablo 3,4).

Tablo3: Neotrofinin hipoksik-iskemik ensefalopati oluşturulmuş yenidoğan sıçan modelinde apoptoz üzerine etkisi (sol hemisfer)

	Aktive Kaspase-3 pozitif hücre (%)		
	Hipokampus	Prefrontal korteks	Parietal korteks
1. Sham (n:7)	0,72±0,02	0,82±0,04	3,00±0,16
2. Neotrofin (n:7)	2,72±0,24	2,88±0,26	4,17±0,21
3. Salin (n:7)	4,52±0,10	3,54±0,33	6,44±0,25
p değeri			
1 vs 3	0,002	0,002	0,002
2 vs 3	0,002	0,008	0,002

Değerler ortalama±standart deviasyon olarak verilmiştir

Tablo 4: Neotrofinin hipoksik-iskemik ensefalopati oluşturulmuş yenidoğan sıçan modelinde apoptoz üzerine etkisi (sağ hemisfer)

	Aktive Kaspase-3 pozitif hücre (%)		
	Hipokampus	Prefrontal korteks	Parietal korteks
1. Sham (n:7)	0,74±0,011	0,82±0,04	3,24±0,22
2. Neotrofin (n:7)	1,34±0,19	1,11±0,27	3,1±0,27
3. Salin (n:7)	4,52±0,10	2,18±0,13	4,22±0,13
p değeri			
1 vs 3	0,002	0,002	0,002
2 vs 3	0,002	0,002	0,002

Değerler ortalama±standart deviasyon olarak verilmiştir

7. TARTIŞMA

Hipoksik iskemik ensefalopati, yenidoğanlarda önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Hipoksik iskemik hasara uğramış nöronların hipoksiye dayanıksız olması ve çoğalma yeteneklerinin olmayışı nedeniyle tedavi başarısı düşüktür. Bu bağlamda, nöronal dokuda tamir mekanizmalarını harekete geçirebilecek ya da güçlendirebilecek yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada neotrofinin, hipoksik iskemik beyin hasarı oluşturulan yenidoğan sıçan modelinde nöronal hücre kaybını ve apoptozu önlediği gösterilmiştir. Neotrofin hipoksi ve iskemiye maruz bırakılan sıçan beyinde nöroprotektif etki göstermektedir. Deneysel olarak kanıtladığımız bu etki gelecekte hipoksik iskemik ensefalopatili çocukların tedavisinde umut ışığı olabilir. Literatüre bakıldığında bu çalışma neonatal hipoksik iskemik beyin hasarında neotrofinin nöroprotektif etkilerini gösteren ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır.

Çalışmada 7 günlük sıçanların seçilmesinin nedeni beyin gelişim basamakları göz önüne alındığında yenidoğan beyin fizyolojik özelliklerine en yakın olduğu dönemin 7. gün olmasıdır. Başka bir deyişle insan yenidoğanlarına göre sıçanlar prematüre doğarlar ve yaklaşık 7. günde matür yenidoğan özelliklerine ulaşırlar.

Neonatal hipoksik iskemik ensefalopatideki majör patofizyolojik mekanizma; glutamatin, serbest radikallerin ve hücre içi Ca birikmesinin destrüktif etkisidir (54). Daha önce in vitro yapılan çalışmalarda neotrofinin, hipokampal nöron hücre kültürlerinde glutamat toksisitesini engellediği gösterilmiştir. Hem deneysel hem de gönüllü erişkinlerde yapılan çalışmalarda da neotrofinin doz bağımlı olarak NGF, NT-3 ve BDNF gibi çeşitli nörotrofik faktörlerin dokudaki ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır (55). Glasky ve arkadaşları, 7 günlük neotrofin tedavisi sonrasında parietal kortekste ve hipokampus bölgelerinde BDNF ve NGF düzeylerinde anlamlı düzeyde artış olduğunu göstermişlerdir (56). Farmakodinamik çalışmalarda neotrofinin kan-beyin bariyerini kolayca geçtiği, astrositler ve nöron hücrelerinde anlamlı düzeylere hızlı ulaştığı gösterilmiştir (57). Yine deneysel çalışmalarda neotrofinin reaktif oksijen ürünlerine karşı defansif etki gösterdiği heme-oksijenaz 1 ve 2 düzeylerini arttırdığı saptanmıştır (58). Yenidoğan hipoksik iskemi ensefalopati modelimizde neotrofinin, hipokampus (CA1,CA3,dentat girus), prefrontal ve parietal korteks bölgelerinde nöroprotektif etki gösterdiğini kanıtladık. Etki mekanizması çok net olmamakla beraber, yukarıda anlatılan şekilde etki gösterdiği düşünülmektedir.

