



T.C.

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

BEYİN ve SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**DeneySEL Kafa Travması Modelinde High
Mobility Group Box-1 Protein Düzeylerinin
Oksidatif Stres, Apoptoz, Serebral Ödem ve
Kan Beyin Bariyeri Üzerine Etkilerinin
Araştırılması**

Dr. Şevket EVRAN

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Mustafa Aziz HATİBOĞLU

İSTANBUL

2016

ÖNSÖZ

Öncelikle beni bugünlere getiren, şu an burada olmamı sağlayan, sevgilerini hiç esirgemeyen babam Dr. A. Dinçer EVRAN'a, annem Semra EVRAN'a , ablam Dr. Betül EVRAN'a ve her zaman yanımda olan, desteğini hiç esirgemeyen, sevgili eşim Çiğdem EVRAN'a sonsuz TEŞEKKÜRLER.

Nöroşirürji uzmanlık eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, mesleki eğitimimde büyük katkısı olan, her zaman kişiliği ve iş ahlakı ile örnek aldığım, yolunda ilerlediğim ve ömür boyu ilerleyecek olduğum, bir baba gibi her koşulda bana güvenen ve desteğini hissettiğim sevgili hocam Prof. Dr. Mehmet Yaşar KAYNAR'a; bize tecrübeleri ve cerrahi becerisi ile ışık tutan saygıdeğer hocamız Prof. Dr. Saffet TÜZGEN'e; yetişmemde büyük katkısı olan, sakın tavırlarını örnek aldığım, asistan dostu Yrd. Doç. Dr. M. Hakan SEYİTHANOĞLU'na; nöroşirürjiyi belki de en çok seven ve en özverili olarak çalışan, hayatını bu mesleğe adadığını düşündüğüm, bana her zaman sert de olsa içten tavırları ile yaklaşan, yetişmemde en fazla katkı sahiplerinden biri olan, ağabeyim Doç. Dr. Hakan HANIMOĞLU'na; birlikte çalıştığımız süre içinde işine özveriyle bağlı olan, çalışma azmini ve disiplinini örnek aldığım anabilim dalı başkanımız ve tez danışmanım Doç. Dr. M. Aziz HATİBOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Birlikte çalıştığım ve çok şey öğrendiğim, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim, bir aile oluşturduğumuz, Op. Dr. Meliha Gündoğ PAPAĞER'e, kıdemlilerim Op. Dr. Serkan KİTİŞ'e, Op. Dr. Şeref ÖZTÜRK'e, Op. Dr. Tolga Turan DÜNDAR'a, Op. Dr. Serdar ÇEVİK'e ve asistan arkadaşlarım, Dr. Enes AKKAYA'ya, Dr. Fatih ÇALIŞ'a ve Dr. Abdurrahim TEKİN'e; nöroşirürji eğitimimde bana her anlamda destek olan servisimizin ve ameliyathanemizin çok değerli hemşire ve personellerine çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	III
TABLolar DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
RESİMLER DİZİNİ	VIII
KISALTMALAR	IX
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1)GİRİŞ VE AMAÇ	4
2)GENEL BİLGİLER.....	7
2.1 Kafa Travması	7
2.1.1 Tanım, epidemiyoloji	7
2.1.2 Kafa travmalarının tarihçesi	8
2.1.3 Kafa travmalarında tanı.....	9
2.1.4 Kafa travmalarının değerlendirilmesi:	10
2.2 Kafa Travmalarının Patofizyolojisi.....	11
2.2.1 Primer beyin hasarı	12
2.2.2 Sekonder beyin hasarı	12
2.3 Sekonder Hücre Hasarında Temel Biyolojik Mekanizmalar	14
2.3.1 Eksitotoksisite ve kalsiyum bağımlı hücre hasarı.....	14
2.3.2 Oksidatif stres	15
2.3.3 Apoptoz	17
2.3.4 Enflamasyon.....	19
2.4 HMGB1 Protein	22
2.4.1 RAGE ve TLR4.....	24
2.5 Beyin Ödemi.....	25
2.5.1 Kan beyin bariyeri	26
2.5.2 Sıkı bağlantı molekülleri	27
2.6 Etil Pirüvat	29
2.7 Kafa Travmalarında Klinik Tedavi	30

3)GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1 Deney Hayvanlari	31
3.2 Anestezi ve Siçanlarin Hazirlanmasi.....	31
3.3 Kafa Travmasi Modeli ve Uygulanmasi.....	32
3.4 Deney Gruplari	34
3.5 Sakrifikasyon İşlemi ve Doku Örneklerinin Alinmasi.....	35
3.6 Beyin Dokusu Su Oraninin Saptanmasi.....	35
3.7 İmmünohistokimyasal Yöntem	36
3.8 Dna Fragmentasyonunun Belirlenmesi (Tunel Yöntemi).....	37
3.9 H-Skor ve Apoptotik İndeksin Hesaplanmasi.....	38
3.10 Western Blot Yöntemi.....	38
3.11 Biyokimyasal Yöntem	39
3.11.1 Total antioksidan kapasite (TAS) ve total oksidan kapasite (TOS)....	39
3.11.2 Oksidatif stres indeksinin (OSI) hesaplanmasi.....	40
3.12 İstatistiksel Analiz.....	40
4) BULGULAR.....	41
4.1 Beyin Su İçeriğinin Değerlendirilmesi	41
4.2 İmmünohistokimyasal Bulgular	41
4.2.1 HMGB1, TLR4 ve RAGE düzeyleri	42
4.2.2 Okludin, Klaudin-5 ve ZO-1 düzeyleri	45
4.3 DNA Fragmentsayonu (Tunel yöntemi) Bulgulari	47
4.4 Western Blot Bulgulari	48
4.4.1 HMGB1, TLR4 ve RAGE düzeyleri	48
4.4.2 Okludin, Klaudin-5 ve ZO-1 düzeyleri	51
4.4.3 Bax, Bcl-2 ve aktif kaspaz-3 düzeyleri	53
4.5 Biyokimyasal Bulgular.....	55
4.5.1 Total antioksidan kapasite (TAS), total oksidan seviye(TOS) ve oksidatif stres	
indeksi (OSI) bulguları	55
5) TARTIŞMA.....	57
6) SONUÇ	63
7) KAYNAKLAR	64

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1: Glasgow Koma Skalası.....	9
Tablo 2: HMGB1, TLR4 ve RAGE değerlerinin ortalama \pm standart hata değerleri	42
Tablo 3: Okludin, Klaudin-5, ZO-1'e ait H-Skor değerlerinin ortalama \pm standart hata değerleri.	45
Tablo 4: TUNEL sonuçlarına ait apoptotik indeksin ortalama \pm standart hata değerleri.	47
Tablo 5: HMGB1, TLR4 ve RAGE'e ait western blot değerlerinin ortalama \pm standart hata değerleri.	48
Tablo 6: Okludin, Klaudin-5 ve ZO-1'e ait western blot değerlerinin ortalama \pm standart hata değerleri.	51
Tablo 7: Bax, Bcl-2 ve Aktif Kaspaz-3'e ait western blot değerlerinin ortalama \pm standart hata değerleri.	53
Tablo 8: Total antioksidan kapasite (TAS), total oksidan kapasite (TOS) ve oksidatif stres indeksine (OSI) ait ortalama \pm standart hata değerleri.	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: HMGB-1etki mekanizması.....	23
Şekil 2: Kan Beyin Bariyeri.....	26
Şekil 3: Serebrovasküler endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantı kompleksi	28
Şekil 4: Kontrol, travma, travma+EP gruplarının beyin su içeriğindeki değişiklikler..	41
Şekil 5: Tüm gruplara ait perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde HMGB1, TLR4 ve RAGE düzeyleri.	44
Şekil 6: Tüm gruplara ait perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde Okludin, Klaudin-5 ve ZO-1 düzeyleri..	46
Şekil 7: Deney gruplarının apoptotik indekslerinin karşılaştırılması.....	48
Şekil 8: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde HMGB1 proteini ekspresyonunun Western blot yöntemiyle gösterilmesi.	49
Şekil 9: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde TLR4 proteini ekspresyonunun Western blot yöntemiyle gösterilmesi.	50
Şekil 10: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde RAGE proteini ekspresyonunun Western blot yöntemiyle gösterilmesi..	51
Şekil 11: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde Okludin proteini ekspresyonunun Western blot yöntemiyle gösterilmesi..	52
Şekil 12: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde Klaudin-5 proteini ekspresyonunun Western blot yöntemiyle gösterilmesi.	52
Şekil 13: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde ZO-1 proteini ekspresyonunun Western blot yöntemiyle gösterilmesi.	53
Şekil 14: Peri-kontüzyonel beyin dokusu örneklerinde proapoptotik Bax proteini ekspresyonunun Western blot yöntemiyle gösterilmesi.	54
Şekil 15: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde antiapoptotik Bcl-2 proteini ekspresyonunun Western blot yöntemiyle gösterilmesi..	54
Şekil 16: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde aktif kaspaz-3 proteini ekspresyonunun Western blot yöntemiyle gösterilmesi.	55
Şekil 17: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde total antioksidan kapasite (TAS), total oksidan kapasite (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) değerleri.	56

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Sıçanların stereotaksi aletine yerleştirilmesi	31
Resim 2: Sıçanlara kafa travması uygulanması.....	34
Resim 3: Kraniumdan çıkarılan beyindeki kontüzyon alanı ve derinliği.....	35
Resim 4: Reaksiyonun görülmediği negatif kontrol.	42
Resim 5: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde sitoplazmada gözlenen HMGB1protein düzeylerinin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi	43
Resim 6: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde TLR4 düzeylerinin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi	43
Resim 7: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde RAGE düzeylerinin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi	43
Resim 8: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde Okludin düzeylerinin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi	45
Resim 9: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde Kludin-5 düzeylerinin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi	46
Resim 10: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde ZO-1 düzeylerinin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi	46
Resim 11: Perikontüzyonel beyin dokusu kesitlerinde TUNEL reaksiyonu	47

KISALTMALAR

AMPA: Amino 3-Hidroksi 5-Metil 4-Isoksazol Propiyonik Asit

DAH: Diffüz Aksonal Hasar

DAMP: Hasar ilişkili moleküler paternler

EP: Etil pirüvat

GKS: Glasgow Koma Skalası

HMGB-1: High Mobility Group Box-1

IL: İnterlökin

iNOS: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

JAM: Bileşke Adhezyon Molekülü

KBB: Kan Beyin Bariyeri

KİBAS: Kafa İçi Basınç Artış Sendromu

MMP: Matriks Metalloproteinaz

NADP: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

NF-κB: Nükleer faktör kappa B

NMDA: N-Metil D-Aspartat

OAKB: Ortalama Arteriyel Kan Basıncı

RAGE: Glikasyon son ürünlerinin reseptörü

ROT: Reaktif Oksijen Türleri

SKA: Serebral Kan Akımı

SPB: Serebral Perfüzyon Basıncı

SSS: Santral Sinir Sistemi

SVD: Serebral Vasküler Direnç

TBH: Travmatik Beyin Hasarı

TGF-β: Transforming Growth Faktör beta

TJ: Tight Junction

TLR: Toll Like Reseptör

TNFR: Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü

ZO: Zonula Okludens

ÖZET

Deneyisel Kafa Travmasında High Mobility Group Box-1 Protein Düzeylerinin Oksidatif Stres, Apoptoz, Serebral Ödem ve Kan Beyin Bariyeri Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Amaç: Travmatik beyin hasarı özellikle genç erişkinlerde en önemli morbidite ve mortalite nedenlerindedir. Kafa travmasında mekanik etkiye bağlı primer hasar önlenemez iken, bu hasarın neticesinde oluşan ve ön planda nöroinflamasyona bağlı geliştiği düşünülen sekonder hasar önlenebilir ve böylece mortalite ve morbidite azaltılabilir. Bu çalışmada amacımız deneyisel kafa travması oluşturduğumuz sıçanlarda primer hasar sonucu oluşan nekrotik dokulardan salınan ve travma sonrası nöroinflamatuvar süreci başlattığı düşünülen HMGB-1 proteinin; reseptörleri olan TLR-4 ve RAGE düzeylerine, kan beyin bariyerine, serebral ödem miktarına, apoptoz ve oksidatif stres değerlerindeki değişime etkisini incelemektir.

Metod: 280-320 g ağırlığında, 10-12 haftalık, toplam 30 adet erişkin erkek sprague-dawley cinsi sıçanlar, kontrol, travma ve travma+etil pirüvat (her bir grupta n=10) olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Yüksekten ağırlık atılarak sağ parietal kontüzyon oluşturuldu. Travma sonrası 24. saatte sıçanlar sakrifiye edilerek, perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde Western Blot ve immunohistokimya yöntemleri ile HMGB1, TLR-4, RAGE, okludin, klaudin-5, ZO-1 düzeylerine bakıldı; apoptoz açısından immunohistokimya ile TUNEL, Western Blot ile bax, bcl-2, kaspaz-3 düzeyleri değerlendirildi. Ayrıca sıçanlardan alınan kan örneklerinde, total oksidan ve antioksidan kapasite ile oksidatif stres indeksi bakıldı. Alınan beyin dokularının yaş ve kuru ağırlıkları tartılarak beyin ödemi derecesi hesaplandı.

Bulgular: Travma sonrasında HMGB-1 protein ekspresyonunun arttığı gözlemlendi ve bunun da TLR4 ve RAGE düzeylerinde artışa neden olduğu; aynı zamanda KBB'deki sıkı bağlantı molekülleri olan okludin, klaudin-5 ve Zo-1 düzeylerinde azalmaya yol açarak beyin ödemi arttırdığı saptandı. Aynı zamanda, HMGB-1 protein artışı; bax ve kaspaz-3 düzeyini arttırıp, bcl-2 düzeylerinde azalmaya yol açarak apoptozu indüklemiş, ve total oksidatif kapasiteyi artırarak oksidatif hasarda artış meydana getirmiştir. Etil pirüvat verilen grupta ise HMGB-1 inhibisyonu sonucu, bu etkiler kontrol grubuyla benzer düzeylere gelmiştir.

Sonuç: HMGB1 proteini, sekonder hasar mekanizmalarını tetikleyerek kan beyin bariyeri disfonksiyonuna neden olarak ve serebral ödem, oksidatif stres ve apoptozu arttırarak travmatik beyin hasarı patofizyolojisinde anahtar rol üstlenmektedir. HMGB1 proteini, bu özellikleri nedeniyle kafa travması tedavisinde potansiyel hedef olabilir.

Anahtar kelimeler: Apoptoz, beyin ödemi, HMGB-1, travmatik beyin hasarı

ABSTRACT

The effect of High Mobility Group Box-1 protein on cerebral edema, blood-brain barrier, oxidative stress and apoptozis in traumatic brain injury

Objective: Traumatic brain injury (TBI) is one of the most important causes of morbidity and mortality especially among in young adults. While the primary injury due to mechanical impact is unavoidable, the secondary injury, which is formed as a result of primary injury and tought to occur due to neuroinflammation, can be prevented and thus the risk of mortality and morbidity can be reduced. The HMGB-1 protein, which is released to cytoplasm or extracellular space from necrotic tissues after traumatic brain injury and tought to starts neuroinflammatory process, may direct the other secondary injury mechanisms. The aim of this study was to investigate the effects of HMGB-1 on its receptors TLR-4 and RAGE, cerebral edema, blood-brain barrier, oxidative stress and apoptosis in experimental traumatic brain injury.

Materials and methods: A total of 30 adult male Sprague-Dawley rats, weighing 280-320 g with age of 10-12 weeks, were used for the experiments. The rats were randomly assigned to 3 groups: 1) Control, 2) TBI and 3) TBI + ethyl pyruvate group (n=10 for each group). Right parietal cortical contusion was made by using a weight-dropping TBI method. Brain samples were harvested from pericontisuonal area at 24 h after TBI. HMGB1, TLR-4, RAGE, occludin, claudin-5, ZO-1 levels are investigated by Western Blot analyses and immunohistochemistry examinations. To assess apoptosis, TUNNEL for immunohistochemistry and Western Blot for bax, bcl-2, caspase 3 were performed. In addition, total oxidant and antioxidant capacity and oxidative stress index were evaluated in blood samples. Also, brain water content for determining cerebral edema was calculated by weighing wet and dry weight of the brain tissue.

Results: HMGB-1, TLR-4 and RAGE expressions increased after TBI. Major tight junction proteins in the blood-brain barrier including occludin, claudin-5 and ZO-1 expressions decreased after TBI and brain edema was found to be increased. Also proapoptotic bax and caspase 3 expressions increased, antiapoptotic bcl-2 levels decreased after TBI. Total oxidant status and oxidatif stress increased, total antioxidant status decreased after TBI. These effects came to similar levels as the sham group in the group treated with ethyl pyruvate, a HMGB-1 inhibitor.

Conclusion : HMGB1 protein triggers secondary injury mechanisms by increasing blood-brain barrier dysfunction, cerebral edema, oxidative stress and apoptosis, so HMGB-1 protein plays a key role in the pathophysiology of traumatic brain injury. Our results suggest that HMGB-1 protein may be a potential target for the treatment of TBI.

Key words: Apoptosis, brain edema, HMGB-1, traumatic brain injury

1)GİRİŞ VE AMAÇ

Travmatik beyin hasarı (TBH), özellikle genç erişkinlerde ciddi nörolojik defisit oluşturan en önemli morbidite ve mortalite nedenlerindedir (1). TBH, primer ve sekonder hasar olarak sınıflandırılmıştır. Travma sonucu santral sinir sisteminde (SSS) ilk olarak primer beyin hasarı meydana gelmektedir. Primer beyin hasarı skalp yaralanması, kafatası kırığı, kontüzyon, beyin laserasyonu, diffüz aksonal hasar ve intrakranial kanama (epidural, subdural, intraserebral) gibi olayları içermektedir. Ancak, kafa travması sonucu oluşan hasardan sadece primer harabiyet sorumlu değildir. Primer beyin hasarını takiben ortaya çıkan birçok karmaşık fizyopatolojik olaylara bağlı olarak sekonder beyin hasarı oluşmaktadır (2).

Yaygın kafa travmalı hastaların üçte birinde sekonder hadiselerden bir ya da birkaçı, travma ile hastanın tedavisinin başlatılması arasında geçen süre zarfında ortaya çıkmaktadır ve bu olaylar mortalite ve morbiditenin neredeyse iki katına çıkmasına neden olmaktadır (3). Kafa travmasına yaklaşımda, acil müdahale başlayana kadar hayatta kalabilen hastalar için en önemli nokta, başlangıç hadisesini izleyen ve beyin hasarını arttıran sekonder hadiseler ile mücadele etmektir (4).

Sekonder beyin hasarı ödem, hipoksi, geç kanama, kafa içi basınç artışı ve iskemiye içerir. Sekonder beyin hasarının kafa travmalı hastalarda prognozu önemli ölçüde kötü yönde etkilediği gösterilmiştir. Bu nedenlerin bir kısmı önlenmektedir ve ortaya çıkan hasar azaltılabilmektedir (2, 5). İkincil doku hasarlarına sebep olan mekanizmaların bir halkasını da posttravmatik enflamatuar yanıt oluşturur. Travmanın şiddetinden bağımsız olarak, enflamasyon travmatik beyin hasarının patofizyolojisinin ayrılmaz bir parçasıdır (6, 7). Enflamasyonun, sekonder hasara yol açan immun sistemin aşırı tepki ve yan etkilerini kapsadığı açıktır (8). Mikroglia veya astrosit aktivasyonu, immun hücrelerin infiltrasyonu, kan beyin bariyerinin hasarlanması ve beyin ödemi travmatik beyin hasarında enflamatuar mediatörlerin erken dönemdeki etkilerinin en değerli göstergeleridir (6, 9-11). İmmün sistem, merkezi sinir sistemi hücreleri üzerinde varolan TNFR, FAS ve TNF ilişkili apoptoz indükleyici ligand gibi ölüm reseptörlerini tetikleyerek çeşitli yollardan apoptotik hücre ölümünü direkt olarak indükler. Travmatik beyin hasarında inflamasyonun komplemanlar ya da antikorlar aracılığıyla hücre ölümünü nasıl indüklediği hala net olarak gösterilememiştir (12). Travmatik beyin hasarında, primer hasar sonucu hasarlanmış ve ölen hücrelerden hasar ilişkili moleküler paternler (DAMPs) olarak isimlendirilen çeşitli iyon, molekül ve proteinlerin ekstrasellüler salınımı gerçekleşir (13). Bu moleküllerden bazıları ATP,

potasyum, çift sarmal DNA ve High Mobility Group 1 kromatin proteindir. Travmatik beyin hasarında, primer hasar sonucu oluşan nekrotik hücrelerin cerrahi eksizyonu kafa içi basınçta azalma ve klinik sonuçlarda iyileşme sağlayabilmekte, fakat nekroz ve sekonder hasarlanma arasındaki bağ yeteri kadar anlaşılammıştır (14).

High Mobility Group Box 1 protein (HMGB-1), nükleozomal yapının stabilitesinde ve gen transkripsiyonunda görev alan nonhiston DNA bağlayıcı proteindir. TBH'da primer hasar sonucu nekrotik hücrelerden ekstrasellüler alana salınan HMGB-1, inflamasyonu tetiklemektedir (15). Ayrıca, HMGB-1 protein hücre ölümünde dominant immun aktivatördür (16). HMGB-1 protein hücreden salındığı zaman anahtar sitokin olarak görev alır ve inflamatuvar yanıtın indüklenmesinde rol oynar (17). HMGB-1 protein reseptörleri olan RAGE (Glikasyon son ürünlerinin reseptörü), TLR4 ve TLR 2 ye bağlanarak (18, 19) nükleer faktör kappa B' yi aktif hale getirir ve bunun sonucunda proinflamatuvar mediatörlerin salınımı indüklenir (20, 21). Daha önceki çalışmalarda travmatik beyin hasarını takiben HMGB1 proteinin nöroinflamasyon, nöral apoptoz ve doku hasarı gelişimine çeşitli yollardan aracılık eden önemli bir proinflamatuvar sitokin olduğu gösterilmiştir (14, 22, 23). Mikroglial aktivasyon sonucu oluşan proinflamatuvar M1 mikroglia, tümör nekrozis faktör (TNF), IL-6, IL-1beta gibi sitokinlerin ve kemokinlerin sayısını artırarak ve apoptotik hücreleri fagosite ederek enflamasyonu arttırmaktadır; ayrıca NADPH oksidaz ve iNOS ekspresyonu sonucu, reaktif nitrojen ve oksijen radikalleri gibi çeşitli nörotoksik mediatörleri üreterek oksidatif stresi artırır ve tüm bu olayların sonucunda aktif olarak merkezi sinir sistemi doku yıkımında görev alır (24-27).

Santral sinir sisteminde vasküler endotelin geçirgenliğinin çok az olduğunu gösteren en önemli özellik hücreler arasında sıkı bağlantı bölgelerinin olması ve vezikül sayısının az olmasıdır (28). İskemik inme sonrası HMGB-1 salınımının kan beyin bariyerindeki (KBB) endotel hücrelerine karşı inflamatuvar yanıtı artırabileceği gösterilmiştir (29). Serebral iske mi modelinde, anti-HMGB-1 antikoru uygulanan ratlarda endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların, antikor uygulanmayanlara kıyasla daha fazla korunduğu gösterilmiştir (30). İskemik beyin dokularından açığa çıkan HMGB-1 protein, aktive vasküler endotel hücrelerinden ve mikroglialardan proinflamatuvar sitokin salınımını stimüle edebilmekte ve bunun sonucunda da yüksek miktarda reaktif oksijen radikalleri oluşturmaktadır (29, 31-33). Reaktif oksijen radikalleri de kanda protein ve lipid oksidasyonunu indükler. Proinflamatuvar sitokinler, reaktif oksijen radikalleri ile birlikte vasküler hasarlanmaya ve permeabilite artışına sebep olurlar (6, 24). Daha önceki çalışmalarda matriks metalloproteinaz (MMP-2/9) ve

indüklenebilir nitrik oksit sentazın travmatik beyin hasarında tight-junction (TJ) protein kompleksinin (ZO-1,okludin) ve bazal lamina proteinlerinin (laminin) yıkımında rol aldığı gösterilmiştir (34). Ratlarda deneysel iskemi modeli oluşturularak yapılan çalışmada anti-HMGB1 tedavisi ile KBB geçirgenliğinde, mikroglial aktivasyonda, MMP-2/9 aktivitesinde azalma olduğu ve enflamatuvar yanıtın baskılandığı görülmüştür (35). KBB'deki hasarlanma sonucu beyin ödeminde artış olmaktadır. Bu da travma sonrasında oluşan sekonder beyin hasarının şiddetini arttırmaktadır.

Etil pirüvat (EP), HMGB1 sekresyonunun tanımlanan ilk farmakolojik inhibitörüdür (36). Travmatik beyin hasarında, EP nöroprotektif etkilerini HMGB1/TLR4/NF-Kb yolağının inhibisyonu sonucu gösterir (37).

Travmatik beyin hasarında enflamatuvar aktivasyonu gösteren birçok delil olmasına rağmen, hangi mekanizmanın enflamasyona bağlı sekonder beyin hasarını indüklediği konusunda tam bir fikir birliği yoktur (12).

Bu çalışmadaki hipotezimizde, travma sonrası primer beyin hasarı neticesinde oluşan nekrotik hücrelerden açığa çıkan HMGB-1 proteini, TLR-4 ve RAGE ekspresyonunu artırır ve bunun sonucunda proinflatuar sitokinler ile birlikte oksidatif stres artar; ve bu artış ta kan beyin bariyerindeki endotelial sıkı bağlantı moleküllerini yıkarak KBB geçirgenliğini arttırdığını savunduk. Böylece proinflatuar sitokin ve kemokinlerin beyin parankimine geçişi artar; bu da inflamatuvar cevabı artırır. KBB geçirgenliğindeki ve inflamatuvar cevaptaki artış ta beyin ödeminin artmasına neden olur.

Bu çalışmada, kafa travması sonucunda sekonder hasara neden olan enflamatuvar yanıtın patofizyolojisini açıklamak için, deneysel kafa travması oluşturulan sıçanlarda HMGB-1 proteinin, oksidatif stres ve apoptoz üzerine olan etkileri ve daha önceki çalışmalarda gösterilmeyen, HMGB-1 protein salınımının, KBB'deki sıkı bağlantı moleküllerinin düzeyi üzerinden serebral ödeme etkisinin araştırılması amaçlandı.

2)GENEL BİLGİLER

2.1 Kafa Travması

2.1.1 Tanım, epidemiyoloji

TBH, beynin koruyucu kapasitesini aşan ve kafayı etkileyen, dış kuvvetlerin oluşturduğu intrakranial hasardır. Bu kuvvetler şiddetli bir darbe, ateşli silah yaralanması veya patlama olabilir. Bu kuvvetlerin kaynağı, şiddeti, yönü ve maruz kalma süresi, hasarın derecesini ve sonuçlarını belirler. Kafa travmalarında, basit bir kontüzyondan uzun süre tedavi ve bakım gerektirebilen ağır komaya, ölüme ve kalıcı sakatlıklara sebep olabilen durumlarla karşılaşmaktadır (38).

Kafa travmalarının epidemiyolojisi sosyoekonomik seviye farklılıklarına, yaş, ırk ve cinsiyete göre değişim göstermektedir. Kafa travmalarının en sık nedeni erişkinlerde trafik kazaları, çocuk yaş grubunda ise düşme ve ikinci sırada darptır. Kafa travması açısından 15-24 yaş grubu erkekler en riskli grubu oluşturur; bunun yanısıra diğer riskli grubu da cinsiyet farkı olmaksızın 65 yaş üzeri nüfus oluşturur. Kafa travmalarına daha çok erkeklerin maruz kaldığı ve kadın/erkek oranının yaklaşık 1/3 olduğu bildirilmektedir (39). Ateşli silah yaralanmalarına bağlı kafa travmaları ise kırsal kesimlerde ve sosyoekonomik seviyesi düşük toplumlarda daha sık görülür (39).

Türkiye’de yapılan bir çalışmada, 2006 yılı boyunca acil servise kafa travması nedeniyle başvuran toplam 1787 olgudan, kliniğe yatarak takibi gereken 430 olgu değerlendirilmiş, TBH’nın en sık iki nedeninin yüksekte düşme (%40) ve motorlu taşıt kazaları (%37) olduğu gözlenmiştir (40).

TBH, ciddi bir ulusal sağlık problemidir ve ABD’de yaralanmalara bağlı ölümlerin %30’ unu oluşturmaktadır (41, 42). Aynı zamanda prevalansı tahmini 3.2-5.3 milyon kişi olmakla birlikte yılda yaklaşık 50.000 kişinin ölümüne, 85.000 kişinin kronik sakatlığına, 1,4 milyon kişinin acil servise başvurmasına ve 235.000 kişinin bu sebeple hastanede yatmasına sebep olmaktadır (1). Ekonomik olarak 20.6 milyar dolar işgücü kaybına, 4.5 milyar dolar hastanede tedavi hizmetlerine ve 12.7 milyar dolar erken ölümlere bağlı ülkeyi zarara uğratmaktadır (43).

Kafa travması nedeniyle meydana gelen ölümlerin %50’si hastaneye ulaşmadan, hastanedeki ölümlerin 2/3’ü ise ilk 24 saat içinde gerçekleşmektedir. Bu ölümlerin 1/3’ü

primer beyin hasarına bağlı iken, sekonder beyin hasarına bağlı ölümlerin büyük kısmı kontrol edilemeyen kafa içi basınç artışı (KİBAS) ile ilişkilidir. Son yıllarda kafa travmalarının fizyopatolojisi hakkındaki araştırmalar, travmatik beyin hasarında sekonder hasar mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalar ve yoğun bakım ünitesinde hasta takibindeki gelişmelere bağlı olarak, mortalite oranlarında ve hastaların prognozunda belirgin düzelmeler görölmektedir.

2.1.2 Kafa travmalarının tarihçesi

M. Ö. 2800 yıllarında yaşayan Mısırlı hekim Imhotep, kafa travmaları ile ilgili bilinen ilk raporun sahibidir. Thabes şehri yakınlarında arkeolojik çalışmalarda bulunan ve M.Ö. 1700 yıllarına ait olduğu düşünölen Imhotep'e ait olan belgelerde travmaların muayene, tanı ve tedavi prensipleri belirtilmiştir. Bu belgelerde mevcut olan 48 travma vakasının 15'i kafa travması ile ilgilidir. Imhotep kafa travmalarını tedavi edilir, tedavi edilebilir ve tedavi edilemez olarak üç gruba ayırmıştır. Yüzyıllar sonra günümüzde, bu gruplandırma kabaca geçerliliğini sürdürmektedir; fakat tedavi edilemez kafa travmaları oranı geçmişe göre daha aza indirilmiştir (44).

