



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI

FARE KAFA TRAVMASI MODELİNDE DOKSİSİKLİNİN
İNFLAMASYON ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Dr. Said MARJANI

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA 2020



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI

FARE KAFA TRAVMASI MODELİNDE DOKSİSİKLİNİN
İNFLAMASYON ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Said MARJANI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Melike MUT AŞKUN

ANKARA 2020

TEŞEKKÜR

Nöroşirürji eğitimim süresince bilgi, birikim ve desteğini esirgemeyen; bu çalışmanın planlanması, uygulanması ve sonuçlandırılmasında büyük emeği geçen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Melike Mut Aşkun'a saygı ve sevgilerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca bilimsel, mesleki ve sosyal deneyimlerini benimle paylaşan, cerrahi prensip ve mesleki özgüvenimin oluşmasında büyük emeği olan, yanında çalışmaktan onur duyduğum Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Mustafa Berker ve değerli öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Servet İnci, Sayın Prof. Dr. Burçak Bilginer, Sayın Prof. Dr. Halil Kamil Öge, Sayın Doç. Dr. Ahmet İlkey Işıkay, Sayın Uzman Dr. Şahin Hanalioğlu ve Sayın Uzman Dr. Dicle Karakaya'ya teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, eğitimim boyunca beraber çalıştığım araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için gerekli altyapı ve desteği sağlayan Dr. Canan Çakır Aktaş ve Histoloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Sevda Müftüoğlu ve Dr. Selim Zırh'a teşekkür ederim.

Son olarak uzmanlık eğitimim sırasında en zor zamanlarımda yanımda olan, hiçbir fedakarlıktan çekinmeyen, varlıkları ile her daim yolumu aydınlatan sevgili eşim, annem ve ablalarıma destekleri için teşekkür ederim.

Tezimi rahmetli babam Mohammad Marjani'ye ithaf ediyorum.

ÖZET

Marjani S. Fare kafa travması modelinde Doksisisiklinin inflamasyon üzerine etkilerinin incelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroşirurji Anabilim Dalı, Ankara, 2020.

Giriş ve Amaç: Travmatik beyin hasarı (TBH) dünyada gençlerin önemli ölüm nedenlerinden biridir. TBH son yıllarda önemli bir halk sağlığı sorunu olup dünya genelinde sakatlıkların ve ölümün en sık nedenidir.

Hasar oluşumunu takiben ilk 24 saatte mikroglialar tarafından TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler salgılanır. Akut dönemin ardından, inflamazomlar (NLRP3) aktive olur. Bunun sonucunda inaktif formda bulunan kaspaz enzimi NLRP3 kompleksi tarafından aktif formuna dönüşür. Aktifleşen kaspaz-1 inflamatuvar olaylarda rolü olan IL-1 β ve IL-18 sitokinlerinin salınımını uyarır.

Doksisisiklin (DOX), *Food and Drug Administration* (FDA) tarafından onaylanmış olan bir antibiyotiktir ve kan-beyin bariyerinden iyi geçişi vardır. Doksisisiklin mikroglialarda, matriks metalloproteinaz-3(MMP-3)'ü azaltarak, nitrik oksid (NO), TNF alfa, IL-1, IL-6, IL-8 üzerine inhibitör etki yapar. Bu çalışmada, kafa travması modelinde düşük ve yüksek dozlarda verilen intraperitoneal doksisisiklin'in, üçüncü günde inflamasyon üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada, 4 ayrı grup (sham, kontrol, düşük ve yüksek doz DOX) ve her grupta 5 fare (n=5) olacak şekilde toplam 20 adet fare kullanılmıştır. Hayvanlara 11 cm yükseklikten 75 gr serbest ağırlık düşürülerek kafa travması modeli oluşturulmuştur. Travmadan yarım saat sonra kontrol grubuna serum fizyolojik, düşük doz grubuna 10 mg/kg ve yüksek doz grubuna 100 mg/kg intraperitoneal doksisisiklin enjeksiyonu yapılmıştır. Hayvanlar üçüncü günde sakrifiye edilerek beyin dokularındaki histopatolojik ve immünohistokimyasal bulgular kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır.

Bulgular: IL-6 sinyal pozitifliği, 10 mg/kg DOX verilen grupta anlamlı olarak azalmıştır (p=0,003). 100 mg/kg DOX verilen grupta pozitif hücre sayısında azalma görülmüştür, fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,58).