Neotrofin uygulanan grupta hipokampusun CA2 bölgesindeki hücre sayıları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında yüksek bulundu; ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi. Literatüre bakıldığında hipoksik iskemik ensefalopati modelinde yapılmış diğer çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edildiği görüldü (59). Bu sonuçların anlamlı çıkmaması, bu bölgedeki nöronların plastisite yeteneklerinin yetersiz olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Neotrofinin nöroprotektif etkisi, hem deneysel çalışmalarla hem de erişkinlerde yapılmış faz 1 ve faz 2 çalışmalarla kanıtlanmıştır. Literatürdeki birçok çalışmada gösterilen nöroprotektif etki yüksek ve çoklu doz kullanılarak elde edilmiştir (60,61). Bu çalışmada ise neotrofin 60 mg/kg tek doz uygulandı ve anlamlı sonuçlar elde edildi.

Apopitozis, perinatal dönemde beyin hasarında ve hücre ölümünde en önemli mekanizmalardan biridir (62). Deneysel çalışmalarda serebral hasarın DNA hasarı ile oluşan gecikmiş hücre ölümüne bağlı olduğu gösterilmiştir. Neonatal hipokampal CA1 bölgesi, hipoksik hasara en duyarlı olan bölgedir. İkinci en sık duyarlı olan bölge, hipokampusun CA3 ve onu takip eden girus dentatus bölgesidir. Bu çalışmada DNA fragmantasyonu; hipokampus, prefrontal ve parietal kortekste aktive kaspaz-3 ile değerlendirildi. Sham grubunda tüm bölgelerde sadece birkaç adet apoptotik hücreye rastlandı. Hipoksik iskemik beyin hasarı oluşturulan ve normal salin solüsyonu uygulanan grupta ise kaspaz-3 ile boyanan hücre sayılarında artış vardı. Bununla beraber neotrofin verilen grupta ise tüm bölgelerde apoptotik hücrelerin azaldığı görüldü. Böylece yenidoğan hipoksik iskemik beyin hasarı modelinde nöroprotektif etkisinin yanı sıra antiapoptotik etkisinin de olduğu gösterildi.

Özet olarak bu çalışmanın sonuçlarına göre 60 mg/kg intraperitoneal yol ile uygulanan neotrofin, hipokampus, prefrontal ve parietal kortekste hipoksi-iskemi sonucu gelişen nöronal hücre kaybını ve apoptotik hücre indeksini azaltır. Yenidoğan hipoksik iskemik beyin hasarı modelinde yapılmış, neotrofinin nöroprotektif ve antiapoptotik etkisi olduğunu gösteren ilk çalışmadır. Sonuçlar değerlendirildiğinde neotrofin yenidoğanlarda görülen mortalitesi ve morbiditesi çok yüksek olan hipoksik iskemik ensefalopatinin tedavisinde umut ışığı olabilir.

8. KAYNAKLAR

1. Volpe JJ. Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: Clinical Aspects. In: Volpe JJ(eds). Neurology of the Newborn.(5th. Ed).Chapter 9;Philedelphia.WB Saunders, 2008:400-480.
2. Shah P, Riphagen S, Beyene J, Perlman M. Multiorgan dysfunction in infants with post-asphyxial hypoxic-ischemic encephalopathy. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2004; 89:152-155.
3. Lai MC. Yang SN. Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. J Biomed Biotechnol. 2011; Epub 2010 Dec 13.
4. Badr Zahr LK, Purdy I. Brain injury in the infant: the old, the new, and the uncertain. J Perinat Neonatal Nurs. 2006; 20:163-175
5. Stoll BJ. Nervous System Disorders. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB (eds).Nelson Textbook of Pediatrics (18th.Ed). Chapter 99; USA: WB Saunders.2008:718-720.
6. Dilenge ME, Shevell MI. Long-Term developmental outcome of asphyxiated term neonates. J Child Neurol. 2001;16: 781-792.
7. Caciagli F, Ciccarelli R, Di Iorio P et al. The hypoxanthine derivative AIT-082 protects against neurotoxicity in vitro and in vivo. Soc. Neurosci. Abstr. 1998;24: 1941.
8. Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. Trends Neurosci. 2002; 25:295-301
9. Dicou E. Neurotrophins and neuronal migration in the developing rodent brain. Brain Res Rev. 2009; 60:408-417.
10. Bibel M, Barde YA. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. Genes Dev. 2000; 14:2919-2937.