Avusturya ve Fransa'da mezar kazısı ile cilalı taş devrine ait olduğu düşünölen kafataslarının yaklaşık % 10'unda burr hole benzeri belirtiler görölmüştür. Avrupada, Hippocrates (M.Ö. 460-355), Cornecius Celcus (M.S. 1. yy), Galen (M.S. 131-201) gibi eski Roma doktorları zamanında tedavi amacı ile burr hole kullanılmıştır. İbni Sina M. S. 9. yüzyılda tedavi amaçlı burr hole önermiştir (44, 45). Kafatası çökme kırıklarında Guy de Chauliac (M.S. 1300-1386) cerrahi tedavi uygulamıştır. Doktor Ambroise Pare, 1510 yılında Fransa kralı II. Henry'nin travmatik supraorbital intraserebral hematoma ameliyatını yapmıştır. Bologna Üniversitesi'nde bir profesör olan Caprri Jacop, 1518 yılında kafa travmaları üzerine ilk kitabını yazmıştır. Bu kitap sadece nöroşirürji konuları üzerine yazılmış olan ilk kitaptır (46).

Arkeolojik çalışmalarda Anadolu'da erken bronz çağında İkiztepe-Samsun yöresinde burr hole uygulandığı, bronz çağında Kültepe yöresinde yaşamış Asurların burr hole uyguladıkları ortaya çıkarılmıştır. Arkeolojik çalışmalarda Urartu dönemine (M.Ö. 800) ait Dilkaya-Van yöresinde bulunan kafatası incelendiğinde, orta meningeal dallarını çaprazlayan, frontalden oksipitale kadar uzanan lineer fraktür saptanan, kafa travması geçirmiş bir hastada, muhtemelen epidural bir hematoma boşaltmak için on üç adet burr hole açılmış, bunlar bir

keski yardımıyla birleştirilerek 11x6 cm boyutlarında serbest flep kraniotomi uygulanıp daha sonra kemik flebin tekrar yerine konmuş olduğu saptanmıştır (45).

Travmatik intrakranyal lezyonların tedavisinde, 19. yüzyıl sonunda ve 20. yüzyıl başlarında nöroşirürjinin öncülerinden Victor Horsley, Harvey Cushing, W.H. Jacobson, Hugh Cairns ve Walter Dandy'nin katkıları sayesinde ilerleme elde edilmiştir. Bilgisayarlı tomografinin (BT) 1970'li yıllarda Hounsfield tarafından geliştirilmesi ve klinik kullanıma girmesi ile kranial patolojilerin değerlendirilmesinde bir devrim gerçekleştirilmiştir (44, 45).

2.1.3 Kafa travmalarında tanı

Acil servise getirilen ağır kafa travmalı hastaların; %45'inde arteriyel pO₂ 65 mmHg'dan düşük, %35'inde sistolik kan basıncı 85 mmHg'dan az ve %12'sinde anemi tespit edilmiştir (47). Bu hastalarda hipoksi, hipotansiyon ve aneminin bulunması sekonder beyin hasarı gelişimi açısından büyük risk taşımaktadır. Kardiyopulmoner fonksiyonlar kontrol altına alındıktan sonra hızlı bir şekilde nörolojik muayene yapılmalıdır.

Nörolojik muayene: Kafa travmalı hastaların takibinde en önemli değerlendirme yöntemidir. Hastalardan veya hasta yakınlarından iyi bir anemnez alınmalı, kan basıncı, nabız, solunum ve kan gazı takibi yapılmalıdır. Şuur seviyesi, pupiller, motor fonksiyonlar ve göz hareketleri incelenir. Mümkün olan hastalarda kafa çiftleri ve serebellar testler değerlendirilir. Metabolik patolojilerin kafa travmalı hastalarda şuuru baskılayabileceği unutulmamalıdır.

Entübe ve periorbital ödemli hastaları değerlendirmede problem olsa da, tek başına motor yanıt ile dahi prognoz hakkında bilgi verebilmesi açısından, serebral korteks fonksiyonlarını ve beyin harabiyetinin şiddetini pratik olarak en iyi gösterdiği kabul edilen Glaskow koma skorlaması (GKS), bugün pek çok nöroşirürji kliniğinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Göz Açma(G)	Skor	Motor Cevap (M)	Skor	Sözel Cevap (S)	Skor
Kendiliğinden	4	Emirlere uyar	6	Oryante	5
Sesli uyarıyla	3	Ağrıyı localize eder	5	Konfüze	4
Ağrılı uyarıyla	2	Ağrı ile çeker	4	Uygunsuz cevap	3
Cevap yok	1	Fleksör cevap	3	Anlaşılmaz ses	2
		Ekstansör cevap	2	Cevap yok	1
		Cevap yok	1		

Tablo 1:Glasgow Koma Skalası (Teasdale ve Jennet 1974)

Radyolojik çalışmalar: Endikasyona göre aşağıdaki tetkikler yapılabilir .

- Direkt kafa grafileri
- Bilgisayarlı beyin tomografisi
- Manyetik rezonans görüntüleme
- Transkraniyal Doppler
- Anjiyografi
- Elektroensefalografi
- Pozitron Emisyon Tomografi
- Beyin sapı uyarılma potansiyelleri
- Kraniyal ultrasonografi

2.1.4 Kafa travmalarının değerlendirilmesi:

TBH; hafif, orta, ağır olarak sınıflandırılmıştır (48). Bu sınıflandırmada en sık kullanılan klinik test olan GKS; motor yanıt, verbal yanıt ve göz açmanın değerlendirilmesini ve buna bağlı olarak genel bilinç durumu hakkında bilgi edinilmesini sağlar.

GKS 3-8 şiddetli, 9-13 orta şiddetli ve 14-15 hafif şiddetli kafa travması olarak sınıflandırılmıştır (49, 50). Konküzyon olarak da tanımlanan hafif şiddetli TBH, en sık karşılaşılan TBH sınıfıdır (41, 42, 51).

Hafif (Minör) kafa travmaları

Klinik olarak hastanın GKS ölçümü 14 veya 15 olmalıdır. Geçici hafıza kayıpları veya travma anında somnolans, konfüzyon ve oryantasyon bozukluğu görülebilir. Fokal nörolojik defisitler (hemiparezi) görülmez.

Orta şiddetli kafa travmaları

Klinik olarak hastanın GKS ölçümü 9 ile 13 arasında olduğu zaman orta şiddetli kafa travması olarak tanımlanmaktadır. Bu hastalar komada değildir. Ancak göz açma, konuşma veya emirlere uymada yetersizlik görülmektedir. Kafatası kırıkları, diffüz aksonal hasar (DAH), beyin parankiminin kontüzyon ve laserasyonları bu grupta görülebilen patolojilerdir. İlerleyen dönemde gelişebilecek kafa içi basınç artışı, epidural ve subdural hematomlar gibi

komplikasyonlar açısından risk artışı saptanmıştır. Bu gruptaki hastalar klinik olarak dikkatlice incelenmeli ve takipleri ara yoğun bakım ünitesinde olmalıdır. Prognozları genellikle iyidir, fakat iyileşme sonrasında nörolojik sekel kalabilmektedir.

Ciddi (Ağır) kafa travmaları

GKS 8 ve daha düşük olan hastalardır. Bu hastalar komada kabul edilirler. Başlangıçta hastaların gözleri spontan açık olabilir, konuşabilir, emirlere uyabilir fakat hızlı bir şekilde bilinçleri kapanır. GKS düşük olan hastalar daha kötü prognoza sahiptir. Motor cevabın değerlendirilmesi GKS' na göre prognoz tayininde diğer iki komponente göre daha önemlidir. Fleksör veya ekstansör postürde olan hastalar ağrıyı lokalize edenlere göre daha kötü prognozludur.

2.2 Kafa Travmalarının Patofizyolojisi

Travmanın mekanik etkisiyle, travma anında doku bütünlüğünün bozulup, nöronların harabiyete uğraması ve sinir iletilsinin bozulması durumuna **primer hasar** (birincil zedelenme) denir. Primer hasarda mekanik travma etkisi ile damar, nöron ve aksonlarda fiziksel hasar oluşur. Primer hasarı takiben ilerleyen dakikalar, saatler ve hatta günler içerisinde gelişen bir takım karmaşık fizyopatolojik olaylar; vasküler ve nöronal hasara yol açar. Bu duruma da **sekonder hasar** (ikincil zedelenme) denir.

Birincil hasar travmanın mekanik etkisiyle oluşur ve önlenemez iken ikincil hasar ise birincil hasarı takip eden biyokimyasal ve patofizyolojik önlenebilir değişiklikler nedeniyle oluşur ve böylelikle ikincil hasar önlendiğinde mortalite ve morbidite azaltılabilir (12, 52).

Primer hasar travma anında oluşur. Sekonder hasar ise çeşitli fizyopatolojik olayları takiben gelişen, travma anında olmayıp daha sonra saatler veya günler içerisinde ortaya çıkan; hipoksi, iskemi, hipoperfüzyon, tromboz beyin ödemi, sistemik hipotansiyon, inflamasyon, vazospazm, KİBAS ve hiperemi olarak görülebilen geç dönem beyin harabiyetini ifade eder (53). Primer hasarı takiben hücresel düzeyde metabolik değişiklikler ve inflamatuvar yanıt gelişir ki bu da reaktif oksijen ürünlerinin oluşumuna neden olur. Sekonder hasara neden olan nöroinflamasyon; doku hasarının tamirinde etkili olabildiği gibi, nörotoksik ve proapoptotik özellik göstererek hücre ölümünü arttırabilir.

Son yıllarda yapılan araştımlar, kafa travmaları sonucunda oluşan hasarların tümünün darbe anında meydana gelmediğini göstermiş, primer hasarlanma ile geç dönemde oluşan sekonder hasarlanma arasındaki ayırımı ortaya çıkar mışlardır (54). Bunun neticesinde son yıllarda yapılan deneysel ve klinik çalışmaların önemli bir bölümü sekonder hasarın mekanizmalarının anlaşılmasına ve önlenmesine odaklanmış; ve bu alanda kaydedilen gelişmeler klinik tedavinin yönlendirilmesine, ölüm ve sakatlık oranlarının azaltılmasına büyük katkı sağlamıştır.

2.2.1 Primer beyin hasarı

Primer beyin hasarı, travmadan hemen sonra ve travmanın doğrudan sonucu olarak ortaya çıkan patolojik süreçlere denir. Primer beyin hasarına bağlı birçok vakada direkt olarak hücre ölümü ve nöral hücre kaybı görülür. Travma anında ve travmanın direkt etkisi sonucunda oluştuklarından dolayı önlenemezler.

Primer beyin hasarı, fokal ve diffüz olarak ikiye ayrılmaktadır. Fokal beyin hasarında kafatası kubbe ve kaide kırıkları, kontüzyon ve hematomlar görülebilir (49). Konküzyo serebri ve diffüz aksonal yaralanma ise diffüz primer beyin hasarlarının örnekleridir.

2.2.2 Sekonder beyin hasarı

Sekonder beyin hasarı sistemik ve intrakranial bulgular olmak üzere ikiye ayrılabilir. Sistemik bulgular, hipoksi, hipotansiyon, hiperkapni, hipertermi, anemi ve elektrolit dengesizlikleri iken, intrakranial bulgular ise beyin ödemi, yüksek intrakranial basınç ve fellerdir. Beyin parankimindeki primer hasarın bir tedavisi yoktur, fakat sekonder hasar bu gösterilen intrakranial ve sistemik bulgulara önlem alındığı zaman ciddi oranda azaltılabilmektedir. Son yıllarda, önlenbilir ikincil beyin hasarına dair yapılan klinik ve laboratuvar araştırmalar, daha önce bilinmeyen ve kafa travmasını takip eden metabolik düzensizliklere açıklık getirmeye çalışmıştır. Kafa travmalarında primer hasar sonrasında birçok farklı fizyopatolojik mekanizma harekete geçerek sekonder hasarı başlatabilir. Sekonder hasar mekanizmaları; kalsiyum bağımlı hücre hasarı, nörotransmitter salınımı, reaktif oksijen radikallerinin oluşumu, gen aktivasyonu, mitokondriyal disfonksiyon ve enflamatuar yanıtı içerir (49). Özetle sekonder hasarın gelişimi ve şiddeti, hastanın primer yaralanmaya yanıtına ve uygulanan tedavilere bağlıdır.

Kafa travmalarından sonraki fizyopatolojik süreç bir takım intrakranial dinamiklere bağlı olarak değişir. Bunlar: serebral kan akımı ve metabolizma değişimleri, intrakranial hipertansiyon, serebral ödem ve BOS dinamiği değişimleridir.

Serebral kan akımı (SKA) 100 gr beyin dokusundan 1 dakikada geçen kan miktarıdır ve mililitre (ml) olarak ifade edilir. Ortalama SKA; mikst kortikal akım için yaklaşık 50 ml/100gr/dk, beyaz cevher için 20 ml/100gr/dk ve gri cevher için yaklaşık 80 ml/100gr/dk olarak bilinmektedir. Serebral kan akımı 10 mL/100 g/dk'nın altına düşerse geri dönüşümsüz nöronal hasar ortaya çıkar. SKA 18 ml/100gr/dk'nın altına düştüğünde beyin elektriksel aktivitesi bozulup sinapslar arasında ileti durmasına karşın hücre membranındaki iyon pompaları fonksiyon görmeye devam eder. Akım 10 ml/100g/dk 'nın altına düştüğünde ise iyon pompaları çalışmaz. Buna bağlı olarak ekstrasellüler potasyum ile intrasellüler sodyum ve kalsiyum miktarı artar ve hücre ölümü gerçekleşir. 10-18 ml/100g/dk arasındaki serebral kan akımı değerleri “*penumbral zon= iskemik penumbra*” olarak tanımlanır ve hızlı bir şekilde reperfüzyon sağlandığında kalıcı hasar olmadan düzelme olur (55).

Serebral vasküler direnç (SVD) ise; kanın serebral arterlerden venlere doğru akımına karşı koyan güçtür. Bu da başlıca kan viskozitesine ve vasküler faktörlere bağlıdır.

$$\text{SKA} = \text{SPB} / \text{SVD}$$

Serebral metabolizmanın artması, kan Ph derecesinin düşmesi, pCO₂'nin artması ve pO₂'nin 50 mmHg'nın altına inmesi gibi serebral vasküler direnci azaltan faktörler serebral vazodilatasyona neden olarak serebral kan akımını artırırken; kan pH yükselmesi, serebral metabolizmanın yavaşlaması ve pCO₂'nin azalması gibi vasküler direnci artıran faktörler de serebral vazokonstriksiyona neden olarak serebral kan akımını azaltır (56).

Serebral perfüzyon basıncı (SPB); ortalama arteryel kan basıncı (OAKB) ile kafa içi basınç (KİB) arasındaki farktır. Akut kafa travmalı hastalarda, serebral dokuların kanlanması için gerekli olan perfüzyon basıncı 70 mmHg'nın üzerindeki değerlerdir. 40-50 mmHg aralığında hipoksi, 40 mmHg'nın altına indiğinde iskemi gelişir ve serebral otonöregülasyon mekanizmaları bozularak irreversible hasar başlar (57).

$$\text{SPB} = \text{OAKB} - \text{KİB}$$

Travmanın hemen ardından hipotansiyon (sistolik kan basıncı <90 mmHg) veya hipoksi (arteriyel oksijen basıncı <60mmHg) gelişimi ile morbidite ve mortalite artar. Hipoksik ve hipotansif sekonder etkiler, yeterli serebral perfüzyon basıncının sağlanması ile azalır.

Serebral otoregülasyon; beynin kendi gereksinimlerine göre, sistemik arteryel basınç değişikliklerine karşı serebral kan akımını düzenlemesi olarak tanımlanabilir. Sekonder beyin hasarlarının sık karşılaşılan ve önlenebilir bir nedeni de serebral iskemidir. Ağır kafa travmasından dolayı kaybedilen hastaların birçoğunda parankimal iskemik hasarlar saptanmıştır. Yüksek intrakranial basınç, sistemik arteryel hipotansiyon ve serebral ödem posttravmatik serebral iskemiden sorumlu ana faktörlerdir (55).

Kafa travması sonrasında kafa içi basıncın artması, serebral kan akımını azaltır ve beynin beslenmesi için gerekli olan kan akımı sağlanamaz. Bu durumda beyine gelmek üzere arkus aorta ve karotid arterlerden geçen kan miktarı azalınca, aortik ark ve karotid sinüsteki baroreseptörler uyarılır ve bulbusa impulslar gönderilir. Bunun sonucunda bulbustaki vazomotor refleks uyarılarak kalpten beyine pompalanan kan miktarında artış olur. Böylece arteryel kan basıncı artar ve buna bağlı olarak SKA da artar. Böylece beyin dokusunun beslenmesi için gerekli olan perfüzyon basıncının sağlanmasına çalışılır. Bu kompensasyon mekanizması "*Cushing refleksi cevabı*" olarak bilinir ve klinik olarak ani tansiyon yükselmesi şeklinde görülür (58)

Kafa travması sonrası prognozu etkileyen ana faktörlerden birisi de KİB'tır. KİB'in normal değerleri erişkinlerde 0–20 mmHg 'dır (1 mmHg=1.36 cmH₂O). Erişkinlerde 5 dakikadan daha uzun süren 20 mmHg veya daha yüksek basınç patolojik olarak kabul edilir. KİB artışıyla beraber beyinde ilk olarak kan daha sonra da BOS miktarı azalır. Kafa travması sonrası tedavideki ana amaç KİB'ı azaltmak olmalıdır; çünkü KİB'in normal sınırlarda tutulması, kafa travmaları sonrasında mortalite ve morbiditeyi azaltmaktadır. KİB artışı klinikte kendisini '*cushing triadı*' ile gösterir. Bu triad; hipertansiyon, bradikardi ve solunum düzensizliğinden oluşur.

2.3 Sekonder Hücre Hasarında Temel Biyolojik Mekanizmalar

2.3.1 Eksitotoksisite ve kalsiyum bağımlı hücre hasarı

Eksitator aminoasit hipotezi (EAA), içinde travmanın da bulunduğu değişik yaralanmalarda nörotransmitterlerin aşırı salınımı ve birikimi ile kesintisiz hücre hasarı başlatacağı ve bu olaylar zinciri içerisinde fazla miktarda kalsiyumun hücre içine girerek, hücre ölümüne yol açacağı esasına dayanır (59). EAA'ler üzerinde en çok araştırma yapılanlar; memeli santral sinir sisteminin ana nörotransmitterleri olan glutamat ve aspartattır. Bu amino asitler, nöronlara iyon girişinin kontrolü ve sinaptik geçişin yönlendirilmesinde rol

oyunarak normalde eksitator iletiden sorumlu oldukları halde bazı patolojik durumlarda, nörotoksisitenin potansiyel kaynağıdır.

Travma sonrası birincil beyin hasarına bağı yaygın nöronal depolarizasyon, ekstrasellüler glutamat artışı ve glikoliz görülür. İkincil hasar olarak gelişen iskeminin neticesinde ATP üretimi azalır, buna bağı olarak hücre membranındaki Na/K pompasının çalışması engellenir. Böylece ekstrasellüler sodyum seviyesi azalır, Na/Glutamat kotransportu tersine döner ve ekstrasellüler glutamat artar. Membran geçirgenliğinin ve fosfolipaz aktivitesinin artması sonucu hücrelerden ekstrasellüler aralığa glutamat geçişi olurken; intrasellüler sodyum miktarının artışı sonucunda sodyum hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak kalsiyum kanallarının açılmasına ve hücre içi kalsiyum düzeyinin artışına neden olur. Kalsiyumla beraber hücre içine su girişi de artar. Beyinde sekonder hasarın ilerlemesinde, anormal kalsiyum dengesi önemli rol oynamaktadır. Hücre içi kalsiyum artışı erken mitokondriyal şişme ile ilişkilidir ve bu ilişki aksonal hasarda aksonlar arasındaki bağlantının kesilmesi ile sonuçlanan olaylar kaskadını başlatır (60). Mitokondri fonksiyonlarının bozulması ile hücre membranındaki ATP bağımlı iyon pompalarının bozulması ve kalsiyum aracılı ekzositoz, nöronlardan depolarizasyona bağı glutamatın ekstrasellüler salınımına neden olur (61). Glutamat reseptörleri kimyasal agonistlerine duyarlılıklarına göre AMPA (a-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolepropionik asit) veya NMDA (N-metil-D-aspartik asit) reseptörleri olarak sınıflandırılır. Kortikal nöronlara karşı gelişen travmatik hasar sonucunda AMPA reseptör agonistlerine karşı iletim cevabında artış saptanır. Hasarlı nöronlarda daha fazla AMPA reseptör iyon iletimi ile kuvvetli hipereksitabilite ve hücre içi kalsiyum düzeyinde artış görülür. AMPA reseptörlerine aşırı duyarlılık olduğunda, travmadan sonra sinaptik glutamatın kısa süreli artışına bağı olarak gelişen nörotoksisite sonucunda oluşan hipereksitabiliteye, epileptik aktiviteye veya kalsiyuma bağı hücre şişmesine bağı olarak hücre hasarı ve hücre ölümü görülebilir (62).

2.3.2 Oksidatif stres

Travma sonrası gelişen oksidatif hasar sekonder hasar mekanizmalarının önemli bir bileşenidir. Beyin dokusu diğer dokulardan farklı birçok özelliği nedeni ile oksidatif hasara daha duyarlıdır. Bu özellikler:

- 1) Nöronların membran/stoplazma oranları diğer hücrelere göre daha büyüktür.
- 2) Beyindeki hücrelerin membranları lipid bakımından diğer organların hücrelerinden daha zengindir.

3) Oksidatif stresten koruyucu enzimler olan antioksidan enzim aktiviteleri düşüktür.

4) Oksidatif metabolik aktiviteleri oldukça yüksektir.

5) Spesifik nörokimyasal reaksiyonlarla endojen olarak fazla miktarda ROT üretilmektedir. Bunun en iyi örneği dopamin oksidasyonudur.

6) Nöronların bölünememesi, hasara uğrayan hücrenin yenilenememesine ve böylece dokunun hasara daha duyarlı hale gelmesine neden olmaktadır.

Bütün bu özellikleri nedeniyle oksidatif hasara diğer doku ve organlardan daha yatkın olan beyin dokusunun korunma ihtiyacı da diğer dokulardan daha fazladır (63).

Serbest radikaller en dış kısmında serbest elektronu bulunan kimyasal bileşiklerdir. Bu elektron oksidasyon esnasında başka bir biyolojik moleküle kolaylıkla transfer edilebilir. Bu özellik serbest radikal moleküllerini fazlasıyla reaktif yapar. Serbest radikallerin üretimi mitokondrideki elektron transport zincirinin normal bir ürünü ve bütün aerobik canlıların önemli bir özelliğidir. Fizyolojik olarak doğal antioksidanlar ile serbest oksijen radikalleri radikal formasyonlarını kaybederler. Serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemleri arasındaki bu etkileşim normal beyin fizyolojisinin bir parçasıdır ve serbest oksijen radikallerinin üretimi ve yıkımı arasında bir denge vardır. Travma gibi iskemiye neden olan olaylarda serbest oksijen radikallerinin üretimi artmaktadır. Bu serbest oksijen radikalleri arasında en bilinenleri süperoksit (O₂-), nitrik oksit (NO), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikalidir (OH-) (5).

Fazla miktarda oluşan serbest radikallerin patolojik etkisiyle iki yoldan hücre hasarı gelişir;

1-Lipidlerin peroksidasyonu sonucu hücre membranının geçirgenliği bozulur,

2-Oluşan serbest radikaller diğer biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek hasar oluşturur. Reaksiyona girdikleri biyolojik moleküller arasında; çeşitli enzimlerin yapısına giren proteinler, hücre membranı, hücre organellerinde bulunan doymamış yağ asitleri, karbonhidratlar ve çeşitli protein sentezi ve genetik kod aktarımını yöneten nükleik asitler yer alır. Normal şartlarda doğal savunma mekanizmaları tarafından nötralize edilen serbest radikallerin fazla miktarda oluşması travma sonrası nöronların dejenerasyon ve ölümünde önemli bir rol oynar (64).

Serbest oksijen radikalleri, TBH'dan sonra oksidatif hasarın oluşumu ve artmasında ciddi öneme sahiptir. Bu moleküller çeşitli yollar üzerinden oluşmaktadır. Bu yollar araziidonik asit metabolizması, mitokondriden kalsiyum nedenli çıkış, ksantin oksidaz aktivasyonu, ekstrasvaze hemoglobin bozukluğu ve katekolaminin otooksidasyonudur. Araşidonik asit yolu, travmatik hasar sonucu artan serbest radikallerin en etkin kaynağıdır. Eksitatör aminoasitlerin hücre dışına çıkmasının neden olduğu kalsiyumun hücre içine girişı ile proteazlar ve lipazlar aktive olur (fosfolipaz A2, lipooksigenaz ve siklooksigenaz). Sonuç olarak, aktiveleşen bu enzimler ile araziidonik asit; tromboksan A2, prostaglandinler, lökotrienler ve serbest aminoasitlere dönüşür. Bu bozulma ürünleri ise serbest oksijen radikalleri üretir (65).

Hücre membranında oksidasyona duyarlı ve doymamış yağ asitleri fazla olan fosfolipidler bulunur. Serbest radikaller, oksijen varlığında doymamış yağ asitlerinin çift bağlarını kırarak zincirleme bir reaksiyon meydana getirirler ve bunun sonucunda hücre zarının stabilizasyonu bozulur, permeabilite etkilenir, membran potansiyeli oluşturabilme yeteneği bozulur. Hücre içinde fazla miktarda kalsiyum birikir ve hücre ölümü olur (66).

2.3.3 Apoptoz

Apoptoz, gelişmiş organizmalarda hücrelerarası ilişkilerin gereği olarak artık gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin çevresine zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan genetik olarak kontrol edilen bir olaydır. Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, hücre kaybı ve fizyolojik hücre ölümü apoptozis ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir. İlk zamanlarda hücre ölümünün sadece fizyolojik formu olduğu düşünülmesine rağmen günümüzde patolojik hücre ölümüne de aracılık ettiği bilinmektedir.

Nöronlar bölünemeyen dolayısıyla çoğalamayan hücrelerdir. Yenilenemediklerinden dolayı ömür boyu yaşarlar. Oysa Alzheimer, Parkinson, Huntington koresi gibi nörodejeneratif hastalıklarda apoptozis süreci tetiklenerek nöronların öldüğü bilinmektedir (67). Ayrıca iskemi-reperfüzyon hasarı gibi çeşitli yaralanmalar sonucu meydana gelen hasarlarla dokulara yeterli besin sağlanamayabilir. Bu durumda hücreler apoptozise gider ve hasar devam ettikçe apoptozisin hızı artar ve hücre geri dönüşümsüz bir yola girer (68).

Memeli hücrelerinde başlıca iki apoptozis yolu tanımlanmıştır;

a)Fas/TNFR yolu (Ekstrinsik yol)

Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine (Fas, TNFR, DR5) ölüm sinyallerinin (FasL, TNF-alfa, TRAIL) bağlanması sonucunda reseptörler trimerik yapı kazanır. Trimerik yapı kazanan reseptör; adaptör molekülleri ve prokaspazla birleşerek DISC (Death inducing signaling complex) adı verilen yapıyı oluşturur. Bu birleşmeden sonra inaktif durumdaki prokaspaz-8'den aktif kaspaz-8'in oluşması sağlanır. Aktif kaspaz-8 doğrudan ve dolaylı olmak üzere 2 yolla kaspaz-3'ü aktive eder ve apoptoz başlar. Ya direkt kaspaz-8 kaspaz-3'ü aktive eder ya da dolaylı olarak intrinsik mekanizma ile kaspaz-9'u aktive ettikten sonra kaspaz-3'ü aktive eder. Her 2 yolla da aktive olan kaspaz-3 DNA fragmentasyonuna neden olur. Fas ve TNF alfa dışında TRAIL ve TRAIL reseptörleri de benzer yolla apoptozu uyarabilir (69-71).

b)Mitokondriyal yol (intrinsik yol)

Büki ve ark. tarafından aksonlarda mitokondri iç zarından sitokrom c salınımı tanımlanmıştır (60). Mitokondri iç zarından sitozole salınan sitokrom c, apoptozisin mitokondriyal yolunu başlatır. Sitozoldeki sitokrom c, apoptozis aktive edici faktör-1, kaspaz-9 ve deoksiadenozintrifosfata bağlanır ve sırasıyla; kaspaz-3 aktivasyonuna, daha sonra poli ADP-riboz polimeraz gibi substratından ayrılmasına, endonükleazların aktivasyonuna ve son olarak DNA'nın yıkılmasına yol açar. Bu nedenle mitokondriden sitokrom c salınımına yol açan mekanizmaların aydınlatılması akut kafa travmasında apoptozis mekanizmalarının anlaşılmasında önemlidir (72).

Hücrede herhangi bir nedenle (radyasyon, kemoterapi) DNA hasarı olduğunda eğer hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusu G1 fazında durdurulur ve hücreye DNA' sını tamir edebilmesi için zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda aktive olan bazı genler, hücrenin apoptozisine neden olabilir. Bu genlerden en önemlisi p53 genidir ve bu gen DNA tamiri yapan proteinlerin transkripsiyonunu sağlar. Bu proteinler DNA hasarını tamir edebilirse hücre siklusundaki blok kalkar (73). Hücre hasarının tamiri başarılı olmazsa p53 geni bax proteinini (pro-apoptotik) aktive ederek mitokondri aracılığı ile hücrenin apoptozise giderek ölmesini sağlar. Böylece DNA hasarlı hücre ortadan kaldırılmış olur (68, 73).

Bir hücrede hücre içi bax/bcl-2 oranı hücrenin apoptozise gidip gitmeyeceğine karar vermede son derece önemlidir. Eğer bax (proapoptotik gen) fazla ise hücre apoptozise gidecektir, bcl-2 (antiapoptotik gen) fazla ise apoptozis inhibe olacaktır. Son yıllarda, kafa

travması sonrası nöral hücre ölümünden P53'e bağımlı apoptozis mekanizmasının sorumlu olduğu yönündeki araştırmalar mevcuttur (74). Ancak TBH sonrasında oluşan apoptoz mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır.