Iba-1 (İyonize kalsiyum bağlayıcı adaptör molekül-1) ile işaretlenen mikrogliaların hasarlı bölgeye göçünün, kontrol grubuna göre 10 mg/kg ve 100 mg/kg DOX verilen gruplarda daha az olduğu görülmektedir (p=0,0001, p=0,003).

CD-3 sinyal pozitifliği ve pozitif hücre sayısı, 10 mg/kg ve 100 mg/kg DOX verilen gruplarda anlamlı olarak azalmıştır (p=0,00001, p=0,003).

Son olarak, düşük ve yüksek doksisisiklin verilen travma gruplarında, ilaçsız travma grubuna göre daha yüksek oranda apoptoza gitmeyen nöron ve glia oranları görülmüştür.

Sonuç: Kafa travmasında DOX kullanımı, akut nöroinflamasyon ve mikroglia aktivasyonunu inhibe ederek kafa travması sonrası ortaya çıkan ikincil hasarın azaltmasında etkin olarak kullanılabilir yeni bir tedavi yöntemi olarak umut vaat etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Travmatik beyin hasarı, nöroinflamasyon, mikroglia, doksisisiklin

ABSTRACT

Marjani S. Investigation of antiinflammatory effects of Doxycycline on experimental traumatic brain injury model, Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Neurosurgery, Ankara, 2020.

Introduction & Objectives: Traumatic brain injury (TBI) is one of the major causes of death among young people in the world. TBI is an important public health problem in recent years and is the most common cause of disability and death worldwide.

After the trauma, the response of the cells and the activated molecular pathways differ depending on the time elapsed after the formation of damage. Microglia, activates proinflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β and IL-6. After the acute period, inflammasome (NLRP3), are activated. As a result, the caspase enzyme, is transformed into its active form. Activated caspase-1 stimulates the release of IL-1 β and IL-18 cytokines, which play a role in inflammatory events. Doxycycline is a *Food and Drug Administration* (FDA) approved antibiotic and can pass through the blood-brain barrier and inhibits nitric oxide (NO), TNF alpha, IL-1, IL-6, IL-8. In this study, we aimed to investigate the antiinflammatory effects of intraperitoneal doxycycline given in low and high doses, on the third day after the head trauma in experimental traumatic brain injury model.

Material & Methods: In this study, twenty male Swiss albino mice were divided into four groups: sham (n=5), control (n=5), 10 mg/kg DOX (n=5) and 100 mg/kg DOX (n=5) injected groups. Closed head trauma was performed by using weight drop model (75 gr, 11 cm). 30 minutes after the trauma, intraperitoneal saline was injected into the control group and intraperitoneal 10 and 100 mg/kg DOX were given to the experimental (low dose, high dose) groups. Histopathologic and immunohistochemical findings of the brain tissues were examined and compared with the control group.

Results: IL-6 signal positivity significantly decreased in the group that received 10 mg/kg DOX ($p = 0.003$). There was a decrease in the number of positive cells in the group given 100 mg/kg DOX, but this decrease was not statistically significant ($p = 0.58$). It is observed that the migration of microglia marked with Iba-1 to the damaged area is lower in both groups given 10 mg/kg and 100 mg/kg DOX compared to the control group ($p = 0.0001$, $p = 0.003$).

CD-3 signal positivity and positive cell count decreased significantly in both groups given 10 mg/kg and 100 mg/kg DOX ($p = 0.00001$, $p = 0.003$).

Finally, the TUNEL (+) neuron and glia cell numbers with apoptosis decreased significantly in both low and high DOX groups compared to the trauma group.

Conclusion: The use of DOX in head trauma has inhibited neuroinflammation and microglial activation. Therefore, administration of doxycycline after traumatic brain injury is a novel approach to effectively reduce secondary brain injury aggravated by the acute neuroinflammatory response.