11. Middlemiss PJ, Glasky AJ, Rathbone MP, et al: AIT-082, a unique purine derivative, enhances nerve growth factor mediated neurite outgrowth from PC12 cells. *Neurosci Lett.* 1995; 199:131–134.
12. Rathbone MP, Middlemiss PJ, Crocker C, et al: AIT-082 as a potential neuroprotective and regenerative agent in stroke and central nervous system injury. *Exp Opin Invest Drugs.* 1999; 8:1-8.
13. Juurlink BHJ, Rathbone MP. The hypoxanthine derivative AIT-082 promotes neurite formation and regeneration in cultured hippocampal neurons. *Soc. Neurosci. Abst.* 1998; 24:1941
14. Nannan G, Runmei Y, Fusheng L, Shoulan Z, Guangqing L. Effects of AIT-082, a Purine Derivative on Tremor Induced by Arecoline or Oxotremorine in Mice. *Pharmacology.* 2007;80:21–26.
15. Di Iorio P, Virgilio A, Giuliani P. AIT-082 is neuroprotective against kainate-induced neuronal injury in rats. *Exp Neurol.* 2001;169:392–399.
16. Potkin SG, Alva G, Keator D, Carreon D, Fleming K, Fallon JH. Brain metabolic effects of Neotrofin in patients with Alzheimer's disease. *Brain Research.* 2002; 951:87-95.
17. Shankaran S. Neonatal Encephalopathy: Treatment with Hypothermia. *J Neurotrauma.* 2009; 26:437-443.
18. Türk Neonatoloji Derneği Hipoksik İskemik Ensefalopati Çalışma Grubu. Türkiye'de yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde izlenen hipoksik iskemik ensefalopatili olgular, risk faktörleri, insidans ve kısa dönem prognozları. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2008; 51: 123-129.

19. Katar S, Devecioğlu C, Ayrancı Sucaklı İ, Taşkesen M. Hipoksik İskemik Ensefalopatili 80 Term Yenidoğan Hastanın Değerlendirilmesi. *Dicle Tıp Dergisi*, 2007; 1:38-41.
20. Dzakpasu S, Joseph KS, Huang L. et al. Decreasing Diagnoses of Birth Asphyxia in Canada: Fact or Artifact. *Pediatrics*. 2009; 123:668-672.
21. Berger R, Garnier Y. Perinatal brain injury. *J Perinat Med*. 2000; 28:261-285
22. Girard S, Kadhim H, Roy M et al. Role of perinatal inflammation in cerebral palsy. *Pediatr Neurol*. 2009; 40:168-174.
23. Inder TE, Volpe JJ. Mechanisms of perinatal brain injury. *Semin Neonatol*. 2000;5:3-16.
24. Grow J, Barks JD. Pathogenesis of hypoxic-ischemic cerebral injury in the term infant: Current concepts. *Clin Perinatol*. 2002; 29:585-602.
25. Rivkin MJ. Hypoxic-ischemic brain injury in the term newborn. *Neuropathology, clinical aspects, and neuroimaging*. *Clin Perinatol*. 1997; 24:607–625.
26. Busto R, et al. The importance of brain temperature in cerebral ischemic injury. *Stroke*. 1989; 20:1113–1114.
27. Folkerth RD. Periventricular Leukomalacia: Overview and Recent Findings. *Pediatr Dev Pathol*. 2006; 9:3-13.
28. Khwaja O, Volpe JJ. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed*. 2008; 93:153-161.
29. American Academy of Pediatrics on Fetus and Newborn: Use and Abuse of the Apgar Score. *Pediatrics* 1996; 98:141-142.
30. Dixon G, Badawi N, Kurinczuk JJ et al. Early developmental outcomes after newborn encephalopathy. *Pediatrics*. 2002; 109:26–33.

31. Tekgul H, Gauvreau K, Soul J et al. The current etiologic profile and neurodevelopmental outcome of seizures in term newborn infants. *Pediatrics*. 2006; 117:1270-1280.
32. Sankar MJ, Agarwal R, Aggarwal R, Deorari AK, Paul VK. Seizures in the newborn. *Indian J Pediatr*. 2008; 75:149-155.
33. Holmes GL, Lombroso CT. Prognostic value of background patterns in the neonatal EEG. *J Clin Neurophysiol*. 1993; 10:323–352.
34. Blankenberg FG, Loh NN, Bracci et al. Sonography CT, and MR imaging: a prospective comparison of neonates with suspected intracranial ischemia and hemorrhage. *Am J Neuroradiol*. 2000; 21:213–218.
35. Biagioni E, Mercuri E, Rutherford M et al. Combined Use Of Electroencephalogram and Magnetic Resonance Imaging in Full-Term Neonates With Acute Encephalopathy. *Pediatrics*. 2001;107: 461-468.
36. Bertsch T, Casarin W, Kretschmar M, et al. Protein S-100B: a serum marker for ischemic and infectious injury of cerebral tissue. *Clin Chem Lab Med*. 2001; 39: 319-323.
37. Sarnat HB, Sarnat MS. Neonatal encephalopathy following fetal distress: a clinical and electroencephalographic study. *Arch Neurol*. 1976;33: 695–706
38. Thompson CM, Puterman AS, Linley LL et al. The value of a scoring system for hypoxic ischemic encephalopathy in predicting neurodevelopmental outcome. *Acta Paediatr*. 1997; 86:757-761.
39. Verklan MT. The Chilling Details: Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *J Perinat Neonat Nurs*. 2008; 23:59-68.
40. Scafidi J, Gallo V. New Concepts in Perinatal Hypoxia Ischemia Encephalopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2008; 8:130-138.