2.3.4 Enflamasyon

Travmatik beyin hasarı genel olarak akut hasarlanma olarak değerlendirilmesine rağmen klinik ve laboratuvar kanıtları ile kronik bir patoloji olduğu görölmüştür. Travmatik beyin hasarı Parkinson ve Alzheimer gibi kronik nörodejeneratif hastalıklarla belirli noktalarda benzerlikler göstermektedir (51, 75-77). Klinik ve laboratuvar kanıtlar nöroinflamasyonun, travmatik beyin hasarının akut ve kronik evrelerinin her ikisinde de rol aldığını ve ekstra hücre ölümüne sebep olan bu ikinci hasar mekanizmasının, kafa travmasının patoloji ve tedavisinde anahtar rolün sahibi olabileceğini göstermiştir (41, 42, 48, 78).

TBH, son zamanlarda SSS'nin nöroinflamatuvar bir hastalığı olarak değerlendirilmektedir. Beyinde erken inflamasyonun göstergesi aktive mikrogliaların, nötrofillerin ve ödemin bulunmasıdır. Önceden beyin dokusu, lenfatik sistemi olmaması ve kan beyin bariyerinin hücreler ve çözünmüş maddelere karşı geçirgen olmamasından dolayı immünolojik açıdan ayrıcalıklı olarak değerlendirilmekteydi (79). Fakat yaklaşık 25 yıl önce yapılan bir çalışmada TBH sonrası nöroinflamatuvar sürecin başladığı, KBB'den beyin parankimine immün hücrelerin göçü olduğu gösterilmiştir (80). Bundan sonra araştırmalar bu yönde giderek yoğunlaşmıştır. Travma sonrası KBB'ndeki permeabilite artışı, immünolojik reaksiyonlarda kolaylaştırıcı faktör olarak düşünölmekte ve günümüzde hücre içi bileşenleri ile birlikte nöroinflamasyon olarak adlandırılmaktadır. Çeşitli immün ve immün olmayan hücrelerden sistemik ve intratekal üretilen sitokinler, periferik hematojen hücrelerin takviyesi, serebrovasküler geçirgenliğin artması ve SSS'deki mikroglial hücre aktivasyonu nöroinflamasyona aracılık ederler (81). Nöroinflamasyon immün hücreler, mikroglia, sitokinler, kemotaktik sitokinler(kemokin) ve diğer enflamatuvar mediatörleri kapsamaktadır (82). Mikroglia, immün reaktif denetleyici bir hücre gibi davranır ve patojenlerin yakalanması, konak savunması ve doku onarımı için gereklidir. Travmayı takiben mikroglia periferik dokulardaki makrofajlardan morfolojik ve immunolojik olarak ayırt edilemez hale gelir (83). Sitokinlerin sadece harabiyete neden olmadığı, aynı zamanda nöroprotektif ve nörotrofik etkileri sayesinde sinir gelişimi ve normal SSS fonksiyonlarının sürdürölmesi için gerekli oldukları da iyi bilinmektedir (79). Travma sonrası, hasarlanmış bölgeyi patojenlerden korumak ve hasarlı hücrelerin onarımı için kompleman aktivasyonuna eşlik eden nötrofil,

monosit ve lenfositlerin hasar görmüş KBB' den beyin parankimine infiltrasyonu ile bu immun hücrelerden prostoglandin, serbest radikaller, proinflamatuvar sitokinler ve diğer enflamatuvar mediatörlerin sekresyonu sonucu kemokin ve hücre adezyon moleküllerinin sayısı artar ve endojen enflamatuvar yanıt tetiklenir; bu da immun hücrelerin ve mikrogliaların beyin parankimine mobilize olması ile sonuçlanır; fakat bu yanıtın ekta nöral hücre ölümüne de sebep olduğu görülmüştür (82, 84, 85). Bu mediatörler yalnızca nöroinflamatuvar yanıtın yayılmasından sorumlu değil aynı zamanda onun varlığının bir göstergesidir.

Sistemik makrofajlar olan periferik ve yerleşik mikroglialar hasarlı dokuları sağlıklı dokulardan ayırarak genel hasarın boyutunu sınırlandırır ve travma sonrası koruyucu cevap oluşturur (86). Fakat TBH'da mikroglial aktivasyon normalden fazla olur ve tümör nekrozis faktör α (TNF- α), IL-1 β , IL-6, IL-12 ve interferon γ gibi proinflamatuvar sitokin salınımı artar (42, 84). Bu sitokinlerin salınımındaki artışa bağlı olarak gelişen, KBB'deki endotel hücrelerinden hücre adezyon molekülü salınımı artışı ve kemokinlerin salınımındaki artış sonucunda KBB'nin permeabilitesi artar. Bunun sonucunda kandan beyin parankimine inflamatuvar hücrelerin göçüyle enflamatuvar yanıt daha da artar (87). Devam eden mikroglial aktivasyon sonucunda serbest radikaller ve nörotoksik moleküller üretilir ve buna bağlı olarak mikroglial aktivasyon sekonder hasara bağlı hücre ölümünün diğer mekanizmalarına öncülük eder (42, 88). Buna ek olarak aktive mikroglial hücreler, nörodejenerasyon ile direkt ilişkili olan klas 2 majör histokompatibilite kompleks (MHC 2) ekspresyonunu artırır (42).

Aktive mikroglialar çoğu zaman inflamatuvar cevapta majör rolü üstlenseler de böyle olmadığını gösteren örnekler de vardır. Aktive oldukları mikroçevreye bağlı olarak mikroglialar farklı fenotiplere dönüşebilirler. Lipopolisakkarid ve interferon γ varlığında klasik mikroglial aktivasyon olarak nitelendirilen M1 fenotipi oluşur (42, 86). Bu subtip proinflamatuvar sitokin sentezinde artış ve IL-10 gibi antiinflamatuvar sitokinlerin düşük düzeyde olması ile karakterizedir. Zıt olarak IL-4 ve IL-13 gibi sitokinlere maruz kalan mikroglia M2 fenotipine dönüşür (89). Alternatif aktivasyon olarak nitelendirilen bu fenotip ile proinflamatuvar sitokin üretimi azalır, sitokin sinyal mekanizmaları baskılanır ve IL-10, TGF-1 β (transforming growth factor) gibi antiinflamatuvar sitokinlerin üretimi artar (42, 86).

Deneysel fokal hasarda serebral immun yanıt tanımlanmasına rağmen, TBH sonrası ilk 24 saatte nötrofilik infiltrasyon ve 3-5 günde makrofajlarla takviye edilen inflamatuvar sürecin gerçekleşmesi aslında beyin kontüzyonuna bağlıdır (90). Buna karşılık deneysel diffüz aksonal hasarda, sistemik dolaşımdan akut nötrofil cevabı olmadan astrosit ve mikrogliaların immün aktivasyonu ve periferik makrofajların infiltrasyonu gösterilmiştir. Bu immün

reaksiyonlardaki farklılık KBB'deki değişik derecelerdeki bozulmalardan ya da kişinin gösterdiği immün yanıtta kaynaklanabilir. Birçok deneysel TBH araştırması fokal hasar modellerine odaklanmakla birlikte, diffüz aksonal hasardaki immün yanıt son yıllarda aydınlanmaya başlamıştır (91).

İnterlökin 1'in (IL-1) zararlı etkileri; fokal hasarda mikroglialardan, diffüz hasarda nöronlar ve travmanın erken dönemlerinde açığa çıkan reaktif astrositlerden eksprese edilen IL-1 reseptörü aracılığı ile (91, 92). IL-1'den kaynaklanan hasar, yalnız sitokin kendisine bağlı değil daha çok TNF- α , siklooksijenaz 2, fosfolipaz A2 ve prostaglandinleri içeren diğer proinflatuar sitokinleri aktive etmesi, onlarla sinerjistik etki göstermesi ve glutamat aracılı eksitotoksititeyi artırmasına bağlıdır. TBH'da proinflatuar ve nörotoksik özelliği olan IL-1 ile devam eden nöroinflamasyonun kötü prognoz ile ilişkili olduğu deneysel olarak gösterilmiştir. TBH sonrası serebrospinal sıvılarında yüksek IL-1 düzeylerine sahip hastalarda GKS daha düşük bulunmuştur (93).

TNF- α ; IL-1 gibi TBH çalışmalarında sadece proinflatuar bir sitokin olarak düşünülürken, son yıllarda olası nöroprotektif özellikleri ortaya çıkmaya başlamıştır. TNF- α 'nın mikrogliaların üretimini ve hipertrofiye olmalarını arttırdığı, bu hücrel kaynaklardan parakrin etki ile kendi üretimini attırdığı bilinmektedir. Ayrıca özellikle diffüz hasarda önemli olan periferik dolaşımdan lökosit toplanmasını, KBB'nin bozulmasına yol açan proteolitik enzimlerin salınımını ve astrositik yeniden yapılanmanın ve nöronal rejenerasyonun inhibisyonunu destekler (94). Fokal hasar modelleri, TNF- α 'nın etkilerinin yayılan özelliğini göstermektedir. Örneğin TNF- α ekspresyonu fokal hasarlı farede kontralateral korteks ve hipokampusta artmış olarak bulunmuştur; kontrollü kortikal çarpma modellerinde ise pik serebral ödem olmadan önce en yüksek düzeyde saptanmıştır (95).

İnterlökin-10 (IL-10) ve TGF- β , immünsüpresif etkileri olan antiinflatuar sitokinlerdir ve etkilerini TNF- α , IL-1 ve interferon- γ gibi proinflatuar sitokinleri inhibe ederek gösterirler (96). IL-10, santral nöroinflamasyonu azaltırken politravmalı hastalarda periferik olarak immünsüpresyona yol açar. Multitravmalı hastalarda bu çok önemlidir, çünkü sistemik antiinflatuar yanıtlar klinik olarak enfeksiyona yatkınlığı arttırmak gibi sekonder beyin hasarına katkı sağlayabilir. Bunun dışında antiinflatuar sitokinin kendisi nöroinflamasyona bağlı sekonder beyin hasarını azaltabilir.

Lökosit iletişimi ve göçündeki rolleri ile bilinen kemokinler, TBH'dan sonra periferik lökositlerin göçünü başlatırlar. Yapılan çalışmalarda kemokinlerin intraserebral üretimi

gösterilmiştir (97). Kemirgenlerde makrofaj inflamatuvar protein-2 olarak bilinen IL-8, nötrofiller için güçlü bir kemotaktik faktördür ve proteazları indükleyerek sekonder hasara aracılık ettiği bildirilmiştir (98). Günümüzde artık SSS'nin periferik immün infiltrasyona reaktif bir yapı olmadığı ve santral immünoaktivasyonun periferik immünolojik olayları etkilediği düşünülmektedir.

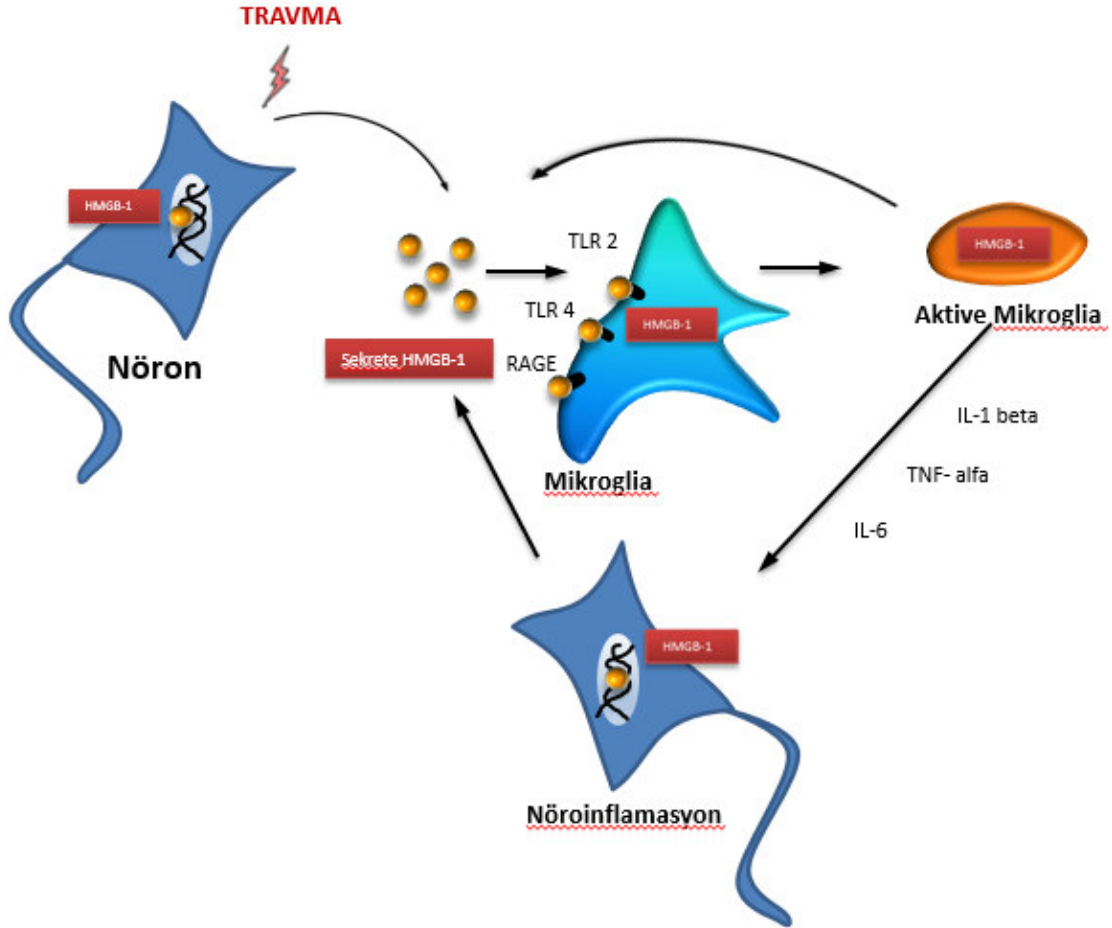
2.4 HMGB1 Protein

1973 yılında Ernest Johns ve Graham Goodwin tarafından hücre nükleusundan histonlarla birlikte 30 kDA molekül ağırlıklı protein serbestleştirilmiş ve elektroforez jelindeki hızlı hareketinden dolayı High mobility group (yüksek hareketli grup) box-1 olarak adlandırılmıştır. Nükleer bir non-histon protein olan HMGB-1, kromatin bağlayıcı önemli yapısal bir faktördür. Nükleozomal yapı ve stabilitenin belirlenmesi, transkripsiyon faktörlerinin aynı kökenli DNA yapılarına bağlanması gibi farklı hücresel fonksiyonlar içerir. İleri derecede elektriksel yüke sahip olan HMGB-1 protein, C-terminalinde negatif yüklü rezidüler (aspartik ve glutamik asit), N-terminalinde pozitif yüklü bölgeler (A box ve B box) içerir. Sekonder DNA yapıları için bağlanma bölgeleri mevcuttur. Bu gözlemler HMGB1 proteinin DNA rekombinasyonu, onarımı, replikasyonu ve transkripsiyonunda rol oynadığını desteklemektedir (99, 100).

1999 yılında HMGB-1 proteinin sepsiste geç mediatör olduğunun bulunması ile birlikte yeni bir araştırma alanı doğmuştur (99). Sepsis, iskemi-reperfüzyon hasarı, Alzheimer, Huntington, Parkinson, multipl skleroz, amyotrofik lateral skleroz, optik nöromiyelit, epilepsi, nöropatik ağrı, menenjit, epilepsi, spinal kord yaralanması, koroner arter hastalığı, vaskülit, ateroskleroz, abdominal aort anevrizması, artrit, miyozit, sistemik lupus eritematosus ve ayrıca çeşitli akciğer, karaciğer, mide, bağırsak, böbrek hastalıklarında, AİDS ve kanserlerde HMGB-1 proteinin rol aldığını gösteren çalışmalar yapılmıştır (101).

Enflamatuvar stimülasyona bağlı olarak HMGB-1 proteinin bağışıklık sistem hücrelerinden (monosit, makrofajlar) aktif, nekrotik hücrelerden de hücre dışına pasif salınımı söz konusudur (99). HMGB-1 proteinin aktif salınımı, ekzojen bakteriyel endotoksin veya endojen proinflamatuvar sitokin (TNF- α , IL-1 β) stimülasyonu ile doz ve zaman bağımlı olarak gerçekleşir. Nekrotik ve hasarlı hücrelerden pasif olarak salınan HMGB-1 protein ise komşu bağışıklık sistem hücrelerine hasar sinyalinini taşır (102, 103). HMGB-1 beyinde yaygın olarak bulunur (104-106). Beyinde travma ve iskemi gibi nöral doku hasarı yaratan patolojilerden

sonra nekrotik dokuların nükleuslarından sitoplazmaya veya ekstrasellüler aralığa salınan HMGB-1 proteinin, proinflamatuvar sitokin salınımını indükleyerek enflamasyonun başlangıç basamağı olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 1: HMGB-1 etki mekanizması

Hücre nükleusunda yerleşik HMGB-1, DNA rekombinasyonu, onarımı, replikasyonu ve transkripsiyonunda rol oynarken aynı zamanda hücreyi apoptozdan koruyucu rolü de üstlenir (107, 108). HMGB-1 protein nükleustan sitoplazmaya geçince otofaji işlemine aracılık eder. Nükleus dışına çıkan HMGB-1 protein ise, alarmin veya hasar ilişkili molekül (DAMP) olarak adlandırılarak bu şekilde işlev görmeye başlar (109, 110). Ekstrasellüler alanda HMGB-1, patojen ilişkili moleküler paternler (PAMPs), sitokinler ve kemokinler ile ilişki kurarak işlev görür ve böylece inflamatuvar ve otoimmün hastalıkların patogenezinde rol oynar (111, 112).

Orta serebral arter oklüzyon modeli uygulanan farelerde HMGB-1 proteinin hasarlı nöronlardan hücre dışına salındığı görülmüştür (113). Yapılan çalışmalarda serebral iskemi hastalarında serumda, subaraknoid hemoraji hastalarında beyin omurilik sıvısında HMGB-1

protein düzeylerinin artış gösterdiği ve nörolojik hasarı saptamada potansiyel laboratuvar göstergesi olabileceği saptanmıştır (114, 115).

Hücre dışına salınan salınan HMGB-1 protein anahtar sitokin olarak rol alır ve enflamatuvar yanıtın indüklenmesinde rol oynar (17). Hücre dışına çıkan HMGB-1 protein, reseptörleri olan RAGE, TLR-4 ve TLR-2' ye bağlanır (18, 19). Bu bağlantı nükleer faktör kappaB'yi aktif hale getirir ve böylece proinflamatuvar mediatörlerin salınımı indüklenir ve bu yolla HMGB-1 protein enflamatuvar yanıtı aracılık eder (20, 21).

Genetik olarak lipopolisakkaride dirençli farelere intratrakeal verilen HMGB1 akciğerde nötrofil birikimini ve proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-1 β) akciğer dokusunda lokal üretimini stimüle eder. Akciğer dokusunun histolojik incelemesinde interstisyel ve intraalveolar alanlarda nötrofil birikimi, interstisyel ödem, alveolar yüzeye protein eksüdasyonu ile karakterize akut diffüz enflamatuvar yanıt görülür (116). HMGB-1 proteinin intraventriküler verilmesi, beyinde TNF- α ve IL-6 yapımını artırır (117). Gastrointestinal sistem üzerine etkisi incelendiğinde, nitrik oksit sentaz aktivitesini, epitelyal bariyer fonksiyon kaybı ile intestinal mukozal permeability ve mezenterik lenf nodlarına bakteriyel translokasyonu arttırdığı gösterilmiştir (118). Enflamasyonun geç mediatörü olarak salınan HMGB-1 protein sistemik enflamatuvar yanıt patogenezinde erken medyatör yanıtından sonra katılır (119).

Deneyssel olarak HMGB-1 proteinin salınımını ya da aktivitesini inhibe eden tedavi stratejileri, hayvanlarda sepsise bağlı ölümü önlemiştir. HMGB1 protein antikorları ve HMGA box (HMG'nin N-terminalinde yer alan pozitif yüklü bölge) HMGB1 proteini antagonize ederken, etil pirüvatın HMGB-1 protein salınımını inhibe ettiği gösterilmiştir (102).

2.4.1 RAGE ve TLR4

RAGE, immüoglobulin gen süper familyasının bir üyesidir. Bir transmembran reseptörü olan RAGE'nin; ekstrasellüler bölge, kısa transmembran bölgesi ve 43-amino asitlik sitoplazmik kuyruğu bulunmaktadır. İnsanda ve farede geni, HLA lokusu yanında majör histokompatibilite kompleksi sınıf III bölgesi civarındadır ve kromozomu 6p21.3 üzerinde lokalizedir. Yeni yapılan bir çalışmada RAGE'nin hücre adezyon molekülü ailesinden olduğu ve memeli hücrelerinde adezyon molekülü olarak görev aldığı belirtilmiştir (120). Sitoplazmik kuyruğu NF-KB sinyali gibi hücre içi sinyal iletimi için gereklidir. RAGE birçok sayıda fizyolojik ve patolojik süreçlerin düzenlenmesi için; HMGB1, S100, amiloid β peptid,

DNA ve RNA gibi çeşitli moleküllere bağlanır. Bir dizi çalışma HMGB-1 kaynaklı hücre göçü, proliferasyon, rejenerasyon, inflamasyon, hasar, metabolizma, otofaji ve immunité gibi durumlarda, HMGB1 proteinin etkisini gösterebilmesi için RAGE reseptörlerine bağlanmasının gerekli olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak ekstrasellüler HMGB-1 çeşitli hücre tiplerinde RAGE ekspresyonunu uyarabilir (121). HMGB1-RAGE sinyal eksenini, enflamatuar ve otoimmün hastalıkların tedavisi için önemli bir potansiyel hedefdir (122, 123).

Toll-like reseptörler (TLR); tip1 transmembran reseptör ailesinden olup, lösenden zengin ekstrasellüler kısım ve sitoplazmik Toll/IL-1reseptör bölgesi içerirler. Toll like reseptörler hücrel hasarlanma ve enfeksiyon gibi durumlarda PAMP ve DAMP gibi bazı tehlike sinyallerini tanıyarak savunma amacıyla immün sistemi aktive ederler (124). TLR aktivasyonu ile iki tane majör sinyal iletim yolu vardır. MyD88 bağımlı yol inflamatuvar sitokinlerin üretimi için gereklidir. HMGB-1 protein, Toll-like reseptörler ile etkileşime girerek NF- κ B'ı aktive eder ve bunun sonucunda inflamatuvar ve immün cevaplar için sitokinler ve kemokinler üretilir. HMGB-1/TLR-4 ilişkisinin inflamasyonu aktive etmenin yanında radyoterapi ve kemoterapi sırasında antikanser immünitesine de aracılık ettiği gösterilmiştir (125). *In vivo* veya *in vitro* TLR4'ün inhibe edilmesiyle, HMGB-1 proteinin indüklediği hücre hasarında azalma görülmüştür (14).

2.5 Beyin Ödemi

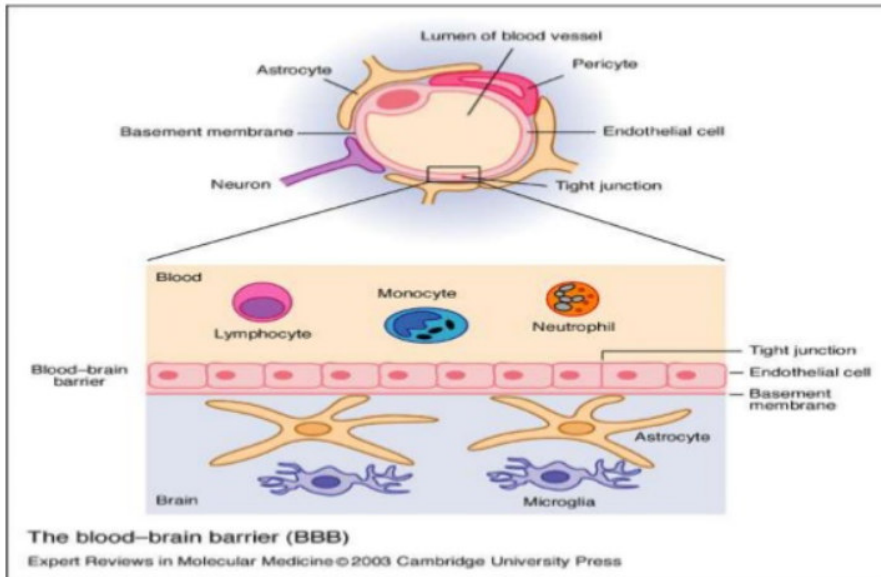
Mortalite ve morbidite açısından travmatik beyin hasarında beyin ödeminin varlığı ve şiddeti önemli bir yer tutmaktadır. Hastalarda ödem ile birlikte artan kafa içi basıncı ve serebral perfüzyonun bozulması ağır hasarla veya ölümlle sonuçlanabilir.

Travma sonrası beyinde vazojenik ve sitotoksik ödem oluşur. Vazojenik ödem, travma sonrası KBB'deki permeabilite artışı sonucu proteinlerin (plazma türevleri) ve buna bağılı olarak suyun geçişi ile oluşur. İskemik ödem olarak sitotoksik ödemde, kan beyin bariyeri hasarı olmadan ödem meydana gelir (126). İskemi sonrası oluşan hipoksi (kan akımı<12mL/100gm/dk) ve buna bağılı Na/K ATPaz pompasının enerji azlığına bağılı işlev bozukluğu sitotoksik ödem gelişmesine neden olur. Hücre içine sodyum girişi, hücre dışına potasyum çıkışı olur ve bu olayları hücre içine pasif difüzyonla su girişi takip eder.

2.5.1 Kan beyin bariyeri (KBB)

Nöronların elektrolit dengesinin sağlanması, elektrofizyolojik özelliklerini sürdürebilmeleri için gereklidir. KBB iyon transportunu ve beyin fonksiyonları için gerekli metabolitlerin hareketini yönetir. Beyin dokusu arasındaki iyon, metabolik maddeler ve sıvı değişimi esas olarak kapiller dolaşım tarafından yapılmaktadır.

KBB'nin yapısı incelendiğinde; endotel hücrelerinin pentalaminar sıkı bağlantılar ile birbirlerine kenetlendikleri, kapiller bazal membranın kesintisiz olarak devam ettiği ve astroglial ayaksı uzantılarıyla desteklenmiş olduğu, endotelial hücrelerin mikropinositik aktivitelerinin kısıtlandığı, fazla miktarda mitokondri içerdiği ve fenestrasyonlarının olmadığı görülmüştür. Serebrovasküler endotelin geçirgenliğinin çok düşük olduğunu gösteren en önemli özellik hücreler arası sıkı bağlantının çok kuvvetli olması, transendotelial kanalların ve pencerelerin olmayışıdır. Beyin kapiller endotel membranı yarı geçirgen bir lipid membran olarak işlev görür. Böylece yağda eriyen moleküllerin, O₂ ve CO gibi gazların geçişine izin verir. Buna karşın polar ve büyük maddeler geçemezler. Maddelerin beyine pasif difüzyonla geçişi, maddelerin moleküler boyutları, elektrik yükleri, yağda eriyebilme gibi kimyasal özelliklerine bağlıdır. Yağda eriyebilen maddeler KBB'den daha rahat geçerler. Aminoasitler, glikoz, biyolojik aminler ve diğer esansiyel besinler, membran transport mekanizmaları ile KBB'den geçebilirler.



Şekil 2: Kan Beyin Bariyeri

Serebrovasküler permeabilite kafa travması sonrası çeşitli mekanizmalar sonucunda artış gösterir. Bu mekanizmalar:

- Endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların ayrılmaları,
- Endotel hücre membranlarının biyokimyasal veya yapısal değişikliği,
- Transendotelial kanalların veya porların genişlemesi,
- Veziküler transportun artmasıdır.

KBB; yüksek selektivitesi nedeniyle, beyin parankimine kan yoluyla geçen faktörlerden (albümin, trombin, fibrinojen) ve immun hücrelerden arınmış bir mikroçevre yaratır. KBB'deki sıkı bağlantıların hasar görmesi sonucu bu faktörler ve immun hücrelerin beyin parankimine geçişi başlar (87).

KBB disfonksiyonu; oksidatif stres, enflamasyon ve hücre ölümü gibi diğer sekonder hasar mekanizmalarını tetikler ve böylelikle artan beyin ödemi ve iskemiye bağlı olarak gelişen kafa içi basınç artışı sonucunda herniasyon tabloları oluşur (127).

Travmatik beyin hasarı sonucu KBB bariyeri disfonksiyonu gelişimine sebep olan mekanizmalardan birisi de matrix-metalloproteinaz 9 (MMP-9) artışıdır. MMP-9; KBB' deki sıkı bağlantıların kopmasına ve KBB disfonksiyonuna neden olarak, bunun sonucunda lökositler gibi büyük moleküllerin geçişini sağlayarak beyinde yarattığı osmotik kuvvet sayesinde beyin ödemi artışına ve buna bağlı olarak artan intrakranial basınç neticesinde gelişen iskemi ve hücre ölümü ile direkt ilişkilidir (128, 129).