Keywords: Traumatic brain injury, neuroinflammation, microglia, doxycycline

İÇİNDEKİLER**Sayfa**

TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Travmatik Beyin Hasarı: Epidemiyoloji	3
2.2. Travmatik Beyin Hasarı: Türleri Ve Sınıflandırması	4
2.3. Travmatik Beyin Hasarı: Tanı, Klinik, Prognoz	6
2.3.1. Fokal Beyin Hasarı	6
2.3.1.1. Epidural Hematom	6
2.3.1.2. Subdural Hematom	7
2.3.1.3. Kontüzyon	8
2.3.1.4. Intraserebral Hematom	8
2.3.2.1. Diffü Aksonal Yaralanması	10
2.3.2.2. Konküzyon	10
2.4. Travmatik Beyin Hasarında Görüntüleme Yöntemleri	10
2.5. Yapılan Çalışmalarda Travmatik Beyin Hasarına Önerilen Tedaviler	11
2.5.1. Hipertonik salin	11
2.5.2. Mannitol	12
2.5.3. Magnezyum	12
2.5.4. Steroidler	12
2.5.5. Kalsiyum kanal blokerleri	12
2.5.6. Dekompresif Kraniotomi Ve Kraniektomi	12
2.5.7. Barbitüratlar	12

2.5.8. Diğer İlaçlar	13
2.6. Travmatik Beyin Hasarının Mekanizması	13
2.6.1. Primer (Birincil) Hasar	15
2.6.2. Sekonder (İkincil) Hasar	15
2.7. Travmatik Beyin Hasarının Spesifik Patofizyolojisi	17
2.7.1. Serebral Kan Akımı	17
2.7.1.1. Hipoperfüzyon Fazı	17
2.7.1.2. Hiperperfüzyon Fazı	18
2.7.1.3. Vazospazm Fazı	18
2.7.2. Serebrovasküler Otoregülasyon ve CO ₂ Reaktivitesi	18
2.7.3. Serebral Vazospazm	19
2.7.4. Serebral Oksijenizasyon	19
2.7.5. Serebral Metabolik Disfonksiyon	19
2.7.6. Serebral Ödem	20
2.7.7. Nekroz Ve Apoptoz	20
2.7.8. İnflamasyon	21
2.7.9. İntrakranial Basınç	21
2.8. Nöroinflamasyon	22
2.8.1. İnflamazom Tanımı	22
2.8.2. İnflamazom Aktivasyonu Ve Regülasyonu	24
2.8.3. İnflamazom Aktivasyonunun Nöroinflamasyon Üzerine Etkileri	25
2.8.4. Nörolojik Hastalıklarda İnflamazomlar	26
2.8.4.1. Multiple Skleroz (MS)	26
2.8.4.2. Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS)	27
2.8.4.3 Prion Hastalığı	27
2.8.4.4. İskemik SVO	28
2.8.4.5. Hemorajik SVO	28
2.8.4.6. Alzheimer Hastalığı	29
2.8.4.7. Parkinson Hastalığı	30
2.9. Travmatik Beyin Hasarında İnflamasyon	30
2.9.1. Lökosit	31

2.9.2. Astrosit	32
2.9.3. Mikroglia	32
2.9.4. İnflamazom	33
2.10. Doksisisiklin	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Deney Hayvanları Ve Barınma Koşulları	35
3.2. Deney Grupları Ve Protokol	35
3.3. Yaşamsal Bulguların Takibi Ve Anestezi	37
3.4. Kafa Travmasının Oluşturulması	38
3.5. Doksisisiklin'in Hazırlanması ve İntraperitoneal Yolla Verilmesi	39
3.6. Sakrifikasyon, Beyinlerin Çıkarılması Ve Fiksasyon	39
3.7. Kesitlerin Alınması ve İmmünohistokimyasal ve Histopatolojik Değerlendirme	40
3.7.1. İmmünoperoksidaz İşaretleme	40
3.7.2. TUNEL İşaretleme	41
3.8. İstatistiksel Değerlendirme	42
4. BULGULAR	42
4.1. Travma Şiddetinin Etkisi	42
4.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirme	43
4.2.1 CD-3	43
4.2.2. Iba-1	45
4.2.3. IL-6	46
4.2.4. TUNEL Sonuçları	48
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ	56
7. KAYNAKLAR	57

SİMGELER ve KISALTMALAR

A β	Amiloid β
AMP	Adenozin monofosfat
ALS	Amyotrofik lateral skleroz
ATP	Adenozin trifosfat
AVFO ₂	Arteriovenöz oksijen farkı ^{[1][2]} _{SEP}
cAMP	Siklik AMP
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
COX-2	Siklooksijenaz-2
BT	Bilgisayarlı Tomografi
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
DAH	Diffüz Aksonal Hasar
DAMPs	Damage Associated Molecular Patterns
DOX	Doksisiklin
EDH	Epidural Hematom
FDA	Food and Drug Administration
GFAP	Glial Fibriler Asidik Protein
GKS	Glasgow Koma Skoru
HSP	Isı Şok Proteinleri
Iba-1	İyonize kalsiyum bağlayıcı adaptör molekül-1
ICD	International Classification of Disease
IL	İnterlökin
İSH	İntraserebral Hematom
İKB	İntrakranial Basınç
İP	İntraperitoneal
MMP	Matriks Metalloproteinaz
MS	Multiple Skleroz
MRS:	MR Spektroskopi