41. Groenendaal F, Brouwer AJ. Clinical aspects of induced hypothermia in full term neonates with perinatal asphyxia. *Early Hum Dev.* 2009; 85:73-76.
42. Eicher DJ, Wagner CL, Katikaneni LP et al. Moderate Hypothermia in Neonatal Encephalopathy: Efficacy Outcomes. *Pediatr Neurol.* 2005; 32:11-17.
43. Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicenter randomized trial. *Lancet.* 2005; 365: 663-670.
44. Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA et al. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic ischemic encephalopathy. *N Engl J Med.* 2004; 353:1574-1584.
45. Higgins RD, Raju TNK, Perlman J et al. Hipotermi ve Perinatal Asfiksi: Ulusal Çocuk Sağlığı ve İnsan Gelişimi Enstitüsü (NICHD) Çalıştay Özeti. *J Pediatr.* 2006; 148:170-175.
46. Ichiba H, Yokoi T, Tamai H et al. Neurodevelopmental outcome of infants with birth asphyxia treated with magnesium sulfate. *Pediatr Int.* 2006; 48:70-75.
47. Chaudhari T, McGuire W. Allopurinol for preventing mortality and morbidity in newborn infants with suspected hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008; 2:CD006817.
48. Perlman JM. Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury. *Clin Ther.* 2006; 28:1353-1365.
49. Scher MS. Neonatal seizures and brain damage. *Pediatr Neurol.* 2003; 29:381-390
50. Ortibus E. Early and long-term consequences of intrapartum asphyxia. *International Congress Series.* 2005:353-357.
51. Pressler RM, Boylan GB, Morton M, et al. Early serial EEG in hypoxic ischaemic encephalopathy. *Clin Neurophysiol.* 2001;112:31-37.

52. Vannucci R.C, Vannucci S.J. Perinatal hypoxic–ischemic brain damage: evolution of an animal model. *Dev. Neurosci.* 2005; 27:81–86.
53. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th ed. Academic Press, New York, 2002. USA.
54. Fernández-López D, Martínez-Orgado J, Casanova I et al. Immature rat brain slices exposed to oxygen–glucose deprivation as an in vitro model of neonatal hypoxic–ischemic encephalopathy. *J. Neurosci. Methods.* 2005; 145:205-212.
55. Chu-LaGraff Q, Pham H, Taylor EM, et al: Effect of AIT-082 on brain NGF levels and transport of AIT-082 across the blood-brain barrier. *Soc Neurosci. Abstr* 1998; 24: 1941.
56. Glasky MS, Corner JM, Tuszynski MH. Oral administration of AIT-082 stimulates BDNF and NGF expression in vivo in rats. *Soc. Neurosci. Abstr* 2001; 27:137-140
57. Taylor EM, Yan R, Hauptmann N, et al: AIT-082, a cognitive enhancer, is transported into brain by a nonsaturable influx mechanism and out of brain by a saturable efflux mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;293: 813–821.
58. Wang X, Hauptmann N, Taylor E, Foreman M, Khawli LA, Maines MD. Neotrofin increases heme oxygenase-1 selectively in neurons. *Brain Research.* 2003;962:1-14
59. Yesilirmak DC, Kumral A, Tugyan K et al. Effects of activated protein C on neonatal hypoxic ischemic brain injury. *Brain Research* 2008;1210:56-62.
60. Grundman M, Farlow M.R, Peavy G et al. A Phase 1 study of AIT-082 in healthy elderly volunteers. *J Mol Neurosci.* 2002;18:283-293.
61. Glasky A. J, Ritzmann RF, Rathbone MP et al. Neurotrophins, growth factors and mimetic agents as neuroprotectors in the treatment of Alzheimer’s disease. In: R. Becker and E. Giacobini, Eds. *Alzheimer Disease: From Molecular Biology to Therapy* 1996:119–124. Birkhauser, Boston.

62. Pulera MR, Adams LM, Liu H et al. Apoptosis in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia. *Stroke*. 1998; 29: 2622–2630.