2.5.2 Sıkı bağlantı molekülleri (Okludin, kludin-5 ve ZO-1)

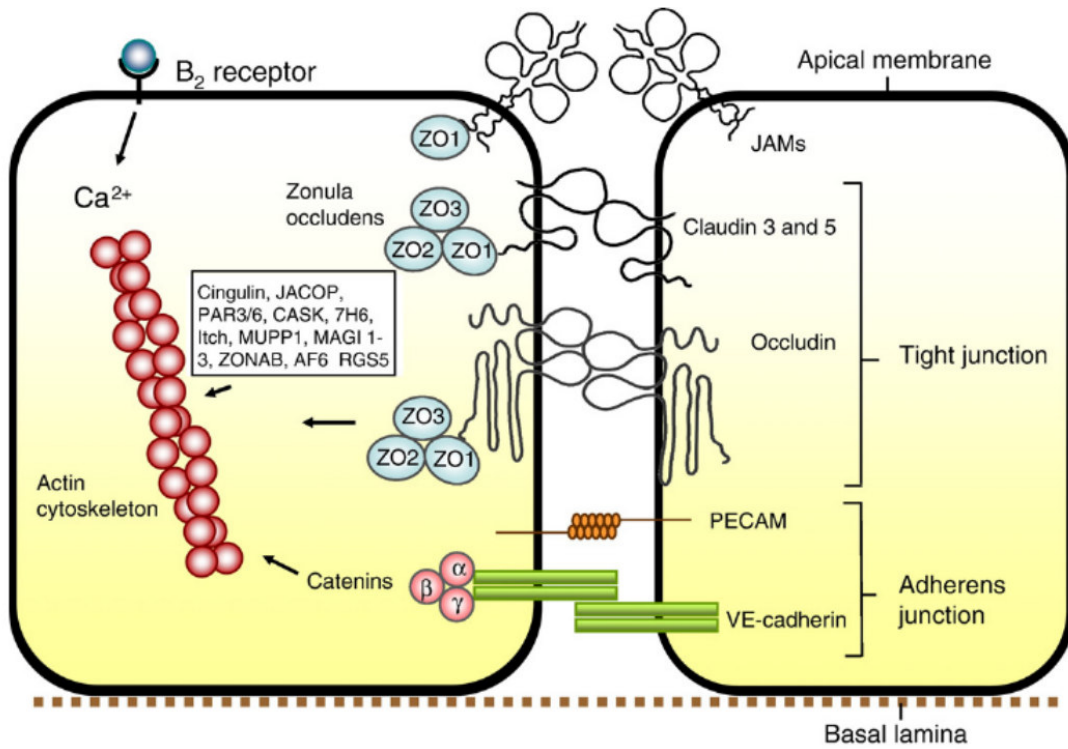
Beyindeki vasküler endotel hücreler, tight junction adı verilen sıkı bağlantılar ile kenetlenmiş, kesintisiz bir bazal membran üzerine yerleşmiş olması ve fenestrasyon göstermemesi nedeniyle periferik vasküler endotelial hücrelerden oldukça farklıdır.

Morfolojik olarak zonula okludens olarak da adlandırılan bu yapıların, lokalizasyonuna göre difüzyon kapasiteleri ve dirençleri değişiklik gösterir. Bu elektriksel direnç değeri, diğer dokularda 3-33 Ω/cm^2 iken, KBB'de 1500-2000 Ω/cm^2 dolayındadır. Bu durum paraselüler yolla (endotel hücreleri arasından) beyne makromolekül ve iyonların geçişini önemli ölçüde kısıtlar. İntraselüler ve ekstraselüler kalsiyum konsantrasyonu ile endotel hücreleri, glial hücreler ve nöronlardan salınan vazoaktif ajanlar ve sitokinler bariyerin elektriksel direncini ve geçirgenliğini değiştirebilir (130, 131).

Serebral endotel hücreleri, koroid pleksus epiteli ve araknoid epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar, kandan beyin dokusuna birçok makromolekül ve polar maddenin geçişini

engelleyen önemli bir yapıdır. TJ yapıları, lokal ve dolaşımdaki faktörlere bağlı olarak paraselüler yolun fonksiyonlarını dakikalar içerisinde düzenleme kabiliyetine sahiptir (131, 132).

Sıkı bağlantı (TJ) proteinleri, integral ve sitoplazmik olmak üzere ikiye ayrılır. İntegral proteinler; klaudin, okludin ve bağlantı adhezyon molekülü (junctional adhesion molecule: JAM) iken, sitoplazmik proteinler ise zonula okludensler (ZO-1, 2, 3), singulin ve diğer proteinlerden oluşmaktadır. Sitoplazmik ve membran proteinleri ile bağlantıda olan aktin, endotel hücresinin fonksiyonel ve yapısal bütünlüğünün korunmasında önemli olan hücre iskeleti proteinidir (131).



Şekil 3: Serebrovasküler endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantı kompleksi (Abbott, N.J. et al., Structure and function of the blood–brain barrier. Neurobiology of disease, 2010. 37(1): p. 13-25.)

a) İntegral proteinler

Klaudin: 22 kDa ağırlığında ve fosfoprotein yapısında olan klaudinler sadece TJ yapıları içerisinde bulunur. Klaudinlerin insan ve farelerde bilinen 20 izomeri mevcuttur. C-terminal uçları ile hücre içinde ZO-1, ZO-2 ve ZO-3'ün PDZ bölgesine (postsynaptic density-95 zone) bağlanır. Klaudinler, TJ yapısı içinde komşu endotel hücrelerindeki klaudine bağlanarak, vasküler endotel hücreleri arasından beyin parankimine makromolekül ve iyonların geçişini önemli ölçüde kısıtlayarak, paraselüler geçirgenlikte anahtar rol oynar

(131, 132). HMGB-1 proteinin, klaudinler arasındaki bağlantının bozulmasında etkili olduğu düşünülmektedir.

Okludin: TJ yapısında ilk keşfedilen, 65 kDa ağırlığında integral fosfoproteindir. Okludinin aminoasit dizilimi insan ve kemirgenlerde %90 homoloji göstermektedir. C-terminal bölgesi ise türler arasında en çok benzerlik gösteren kısmıdır. C-terminal bölgesine, en çok ZO-1 proteini bağlanır ve aktin ile doğrudan ilişki içerisindedir. Kalsiyumdan bağımsız bağlayıcı, yapıştırıcı protein özelliği olan okludinin membrandaki yoğunluğu elektriksel direnç artışı ile paralellik gösterir (131, 132). Okludinin oluşturduğu bu yüksek direnç sayesinde vasküler endotel hücreleri arasından beyin parankimine makromolekül ve iyonların geçişi büyük ölçüde kısıtlanır. Okludinin G-protein bağımlı veya bağımsız olarak fosforilasyonu paraselüler geçirgenliği düzenlemektedir. Son çalışmalar, okludinin epitel hücre farklılaşmasında ve transepitelyal nötrofil migrasyonunda rolü olduğunu göstermektedir (133). HMGB-1 protein proinflamatuvar sitokin salınımına neden olarak, okludinin oluşturduğu elektriksel direnci dağıtarak endotel hücreleri arasındaki paraselüler geçişi arttırabilir.

b) Sitoplazmik proteinler

Okludin, klaudin ve JAM gibi transmembran proteinlerin C-terminal uçları hücre iskelet proteini actine ZO-1 protein tarafından bağlanmaktadır. TJ oluşumunda rol alan sitoplazmik proteinler; ZO-1, ZO-2, ZO-3, singulin, 7H6 ve diğer birkaç proteinden oluşur. ZO-1, 2 ve 3 membran bağlantılı guanilat kinaz benzeri proteinlerdir (MAGUK). ZO-1 ve ZO-2 C-terminal uçları, hücre iskeletini oluşturan aktin proteini ile bağlanır. Aktin primer hücre iskelet proteini olup, TJ proteinleri ile etkileşerek paraselüler geçirgenlikte rol almaktadır (131). ZO-1: okludin, klaudin, JAM ve aktin ile etkileşir. ZO-2: klaudin, okludin, singulin ve α -katenin ile etkileşir. ZO-3 ise singulin, ZO-1 ve miyozine bağlanır.

2.6 Etil Pirüvat

Etil pirüvat (EP), pirüvik asitin basit alifatik esteridir ve çeşitli hastalıklarda koruyucu etkileri gösterilmiştir. EP, hücrede pirüvata çevrilerek metabolize edilir. Pirüvat ise mitokondri içerisinde Krebs siklusuna katılır. EP lipidlerde çözünebildiği için, hücre membranını ve kan beyin bariyerini rahatlıkla geçer (134).

Sistemik enfeksiyon ve letal sepsis oluşturulan farelerde yaşam süresini uzattığı, bunun yanında iskemi kaynaklı miyokard hasarını azalttığı saptanmıştır (135, 136). EP, postiskemik beyinde infarkt hacmini belirgin bir şekilde azaltmıştır (137). Travmatik beyin hasarı ve spinal kord iskemi modellerinde motor fonksiyon skorlarını arttırmıştır (138, 139).

Birçok deneysel hastalık modelinde, EP'nin antiinflamatuvar etkisini HMGB-1 protein serbestlenmesini inhibe ederek gösterdiği ve böylece hücre hasarını azalttığı gösterilmiştir. Wang ve arkadaşları spinal kord iskemi modeli oluşturarak yaptıkları bir çalışmada etil pirüvatın; HMGB-1 protein salınımını engelleyerek motor defisit gelişimini ve apoptotik nöron sayısını azalttığını göstermişlerdir (138).

Yapılan bir çalışmada EP'nin; aktive mikroglialardan TNF, IL-6 ve NO salınımını engellediği görülmüş ve bu inhibisyonun EP'nin antiinflamatuvar etkisinden sorumlu olduğu düşünülmüştür (140). Ratlarda ağırlık bırakılarak deneysel travmatik beyin hasarı oluşturulan model ile yapılan bir çalışmada ise, EP tedavisinin nöroprotektif etkilerinin HMGB1 / TLR4 / NF-kB yolunun aktivasyonunun inhibisyonu ile ilişkili olduğu görülmüştür (37).

2.7 Kafa Travmalarında Klinik Tedavi

Kafa travmalarında tedavinin amacı, artmış kafa içi basıncını azaltmak, ikincil nöronal hasarlardan koruyucu tedbirler almak, beyin dokusunda iyileşme potansiyeli olan hücreler için en iyi biyolojik koşulları sağlamaktır. Bu amaçla beyin ödemi tedavisi hidrostatik, ozmotik ve onkotik güçlerin biçimlendirilmesi ilkesine dayanır. Bu terapötik hedeflerde fizyolojik sınırlardan sapma sıkı takip edilmeli ve olabildiğince hızlı düzeltilmelidir. Klinik olarak uygulanan kafa içi basıncı azaltmaya yönelik tedaviler; solunum desteği, hipertonic sıvı tedavisi, başın 30 derece yükseltilmesi, hiperventilasyon, metabolik fonksiyonların düzenlenmesi, diüretik (furosemid), karbonik asit inhibitörü (asetozolamid) ve mannitol verilmesi, sedasyon sağlanması, BOS drenajı, barbitürat ve cerrahi olarak dekompresif kraniektomidir.

3)GEREÇ VE YÖNTEM

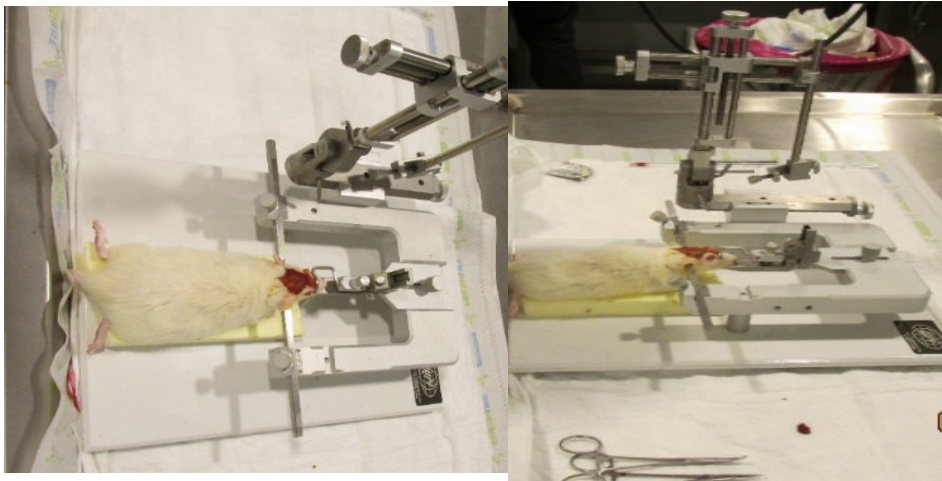
3.1 Deney Hayvanları

Bu çalışmada 10-12 haftalık, ağırlıkları 250- 350 g arasında değişen, daha önce herhangi bir deneyde kullanılmamış, toplam 30 adet erkek erişkin Spraque-Dawley cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan sağlandı. Sıçanların, çalışma süresince oda ısısında (22 ± 2 °C) ve 12 saat aydınlık-12 saat karanlık ışık siklusunda ve %50-60 nem ortamında, standart pelet sıçan yemi ile beslenerek suya serbestçe ulaşabilmeleri sağlandı. Çalışmaya başlamadan önce sıçanlar bir hafta süreyle bu ortamda izlendi ve ortama uyum sağlamaları gözlendi.

Çalışma için Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 27.02.2015 tarih ve 2015/62 sayılı etik kurul onayı alındı.

3.2 Anestezi ve Sıçanların Hazırlanması

Deney hayvanlarına anestezi, cerrahi işlem öncesi 60 mg/kg ketamin hidroklorür (Parke Davis, İstanbul) ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rompun % 2 solüsyon, 50 cc. flakon, Bayer-Türk İlaç Ltd. İstanbul) spontan solunumda arka bacadan intamuskuler yolla uygulandı. Sedasyondan emin olunduktan sonra sıçanların başı traş edildi. Daha sonra sıçanlar sert bir süngerin üstünde yüzüstü pozisyonda stereotaksi aletine (World precision instruments stereotaxic frame Model No:502600 Florida/ USA) yerleştirildi (Resim 1).



Resim 1: Sıçanların stereotaksi aletine yerleştirilmesi

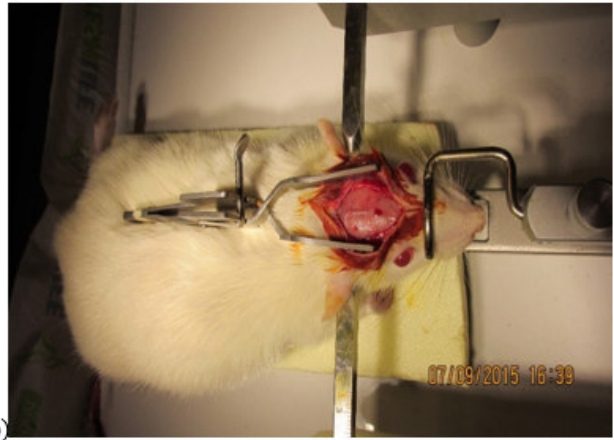
3.3 Kafa Travması Modeli ve Uygulanması

Sıçanlarda kafa travması modeli oluşturulurken, insanda kafa travması sonrası sıklıkla gözlenen serebral ödem, intrakraniyal hipertansiyon ve serebral kan akımı değişikliklerini gerçeğe daha yakın saptaması ve belirgin beyin sapı hasarı oluşturmadan ağır kafa travması düzeyine ulaşılabilmesi nedeniyle 1981 yılında Feeney ve ark. tarafından tanımlanan, kafaya ağırlık düşürülerek (akselerasyon) oluşturulan travma modeli kullanılmıştır (141).

Sıçanlar, anestezi ile sedasyon sağlanıp yüüstü pozisyonda, sert sünger üzerinde, kafaları stereotaktik alet ile sabitlendikten sonra, daha önce traş edilen sıçanın kafası batikonla temizlendi. Orta hattan dikey olarak, 15 numara bistüri ile 3-4 cm uzunluğunda cilt-ciltaltı kesisi yapıldı. Dissektör yardımıyla orta hattan sağ temporal kemiğe doğru periost kemikten sıyrıldı. Otomatik ekartör yerleştirildi. Orta hat, koroner sütün ve lambdoid sütün net olarak görüldü. Sağ parietal alanda dental tur aleti yardımıyla merkezi bregmanın 2.5 mm posteriorunda ve orta hattın 2,5 mm lateralinde kalacak şekilde, 5mm çapında dairesel kraniotomi uygulandı. Kemik flep dissektör yardımıyla kaldırıldı. Bu işlem sırasında dura intakt kalacak şekilde korundu. Gereğinde dura kanamaları için oksitlenmiş selüloz (Surgicel, Ethicon, İstanbul), kemik kanamaları için Bone-wax (Ethicon, İstanbul) kullanıldı. Kanama kontrolünden sonra stereotaktik aparata sabitlenmiş olan 30 cm uzunluğundaki, dış çapı 5 mm, iç çapı 4.5 mm olan cam tüpün üst ucundan, uçları küt olan 20 gr metal ağırlık serbest düşüşe bırakıldı. Bu şekilde 4,5 mm çapında kontüzyon alanı oluşturuldu (Resim 2). İşlem sonrası tekrar kanama kontrolü yapılarak cilt tek kat olarak 3/0 ipek yardımıyla sütüre edildi. Daha sonra batikonla cilt pansumanı yapılarak sıçanlar kafeslerine koyuldu. Tüm bu işlemler esnasında asepsi kurallarına uyuldu ve cerrahi işlem sırasında ısıtıcı pedler kullanılarak vücut ısısı 36.5-37.5 derece aralığında tutuldu.



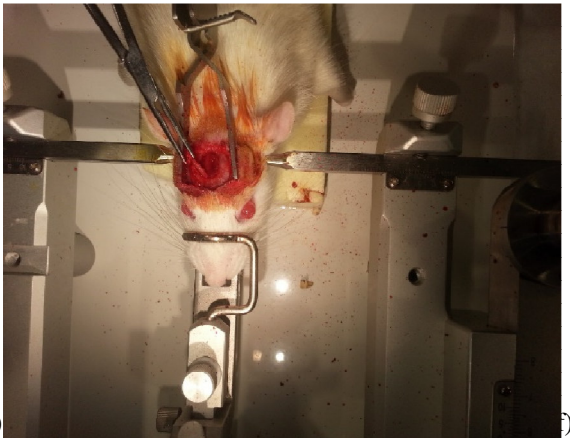
a)



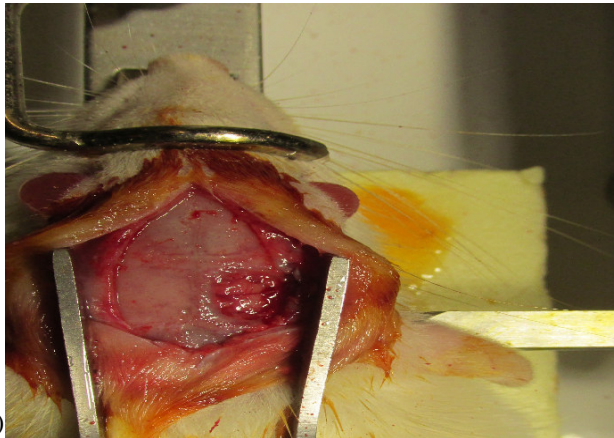
b)

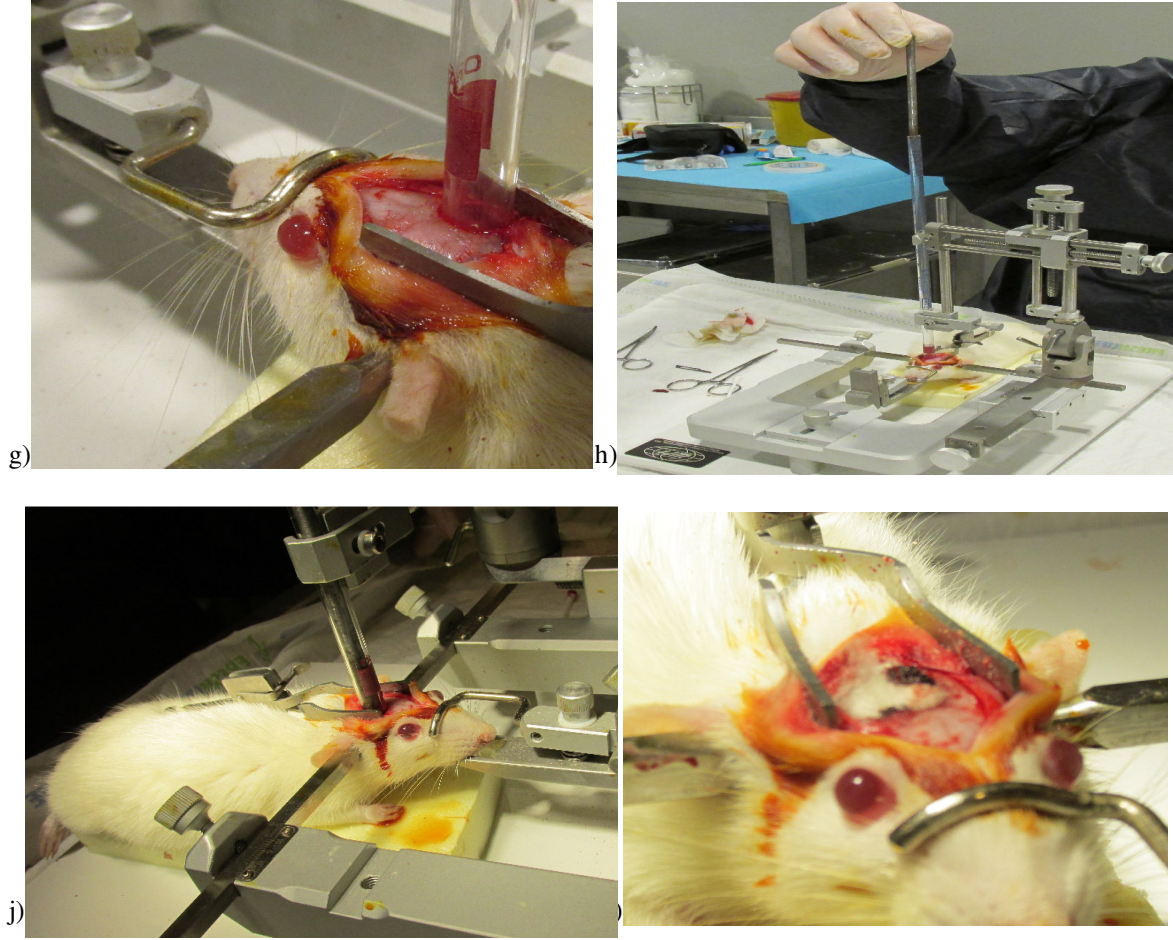


c)



e)





Resim 2: Sıçanlara kafa travması uygulanması. a) Orta hat insizyonu; b) Otomatik ekartörün yerleştirilmesi ve koroner, lambdoid sütürlerin görülmesi; c) Drill ile kraniotomi yapılması; d) Kranotomi sınırları; e) Kemik flebin kaldırılması; f) İntakt dura; g) Cam tüpün yerleştirilmesi; h) Ağırlığın tüpün ucundan atılması; j) Duraya çarpan ağırlık; k) Sargicell ile kanama kontrolü

3.4 Deney Grupları

Sıçanlar rastgele seçilerek, her bir grupta 10'ar adet sıçan olmak üzere üç grup oluşturuldu. Kontrol grubu hariç, diğer gruplara kafa travması uygulandı.

Grup 1 (Kontrol) (n: 10): Sağ parietal kraniotomi yapıp travma uygulanmadan cilt-cilt altı sütüre edilerek kapatılmıştır. Ardından 30. dk, 90. dk ve 6. saatte intraperitoneal yolla %0,9 salin enjeksiyonu yapılmıştır (7,5 ml/kg).

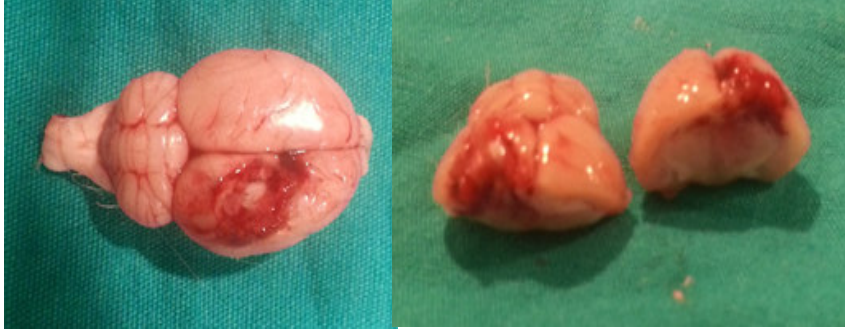
Grup 2 (Travma) (n: 10): Sağ parietal kraniotomi yapıp kafa travması metodu uygulanarak, cilt-cilt altı sütüre edilerek kapatılmıştır. Ardından 30. dk, 90. dk ve 6. saatte intraperitoneal yolla %0,9 salin enjeksiyonu yapılmıştır (7,5 ml/kg).

Grup 3 (Travma+etil pirüvat) (n: 10): Sağ parietal kraniotomi yapıp kafa travması metodu uygulanarak, cilt-cilt altı sütüre edilerek kapatılmıştır. İşlem sonrası ratlara 30. dk, 90. dk ve

6. saatte etil piruvat 75 mg/kg dozunda intraperitoneal yolla verilmiştir. (EP %0,9 salin ile dilüe edilerek 10mg/ml olacak şekilde verilmiştir.)

3.5 Sakrifikasyon İşlemi ve Doku Örneklerinin Alınması

Kontrol grubuna kraniotomi sonrası, diğer gruplara travma sonrası 24. saatte anestezi uygulanıp sedasyon sağlandıktan sonra tüm gruplardaki sıçanlardan intrakardiyak yolla 10 cc kan alındı ve kuru (jelsiz) biyokimya tüplerine koyuldu. Daha sonra sıçanlar dekapitasyon işlemi ile sakrifiye edildi. Beyin travmatize edilmeden kraniumdan çıkarıldı (Resim 3). Kontüzyon alanının çevresindeki, 3mm genişliğindeki perikontüzyonel alan dikkatli bir şekilde kortikal ve subkortikal derin beyin dokusunu da içerecek şekilde çıkarıldı. Alınan örnekler %10 formaldehid içeren tüplere konuldu.



Resim 3: Kraniumdan çıkarılan beyindeki kontüzyon alanı ve derinliği

3.6 Beyin Dokusu Su Oranının Saptanması

Tüm gruplarda işlemden 24 saat sonra dekapite edilen sıçanların beyinleri çıkarılıp örnekler alındıktan sonra kalan beyin dokusu daha önceden darası bilinen tüplere yerleştirilerek yaş ağırlıkları hassas terazide tartıldı. Daha sonra bu tüpler ısı 105 derecede sabit tutulan Pasteur fırınında 24 saat bekletildi. Tüpler yeniden tartılarak kuru ağırlık tespit edildi. İşlem sonrasında elde edilen değerler beyin su oranını veren formüle yerleştirilerek beyin dokusu su oranı saptandı.

Tüm işlemler sonrasında ödem volümü aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\% \left[\frac{(\text{Yaş ağırlık} - \text{Kuru ağırlık}) \times 100}{\text{Yaş ağırlık}} \right]$$

3.7 İmmünohistokimyasal Yöntem

İmmünohistokimyasal çalışmalar için, travmanın 24. saatinde sıçanların sakrifiye edilmesinden sonra beyin dokusu tamamen çıkarıldı ve 3mm kalınlığında perikontüzyonel alan ayrılarak, %10'luk nötral formalinde fikse edildi. Fiksasyonun ardından, doku örnekleri tam otomatik doku takip cihazında (Histokinet) (Leica TP 1020 ve Leica EG 1160; Leica, Wetzlar, Germany) işlenerek, 58 °C'lik parafine gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM2155; Leica, Wetzlar, Germany) ile alınan 4-µm kalınlığındaki kesitler, pozitif yüklü lamlara yapıştırıldı. Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde, HMGB1, TLR4, RAGE, Okludin, Klaudin-5 ve ZO-1 immünoaktiviteleri, Streptavidin-Biotin Peroksidaz Kompleks (StrepABC) yöntemi ile immünohistokimyasal olarak incelendi.

Streptavidin-Biotin Peroksidaz Kompleks (StrepABC) Yöntemi: Parafin kesitler deparafinizasyon işleminden sonra hidrate edilerek, saf su ile yıkandı. Kesitleri içeren pozitif yüklü lamlar saf suda yıkandıktan sonra, mikrodalgada 10 dakika (2x5 dakika) boyunca sitrat tamponu (pH 6.0) içerisinde 700 Watt'ta kaynatıldı ve ardından 20 dakika oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Sitrat tamponunun ardından saf suda yıkanan lamlar 9-10 dakika (3x3 dakika) boyunca tuzlu fosfat tamponunda (PBS; 0.01 M; pH 7.4) bekletildi. Oda sıcaklığında ve nemli ortamda metanolde hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂)'de (Merck, 1.08597) endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için 10 dakika karanlık ortamda tutulduktan sonra tekrar PBS'e alındı. Ardından kesitlere oda sıcaklığında 10 dakika boyunca bloklayıcı serum (Thermo Scientific, TA-125-UB; Deutsch, Germany) uygulaması yapıldı. Kesitler, antikor uygulama protokolüne uygun olarak HMGB1 (Novus, NB100-2322), RAGE (Novus, NBP2-03950) ve Tight Junction Protein 1 (ZO-1) (Novus, NBP1-85046) antikorlarında +4 °C'de bir gece (18-19 saat), TLR4 (Novus, NB100-56566), Okludin (Novus, NBP1-87402) ve Klaudin-5 (Novus, NB120-15106) antikorlarında 37 °C etüvde 1 saat inkübe edildi. HMGB1, TLR4, Okludin ve ZO-1 antikorları, antikor sulandırıcı (Thermo Scientific, TA-125-UD) ile 1:100 oranında, RAGE ve Klaudin-5 antikorları ise 1:50 oranında sulandırıldı. Antikor uygulamasının ardından kesitler, PBS'de 10 dakika yıkandıktan sonra, oda sıcaklığında 30 dakika boyunca keçiden elde edilmiş biyotinlenmiş anti-tavşan sekonder antikor (Thermo Scientific, TP-125-BN) ile inkübe edildiler. Lamlar, PBS'de 10 dakika yıkandıktan sonra, peroksidaz ile işaretli streptavidin (Thermo Scientific, TS-125-HR)'de oda sıcaklığında 30 dakika tutuldu. Renkli reaksiyon ürününün oluşması için kesitler, mikroskopta reaksiyonun izlenmesi temel alınarak, yaklaşık 10 dakika boyunca 3-amino-9-etilkarbazol

(AEC) (Thermo Scientific, TA-004-HAC) ile karanlık ortamda inkübe edildi ve ardından reaksiyonun durdurulması amacıyla distile su ile yıkandı. Yıkamanın ardından, zıt boyama aşaması için kesitler 1 dakika boyunca Mayer hematoksilende (Thermo Scientific, TA-125-MH) bekletildi. Kesitler, 5 dakika boyunca musluk suyunda yıkandıktan sonra su bazlı kapatıcı (Thermo Scientific, TA-060-UG) ile kapatıldı. Negatif kontrol kesitlerine, primer antikor yerine distile su uygulaması yapıldı. Kesitler, Leica DM4000 B ışık mikroskobu ile incelendi ve fotoğrafları çekildi.