MRG:	Manyetik Rezonans Görüntüleme
NF- κ B	Nükleer Faktor kappa B
NLRs	NOD benzeri reseptörler
NMDA	N-metil D-aspartat
NO	Nitrik Oksit
NRLP1	Nod benzeri reseptör proteini 1
NRLP3	Nod benzeri reseptör proteini 3
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PtO ₂	Beyin dokusu oksijen basıncı
PTA	Posttravmatik Amnezi
PYD	Pyrin Halkası
SAK	Subaraknoid Kanama
SDH	Subdural Hematom
SKA	Serebral Kan Akımı
SMHO ₂	Oksijenin Serebral Metabolik Hızı
SSS	Santral Sinir Sistemi
SVO	Serebro Vasküler Olay
TBH	Travmatik Beyin Hasarı
TNF	Tümör Nekroze edici Faktör

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Subdural ve epidural hematom	8
2.2. Primer travmatik beyin hasarı.	9
2.3. İntrakranial kanamaların türleri	9
2.4. Travmatik beyin hasarın patofizyolojisi.	14
2.5. TBH’de primer ve sekonder hasar.	14
2.6. İnflamazomun olumlu ve olumsuz etkileri.	22
2.7. İnflamazom aktivasyonunun nöroinflamasyon üzerine etkileri	23
2.8. İnflamazomun işlevi	24
2.9. NRLP3 inflamazom işlev mekanizması.	25
2.10. Prion hastalığında inflamazom aktivasyonu.	28
2.11. İskemik ve hemorajik SVO.	29
2.12. Alzheimer hastalığında inflamazom aktivasyonu.	30
2.13. İnflamasyonda mikroglialinin rolü.	32
2.14. TBH’de primer hasar sonrası oluşan nöroinflamasyon kaskadı.	33
2.15. Doksisisiklinin kimyasal yapısı.	34
3.1. Travma modelinde ağırlığın düşürüldüğü nokta.	37
3.2. Kraniumun ortaya konulması.	38
3.3. Ağırlık düşürme düzeneği ile kafa travmasının oluşturulması.	39
3.4. Sakrifiye edilen farenin kafatası.	40
4.1. Farede travma sonrası kafatası kırığı ve SAK .	43
4.2. CD3 pozitif hücrelerin mikrografları	44
4.3. İmmünohistokimya ile CD-3 pozitif hücrelerin gruplara göre sayı dağılımı	45
4.4. Iba1 ile microglial hücrelerin işaretlenmesi	46
4.5. İmmünohistokimya ile mikroglia hücrelerinin gruplara göre sayı dağılımı	46
4.6. IL-6 işaretlemesinin gruplara göre mikrografları	47

4.7. İmmünohistokimyasal olarak nöron ve glialarda IL-6'nın immünperoksidaz işaretleme analizleri.	48
4.8. Gruplara göre TUNEL işaretleme mikrografları	49
4.9. TUNEL işaretleme sonrası pozitif ve negatif nöron ve gliaların gruplara göre sayı dağılımı	49
5.1. TBH'de immün yanıtta yer alan mediatörlerin zamansal dağılımı	51
5.2. Nörodejeneratif hastalıklarında Doksisisiklinin etkileri	52

TABLULAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1. Glasgow Koma Skalası	4
2.2. Post travmatik amnezinin sınıflandırılması	5
2.3. Beyin hasarının BT bulgularına göre sınıflandırılması: <i>Rotterdam</i>	6
2.4. Subdural hematoma sınıflandırılması	7
2.5. Diffüz aksonal hasarın nöropatolojik sınıflandırılması	10
2.6. Sekonder beyin hasarından sorumlu olaylar	16

1. GİRİŞ

Travmatik beyin hasarı (TBH) dünyada gençlerin önemli ölüm nedenlerinden biridir [1].

Travmatik beyin hasarı beynin normal fonksiyonlarını bozan bir yaralanmadır [2]. Amerika Birleşik Devletleri'nde yıllık yaklaşık 2.5 milyon hasta TBH nedeniyle acile başvuru yapmaktadır. Bunlardan yaklaşık %87'si (2,200,000) ayaktan ve %11'i (280,000) yatarak tedavi edilmektedir. Her yıl yaklaşık 50,000 kişi TBH nedeniyle hayatını kaybetmektedir.