3.8 DNA Fragmentasyonunun Belirlenmesi (TUNEL Yöntemi)

Perikontüzyonel, formalin ile fikse edilmiş beyin dokusu örnekleri 58°C'lik parafine gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom ile alınan 4-µm kalınlığındaki kesitler, pozitif yüklü lamlara yapıştırıldı. Kesitlerdeki apoptotik hücreler, ApopTag® Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Kit (Chemicon International; Darmstadt, Germany) kullanılarak, TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) yöntemi ile gösterildi. Parafin bloklardan alınan 4-µm kalınlığındaki kesitler bir gece 37 °C'de tutuldu. Ksilol ve azalan alkol serilerinden geçirilerek deparafinize edilen kesitler, PBS'de yıkandı. Bunu takiben, kesitler 15 dakika boyunca 20 µg/ml proteinaz K (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) enzimi ile 37 °C etüvde inkübe edildi. Kesitlere, karanlık ortamda endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için 5 dakika boyunca PBS'de hazırlanmış %3'lük H₂O₂ (Merck, 1.08597) uygulandı. 37 °C etüvde dengeleme tamponunda 10 dakika tutulan kesitlere, 1.5 saat süresince TdT enzimi uygulaması yapıldı. TdT enziminin reaksiyonunu durdurmak için, kitin içerisinde bulunan durdurma/yıkama tamponu oda sıcaklığında 10 dakika uygulandıktan sonra, kesitler PBS ile 3 dakika (3x1 dakika) boyunca yıkandı. Bunu takiben anti-digoksinin peroksidaz enzimi 30 dakika boyunca 37 °C etüvde uygulandı. PBS'de 8 (4x2) dakika yıkama yapıldıktan sonra, kesitlere kromojen olarak 3,3'-diaminobenzidine (DAB) substratı uygulandı. 30-45 dakikalık uygulamanın ardından, kahverengi olarak gözlenen reaksiyon, distile su ile durduruldu. Kesitler bu aşamadan sonra zıt boya olarak kullanılan metil yeşili ile boyandıktan sonra, hızlı bir şekilde bütanolden geçirildi. Toplam 15 dakikalık (3x5 dakika) ksilol uygulaması ile saydamlaştırılan lamlar entellan ile kapatılarak, ışık mikroskopunda incelenmek üzere hazırlandı. TdT enziminin uygulandığı basamakta, negatif kontrol preparatında enzim yerine distile su kullanıldı.

3.9 H-Skor ve Apoptotik İndeksin Hesaplanması

Tüm değerlendirmeler iki kör gözlemci tarafından bağımsız olarak yapıldı. Yapılan immünohistokimyasal boyama sonrasında peri-kontüzyonel alandan alınan doku kesitlerindeki reaksiyonlar, 3 farklı grubun tüm bireylerinde, 400x büyütmede ve rastgele seçilmiş 8-10 farklı alanda değerlendirildi. İmmünohistokimyasal olarak HMGB1, TLR4, RAGE, Okludin, Klaudin-5 ve ZO-1 ekspresyonlarını analiz etmek için, kesitlerdeki immün pozitif hücreler histolojik skor (H-Skor) kullanılarak değerlendirildi. Pozitif boyanan hücreler sayılarak ve boyanma yoğunluğuna bağlı olarak derecelendirildi: 0, negatif; 1, hafif; 2, orta; 3, yoğun olarak kabul edildi. Her bir dokuda H-Skor değeri, $H-Skor = \frac{P_i}{i + 1}$ formülüyle belirlendi. Formülde, “i” yoğunluk skoru (derecesi), “Pi” ise boyanma gösteren hücrelere ait yüzde değeridir. Tüm kesitler, Leica DM4000 B mikroskobu (Leica) kullanılarak fotoğraflandı.

Apoptotik indeks yüzdesi, iki kör gözlemci tarafından bağımsız olarak, 3 farklı grubun tüm bireylerinde, 400x büyütmede, ortalama 800-1000 hücre içeren rastgele seçilmiş 8-10 farklı alanda sayım yapılarak belirlendi. Gözlemciler arasındaki sonuçlar karşılaştırılarak uyumlu olmayan sonuçların elde edildiği preparatlar tekrar incelendi. Hücre sayımının ardından apoptotik indeks: $100 \times \left(\frac{\text{TUNEL-pozitif hücre nükleus sayısı}}{\text{toplam hücre nükleus sayısı}} \right)$ formülü kullanılarak hesaplandı.

3.10 Western Blot Yöntemi

Western blot analizi için dokular homojenize edildikten sonra, 14000 rpm'de 15 dakika boyunca +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj edildikten sonra supernatantlar toplandı ve kullanılacak zamana kadar -20°C'de saklandı. Bütün örneklerin protein miktarı Bradford yöntemi ile ölçüldü ve 10x SDS (Sodyum dodesil sülfat) tamponu ile protein miktarları eşit hale getirildi. Protein miktarları eşitlenen örnekler daha sonra yükleme tamponu ile birlikte 95°C'de 5 dakika boyunca kaynatılarak proteinlerin denatüre olması sağlandı. Her kuyucukta 80µg olacak şekilde örnekler %12'lik SDS-Poliakrilamid jele yüklendi. Jel, 20 dakika 80 V'da daha sonra 100 dakika 120 V'da olacak şekilde elektroforez yapıldı. Elektroforez işleminden sonra jelde yürütülen örnekler IBlot (Invitrogen, U.S.A) cihazı ile PVDF (Polyvinylidene fluoride) membrana aktarıldı. Membran, TBS-T (Tris-base saline- Tween 50 mM Tris, 150 mM NaCl 0.05% Tween 20) ile %5'lik olarak hazırlanan yağsız süt tozu kullanılarak, 1 saat

boyunca oda ısısında çalkalamalı olarak inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra, membran 3 kere 5'er dakika boyunca TBS ile yıkandı.

Her bir antikor için bu işlemler aynı şekilde yapıldı. Çalışmamızda HMGB1 (1:1000 dilüsyon, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), TLR4 (1:1000 dilüsyon, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), RAGE (1:1000 dilüsyon, Novus Biotechnology, NA, USA), Okcludin, Klaudin 5, ZO-1 (1:2000 dilüsyon, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), Bax, Bcl-2, Aktif Kaspaz-3 (1:1000 dilüsyon, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) antikorları kullanıldı. 24 saat sonra her bir membran tekrar TBS-T ile 3 kere 5'er dakika boyunca yıkandı. TBS-T ile yıkanan membranlar, HRP konjuge edilmiş sekonder antikor ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalamalı olarak inkübe edildi. Membranlar, kemilüminesans görüntüleme için Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) solüsyonunda 1 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Görüntüleme işlemi Vilber Laurmat Fx5 Fusion (Vilber Laurmat XA, USA) görüntüleme sistemi kullanılarak yapıldı. Elde edilen görüntülerin optik dansitide analizi için Image J (Glyko, Novato, CA, USA) yazılımı kullanıldı.

3.11 Biyokimyasal Yöntem

3.11.1 Total antioksidan kapasite (TAS) ve total oksidan kapasite (TOS)

TAS ve TOS ölçümü yapılarak Etil pürüvat'ın ve kafa travmasının hücredeki oksidan ve antioksidan etkenlerin durumu belirlendi.

Erel ve ark. tarafından geliştirilen tam otomatik bir yöntem olup, güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bir metottur. TAS ölçümü için reaktif 1 (75 mM Clark tamponu (pH=1.8) içerisinde 10 mM o-Dianisidine ve 45 AM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O çözülerek hazırlanır) ve reaktif 2 (7.5 mM hidrojen peroksit, 75 mM Clark tamponu (pH=1.8) içerisinde karıştırılarak hazırlanır) hazırlandı. 50µl alınan örnek üzerine 100µl reaktif 1 ve 150µl reaktif 2 eklenerek 10 dk boyunca 37°C'de inkübe edildi ve daha sonra 412nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. TOS ölçümü için de reaktif A (140 mM'lık NaCl çözeltisi içerisinde 25 mM H₂SO₄ çözülerek ana solüsyon hazırlandı, ana solüsyonda önce %10 oranında gliserol çözülüp daha sonra total hacimde 250 µM Xlenol orange çözülerek hazırlandı) ve reaktif B (Ana solüsyon içerisinde önce 10 mM o-Dianisidine dihidroklorid çözülüp sonra 5 mM amonyom ferröz sülfat çözülerek reaktif hazırlandı) hazırlandı. Örneklerden 100'er µl alınıp üzerlerine sırasıyla, 150 µl reaktif A ve 150 µl reaktif

B eklendi. 1 dakika 37 °C'de bekletildikten sonra spektrofotometrik olarak 240 nm'de okundu. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanıldı ve sonuçlar mmol.Trolox.ekivalent/L olarak ifade edildi. Tüm spektrofotometrik ölçümler için Abbott ARCHITECT i2000 SR otoanalizörü kullanıldı.

3.11.2 Oksidatif stres indeksinin (OSI) hesaplanması

TAS'ın birimi $\mu\text{mol.Trolox.ekivalent/L}$ 'ye çevrilip; aşağıdaki formül kullanılarak oksidatif stres indeksi hesaplandı.

$$\text{Oksidatif stres indeksi (OSI)} = \frac{\text{TOS } (\mu\text{mol.H}_2\text{O}_2.\text{ekivalent/L})}{\text{TAS } (\mu\text{mol.Trolox.ekivalent/L})} \times 100$$

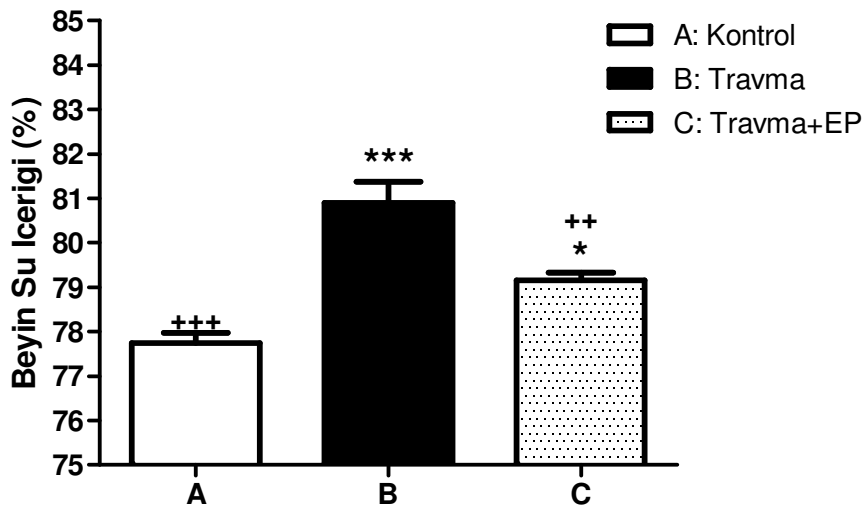
3.12 İstatistiksel Analiz

Çalışma sonunda elde edilen bulgular, ortalama \pm standart hata (S.E.M.) olarak hesaplandı. Grupların dağılımının normal dağılıma uygunluğunun test edilmesini takiben, istatistiksel değerlendirme GraphPad Prism (GraphPad Prism Version 5 Software Program, San Diego, CA) Programı kullanılarak, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonrasında Tukey çoklu karşılaştırmalar testi ile yapıldı. P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4) BULGULAR

4.1 Beyin Su İçeriğinin Değerlendirilmesi

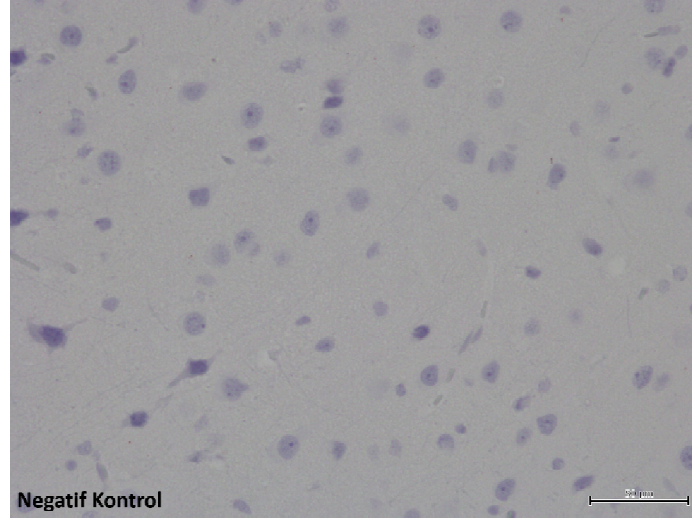
Beyin su içeriği, kontrol grubunda yaklaşık %77,8 (%77,8±0,2) değerindeydi. Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde, travma uygulanan grupta beyin su içeriği kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (%80,9±0,5). Travma grubunda artmış olan beyin su içeriğinin, etil piruvat uygulamasıyla azaldığı (%79,2±0,2) ve kontrol grubu değerlerine yaklaştığı belirlendi (Şekil 4).



Şekil 4: Kontrol, travma, travma+EP gruplarının beyin su içeriğindeki değişiklikler. Travmatik beyin hasarı sonucunda beyin su içeriği, kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken, travma grubuna uygulanan etil piruvat (EP), bu artışı anlamlı olarak azalttı. A: Kontrol, B: Travma, C: Travma+Etil Piruvat (EP) grubu. *P<0.05, ***P<0.001, kontrol grubuna göre; ++P<0.01, +++P<0.001, Travma grubuna göre anlamlılık değeri.

4.2 İmmünohistokimyasal Bulgular

Çalışmamızda, perikontüzyonel beyin dokusu kesitlerinde HMGB1, TLR4, RAGE, Okludin, Klaudin-5 ve ZO-1 düzeyleri immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. Reaksiyonun görülmediği negatif kontrol kesitlerine, primer antikor yerine distile su uygulaması yapıldı (Resim 4).



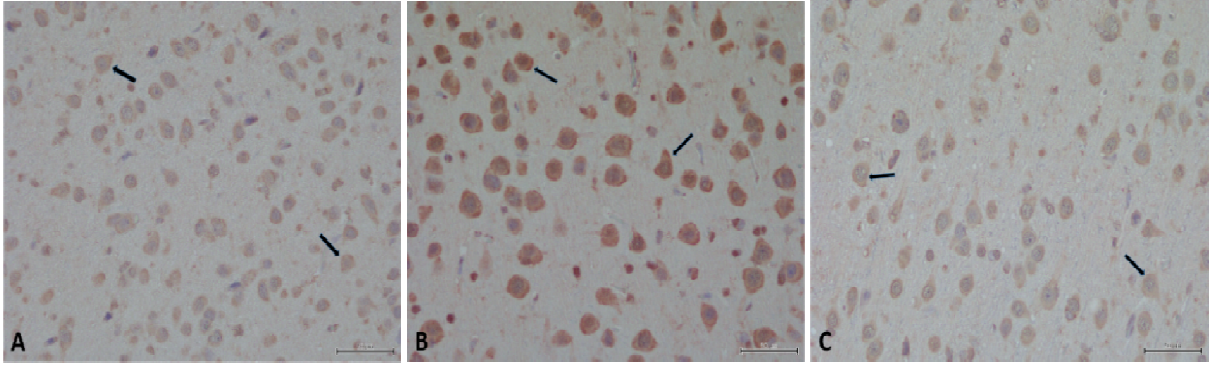
Resim 4: Reaksiyonun görülmediği negatif kontrol. Bar: 50 µm.

4.2.1 HMGB1, TLR4 ve RAGE düzeyleri

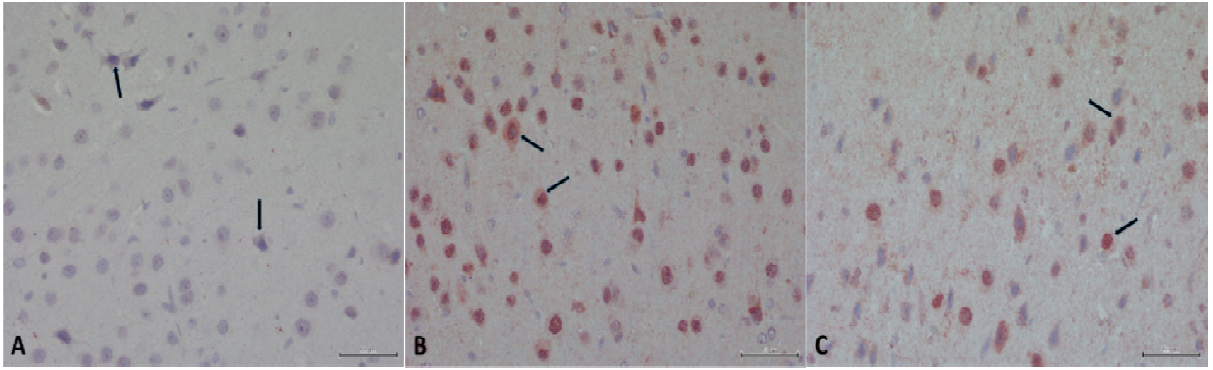
HMGB1, çeşitli tipteki hastalıklarda enflamatuvar yanıtların tetiklenmesinde önemli bir rol oynayarak, TLR4 ve RAGE’i de içeren hücre yüzey reseptörleri aracılığıyla hücreleri aktive eder. Çalışmamızda, perikontüzyonel beyin dokusu kesitlerinde HMGB1 (Resim 5), TLR4 (Resim 6) ve RAGE (Resim 7) düzeyleri immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. Travma grubunda, kontrol grubuna göre HMGB1 ($P<0.001$), TLR4 ($P<0.001$) ve RAGE ($P<0.001$) düzeylerinin anlamlı derecede arttığı belirlendi. Buna karşın etil piruvat uygulaması yapılan Travma+EP grubunda HMGB1 ($P<0.001$), TLR4 ($P<0.001$) ve RAGE ($P<0.001$) düzeylerinin travma grubuna göre anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi (Şekil 5). HMGB1, TLR4 ve RAGE’e ait H-Skor değerlerinin ortalama \pm standart hata değerleri aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 2).

PARAMETRELER	KONTROL	TRAVMA	TRAVMA+EP
HMGB1 (H-Skor)	192,5 \pm 3,4	321,3 \pm 6,6	224,6 \pm 5,6
TLR4 (H-Skor)	92,38 \pm 4,0	246,9 \pm 4,7	184,3 \pm 4,3
RAGE (H-Skor)	90,71 \pm 3,8	222,6 \pm 4,8	199,2 \pm 3,7

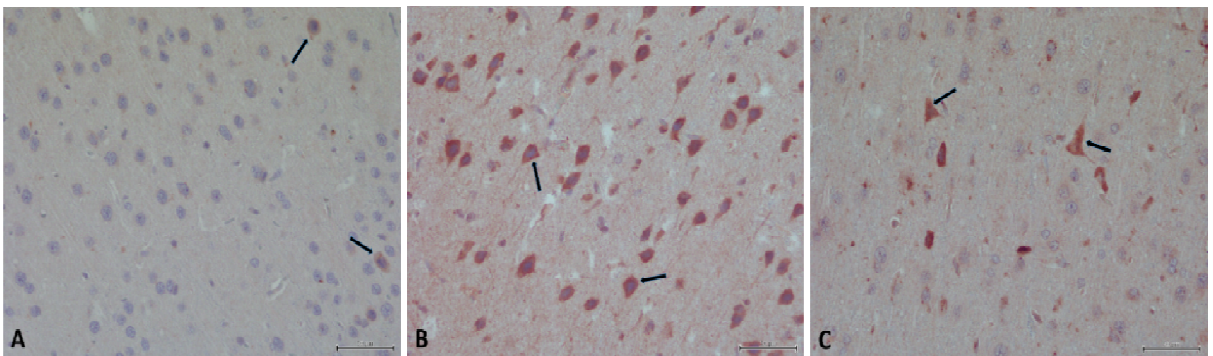
Tablo 2: HMGB1, TLR4 ve RAGE değerlerinin ortalama \pm standart hata değerleri



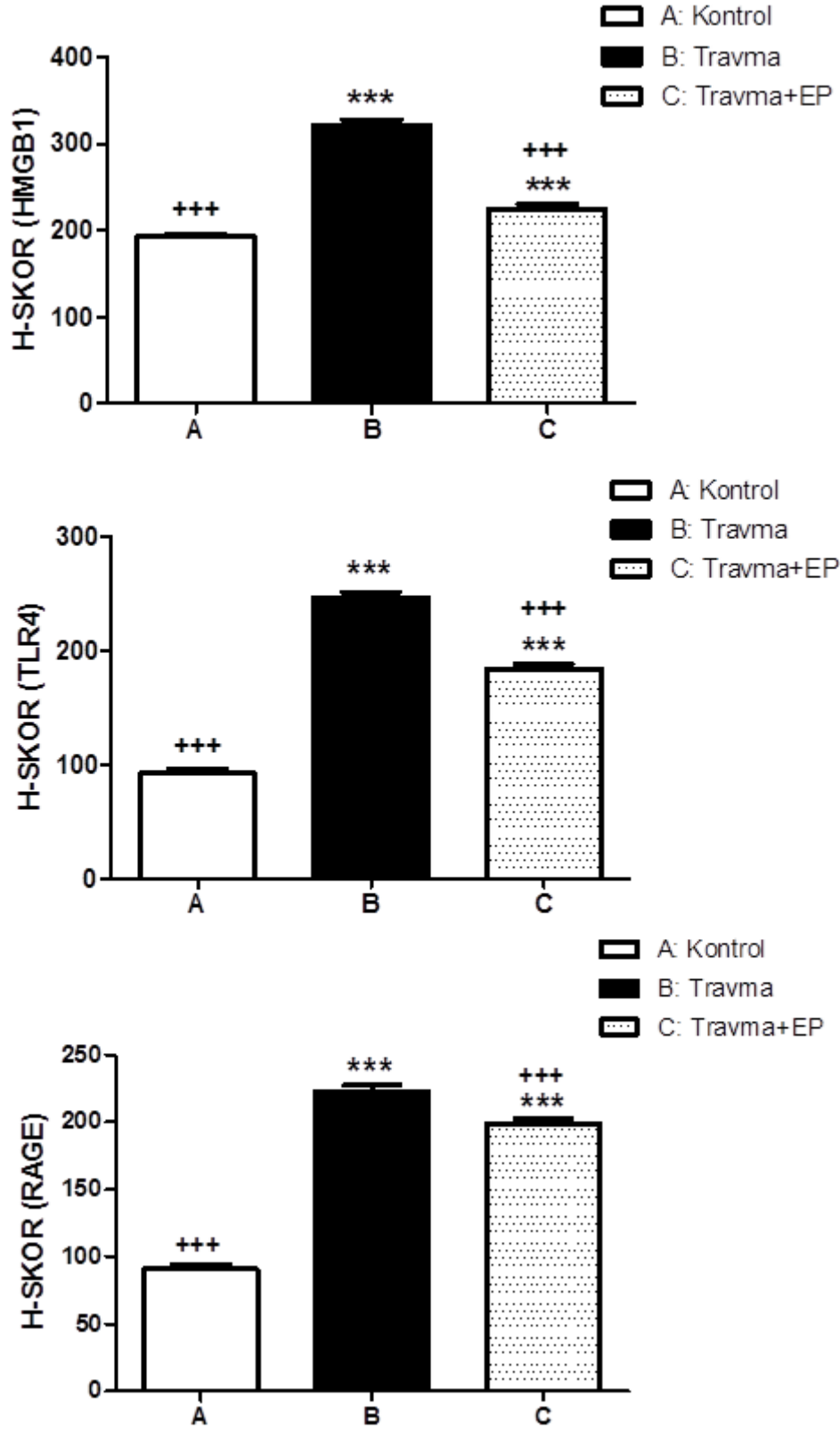
Resim 5: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde sitoplazmada gözlenen HMGB1 protein düzeylerinin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi (↑ ile gösterilmiştir). A: Kontrol, B: Travma, C: Travma + Etil Piruvat (EP) grubu. Bar: 50 µm.



Resim 6: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde TLR4 düzeylerinin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi (↑ ile gösterilmiştir). A: Kontrol, B: Travma, C: Travma + Etil Piruvat (EP) grubu. Bar: 50 µm.



Resim 7: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde RAGE düzeylerinin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi (↑ ile gösterilmiştir). A: Kontrol; B: Travma; C: Travma + Etil Piruvat (EP) grubu. Bar: 50 µm.



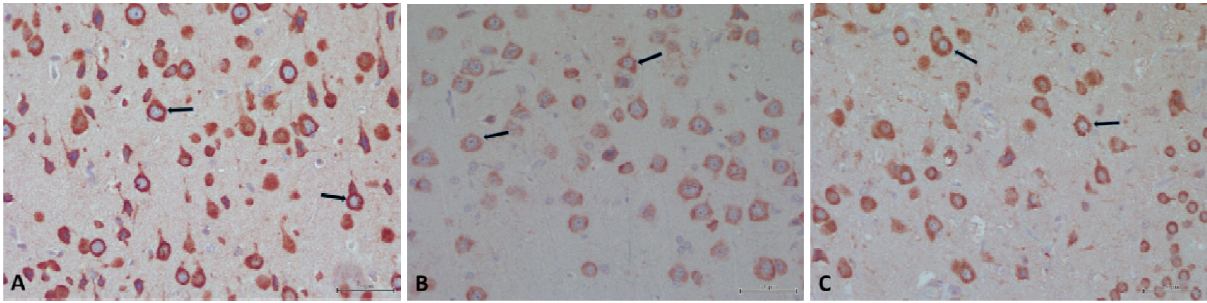
Şekil 5: Tüm gruplara ait perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde HMGB1, TLR4 ve RAGE düzeyleri. A: Kontrol, B: Travma, C: Travma + Etil Piruvat (EP) grubu. Travmatik beyin hasarı sonucunda HMGB1, TLR4 ve RAGE düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken, travma grubuna uygulanan etil piruvat, bu artışı anlamlı olarak azalttı. ***P<0.001, kontrol grubuna göre; +++P<0.001, Travma grubuna göre anlamlılık değeri.

4.2.2 Okludin, Klaudin-5 ve ZO-1 düzeyleri

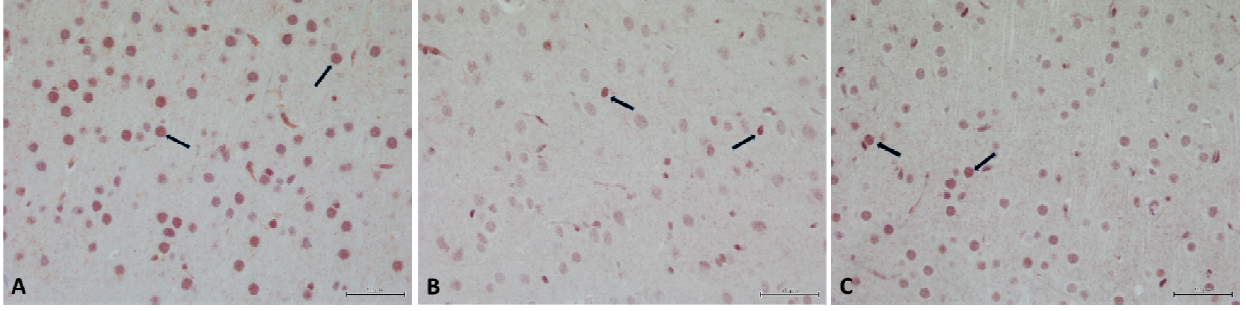
En iyi tanımlanan sıkı bağlantı bileşenleri Okludin, ZO-1 ve Klaudin ailesidir. Perikontüzyonel beyin dokusu kesitlerinde Okludin (Resim 8), Klaudin-5 (Resim 9) ve ZO-1 (Resim 10) düzeyleri immünohistokimyasal olarak değerlendirildiğinde; travma grubunda, kontrol grubuna göre Okludin ($P<0.001$), Klaudin-5 ($P<0.001$) ve ZO-1 ($P<0.001$) düzeylerinin anlamlı derecede azaldığı belirlendi. Travma+EP grubunda ise Okludin ($P<0.001$), Klaudin-5 ($P<0.001$) ve ZO-1 ($P<0.001$) düzeylerinin travma grubuna göre anlamlı derecede arttığı tespit edildi (Şekil 6). Bu sonuçlar travmatik beyin hasarının, sıkı bağlantı ile ilişkili proteinlerin ekspresyonunu azalttığını göstermektedir. Okludin, Klaudin-5 ve ZO-1'e ait H-Skor değerlerinin ortalama \pm standart hata değerleri aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 3).

PARAMETRELER	KONTROL	TRAVMA	TRAVMA+EP
Okludin (H-Skor)	370,9 \pm 4,3	265,5 \pm 5,5	344,0 \pm 3,9
Klaudin-5 (H-Skor)	280,4 \pm 3,6	210,3 \pm 2,8	239,9 \pm 2,8
ZO-1 (H-Skor)	255,1 \pm 4,2	172,4 \pm 2,6	231,0 \pm 3,4

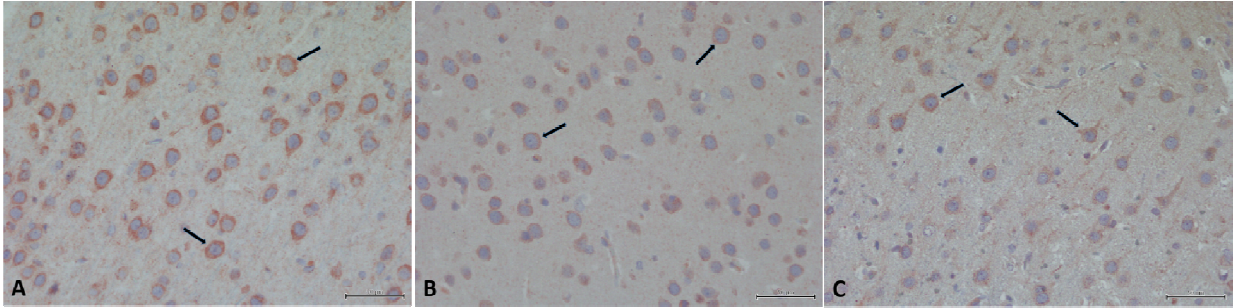
Tablo 3: Okludin, Klaudin-5, ZO-1'e ait H-Skor değerlerinin ortalama \pm standart hata değerleri.



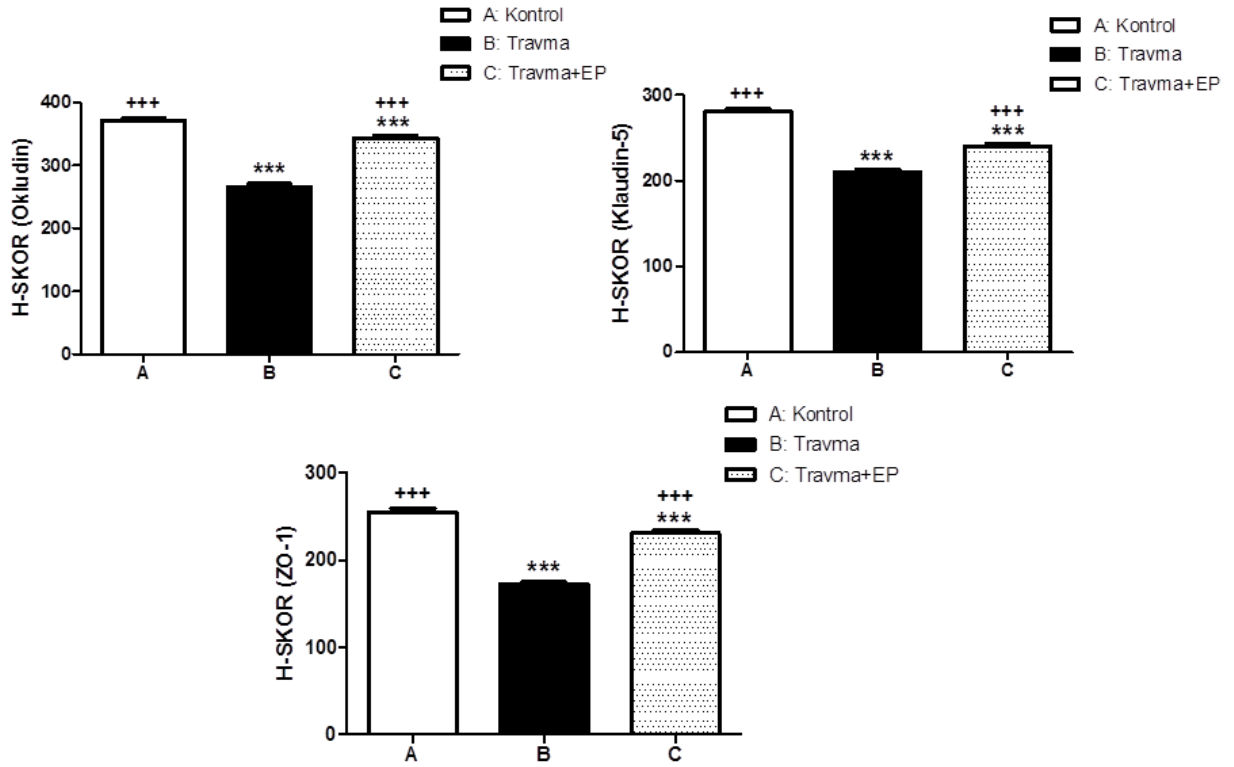
Resim 8: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde Okludin düzeylerinin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi (\uparrow ile gösterilmiştir). A: Kontrol, B: Travma, C: Travma + Etil Piruvat (EP) grubu. Bar: 50 μ m.



Resim 9: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde Klaudin-5 düzeylerinin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi (↑ ile gösterilmiştir). A: Kontrol, B: Travma, C: Travma + Etil Piruvat (EP) grubu. Bar: 50 µm.



Resim 10: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde ZO-1 düzeylerinin (↑) immünohistokimyasal olarak gösterilmesi (↑ ile gösterilmiştir). A: Kontrol, B: Travma, C: Travma + Etil Piruvat (EP) grubu. Bar: 50 µm.



Şekil 6: Tüm gruplara ait perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde Okludin, Klaudin-5 ve ZO-1 düzeyleri. A: Kontrol, B: Travma, C: Travma + Etil Piruvat (EP) grubu. Travmatik beyin hasarı sonucunda Okludin, Klaudin-5 ve ZO-1 düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalırken, travma grubuna uygulanan etil piruvat, bu

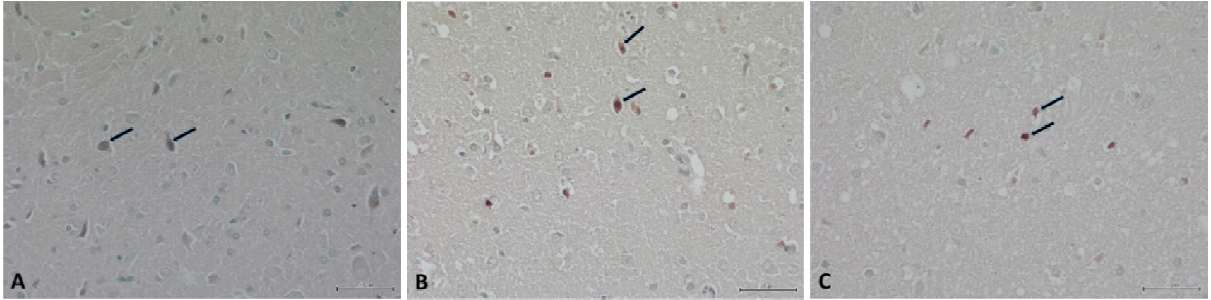
azalan protein düzeylerini anlamlı olarak arttırdı. ***P<0.001, kontrol grubuna göre; +++P<0.001, travma grubuna göre anlamlılık değeri.

4.3 DNA Fragmentsasyonu (TUNEL Yöntemi) Bulguları

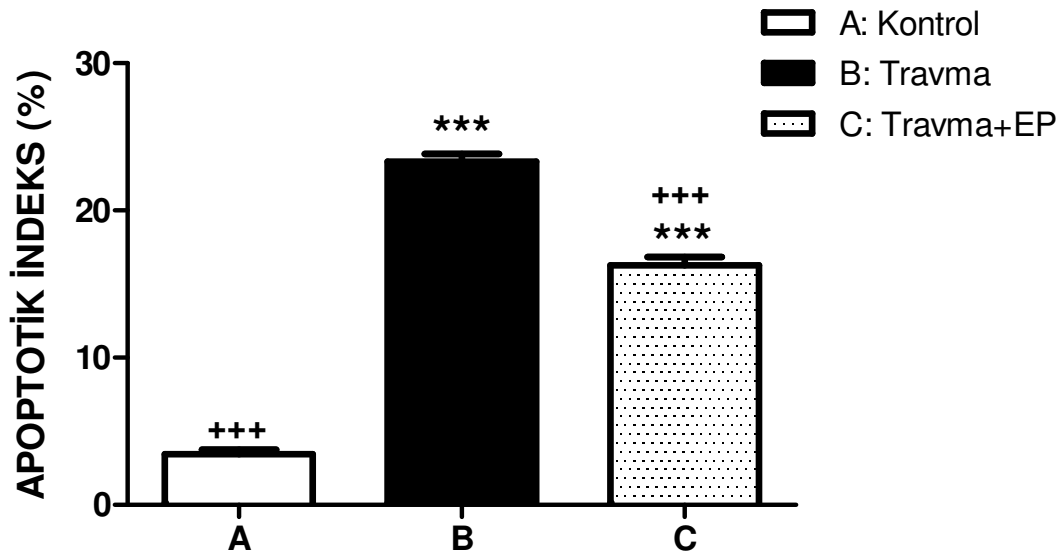
Perikontüzyonel beyin dokusu kesitlerinde TUNEL yöntemi ile apoptotik hücreler incelendi. Buna göre, kontrol grubunda az sayıda apoptotik hücre bulundu (Resim 11). Travma grubunun peri-kontüzyonel alanındaki apoptotik indeksin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı (P<0.001) belirlendi. Travma + EP grubunda ise, travma grubu ile karşılaştırıldığında aynı bölgedeki apoptotik indeksin anlamlı derecede azaldığı (P<0.001) gözlemlendi (Şekil 7). TUNEL sonuçlarına ait apoptotik indeksin ortalama \pm standart hata değerleri aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 4).

PARAMETRELER	KONTROL	TRAVMA	TRAVMA+EP
Apoptotik İndeks (%)	3,4 \pm 0,3	23,3 \pm 0,5	16,3 \pm 0,6

Tablo 4: TUNEL sonuçlarına ait apoptotik indeksin ortalama \pm standart hata değerleri.



Resim 11: Perikontüzyonel beyin dokusu kesitlerinde TUNEL reaksiyonu (↑ ile gösterilmiştir). A: Kontrol, B: Travma, C: Travma + Etil Piruvat (EP) grubu. Bar: 50 µm.



Şekil 7: Deney gruplarının apoptotik indekslerinin karşılaştırılması. A: Kontrol, B: Travma, C: Travma + Etil Piruvat (EP) grubu. Travmatik beyin hasarı sonucunda apoptotik indeks kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken, travma grubuna uygulanan etil piruvat, bu artışı anlamlı olarak azaltmıştır. ***P<0.001, kontrol grubuna göre; +++P<0.001, Travma grubuna göre anlamlılık değeri.

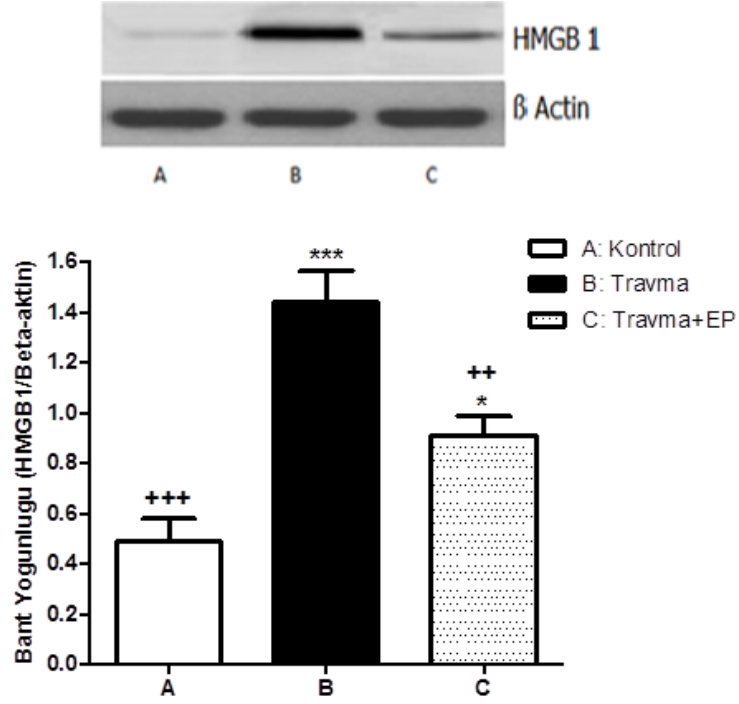
4.4 Western Blot Bulguları

4.4.1 HMGB1, TLR4 ve RAGE düzeyleri

HMGB1 proteini, enflamatuvar cevabın oluşmasında rol oynamaktadır. Çalışmada, kontrol gruplarında bu proteinin ekspresyonu çok az olmaktadır. Travma sonrasında alınan örneklerde bu proteinin seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı (P<0.001), etil piruvat verilen sıçanların HMGB1 proteininin ekspresyonunun, travma grubuna göre azaldığı görülmektedir (P<0.01) (Şekil 8). HMGB1, TLR4 ve RAGE'e ait western blot değerlerinin ortalama \pm standart hata değerleri aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo5).

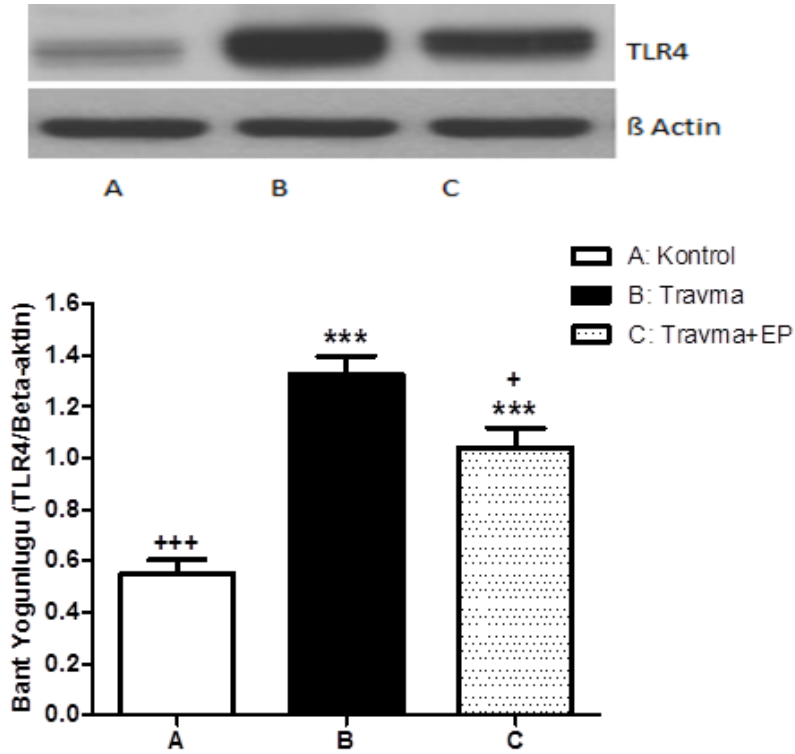
PARAMETRELER	KONTROL	TRAVMA	TRAVMA+EP
HMGB1/ β -aktin	0,49 \pm 0,09	1,44 \pm 0,13	0,91 \pm 0,08
TLR4/ β -aktin	0,52 \pm 0,04	1,32 \pm 0,07	1,04 \pm 0,08
RAGE/ β -aktin	0,40 \pm 0,04	1,26 \pm 0,04	1,27 \pm 0,04

Tablo 5: HMGB1, TLR4 ve RAGE'e ait western blot değerlerinin ortalama \pm standart hata değerleri.



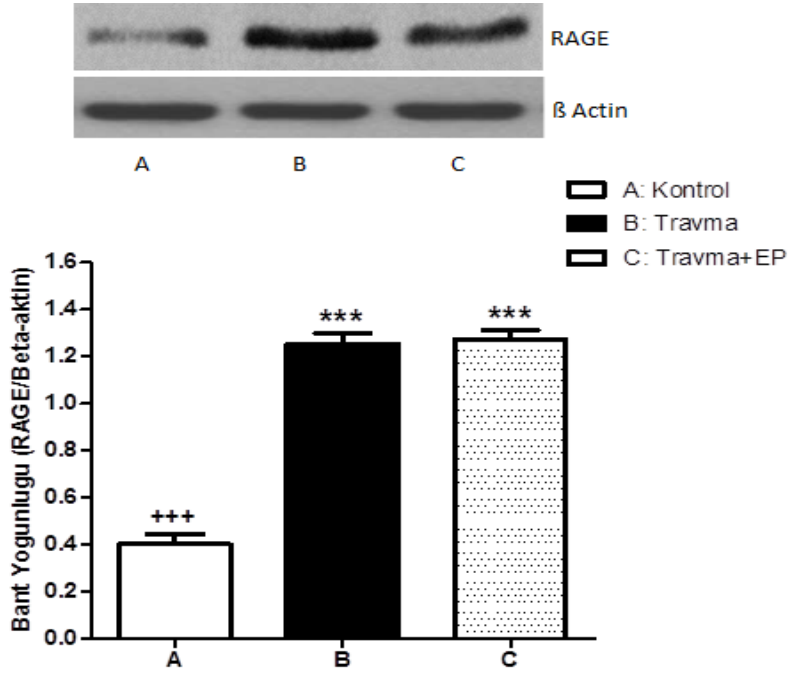
Şekil 8: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde HMGB1 proteini ekspresyonunun Western blot yöntemiyle gösterilmesi. A: Kontrol, B: Travma, C: Travma + Etil Piruvat (EP) grubu. Travmatik beyin hasarı sonucunda HMGB-1 ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken, travma grubuna uygulanan etil piruvat, HMGB-1 ekspresyonunu azaltmıştır. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, kontrol grubuna göre; ++ $P < 0.01$, +++ $P < 0.001$, Travma grubuna göre anlamlılık değeri.

Çalışmamızda kontrol grubu hayvanlarda TLR 4 ekspresyonu oldukça az miktarda olmuşken, travma yapılan gruptaki hayvanlarda TLR 4 ekspresyonu, HMGB1 proteini gibi yüksek miktarda bulunmuştur ($P < 0.001$). Travma+EP grubunda ise HMGB-1 proteinin EP ile inhibisyonu sonucunda TLR 4 ün ekspresyonu da travma grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($P < 0.001$) (Şekil 9).



Şekil 9: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde TLR4 proteini ekspresyonunun Western blot yöntemiyle gösterilmesi. A: Kontrol, B: Travma, C: Travma + Etil Piruvat (EP) grubu. Travmatik beyin hasarı sonucunda TLR4 ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken, travma grubuna uygulanan etil piruvat, bu artışı azaltmıştır. ***P<0.001, kontrol grubuna göre; +P<0.05, +++P<0.001, Travma grubuna göre anlamlılık değeri.

HMGB1 proteininin reseptörü olan RAGE proteini, HMGB1 gibi kontrol gruplarında oldukça düşük düzeyde ifade edilirken, sadece travma yapılmış gruptaki örneklerde HMGB1 ile aynı şekilde aşırı miktarda ifadesi artmıştır (P<0.001). Etil piruvat uygulaması, bu reseptörün ekspresyonunu travma grubuna göre kısmen azaltsa da, bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 10).



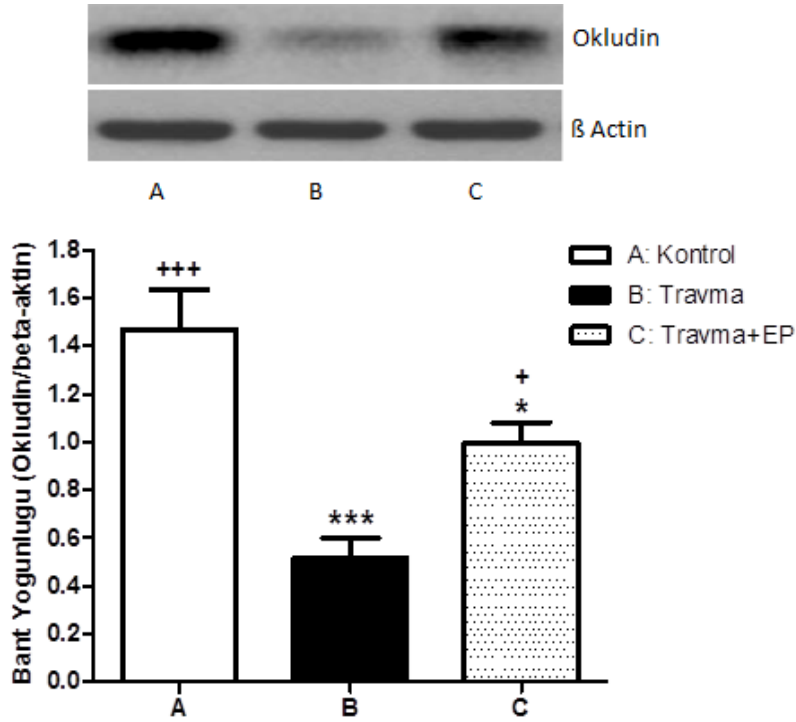
Şekil 10: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde RAGE proteini ekspresyonunun Western blot yöntemiyle gösterilmesi. A: Kontrol, B: Travma, C: Travma + Etil Piruvat (EP) grubu. Travmatik beyin hasarı sonucunda RAGE ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken, travma grubuna uygulanan etil piruvat, bu reseptörün ekspresyonunu travma grubuna göre kısmen azaltsa da, bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir. ***P<0.001, kontrol grubuna göre; +++P<0.001, Travma grubuna göre anlamlılık değeri.

4.4.2 Okludin, Klaudin-5 ve ZO-1 düzeyleri

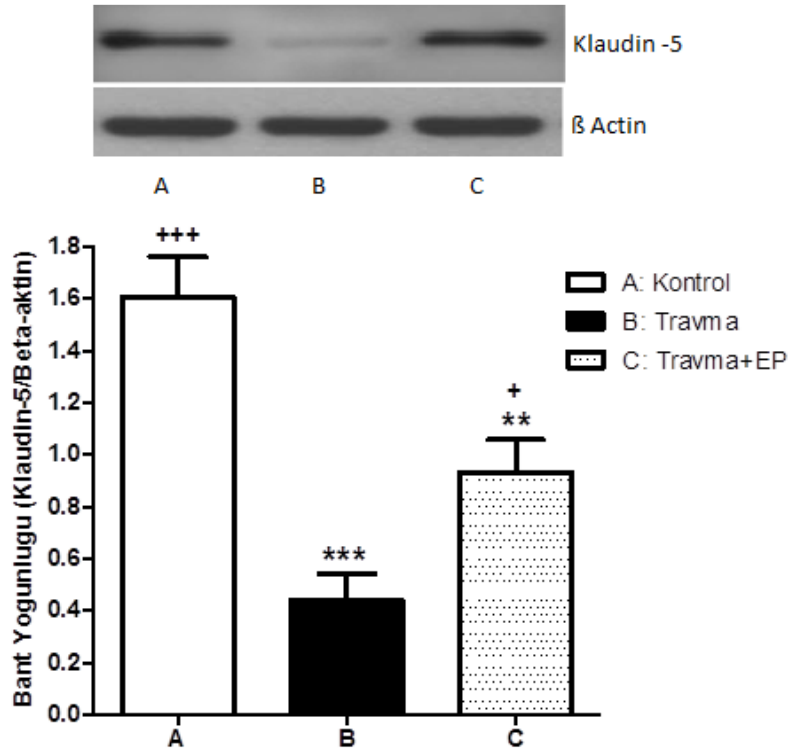
Okludin ve Klaudin-5 proteinleri hem hücre-hücre bağlantısı hem de kan beyin bariyerini oluşturan temel proteinlerdir. Bu proteinlerin travma grubunda ekspresyonları azalmıştır (P<0.001). Kontrol grubunda normal düzeyde eksprese edilmişken, Travma+EP grubunda hem Okludin (P<0.05) hem de Klaudin-5 (P<0.05) ekspresyonlarında artış gözlenmiştir (Şekil 11 ve Şekil 12). Sıkı bağlantı proteini olarak da bilinen ZO-1, hücrelerarası bağlantıda görev alır. Kontrol grubunda bu proteinin ekspresyonu normal olarak tespit edilmişken, travma grubunda ekspresyonu anlamlı derecede azalmıştır (P<0.001). Etil piruvat, HMGB 1 inhibisyonu ile bu proteinin ekspresyonunu arttırmış olsa da bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 13). Okludin, Klaudin-5 ve ZO-1' e ait western blot değerlerinin ortalama ± standart hata değerleri aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 6).

PARAMETRELER	KONTROL	TRAVMA	TRAVMA+EP
Okludin/β-aktin	1,47±0,16	0,52±0,08	1,00±0,08
Klaudin-5/β-aktin	1,61±0,16	0,44±0,10	0,93±0,13
ZO-1/β-aktin	1,70±0,08	0,53±0,08	0,76±0,05

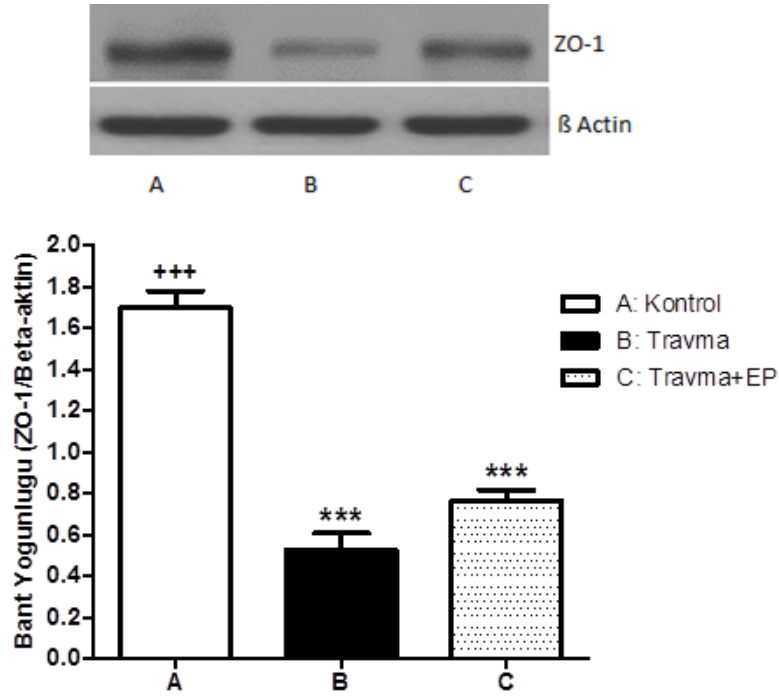
Tablo 6: Okludin, Klaudin-5 ve ZO-1' e ait western blot değerlerinin ortalama ± standart hata değerleri.



Şekil 11: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde Okludin proteini ekspresyonunun Western blot yöntemiyle gösterilmesi. A: Kontrol, B: Travma, C: Travma + Etil Piruvat (EP) grubu. Travmatik beyin hasarı sonucunda Okludin ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalırken, travma grubuna uygulanan etil piruvat, bu proteinin ekspresyonlarını travma grubuna göre arttırdı. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, kontrol grubuna göre; + $P < 0.05$, +++ $P < 0.001$, Travma grubuna göre anlamlılık değeri.



Şekil 12: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde Klaudin-5 proteini ekspresyonunun Western blot yöntemiyle gösterilmesi. A: Kontrol, B: Travma, C: Travma + Etil Piruvat (EP) grubu. Travmatik beyin hasarı sonucunda Klaudin-5 ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalırken, travma grubuna uygulanan etil piruvat, bu proteinin ekspresyonlarını travma grubuna göre arttırdı. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, kontrol grubuna göre; + $P < 0.05$, +++ $P < 0.001$, Travma grubuna göre anlamlılık değeri.



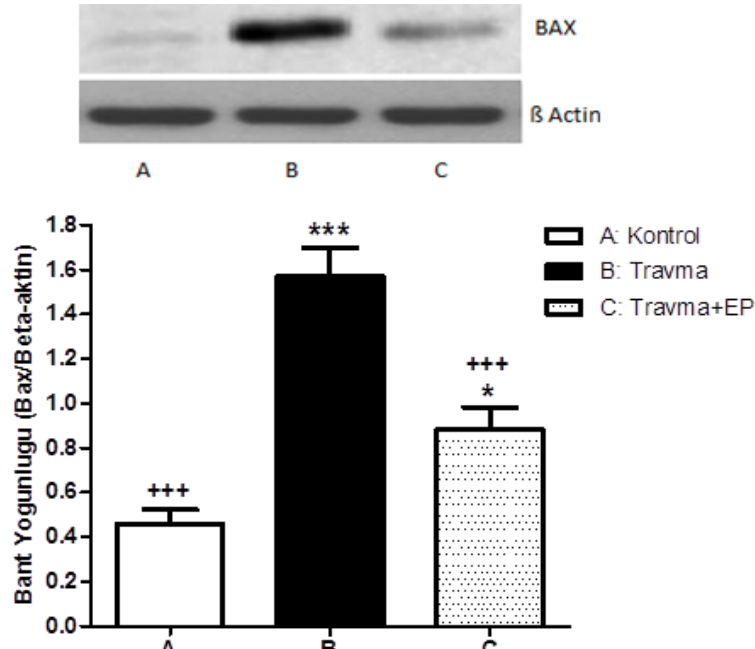
Şekil 13: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde ZO-1 proteini ekspresyonunun Western blot yöntemiyle gösterilmesi. A: Kontrol, B: Travma, C: Travma + Etil Piruvat (EP) grubu. Travmatik beyin hasarı sonucunda ZO-1 ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalırken, travma grubuna uygulanan etil piruvat, bu proteinin ekspresyonunu travma grubuna göre kısmen arttırsa da, bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. ***P<0.001, kontrol grubuna göre; +++P<0.001, Travma grubuna göre anlamlılık değeri.

4.4.3 Bax, bcl-2 ve aktif kaspaz-3 düzeyleri

Bax proteini, p53 adlı tümör baskılayıcı proteinin kofaktörü olma işlevine sahip, insanda bulunan bir proteindir. Bax geni, Bcl-2 gen ailesinin bir üyesidir. Bax, p53 aracılığıyla indüklenir ve bulunduğu hücrenin apoptoza gidişini hızlandırır. Çalışmamızda, kontrol gruplarında düşük seviyede bulunan Bax proteini, travma grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek düzeylere çıkmıştır (P<0.001). Bu da travma sonrasında apoptozun Bax'a bağlı olarak arttığını göstermiştir. Travma oluşturulan sıçanlarda EP uygulaması sonucunda, sadece travma uygulanan gruba göre Bax düzeyleri anlamlı derecede düşüş göstermiştir (P<0.001) (Şekil 14). Bu da HMGB 1 inhibisyonunun, Bax ekspresyonunu azalttığını dolayısıyla apoptozun inhibe olduğunu göstermektedir. Bax, Bcl-2 ve Aktif Kaspaz-3'e ait western blot değerlerinin ortalama ± standart hata değerleri aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 7).

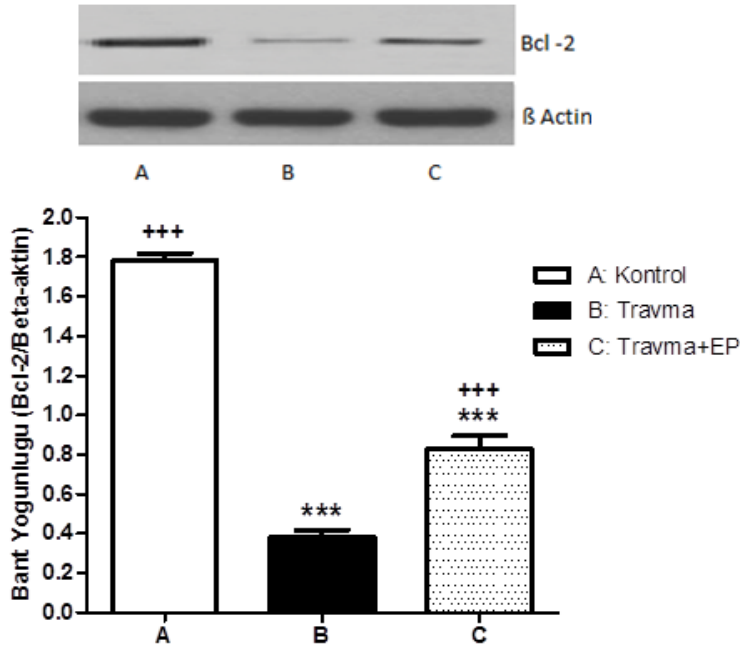
PARAMETRELER	KONTROL	TRAVMA	TRAVMA+EP
Bax/β-aktin	0,46±0,06	1,57±0,13	0,88±0,10
Bcl-2/β-aktin	1,78±0,04	0,38±0,04	0,83±0,07
Aktif Kaspaz-3/β-aktin	0,36±0,06	1,59±0,10	0,96±0,07

Tablo 7: Bax, Bcl-2 ve Aktif Kaspaz-3'e ait western blot değerlerinin ortalama ± standart hata değerleri.