İnsidansı 0-4 yaşındaki çocuklarda, 15-19 yaşındaki gençlerde ve 75 yaş üzerindeki yaşlılarda artış göstermektedir ve erkeklerde daha sıktır [3].

Yaygın mekanizmalar arasında doğrudan darbe, hızlı akselerasyon/deselerasyon, delici yaralanma ve patlama dalgaları bulunur. Bu mekanizmalar heterojen olmasına rağmen, hepsi kafa içine aktarılan dış mekanik kuvvetlerden kaynaklanır. Ortaya çıkan hasar, fokal kontüzyonlar ve hematomların yanı sıra diffüz aksonal yaralanma (DAH), beyin ödemi ve şişkinliği de içerir [4].

Travmaya sekonder beyin hasarı 2 fazdan oluşmaktadır. Travma anında gelişen hasar birincil (primer) hasar olarak tanımlanmaktadır. Birincil hasarda kontüzyon, laserasyon, diffüz aksonal hasar, beyin şişmesi ve intrakranial hemoraji gibi mekanizmalar hücre ölümüne sebep olmaktadır. Primer hasardan günler hatta haftalar sonra gelişen, mekanizması daha karmaşık olan ve nörolojik fonksiyon kayıplarına neden olan ikincil (sekonder) hasar meydana gelmektedir. İkincil hasarda kan beyin bariyerinin bozulması, sitokin üretimi, nöroinflamasyon, oksidatif stres, astrosit ve mikroglia aktivasyonu önemli mekanizmalar olarak bilinmektedir [5].

Travmadan sonra gelişen ikincil hasar kontrolsüz bir şekilde birincil hasarın alevlenmesine, nörodejenerasyona ve gecikmiş hücre ölümüne sebep olmaktadır [6].

Nöroinflamasyon, bağışıklık sisteminin kafa travmasına verdiği hücresel ve humoral yanıtı; hasarı sınırlamak ve hasarlı hücrelerin temizlenmesini ve/veya tamirini sağlamaktadır. Ama kontrolsüz nöroinflamasyon doku hasarı ve nörolojik disfonksiyonlara neden olmaktadır [7].

Travmadan sonra, hücrelerin verdiği yanıt ve aktifleşen moleküler yolaklar hasar oluşumundan sonra geçen süreye bağlı olarak farklılık göstermektedir. Hasar oluşumunu takiben ilk 24 saatte serbest oksijen radikallerinin üretimi, mitokondri fonksiyonlarının bozulması, hasarlı hücrelerdeki (mikroglia, astrosit ve nöronlar) potasyum ve genetik materyalin hücre dışına

çıkması ile beyin dokusunun özelleşmiş makrofajları olan mikroglialar aktifleşir. Aktifleşen mikroglialar tarafından TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler salgılanır [8].

Akut dönemin ardından, doğal bağışıklık sisteminin parçası olan ve çoklu protein kompleksinden oluşan inflamazomlar (NLRP3 gibi) aktive olur. Bunun sonucunda inaktif formda bulunan kaspaz-1 enzimi, NLRP3 kompleksi tarafından proteolitik yıkıma uğratarak aktif formuna dönüşür. Aktifleşen kaspaz-1 ise inflamatuvar olaylarda rolü olan IL-1 β ve IL-18 sitokinlerinin salınımını uyarır [9] .

Doksisiklin geniş spektrumlu, ikinci nesil bakteriyostatik ve FDA (*Food and Drug Administration*) tarafından onaylanmış olan bir antibiyotiktir ve kan-beyin bariyerinden iyi geçişi vardır [10] .

Doksisiklinin hücrel strese bağlı salgılanan matriks metalloproteinaz-3 ü ve buna bağlı gelişen apoptozu inhibe ettiği ispat edilmiştir.

Ayrıca doksisiklin mikroglia MMP-3 ü azaltarak nitrik oksid (NO), TNF alfa, IL-1, IL-6, IL-8 ve siklooksijenaz 2 (COX 2) üzerinde inhibitör etki yapar [11] .

Daha önce doksisiklinin antiinflamatuvar etkisi nörodejeneratif hastalıklarda (Multiple Skleroz, Parkinson hastalığı, Prion hastalığı) incelenmiştir. Özellikle multiple sklerozda IFN- β ve MMP 'yi inhibe ettiği ispatlanmıştır [12-14] .