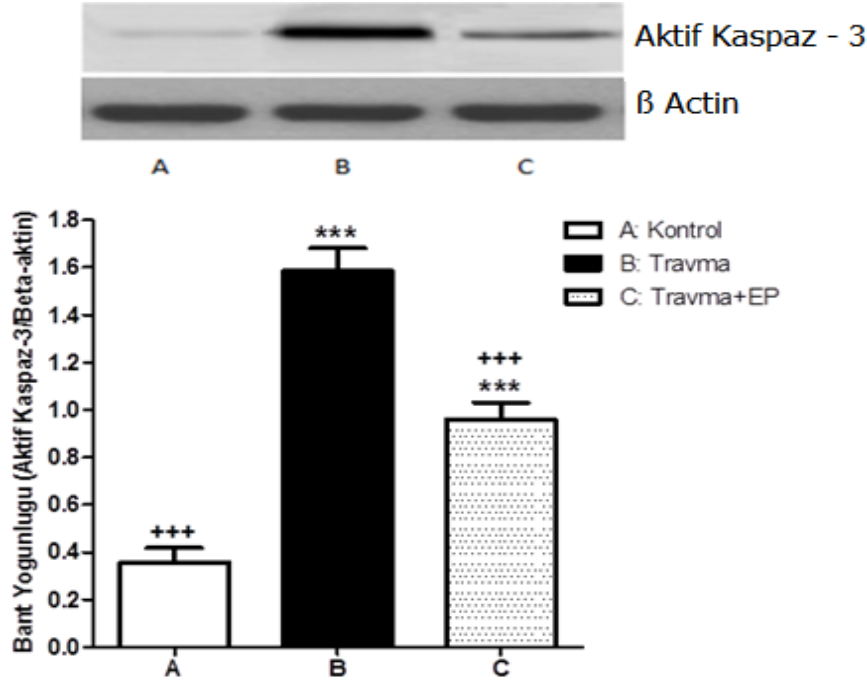
Şekil 14: Peri-kontüzyonel beyin dokusu örneklerinde proapoptotik Bax proteini ekspresyonunun Western blot yöntemiyle gösterilmesi. A: Kontrol, B: Travma, C: Travma + Etil Piruvat (EP) grubu. Travmatik beyin hasarı sonucunda Bax ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken, travma grubuna uygulanan etil piruvat, bu artışı anlamlı olarak azaltmıştır. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, kontrol grubuna göre; +++ $P < 0.001$, Travma grubuna göre anlamlılık değeri.

Bcl-2 proteini antiapoptotik bir proteindir. Kontrol grubunda bu protein miktarı normal seviyede iken, travma grubunda bu proteinin ekspresyonu anlamlı olarak düşmüştür ($P < 0.001$). Travma sonrası EP verilmiş olan grupta ise apoptozun azalmasına bağlı olarak Bcl-2 proteininin seviyesi anlamlı derecede artmıştır ($P < 0.001$). (Şekil 15).



Şekil 15: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde antiapoptotik Bcl-2 proteini ekspresyonunun Western blot yöntemiyle gösterilmesi. A: Kontrol, B: Travma, C: Travma + Etil Piruvat (EP) grubu. Travmatik beyin hasarı sonucunda Bcl-2 ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalırken, travma grubuna uygulanan etil piruvat, bu proteinin ekspresyonundaki azalmayı anlamlı olarak arttırmıştır. *** $P < 0.001$, kontrol grubuna göre; +++ $P < 0.001$, Travma grubuna göre anlamlılık değeri.

Aktif Kaspaz-3, hücre döngüsünde bulunan önemli bir proteindir. Apoptozdan sorumlu olan bu protein kaspaz protein ailesinin bir üyesidir. Kontrol grubunda aktif kaspaz-3 proteini çok az miktarda eksprese edilmiştir. Travma grubunda aşırı derece eksprese edilmiş olan aktif kaspaz-3 proteini ($P<0.001$), apoptozun artışı göstermektedir. Travma+EP grubunda, aktif kaspaz ekspresyonu anlamlı derecede azalmış ($P<0.001$) ve kontrol grubundaki değerlere yaklaşmıştır (Şekil 16).



Şekil 16: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde aktif kaspaz-3 proteini ekspresyonunun Western blot yöntemiyle gösterilmesi. A: Kontrol, B: Travma, C: Travma + Etil Piruvat (EP) grubu. Travmatik beyin hasarı sonucunda Aktif Kaspaz-3 ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken, travma grubuna uygulanan etil piruvat, bu artışı anlamlı olarak azaltmıştır. *** $P<0.001$, kontrol grubuna göre; +++ $P<0.001$, Travma grubuna göre anlamlılık değeri.

4.5 Biyokimyasal Bulgular

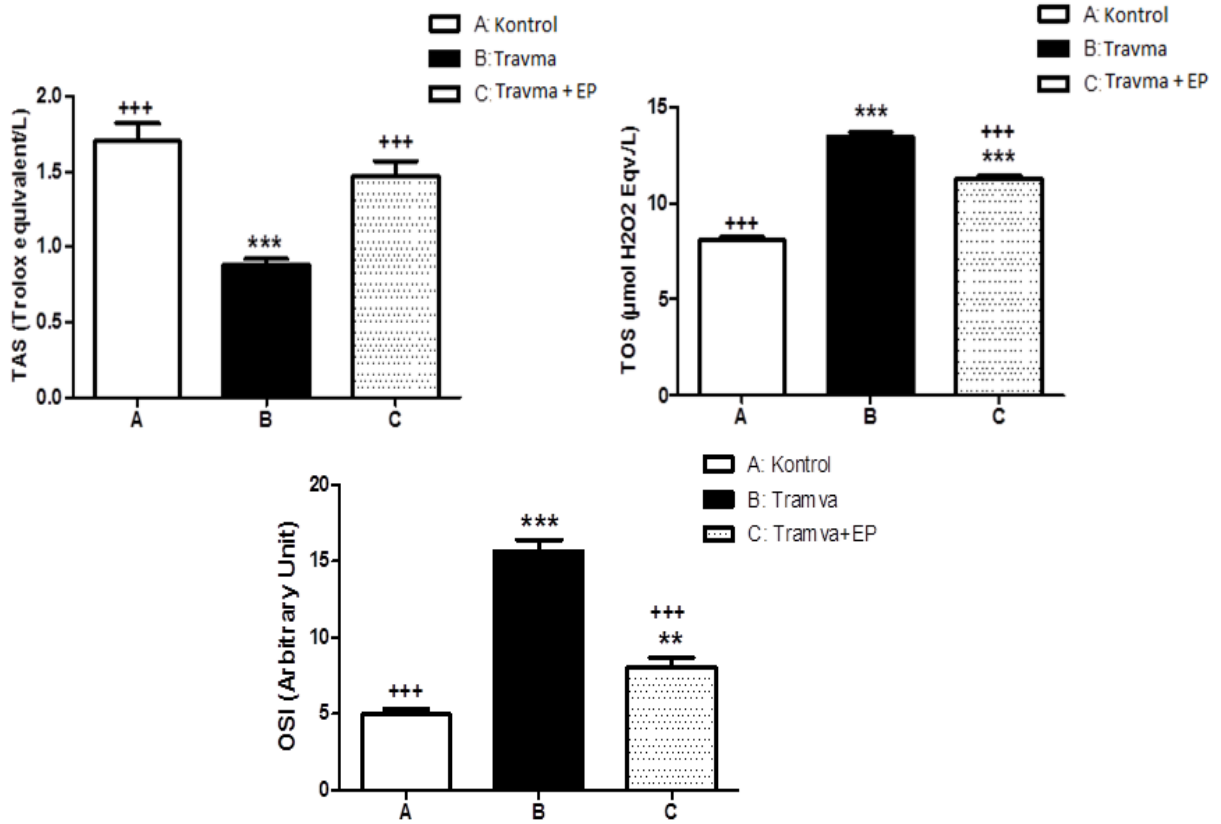
4.5.1 Total antioksidan kapasite (TAS), total oksidan seviye(TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) bulguları

Çalışmamızda, perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde total antioksidan kapasite (TAS), total oksidan kapasite (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) değerleri incelendiğinde, travma grubunda kontrol grubuna göre TAS değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı ($P<0.001$), TOS ($P<0.001$) ve OSI ($P<0.001$) değerlerinin ise anlamlı derecede arttığı belirlendi. Travma+EP grubunda, travma grubunda düşük olan TAS değerlerinin yükselip ($P<0.001$), TOS ($P<0.001$) ve OSI ($P<0.001$) değerlerinin azalarak, kontrol grubu değerlerine

yaklaştırdığı görüldü (Şekil 17). Total antioksidan kapasite (TAS), total oksidan kapasite (TOS) ve oksidatif stres indeksine (OSI) ait ortalama \pm standart hata değerleri aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 8).

PARAMETRELER	KONTROL	TRAVMA	TRAVMA+EP
TAS (Trolox equivalent/L)	1,70 \pm 0,12	0,88 \pm 0,04	1,47 \pm 0,10
TOS (μ mol H ₂ O ₂ Eqv./L)	8,08 \pm 0,16	13,48 \pm 0,23	11,31 \pm 0,15
OSI (Arbitrary Unit)	4,97 \pm 0,37	15,64 \pm 0,75	8,08 \pm 0,60

Tablo 8: Total antioksidan kapasite (TAS), total oksidan kapasite (TOS) ve oksidatif stres indeksine (OSI) ait ortalama \pm standart hata değerleri.



Şekil 17: Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde total antioksidan kapasite (TAS), total oksidan kapasite (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) değerleri. A: Kontrol, B: Travma, C: Travma + Etil Piruvat (EP) grubu. Travmatik beyin hasarı sonucunda TAS değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalırken, travma grubuna uygulanan etil piruvat, bu azalan değeri anlamlı olarak arttırmıştır. Travmatik beyin hasarı sonucunda TOS, OSI değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken, travma grubuna uygulanan etil piruvat, bu artışı anlamlı olarak azaltmıştır. **P<0.01, ***P<0.001, kontrol grubuna göre; +++P<0.001, Travma grubuna göre anlamlılık değeri.

5) TARTIŞMA

Biz bu çalışmada travma sonrası enflamatuvar cevabı indükleyen HMGB-1 protein artışının; TLR4 ve RAGE düzeylerinde artışa, KBB'deki sıkı bağlantı molekülleri olan okludin, klaudin-5 ve Zo-1 düzeylerinde azalmaya yol açarak beyin ödemi arttırdığını gösterdik. Aynı zamanda HMGB-1 proteinin bax ve kaspaz-3 düzeyini arttırıp, bcl-2 düzeylerinde azalmaya yol açarak apoptozu arttırdığını ve total oksidatif kapasiteyi artırarak oksidatif hasarda artış meydana getirdiğini saptadık. Etil pirüvat verilen grupta ise HMGB-1 inhibisyonu sonucu, bu etkilerin travma uygulanmayan grupla benzer düzeylere geldiğini saptadık.

TBH patofizyolojisinde sekonder hasar mekanizmaları, meydana gelebilecek kalıcı sakatlık ve ölüm gibi katastrofik sonuçları önlemek açısından, araştırmaların bu yönde yoğunlaşmasına sebep olmuştur. Bu amaç doğrultusunda yapılan çalışmalar nöroinflamasyonun, travmatik beyin hasarının akut ve kronik evrelerinin her ikisinde de rol aldığını ve özellikle hücre ölümüne sebep olan bu ikinci hasar mekanizmasının kafa travmasının patoloji ve tedavisinde anahtar role sahip olabileceğini göstermiştir (41, 42, 48, 78, 142). Yapılan çalışmalarda, beyinde travma ve iskemi gibi nöral doku hasarı oluşturan patolojilerden sonra nekrotik dokuların nukleuslarından sitoplazmaya veya ekstrasellüler aralığa salınan HMGB-1 proteinin, proinflamatuvar sitokin salınımını indükleyerek enflamasyonun başlangıç basamağı olabileceği düşünülmüştür (14, 15, 17, 22).

HMGB-1 protein; KBB hasarı, beyin ödemi ve beyin hasarı gibi hadiselerin oluşum basamaklarını tetikleyerek, TBH'da sekonder hasar mekanizmalarında rol alır (143, 144). Normal dokuda nükleusta yerleşik olan HMGB1 proteinin, posttravmatik nekrotik hücrelerde sitoplazmaya ve hücre dışına çıkarak inflamatuvar cevabı indüklediği gösterilmiştir (15). HMGB1 proteinin Parkinson hastalığında mikroglial aktivasyonu arttırarak, proinflamatuvar sitokinlerin salınımına bağlı olarak nöral hücre ölümüne sebep olduğu görülmüştür (145). Nörodejeneratif hastalıklarla benzer özellikler gösteren TBH'da da bu aktivasyon gündeme gelmiş ve yapılan bir çalışmada posttravmatik artan HMGB1 proteinin, mikroglial aktivasyonu indüklediği ve buna bağlı olarak KBB'deki astrositlerden Aquaporin 4 ekspresyonunu artırarak beyin ödemi arttırdığı saptanmıştır (14, 101, 146). Posttravmatik beyin dokusunda mikroglial aktivasyona bağlı olarak proinflamatuvar sitokin (TNF-alfa, IL-1) ekspresyonu artar (147, 148). Böylece kaspaz yolları ve mikroglial glutamat salınımı ile TNF-alfa'nın indüklediği nörodejenerasyon olarak isimlendirilen nöron hasarı gelişir (149).

Ayrıca proinflatuar sitokinlerin, okludin ekspresyonunu azaltarak KBB geçirgenliğini artırabileceği tartışılmaya başlansa da bazı araştırmacılar asıl görevlerinin endotelial ve astrositik indüksiyonla kemokin sentezini sağlamak ve inflammatuar hücrelerin kandan beyin parankimine göçünü artırmak olduğunu savunmuşlardır (150, 151). Daha önce yapılan bir çalışmada anti-HMGB1 antikoru uygulanan sıçanlarda KBB geçirgenliğinde, MMP-2/9 aktivitesinde, TNF-alfa ve İNOS ekspresyonundaki azalmaya bağlı olarak beyin ödeminin azaldığı saptanmıştır (152). Yang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada MMP'lerin bazal lamina proteinlerini ve tight junction kompleksini hasara uğrattığı gösterilmiştir (153). Deneysel hayvan modellerinde IL-1 beta artışına bağlı olarak, KBB'deki sıkı bağlantıların yıkıma uğradığı böylece okludin ve ZO-1 düzeylerinde azalmaya yol açtığı ve bu nedenle KBB geçirgenliğinde artışa sebep olduğu gösterilmiştir (154). Daha önce sıçanlarda deneysel iskemi modeli oluşturularak yapılan bir çalışmada artan HMGB1 proteinin, KBB'deki sıkı bağlantılarda deformasyona sebep olduğu elektron mikroskop ile gösterilmiş ve anti-HMGB1 antikoru uygulanan sıçanlarda bu yapıların görünümünde düzelme saptanmıştır (155). Bu veriler ışığında, bu çalışmada kafa travması oluşturulan sıçanlarda travma alanının çevresindeki perikontüzyonel kortikal ve subkortikal beyin dokusunda artan HMGB1 protein düzeylerinin, KBB'deki sıkı bağlantı proteinleri olan Okludin, Klaudin-5 ve ZO-1 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalmaya yol açtığı ve beyin ödeminde artışa sebep olduğunu saptadık. Posttravmatik etil pirüvat uygulanan sıçanlarda ise HMGB1 inhibisyonu sonucu HMGB1, Okludin, Klaudin-5 ve ZO-1 düzeylerinin ve beyin ödeminin travma grubuna göre anlamlı derecede azaldığını gözlemledik.

Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine (Fas, TNFR, DR5), ölüm sinyallerinin (FasL, TNF-alfa, TRAIL) bağlanması ve mitokondri iç zarından sitozole salınan sitokrom c gibi farklı yollar sonucunda kaspaz-3 aktivasyonu ile DNA yıkımına neden olan apoptoz başlar (69-72). Herhangi bir nedenle hücrede DNA hasarı olduğu zaman hücre hasarının tamiri başarılı olmazsa p53 geni, bax proteinini (pro-apoptotik) aktive ederek mitokondri aracılığı ile hücrenin apoptozise giderek ölmesini sağlar. Bir hücrede hücre içi bax/bcl-2 oranı hücrenin apoptozise gidip gitmeyeceğine karar vermede son derece önemlidir. Eğer bax fazla ise hücre apoptozise gidecektir; bcl-2 (antiapoptotik gen) fazla ise apoptozis inhibe olacaktır. Son yıllarda, kafa travması sonrası nöral hücre ölümünden P53'e bağımlı apoptozis mekanizmasının sorumlu olduğu yönündeki araştırmalar mevcuttur (74, 156). Literatüre bakıldığında spinal kord yaralanmasında ve iskemi-reperfüzyon hasarı gibi patolojilerde, HMGB1 proteinin apoptoz üzerine etkisini araştıran çeşitli araştırmalar mevcut olmasına

rağmen TBH'da bu konu üzerine çok az sayıda çalışma olduğu görüldü (157, 158). TBH'da bu alanda yapılan sayılı çalışmada ise HMGB1 proteinin sitokrom c artışıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (159). Sıçanlarda serebral iskemi modeli oluşturularak yapılan bir çalışmanın in vitro aşamasında rekombinant HMGB1 proteinin hücre kültüründe, bax/bcl-2 oranında artış sağlayarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir (160). Sıçanlarda myokardiyal ve serebral iskemik hasar oluşturularak yapılan çalışmalarda HMGB1 proteinin bax, bcl-2 ve kaspaz-3 gibi moleküller üzerinden apoptozis mekanizmalarını regüle ettiği gösterilmiştir (161, 162). Ayrıca sıçanlarda subaraknoid hemoraji modeli oluşturularak yapılan bir çalışmada HMGB1 proteinin kaspaz-3 seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir (163). Bizim çalışmamızda, perikontüzyonel alandan alınan doku örnekleri incelendiğinde, travma grubundaki HMGB1 protein artışıyla beraber apoptotik indeksin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı belirlendi. Travma + EP grubunda ise, travma grubu ile karşılaştırıldığında HMGB1 proteindeki azalma ile aynı bölgedeki apoptotik indeksin anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi. Ayrıca HMGB1 proteinin, bax ve bcl-2 düzeylerine etkisi incelendi ve travma sonrası artan HMGB1 proteindeki artışa bağlı olarak Bax proteininde istatistiksel anlamlı oranda artış, bcl-2 düzeyinde ise azalma saptandı. Travma sonrası EP verilerek HMGB1 inhibisyonu sağlanan grupta ise travma grubuna göre bcl-2 düzeyinde artış, bax düzeyinde azalma saptandı. Perikontüzyonel dokudan alınan örneklerde kaspaz-3 düzeyi değerlendirildiğinde travma grubunda HMGB1 düzeyindeki artışa bağlı olarak kaspaz-3 ekspresyonunun arttığı saptandı. Travma sonrası EP verilerek HMGB1 inhibisyonu sağlanan grupta ise travma grubuna göre kaspaz-3 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma saptandı.

DAMP prototipi olan HMGB1 proteini inflamatuvar etkisini çeşitli reseptörlere bağlanarak gösterir. Bu reseptörler: RAGE, TLR2 ve TLR 4' tür (164, 165). Toll like reseptörler hücrel hasarlanma ve enfeksiyon gibi durumlarda PAMP ve DAMP gibi bazı tehlike sinyallerini tanıyarak savunma amacıyla immun sistemi aktive ederler (124). Bir dizi çalışma HMGB-1 kaynaklı inflamasyon, hasar ve immunité gibi durumlarda, HMGB1 proteinin etkisini gösterebilmesi için RAGE reseptörlerine bağlanmasının gerekli olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak ekstrasellüler HMGB-1 çeşitli hücre tiplerinde RAGE ekspresyonunu uyarabilir (121). HMGB1 reseptör etkileşimi sonucunda NF-KB aktive olur ve proinflamatuvar sitokin salınımını artırır (20, 21, 37). HMGB1 proteinin etkilerinden hangi reseptörün daha fazla sorumlu olduğunu göstermek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu alanda Okuma ve arkadaşları tarafından sıçanlarda TBH modeli oluşturularak yapılan bir çalışmada HMGB1 proteinin oluşturduğu kan beyin bariyeri geçirgenliği artışından RAGE

reseptörlerinin, TLR4 ve TLR2 reseptörlerine kıyasla daha fazla sorumlu olduğu gösterilmiştir (166). Buna karşılık TBH modeli oluşturularak yapılan diğer çalışmalarda HMGB1 proteinin etkisini TLR4 reseptörüne bağlanarak gösterdiği saptanmıştır, fakat bu çalışmalarda RAGE reseptörü ile kıyas yapılmamıştır (14, 37). Yapılan bir serebral iskemi çalışmasında, ölen hücrelerden salgılanan HMGB1 proteinin TLR4 reseptörüne bağlanarak MMP 9 seviyesini artırdığı ve buna bağlı olarak iskemik beyin hasarında ve nörovasküler hasarda artış yaptığı görülmüştür (167). Biz bu çalışmada TBH'da HMGB1 protein artışının, TLR4 ve RAGE ekspresyonuna etkisini inceledik. Travma grubunda, kontrol grubuna göre HMGB1, TLR4 ve RAGE düzeylerinin anlamlı derecede arttığını, buna karşın etil piruvat uygulaması ile HMGB1 inhibisyonu sağlanan Travma+EP grubunda, HMGB1 ve TLR4 düzeylerinin travma grubuna göre anlamlı derecede azaldığını göstermemize rağmen, RAGE ekspresyonunun travma grubuna göre kısmen azalmış olsa da bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını saptadık. Sonuç olarak HMGB1 proteinin TLR4 ekspresyonunda daha etkili olduğunu saptadık.

TBH'da oksidatif stres artışı ile ilgili birçok araştırma mevcuttur (168, 169). Oksidatif hasar travma sonrası nöron ölümüne sebep olur. İskemik beyin dokusunda, HMGB1 protein salınımı sonucu monositlerden proinflamatuvar sitokin salınımı stimüle olur. Bunun sonucunda yüksek miktarda reaktif oksijen türleri üretilir. Bu reaktif oksijen türleri ise protein ve lipid oksidasyonunu indüklerler (33). Yapılan bir çalışmada akut akciğer hasarında alveolar makrofajlarda HMGB1 proteine bağlı olarak, indüklenebilir nitrit oksit sentaz (iNOS) artışı gösterilmiştir (170). TBH'da oksidatif stres ile HMGB1 protein ilişkisini araştıran sınırlı sayıda yayına rastlanmıştır. HMGB1 proteinin mikroglial aktivasyona sebep olabileceğinden daha önce bahsedilmişti. Mikroglial aktivasyon sonucu oluşan proinflamatuvar M1 mikroglia; tümör nekrozis faktör (TNF), IL-6, IL1beta gibi sitokinlerin ve kemokinlerin salınımını artırarak enflamasyonu artırmakla beraber; NADPH oksidaz ve İNOS ekspresyonu sonucu, reaktif nitrojen ve oksijen radikalleri gibi çeşitli nörotoksik mediatörleri üreterek oksidatif stresi artırır, ve tüm bu olayların sonucunda aktif olarak merkezi sinir sistemi doku yıkımında görev alır (24-27). Biz bu çalışmada HMGB1 protein ile oksidatif stres arasındaki ilişkiyi inceledik Perikontüzyonel beyin dokusu örneklerinde total antioksidan kapasite (TAS), total oksidan kapasite (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) değerleri incelendiğinde, travma sonrası HMGB1 protein düzeyinin artmış olduğu grupta TAS değerlerini istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu, TOS ve OSI değerlerini ise anlamlı derecede artmış olduğu belirlendi. Etil piruvat ile HMGB1 inhibisyonu sağlanan grupta düşük HMGB1 protein

düzeyleri ile birlikte; travma grubunda düşük olan TAS değerlerinin yükselip, TOS ve OSI değerlerinin düşerek, kontrol grubu değerlerine yaklaştığı görüldü. Sonuç olarak travma sonrası HMGB1 proteinin, oksidatif hasarda artış yarattığı saptandı.

Etil pirüvat (EP), HMGB1 sekresyonunun tanımlanan ilk farmakolojik inhibitörüdür (36). Sistemik enflamasyon (135) ve inme (137) gibi çeşitli hastalıklarda koruyucu etkisi gösterilmiştir. Birçok deneysel hastalık modelinde EP'nin antiinflamatuvar etkisini HMGB-1 serbestlenmesini inhibe ederek gösterdiği ve böylece hücre hasarını azalttığı gösterilmiştir (171, 172). Wang ve arkadaşları spinal kord iskemisi modeli oluşturarak yaptıkları bir çalışmada EP'nin HMGB-1 salınımını engelleyerek motor defisit gelişimini ve apoptotik nöron sayısını azalttığını göstermişlerdir (138). EP'nin sistemik enfeksiyon ve letal sepsis oluşturulan farelerde yaşam süresini uzattığı, bunun yanında iskemisi kaynaklı miyokard hasarını azalttığı saptanmıştır (135, 136). EP postiskemik beyinde infarkt hacmini belirgin bir şekilde azaltmıştır (137). Travmatik beyin hasarı ve spinal kord iskemisi modellerinde motor fonksiyon skorlarını arttırmıştır (138, 139). Ratlarda ağırlık bırakılarak deneysel travmatik beyin hasarı oluşturulan model ile yapılan bir çalışmada, EP tedavisinin nöroprotektif etkilerinin HMGB1/TLR4/NF-kB yolunun inhibisyonu ile ilişkili olduğu görülmüştür (37). Yapılan bir çalışmada EP'nin aktive mikrogliyalardan TNF, IL-6 ve NO salınımını engellediği görülmüş ve bu inhibisyonun EP'nin antiinflamatuvar etkisinden sorumlu olduğu düşünülmüştür (140).

Bu çalışmada, TBH'nda inflamatuvar cevapta rol oynayan HMGB1 proteinin sekonder hasara yol açan beyin ödemi, oksidatif stres ve apoptoz gibi diğer mekanizmalara, daha önce aynı çalışmada bir arada gösterilmeyen etkileri ilk defa gösterilmiştir. Bu çalışmada gösterilen TBH 'da HMGB1 proteinin, kan beyin bariyerindeki sıkı bağlantı moleküllerine ve bunun sonucunda beyin ödeme etkisi daha önceki çalışmalarda direkt olarak gösterilmemiştir. Ayrıca bu çalışmada gösterilen, HMGB1 proteinin apoptotik göstergeler olan bax ve bcl-2 üzerine etkisine daha önceki çalışmalarda rastanmamaktadır. Sonuçlarımız gelecekteki araştırmalara yol gösterici olacaktır.

Bizim çalışmamızda bazı kısıtlamalar bulunmaktadır. Çalışmamızda, HMGB1 proteinini inhibe etmek için en çok kullanılan ve etkisi en çok bilinen EP kullanılmıştır. Literatürde HMGB1 proteinin etkileri araştırıldığında, yukarıda bahsettiğimiz hastalıklarda etil pirüvat tarafından sağlanan koruyucu etkilerin, aslında HMGB1 proteinin inhibisyonunun etkileri olduğu anlaşılmaktadır. EP'nin, HMGB1 proteini inhibe etmek dışında kendine özgü antiinflamatuvar ve antioksidan etkileri de olabileceği gözönüne alınarak, gelecekte EP'nin

anti-HMGB1 antikoru ile karşılaştırıldığı çalışmalar planlanabilir. İkinci olarak, çalışmamızda HMGB1'in maksimal etkinlik gösterdiğini düşündüğümüz 24. saatte tüm sıçanlar sakrifiye edilerek deneylerimiz yapılmıştır. Kafa travmasından sonra farklı zamanlarda HMGB1'in ekspresyonu incelenmemiştir. Gelecekte yapılacak olan çalışmalarda. kafa travmasından sonra farklı zamanlarda HMGB1 proteinin, zamana bağlı nükleer, sitoplazmik ve ekstrasellüler yer değişimleri ile etkilerinin değişimini karşılaştıran çalışmalar planlanabilir.

6) SONUÇ

Bu çalışmada travma sonrası nekrotik hücrelerden salınarak, enflamatuvar cevabı indükleyen HMGB1 proteinin, reseptörleri olan TLR4 ve RAGE ekspresyonlarını artırarak ve KBB'deki sıkı bağlantı proteinleri olan okludin, klaudin-5 ve ZO-1 düzeylerini azaltarak beyin ödemi arttırdığını, apoptoz ve oksidatif stresi artırarak travma sonrası oluşan sekonder hasar mekanizmalarını da negatif yönde etkilediğini saptadık.

Sonuç olarak, HMGB1 protein sekonder hasar mekanizmalarını tetikleyerek TBH patogeneğinde anahtar rol üstlenmektedir ve bu özellikleri nedeniyle kafa travması tedavisinde potansiyel hedef olabilir.

7) KAYNAKLAR

1. Langlois JA, Rutland-Brown W, Wald MM. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *The Journal of head trauma rehabilitation*. 2006;21(5):375-8.
2. Dohi K, Satoh K, Nakamachi T, Yofu S, Hiratsuka K, Nakamura S, et al. Does edaravone (MCI-186) act as an antioxidant and a neuroprotector in experimental traumatic brain injury? *Antioxidants & redox signaling*. 2007;9(2):281-7.
3. Chesnut RM. Secondary brain insults after head injury: clinical perspectives. *New horizons (Baltimore, Md)*. 1995;3(3):366-75.
4. WALLECK CA. Preventing secondary brain injury. *AACN Advanced Critical Care*. 1992;3(1):19-30.
5. Wilson JX, Gelb AW. Free radicals, antioxidants, and neurologic injury: possible relationship to cerebral protection by anesthetics. *Journal of neurosurgical anesthesiology*. 2002;14(1):66-79.
6. Finnie J. Neuroinflammation: beneficial and detrimental effects after traumatic brain injury. *Inflammopharmacology*. 2013;21(4):309-20.
7. Johnson V, Meaney D, Cullen D, Smith D. Animal models of traumatic brain injury. *Handbook of clinical neurology*. 2014;127:115-28.
8. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual review of immunology*. 2009;27:669-92.
9. Loane D, Stoica B, Faden A. Neuroprotection for traumatic brain injury. *Handbook of clinical neurology*. 2014;127:343-66.
10. Loubopoulos A, Ertürk A, Hellal F. Microglia in action: how aging and injury can change the brain's guardians. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015;9.
11. Woodcock T, Morganti-Kossmann MC. The role of markers of inflammation in traumatic brain injury. *Frontiers in neurology*. 2013;4.
12. Cederberg D, Siesjö P. What has inflammation to do with traumatic brain injury? *Child's nervous system*. 2010;26(2):221-6.
13. de Rivero Vaccari JP, Dietrich WD, Keane RW. Activation and regulation of cellular inflammasomes: gaps in our knowledge for central nervous system injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2014;34(3):369-75.
14. Laird MD, Shields JS, Sukumari-Ramesh S, Kimbler DE, Fessler RD, Shakir B, et al. High mobility group box protein-1 promotes cerebral edema after traumatic brain injury via activation of toll-like receptor 4. *Glia*. 2014;62(1):26-38.
15. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*. 2002;418(6894):191-5.

16. Rovere-Querini P, Capobianco A, Scaffidi P, Valentini B, Catalanotti F, Giazson M, et al. HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO reports*. 2004;5(8):825-30.
17. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nature Reviews Immunology*. 2005;5(4):331-42.
18. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annual review of immunology*. 2009;28:367-88.
19. Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim J-Y, Strassheim D, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2006;290(3):C917-C24.
20. Luan Z-G, Zhang H, Yang P-T, Ma X-C, Zhang C, Guo R-X. HMGB1 activates nuclear factor- κ B signaling by RAGE and increases the production of TNF- α in human umbilical vein endothelial cells. *Immunobiology*. 2010;215(12):956-62.
21. Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, et al. Blockade of RAGE–amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature*. 2000;405(6784):354-60.
22. Lei C, Lin S, Zhang C, Tao W, Dong W, Hao Z, et al. High-mobility group box1 protein promotes neuroinflammation after intracerebral hemorrhage in rats. *Neuroscience*. 2013;228:190-9.
23. Kim S-W, Lim C-M, Kim J-B, Shin J-H, Lee S, Lee M, et al. Extracellular HMGB1 released by NMDA treatment confers neuronal apoptosis via RAGE-p38 MAPK/ERK signaling pathway. *Neurotoxicity research*. 2011;20(2):159-69.
24. Rodriguez-Rodriguez A, Jose Egea-Guerrero J, Murillo-Cabezas F, Carrillo-Vico A. Oxidative stress in traumatic brain injury. *Current medicinal chemistry*. 2014;21(10):1201-11.
25. Goldman T, Prinz M. Role of microglia in CNS autoimmunity. *Clinical and Developmental Immunology*. 2013;2013.
26. Norden DM, Muccigrosso MM, Godbout JP. Microglial priming and enhanced reactivity to secondary insult in aging, and traumatic CNS injury, and neurodegenerative disease. *Neuropharmacology*. 2014.
27. Chen Y, Won S, Xu Y, Swanson R. Targeting microglial activation in stroke therapy: pharmacological tools and gender effects. *Current medicinal chemistry*. 2014;21(19):2146.
28. Wahl M, Unterberg A, Baethmann A, Schilling L. Mediators of blood-brain barrier dysfunction and formation of vasogenic brain edema. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1988;8(5):621.
29. Fisher M. Injuries to the vascular endothelium: vascular wall and endothelial dysfunction. *Reviews in neurological diseases*. 2007;5:S4-11.
30. Zhang J, Takahashi HK, Liu K, Wake H, Liu R, Maruo T, et al. Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody protects the blood–brain barrier from ischemia-induced disruption in rats. *Stroke*. 2011;42(5):1420-8.
31. Kondo T, Reaume AG, Huang T-T, Carlson E, Murakami K, Chen SF, et al. Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema

formation after transient focal cerebral ischemia. *The Journal of neuroscience*. 1997;17(11):4180-9.

32. Heo JH, Han SW, Lee SK. Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radical Biology and Medicine*. 2005;39(1):51-70.

33. Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger A-C, Bloom O, Erlandsson-Harris H, et al. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(4):565-70.

34. Higashida T, Kreipke CW, Rafols JA, Peng C, Schafer S, Schafer P, et al. The role of hypoxia-inducible factor-1 α , aquaporin-4, and matrix metalloproteinase-9 in blood-brain barrier disruption and brain edema after traumatic brain injury: laboratory investigation. *Journal of neurosurgery*. 2011;114(1):92-101.

35. Liu K, Mori S, Takahashi HK, Tomono Y, Wake H, Kanke T, et al. Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats. *The FASEB Journal*. 2007;21(14):3904-16.

36. Sims CA, Wattanasirichaigoon S, Menconi MJ, Ajami AM, Fink MP. Ringer's ethyl pyruvate solution ameliorates ischemia/reperfusion-induced intestinal mucosal injury in rats. *Critical care medicine*. 2001;29(8):1513-8.

37. Su X, Wang H, Zhao J, Pan H, Mao L. Beneficial effects of ethyl pyruvate through inhibiting high-mobility group box 1 expression and TLR4/NF-kappaB pathway after traumatic brain injury in the rat. *Mediators Inflamm*. 2011;2011:807142.

38. Park E, Bell JD, Baker AJ. Traumatic brain injury: can the consequences be stopped? *Canadian Medical Association Journal*. 2008;178(9):1163-70.

39. Jennett B. Epidemiology of head injury. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1996;60(4):362-9.

40. Karasu A, Sabanci PA, Cansever T, Hepgöl KT, İmer M, Dolaş İ, et al. [Epidemiological study in head injury patients]. *Ulusal travma ve acil cerrahi dergisi= Turkish journal of trauma & emergency surgery: TJTES*. 2009;15(2):159-63.

41. Acosta SA, Tajiri N, Shinozuka K, Ishikawa H, Sanberg PR, Sanchez-Ramos J, et al. Combination therapy of human umbilical cord blood cells and granulocyte colony stimulating factor reduces histopathological and motor impairments in an experimental model of chronic traumatic brain injury. *PLoS One*. 2014;9(3):e90953.

42. Hernandez-Ontiveros DG, Tajiri N, Acosta S, Giunta B, Tan J, Borlongan CV. Microglia activation as a biomarker for traumatic brain injury. *Frontiers in neurology*. 2013;4.

43. Thurman DJ, Alverson C, Dunn KA, Guerrero J, Sniezek JE. Traumatic brain injury in the United States: a public health perspective. *The Journal of head trauma rehabilitation*. 1999;14(6):602-15.

44. Hamit GZ. *Nöroşirürji Ders Kitabı*. Mars Matbaası, Ankara. 1998.

45. Erbenği A. History and development of neurosurgery in Anatolia (part one). *Turk Neurosurg*. 1993;3:1-5.

46. Paşaoğlu A. Erişkinde Kafa Travmaları. *Temel Nöroşirürji*.1:316-23.

47. Miller JD, Sweet RC, Narayan R, Becker DP. Early insults to the injured brain. *Jama*. 1978;240(5):439-42.
48. Niyonkuru C, Wagner AK, Ozawa H, Amin K, Goyal A, Fabio A. Group-based trajectory analysis applications for prognostic biomarker model development in severe TBI: a practical example. *Journal of neurotrauma*. 2013;30(11):938-45.
49. Maas AI, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *The Lancet Neurology*. 2008;7(8):728-41.
50. Saatman KE, Duhaime A-C, Bullock R, Maas AI, Valadka A, Manley GT. Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. *Journal of neurotrauma*. 2008;25(7):719-38.
51. Malkesman O, Tucker LB, Ozi J, McCabe JT. Traumatic brain injury—modeling neuropsychiatric symptoms in rodents. *Frontiers in neurology*. 2013;4.
52. Greve MW, Zink BJ. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*. 2009;76(2):97-104.
53. Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Plesnila N, Baethmann A, Reulen H-J. Superior neuroprotective efficacy of a novel antioxidant (U-101033E) with improved blood-brain barrier permeability in focal cerebral ischemia. *Stroke*. 1997;28(10):2018-24.
54. Newcomb J, Zhao X, Pike B, Hayes R. Temporal profile of apoptotic-like changes in neurons and astrocytes following controlled cortical impact injury in the rat. *Experimental neurology*. 1999;158(1):76-88.
55. Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F. Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *The Journal of Neuroscience*. 1990;10(3):1035-41.
56. Bouma GJ, Muizelaar JP, Choi SC, Newlon PG, Young HF. Cerebral circulation and metabolism after severe traumatic brain injury: the elusive role of ischemia. *Journal of neurosurgery*. 1991;75(5):685-93.
57. Marmarou A, Anderson RL, Ward JD, Choi SC, Young HF, Eisenberg HM, et al. Impact of ICP instability and hypotension on outcome in patients with severe head trauma. *Special Supplements*. 1991;75(1S):S59-S66.
58. Miller JD, Piper I, Jones P. Pathophysiology of head injury. *Neurotrauma New York: McGraw-Hill*. 1996;61.
59. Bullock R, Zauner A, Tsuji O, Woodward J, Young H, Marmarou A. Excitatory amino acid release after severe human head trauma: effect of intracranial pressure and cerebral perfusion pressure changes. *Intracranial Pressure IX Tokyo: Springer-Verlag*. 1994:264-7.
60. Büki A, Povlishock J. All roads lead to disconnection?—Traumatic axonal injury revisited. *Acta neurochirurgica*. 2006;148(2):181-94.
61. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences*. 1999;22(9):391-7.
62. Isaac JT, Ashby MC, McBain CJ. The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron*. 2007;54(6):859-71.

63. Stamatovic SM, Shakui P, Keep RF, Moore BB, Kunkel SL, Van Rooijen N, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood–brain barrier permeability. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2005;25(5):593-606.
64. Marzatico F, Cafe C. Oxygen radicals and other toxic oxygen metabolites as key mediators of the central nervous system tissue injury. *Functional neurology*. 1992;8(1):51-66.
65. Braugher JM, Hall ED. Central nervous systems trauma and stroke: I. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine*. 1989;6(3):289-301.
66. Manwaring JD, Csallany AS. Malondialdehyde-containing proteins and their relationship to vitamin E. *Lipids*. 1988;23(7):651-5.
67. Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(14):1365-75.
68. Roseborough G, Lin R, Gao D, McHale A, Chen L, Williams GM, et al. DNA damage and repair in human spinal cord following ischemia–reperfusion injury. *Journal of Cardiothoracic-Renal Research*. 2006;1(2):141-5.
69. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in biochemical sciences*. 2001;26(1):61-6.
70. Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, van den Heuvel FA, Koornstra JJ, Wesseling J, et al. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2004;52(6):821-31.
71. Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cellular signalling*. 2003;15(11):983-92.
72. Lewén A, Fujimura M, Sugawara T, Matz P, Copin J-C, Chan PH. Oxidative stress–dependent release of mitochondrial cytochrome c after traumatic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2001;21(8):914-20.
73. Schuler M, Green D. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochemical Society Transactions*. 2001;29(6):684-7.
74. Rachmany L, Tweedie D, Rubovitch V, Yu Q-S, Li Y, Wang J-Y, et al. Cognitive impairments accompanying rodent mild traumatic brain injury involve p53-dependent neuronal cell death and are ameliorated by the tetrahydrobenzothiazole PFT- α . *PloS one*. 2013;8(11):e79837.
75. Acosta SA, Tajiri N, de la Pena I, Bastawrous M, Sanberg PR, Kaneko Y, et al. Alpha-Synuclein as a Pathological Link Between Chronic Traumatic Brain Injury and Parkinson's Disease. *Journal of cellular physiology*. 2015;230(5):1024-32.
76. Uryu K, Chen X-H, Martinez D, Browne KD, Johnson VE, Graham DI, et al. Multiple proteins implicated in neurodegenerative diseases accumulate in axons after brain trauma in humans. *Experimental neurology*. 2007;208(2):185-92.
77. Tajiri N, Kellogg SL, Shimizu T, Arendash GW, Borlongan CV. Traumatic brain injury precipitates cognitive impairment and extracellular A β aggregation in Alzheimer's disease transgenic mice. 2013.
78. Tajiri N, Acosta SA, Shahaduzzaman M, Ishikawa H, Shinozuka K, Pabon M, et al. Intravenous transplants of human adipose-derived stem cell protect the brain from traumatic

brain injury-induced neurodegeneration and motor and cognitive impairments: cell graft biodistribution and soluble factors in young and aged rats. *The Journal of Neuroscience*. 2014;34(1):313-26.

79. Benveniste EN. Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine & growth factor reviews*. 1998;9(3):259-75.
80. Hickey W, Hsu B, Kimura H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *Journal of neuroscience research*. 1991;28(2):254-60.
81. Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *British journal of pharmacology*. 2006;147(S1):S232-S40.
82. Tajiri N, Hernandez D, Acosta S, Shinozuka K, Ishikawa H, Ehrhart J, et al. Suppressed cytokine expression immediately following traumatic brain injury in neonatal rats indicates an expeditious endogenous anti-inflammatory response. *Brain research*. 2014;1559:65-71.
83. Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Research Reviews*. 1999;30(1):77-105.
84. Schmidt OI, Heyde CE, Ertel W, Stahel PF. Closed head injury—an inflammatory disease? *Brain Research Reviews*. 2005;48(2):388-99.
85. Fluiter K, Opperhuizen AL, Morgan BP, Baas F, Ramaglia V. Inhibition of the membrane attack complex of the complement system reduces secondary neuroaxonal loss and promotes neurologic recovery after traumatic brain injury in mice. *The Journal of Immunology*. 2014;192(5):2339-48.
86. Kumar A, Loane DJ. Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention. *Brain, behavior, and immunity*. 2012;26(8):1191-201.
87. Chodobski A, Zink BJ, Szmydynger-Chodobska J. Blood–brain barrier pathophysiology in traumatic brain injury. *Translational stroke research*. 2011;2(4):492-516.
88. Kabadi SV, Faden AI. Neuroprotective strategies for traumatic brain injury: improving clinical translation. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(1):1216-36.
89. Chhor V, Le Charpentier T, Lebon S, Oré M-V, Celador IL, Josserand J, et al. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain, behavior, and immunity*. 2013;32:70-85.
90. CLARK RS, SCHIDING JK, KACZOROWSKI SL, MARION DW, KOCHANEK PM. Neutrophil accumulation after traumatic brain injury in rats: comparison of weight drop and controlled cortical impact models. *Journal of neurotrauma*. 1994;11(5):499-506.
91. Csuka E, Hans VH, Ammann E, Trentz O, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. Cell activation and inflammatory response following traumatic axonal injury in the rat. *Neuroreport*. 2000;11(11):2587-90.
92. Lu K-T, Wang Y-W, Yang J-T, Yang Y-L, Chen H-I. Effect of interleukin-1 on traumatic brain injury-induced damage to hippocampal neurons. *Journal of neurotrauma*. 2005;22(8):885-95.

93. Shiozaki T, Hayakata T, Tasaki O, Hosotubo H, Fujjita K, Mouri T, et al. Cerebrospinal fluid concentrations of anti-inflammatory mediators in early-phase severe traumatic brain injury. *Shock*. 2005;23(5):406-10.
94. Shohami E, Ginis I, Hallenbeck JM. Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine & growth factor reviews*. 1999;10(2):119-30.
95. Kita T, Liu L, Tanaka N, Kinoshita Y. The expression of tumor necrosis factor- α in the rat brain after fluid percussive injury. *International journal of legal medicine*. 1997;110(6):305-11.
96. Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Otto VI, Stahel PF, Kossmann T. Role of cerebral inflammation after traumatic brain injury: a revisited concept. *Shock*. 2001;16(3):165-77.
97. Ransohoff RM, Tani M. Do chemokines mediate leukocyte recruitment in post-traumatic CNS inflammation? *Trends in neurosciences*. 1998;21(4):154-9.
98. Sherwood ER, Prough DS. Interleukin-8, neuroinflammation, and secondary brain injury. *Critical care medicine*. 2000;28(4):1221-3.
99. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*. 1999;285(5425):248-51.
100. Landsman D, Bustin M. A signature for the HMG-1 box DNA-binding proteins. *Bioessays*. 1993;15(8):539-46.
101. Kang R, Chen R, Zhang Q, Hou W, Wu S, Cao L, et al. HMGB1 in health and disease. *Molecular aspects of medicine*. 2014;40:1-116.
102. Wang H, Yang H, Tracey K. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *Journal of internal medicine*. 2004;255(3):320-31.
103. Wang H, Vishnubhakat JM, Bloom O, Zhang M, Ombrellino M, Sama A, et al. Proinflammatory cytokines (tumor necrosis factor and interleukin 1) stimulate release of high mobility group protein-1 by pituicytes. *Surgery*. 1999;126(2):389-92.
104. Murakami K, Koide M, Dumont TM, Russell SR, Tranmer BI, Wellman GC. Subarachnoid hemorrhage induces gliosis and increased expression of the pro-inflammatory cytokine high mobility group box 1 protein. *Translational stroke research*. 2011;2(1):72-9.
105. Watanabe M, Miyajima M, Nakajima M, Arai H, Ogino I, Nakamura S, et al. Expression analysis of high mobility group box-1 protein (HMGB-1) in the cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum of the congenital hydrocephalus (H-Tx) rat: Springer; 2012.
106. Guazzi S, Strangio A, Franzi AT, Bianchi ME. HMGB1, an architectural chromatin protein and extracellular signalling factor, has a spatially and temporally restricted expression pattern in mouse brain. *Gene expression patterns*. 2003;3(1):29-33.
107. Nagata S, Hanayama R, Kawane K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell*. 2010;140(5):619-30.
108. Kruse K, Janko C, Urbonaviciute V, Mierke CT, Winkler TH, Voll RE, et al. Inefficient clearance of dying cells in patients with SLE: anti-dsDNA autoantibodies, MFG-E8, HMGB-1 and other players. *Apoptosis*. 2010;15(9):1098-113.

109. Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annual review of immunology*. 2011;29:139-62.
110. Harris HE, Andersson U, Pisetsky DS. HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nature Reviews Rheumatology*. 2012;8(4):195-202.
111. Yang H, Antoine DJ, Andersson U, Tracey KJ. The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. *Journal of leukocyte biology*. 2013;93(6):865-73.
112. Andersson U, Harris HE. The role of HMGB1 in the pathogenesis of rheumatic disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. 2010;1799(1):141-8.
113. Qiu J, Nishimura M, Wang Y, Sims JR, Qiu S, Savitz SI, et al. Early release of HMGB-1 from neurons after the onset of brain ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2008;28(5):927-38.
114. Goldstein RS, Gallowitsch-Puerta M, Yang L, Rosas-Ballina M, Huston JM, Czura CJ, et al. Elevated high-mobility group box 1 levels in patients with cerebral and myocardial ischemia. *Shock*. 2006;25(6):571-4.
115. Nakahara T, Tsuruta R, Kaneko T, Yamashita S, Fujita M, Kasaoka S, et al. High-mobility group box 1 protein in CSF of patients with subarachnoid hemorrhage. *Neurocritical care*. 2009;11(3):362-8.
116. Abraham E, Arcaroli J, Carmody A, Wang H, Tracey KJ. Cutting edge: HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation. *The Journal of Immunology*. 2000;165(6):2950-4.
117. Agnello D, Wang H, Yang H, Tracey KJ, Ghezzi P. HMGB-1, a DNA-binding protein with cytokine activity, induces brain TNF and IL-6 production, and mediates anorexia and taste aversion. *Cytokine*. 2002;18(4):231-6.
118. Sappington PL, Yang R, Yang H, Tracey KJ, Delude RL, Fink MP. HMGB1 B box increases the permeability of Caco-2 enterocytic monolayers and impairs intestinal barrier function in mice. *Gastroenterology*. 2002;123(3):790-802.
119. Andersson U, Tracey K. HMGB1, a pro-inflammatory cytokine of clinical interest: introduction. *Journal of internal medicine*. 2004;255(3):318-9.
120. Sessa L, Gatti E, Zeni F, Antonelli A, Catucci A, Koch M, et al. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is only present in mammals, and belongs to a family of cell adhesion molecules (CAMs). 2014.
121. Li J, Qu X, Schmidt AM. Sp1-binding elements in the promoter of RAGE are essential for amphoterin-mediated gene expression in cultured neuroblastoma cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(47):30870-8.
122. Liliensiek B, Weigand MA, Bierhaus A, Nicklas W, Kasper M, Hofer S, et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;113(11):1641.
123. Ullah MA, Loh Z, Gan WJ, Zhang V, Yang H, Li JH, et al. Receptor for advanced glycation end products and its ligand high-mobility group box-1 mediate allergic airway sensitization and airway inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2014;134(2):440-50. e3.

124. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*. 2004;4(7):499-511.
125. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nature medicine*. 2007;13(9):1050-9.
126. Popp A, Feustel P, Kimelberg H. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurosurgery*. 1996;2:2623-37.
127. Pop V, Sorensen DW, Kamper JE, Ajao DO, Murphy MP, Head E, et al. Early brain injury alters the blood-brain barrier phenotype in parallel with β -amyloid and cognitive changes in adulthood. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2013;33(2):205-14.
128. Yu F, Wang Z, Tanaka M, Chiu C-T, Leeds P, Zhang Y, et al. Posttrauma cotreatment with lithium and valproate: reduction of lesion volume, attenuation of blood-brain barrier disruption, and improvement in motor coordination in mice with traumatic brain injury: Laboratory investigation. *Journal of neurosurgery*. 2013;119(3):766-73.
129. Yang SH, Gustafson J, Gangidine M, Stepien D, Schuster R, Pritts TA, et al. A murine model of mild traumatic brain injury exhibiting cognitive and motor deficits. *Journal of surgical research*. 2013;184(2):981-8.
130. Butt AM, Jones HC, Abbott NJ. Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *The Journal of physiology*. 1990;429(1):47-62.
131. Ueno M. Molecular anatomy of the brain endothelial barrier: an overview of the distributional features. *Current medicinal chemistry*. 2007;14(11):1199-206.
132. Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of disease*. 2010;37(1):13-25.
133. Correale J, Villa A. Cellular elements of the blood-brain barrier. *Neurochemical research*. 2009;34(12):2067-77.
134. Hurd RE, Yen YF, Mayer D, Chen A, Wilson D, Kohler S, et al. Metabolic imaging in the anesthetized rat brain using hyperpolarized [1-¹³C] pyruvate and [1-¹³C] ethyl pyruvate. *Magnetic resonance in medicine*. 2010;63(5):1137-43.
135. Ulloa L, Ochani M, Yang H, Tanovic M, Halperin D, Yang R, et al. Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(19):12351-6.
136. Woo YJ, Taylor MD, Cohen JE, Jayasankar V, Bish LT, Burdick J, et al. Ethyl pyruvate preserves cardiac function and attenuates oxidative injury after prolonged myocardial ischemia. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2004;127(5):1262-9.
137. Yu Y-M, Kim J-B, Lee K-W, Kim SY, Han P-L, Lee J-K. Inhibition of the cerebral ischemic injury by ethyl pyruvate with a wide therapeutic window. *Stroke*. 2005;36(10):2238-43.
138. Wang Q, Ding Q, Zhou Y, Gou X, Hou L, Chen S, et al. Ethyl pyruvate attenuates spinal cord ischemic injury with a wide therapeutic window through inhibiting high-mobility group box 1 release in rabbits. *Anesthesiology*. 2009;110(6):1279-86.

139. Su X, Wang H, Zhao J, Pan H, Mao L. Beneficial effects of ethyl pyruvate through inhibiting high-mobility group box 1 expression and TLR4/NF- κ B pathway after traumatic brain injury in the rat. *Mediators of inflammation*. 2011;2011.
140. Stanisavljević S, Jevtić B, Djedović N, Miljković D. Short term exposure to ethyl pyruvate has long term anti-inflammatory effects on microglial cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2015;72:11-6.
141. Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, Murray HM, Dail WG. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Research*. 1981;211(1):67-77.
142. Yu S, Kaneko Y, Bae E, Stahl CE, Wang Y, van Loveren H, et al. Severity of controlled cortical impact traumatic brain injury in rats and mice dictates degree of behavioral deficits. *Brain research*. 2009;1287:157-63.
143. Shlosberg D, Benifla M, Kaufer D, Friedman A. Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nature reviews Neurology*. 2010;6(7):393-403.
144. Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1788(4):842-57.
145. Gao HM, Zhou H, Zhang F, Wilson BC, Kam W, Hong JS. HMGB1 acts on microglia Mac1 to mediate chronic neuroinflammation that drives progressive neurodegeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(3):1081-92.
146. Ohnishi M, Monda A, Takemoto R, Fujimoto Y, Sugitani M, Iwamura T, et al. High-mobility group box 1 up-regulates aquaporin 4 expression via microglia-astrocyte interaction. *Neurochem Int*. 2014;75:32-8.
147. Szmydynger-Chodobska J, Strazielle N, Zink BJ, Ghersi-Egea JF, Chodobski A. The role of the choroid plexus in neutrophil invasion after traumatic brain injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2009;29(9):1503-16.
148. Kinoshita K, Chatzipanteli K, Vitarbo E, Truettner JS, Alonso OF, Dietrich WD. Interleukin-1 β messenger ribonucleic acid and protein levels after fluid-percussion brain injury in rats: importance of injury severity and brain temperature. *Neurosurgery*. 2002;51(1):195-203.
149. Ye L, Huang Y, Zhao L, Li Y, Sun L, Zhou Y, et al. IL-1 β and TNF- α induce neurotoxicity through glutamate production: a potential role for neuronal glutaminase. *J Neurochem*. 2013;125(6):897-908.
150. Mankertz J, Tavalali S, Schmitz H, Mankertz A, Riecken EO, Fromm M, et al. Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. *Journal of cell science*. 2000;113 (Pt 11):2085-90.
151. Szmydynger-Chodobska J, Fox LM, Lynch KM, Zink BJ, Chodobski A. Vasopressin amplifies the production of proinflammatory mediators in traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2010;27(8):1449-61.
152. Okuma Y, Liu K, Wake H, Zhang J, Maruo T, Date I, et al. Anti-high mobility group box-1 antibody therapy for traumatic brain injury. *Ann Neurol*. 2012;72(3):373-84.

153. Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2007;27(4):697-709.
154. Bolton SJ, Anthony DC, Perry VH. Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood-brain barrier breakdown in vivo. *Neuroscience*. 1998;86(4):1245-57.
155. Zhang J, Takahashi HK, Liu K, Wake H, Liu R, Maruo T, et al. Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody protects the blood-brain barrier from ischemia-induced disruption in rats. *Stroke*. 2011;42(5):1420-8.
156. Yang LY, Chu YH, Tweedie D, Yu QS, Pick CG, Hoffer BJ, et al. Post-trauma administration of the pifithrin-alpha oxygen analog improves histological and functional outcomes after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2015;269:56-66.
157. Gong G, Xiang L, Yuan L, Hu L, Wu W, Cai L, et al. Protective effect of glycyrrhizin, a direct HMGB1 inhibitor, on focal cerebral ischemia/reperfusion-induced inflammation, oxidative stress, and apoptosis in rats. *PLoS One*. 2014;9(3):e89450.
158. Kawabata H, Setoguchi T, Yone K, Souda M, Yoshida H, Kawahara K, et al. High mobility group box 1 is upregulated after spinal cord injury and is associated with neuronal cell apoptosis. *Spine*. 2010;35(11):1109-15.
159. Au AK, Aneja RK, Bell MJ, Bayir H, Feldman K, Adelson PD, et al. Cerebrospinal fluid levels of high-mobility group box 1 and cytochrome C predict outcome after pediatric traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2012;29(11):2013-21.
160. Ha YM, Kim MY, Park MK, Lee YS, Kim YM, Kim HJ, et al. Higenamine reduces HMGB1 during hypoxia-induced brain injury by induction of heme oxygenase-1 through PI3K/Akt/Nrf-2 signal pathways. *Apoptosis*. 2012;17(5):463-74.
161. Zhang J, Wu Y, Weng Z, Zhou T, Feng T, Lin Y. Glycyrrhizin protects brain against ischemia-reperfusion injury in mice through HMGB1-TLR4-IL-17A signaling pathway. *Brain Res*. 2014;1582:176-86.
162. Zhai CL, Zhang MQ, Zhang Y, Xu HX, Wang JM, An GP, et al. Glycyrrhizin protects rat heart against ischemia-reperfusion injury through blockade of HMGB1-dependent phospho-JNK/Bax pathway. *Acta pharmacologica Sinica*. 2012;33(12):1477-87.
163. Sun Q, Wu W, Hu YC, Li H, Zhang D, Li S, et al. Early release of high-mobility group box 1 (HMGB1) from neurons in experimental subarachnoid hemorrhage in vivo and in vitro. *J Neuroinflammation*. 2014;11:106.
164. Muhammad S, Barakat W, Stoyanov S, Murikinati S, Yang H, Tracey KJ, et al. The HMGB1 receptor RAGE mediates ischemic brain damage. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008;28(46):12023-31.
165. Yu M, Wang H, Ding A, Golenbock DT, Latz E, Czura CJ, et al. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock*. 2006;26(2):174-9.
166. Okuma Y, Liu K, Wake H, Liu R, Nishimura Y, Hui Z, et al. Glycyrrhizin inhibits traumatic brain injury by reducing HMGB1-RAGE interaction. *Neuropharmacology*. 2014;85:18-26.

167. Qiu J, Xu J, Zheng Y, Wei Y, Zhu X, Lo EH, et al. High-mobility group box 1 promotes metalloproteinase-9 upregulation through Toll-like receptor 4 after cerebral ischemia. *Stroke*. 2010;41(9):2077-82.
168. Angeloni C, Prata C, Dalla Sega FV, Piperno R, Hrelia S. Traumatic brain injury and NADPH oxidase: a deep relationship. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015;2015:370312.
169. Mojtahedzadeh M, Ahmadi A, Mahmoodpoor A, Beigmohammadi MT, Abdollahi M, Khazaeipour Z, et al. Hypertonic saline solution reduces the oxidative stress responses in traumatic brain injury patients. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 2014;19(9):867-74.
170. Ren D, Sun R, Wang S. Role of inducible nitric oxide synthase expressed by alveolar macrophages in high mobility group box 1--induced acute lung injury. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2006;55(5):207-15.
171. Yang Z-Y, Ling Y, Yin T, Tao J, Xiong J-X, Wu H-S, et al. Delayed ethyl pyruvate therapy attenuates experimental severe acute pancreatitis via reduced serum high mobility group box 1 levels in rats. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2008;14(28):4546.
172. Shang G-H, Lin D-J, Xiao W, Jia C-Q, Li Y, Wang A-H, et al. Ethyl pyruvate reduces mortality in an endotoxin-induced severe acute lung injury mouse model. *Respir Res*. 2009;10(1):91.