Bu ilacın nöroinflamasyon üzerinde antiinflamatuvar etkisi bilinmesine rağmen travmatik beyin hasarında yeterli çalışma bulunmamaktadır. Travmatik beyin hasarında bu ilacın etki mekanizmalarını aydınlatmak ve göstermek için başka çalışmalara da ihtiyaç duyulmaktadır.

Yapılan çalışmalarda doksisiklinin düşük ve yüksek doz arasında antiinflamatuvar etkinliği açısından düşük dozun daha etkili olduğu ve yan etki bakımından daha uygun olduğu görülmüştür [15] .

Çalışmamızda, deneysel fare kafa travması modelinde, doksisiklinin travma sonrası oluşan akut nöroinflamasyonda etkisinin olup olmadığının araştırılması ve iki farklı antiinflamatuvar dozda verilen doksisiklinin inflamasyon ve ikincil hasar üzerine etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Travmatik Beyin Hasarı: Epidemiyoloji

Travmatik beyin hasarı (TBH) doğrudan çarpmak, darbe, sarsıntı, kalvaryumun ani akselerasyon ve deselerasyonu veya penetran bir travmaya bağlı gelişen ve nörolojik disfonksiyonlara sebep olan hasardır [16]. 2010 yılında *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)* tarafından yapılan bir çalışmaya göre, ABD’de 2002-2006 yılları arasında yıllık en az yaklaşık 2.5 milyon hasta TBH nedeniyle acile başvuru yapmıştır. Bunlardan yaklaşık %87’si (2,200,000) ayaktan ve %11’i (280,000) yatarak tedavi edilmiş olup, %2’si (52,000) hayatını kaybetmiştir. TBH’lerde ölümle sonlanmayanlar en sık düşme, motorlu araç kazaları ve kafaya sert cisim isabeti; ölümle sonlananlar ise en sık düşme ve intihar nedeniyle gerçekleşmiştir [3]. 2014 yılı için 2.87 milyon acil başvurusu olarak önceki senelere göre artmıştır. Bu yılda ABD’de yaklaşık 812,000 pediatrik travmatik beyin hasarı gerçekleşmiştir [16]. ABD’de TBH en sık 0-4 yaş arasındaki çocuklarda, 15-19 yaş arasındaki adolesanlarda ve 75 yaş üstü erişkinlerde görülmektedir [3].

Yapılan çalışmalarda kadın-erkek oranı 1:3 olarak bildirilmiştir. Fakat 65 yaş üstü ve 4 yaş altında olan hastalarda kadın-erkek oranı farklılık göstermemiştir [17, 18]. Tüm yaş grupları arasında 75 yaş üstü olan hastalarda hastanede yatış ve mortalite oranlarının en yüksek olduğu bildirilmiştir [18].

Halk arasında travmatik beyin hasarının en sık nedenleri sırayla; düşmeler (%35), motorlu taşıt kazaları (%18), kafaya hareketli veya hareketsiz bir cismin çarpması (%17), saldırı, şiddet ve intihardır. 14 yaşın altı ve 65 yaşın üstünde düşmeler beyin travmasının en sık nedeniken, 15-34 yaş arasında motorlu taşıt kazaları TBH’nin en sık sebebidir [16].

Başka bir çalışmada genel olarak TBH’lerin %60’ının trafik kazalarına, %20-30’unun düşmelere, yaklaşık olarak %10’unun şiddete maruz kalma, kalan %10’unun ise iş ve spor kazalarına bağlı olduğu tespit edilmiştir [19]. ABD’de TBH ile ilişkili sakatlık tahmini olarak 3.2 – 5.3 milyon kişiyi etkilemektedir (nüfusun %1-2’si) [20, 21].

2.2 Travmatik Beyin Hasarı: Türleri Ve Sınıflandırması

TBH sonrası bilinç düzeyinin değerlendirilmesinde en sık kullanılan skala Glasgow Koma Skoru (GKS) ve post travmatik amnezinin (PTA) süresidir. GKS'ye göre TBH, hafif, orta ve şiddetli olarak değerlendirilmektedir. 14-15 hafif beyin travması, 9-13 olması orta ve 3-8 olması ağır beyin hasarını göstermektedir [22]. Ağır şiddette TBH'de (GKS: 3-8) hasta komadadır; göz açması ve emirlere uyması yoktur, ikincil beyin hasarının (hipoksik hasar, beyin şişmesi) gelişme riski yüksektir. Orta şiddette travmada (GKS: 9-13) hasta letarjik iken, hafif travmalar (GKS: 14-15) sıklıkla tam nörolojik iyileşme ile sonuçlanmaktadır [23].

Tablo 2.1. Glasgow Koma Skalası

Glasgow Koma Skalası (E₄M₆V₅)

Göz Açıklığı		Motor Tepki		Sözel Cevap	
Spontan	4	Komutlara Uyuyor	6	Oryante	5
Sözel Uyarı	3	Ağrıya Lokalize	5	Uyumsuz ve kendiliğinden yanıt	4
Ağrılı Uyarı	2	Ağrıya Geri Çekme	4	Birbiriyle bağımsız kelimeler	3
Tepki yok	1	Anormal Fleks.	3	İnlemeler -mırıltılar	2
		Anormal Eks.	2	Cevap yok	1
		Tepki yok	1		

TBH, bilinç kaybı ve post travmatik amnezinin (PTA) süresine göre de sınıflandırılmaktadır. Buna göre, hafif travmatik beyin hasarı bilinç kaybının 1 saatten ve PTA'nın 24 saatten kısa sürmesi; orta şiddette beyin hasarı bilinç kaybının 1-24 saat ve PTA'nın 1-7 gün sürmesi; ağır hasar ise bilinç kaybının 24 saatten ve PTA'nın 7 günden daha uzun sürmesi ile tanımlanmaktadır [24].

Tablo 2.2. Post travmatik amnezi sınıflandırması[25]

	GCS	AOC	LOC	PTA
Mild	13-15	≤ 24 hours	0-30 min	≤ 24 hours
Moderate	9-12	> 24 hours	>30 min <24 hours	>24 hours <7 days
Severe	3-8	>24 hours	≥ 24 hours	≥7 days

GCS =Glasgow Coma Score	AOC = Alteration of consciousness
LOC = Loss of Consciousness	PTA = Post-traumatic amnesia

TBH, fokal bir lezyonun (kitle) olup olmadığına göre de sınıflandırılabilir. Buna göre kontüzyon, subdural ve epidural hematoma ve intraparakimial hematomlar fokal hasarlar olarak; diffüz aksonal hasar ve hipoksik-iskemik hasarlar ise diffüz yaralanmalar olarak sınıflandırılmaktadır. Fokal yaralanmaların mortalitesi yaklaşık %40, diffüz yaralanmaların ise %25 olarak bilinmektedir [23].

Bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG) kullanılarak yaralanma paternleri incelenerek anatomik sınıflamalar yapılabilir ve hastaların hasar riskleri, geç nörolojik kötüleşme ve kötü prognoz riskleri öngörülebilir. 1991'den bu yana kullanılan ve radyolojik görüntülerde kitle lezyonu olup olmaması ile kafa içi basınç artışı bulgularına göre derecelendirme yapılan *Marshall skoru* 2005 yılında güncellenerek *Rotterdam Skoru* olarak yeniden isimlendirilmiştir [26, 27].

Tablo 2.3. Beyin hasarının BT bulgularına göre sınıflandırılması: *Rotterdam*[28]

BULGU	SKOR
BAZAL SİSTERNLER	
Normal	0
Komprese	1
Silik	2
ORTA HAT ŞİFTİ	
≤ 5mm	0
>5 mm	1
EPİDURAL KİTLE LEZYONU	
Var	0
Yok	1
İNTRAVENTRİKÜLER KAN VEYA SAK	
Yok	0
Var	1
<i>Sum score</i>	+1
Toplam	1-6

2.3. Travmatik Beyin Hasarı: Tanı, Klinik, Prognoz

2.3.1. Fokal Beyin Hasarı: Fokal beyin hasarları; hematomlar ve kontüzyonlar ile sonuçlanmaktadır.

2.3.1.1. Epidural Hematom

Epidural hematom (EDH), travma sonrası dura materin dış tabakası ile kafatasının iç tabulası arasındaki potansiyel boşluk içine ortaya çıkan kanamalardır. Acil müdahale gerektirebilecek ve tedavi edilmezse önemli morbidite ve mortalite ile ilişkili olabilen ve hayatı tehdit eden bir durumdur. Hızlı tanı ve tedavi iyi bir sonuç için önemlidir [29] .

Epidural hematom, tüm kafa yaralanmalarının % 2'sinde ve tüm ölümcül kafa travmalarının % 15'inde görülür. Erkekler kadınlardan daha sık etkilenir. Ayrıca, ergenlerde ve genç yetişkinlerde görülme sıklığı daha yüksektir. Bireyin yaşı ilerledikçe dura mater, üstteki kemiğe daha fazla yapışır. Bu, kafatası ile dura arasındaki alanda hematom gelişme riskini azaltır [30] . Çoğu epidural hematom, orta meningeal arterin yaralanmasına bağlı ortaya çıkar. Arteriyel kaynaklı EDH en sık temporoparietal kırıklar ile birlikte görülür [31, 32] . EDH'lerin % 10'u dural venöz

sinüsün yırtılmasına bağlıdır. Yetişkinlerde, EDH'lerin %75 kadarı temporal bölgede görülür. Bununla birlikte, çocuklarda temporal, oksipital, frontal ve posterior fossa bölgelerinde benzer sıklıkta görülürler [32].

Radyolojik bulgularına göre üç tipe ayrılır: tip I (akut) birinci günde görülür ve pıhtılaşmamış kan içermektedir, tip II (subakut) 2-4 günler arasında görülür ve katı kandan oluşmaktadır, tip III (kronik) 4-20 günler arasında görülür ve lüsent bir görünümü vardır [33].

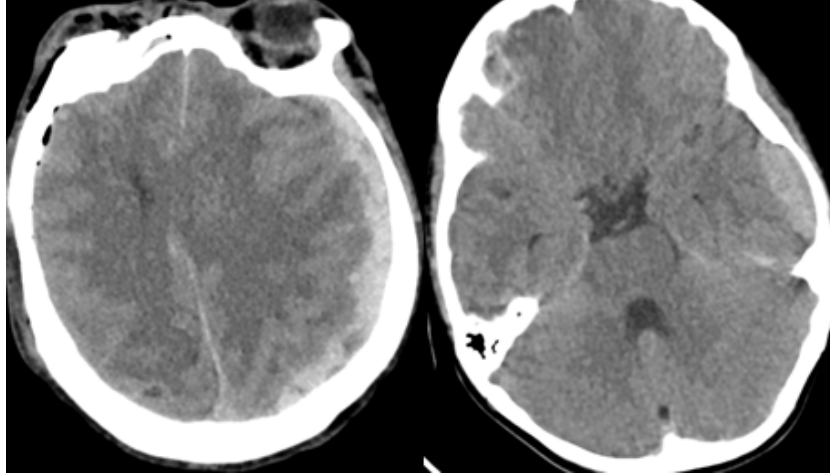
Jacobson tarafından tanımlanmış olan epidural kanama kliniğinde travma sonrası ortaya çıkan bilinç kaybı sonrasında kısa süreli bir düzelme “*lucid interval*” ve ardından tekrar hızlı bir kötüleşme görülür [34].

2.3.1.2. Subdural Hematom

Subdural hematom (SDH), hızlı akselerasyon ve deselerasyon travmalardan sonra dura ve araknoid arasında gelişen kanamadır ve beynin yüzeysel veya köprü venlerinin zedelenmesi ile ortaya çıkmaktadır [35]. Venöz kanama genellikle kafa içi basınç artışı (IKB) veya pıhtı tarafından doğrudan kompresyonla durdurulur. Arteriyel SDH ise vakaların % 30'unu oluşturur ve genellikle küçük (<1 mm çapında) kortikal arterlerin rüptüründen kaynaklanır [23]. Arteriyel rüptürden kaynaklanan SDH'ler daha çok temporoparietalde bulunurken, venlerin yaralanmasına bağlı olan SDH'ler daha çok frontoparietal bölgede bulunmaktadır [36]. Subdural hematom; akut, subakut ve kronik olmak üzere üçe ayrılır. Klinikte akut SDH travmadan sonraki ilk 3 günde, subakut 3-21 günde ve kronik SDH ise 21'inci günden sonra ortaya çıkmaktadır [37].

Tablo 2.4. Subdural hematom sınıflandırması

TİP	GÜN	İÇERİK	BT
Akut	0-2	Pıhtılaşmış kan	Hiperdens
Subakut	2-14	Pıhtılı kan	İzodens
Kronik	>14	Kan	Hipodens



Şekil 2.1. Beyin BT’de yarım ay şekilli akut subdural hematom (soldaki şekil). Beyin BT’de bikonkav, lentiküler epidural hematom (sağdaki şekil)

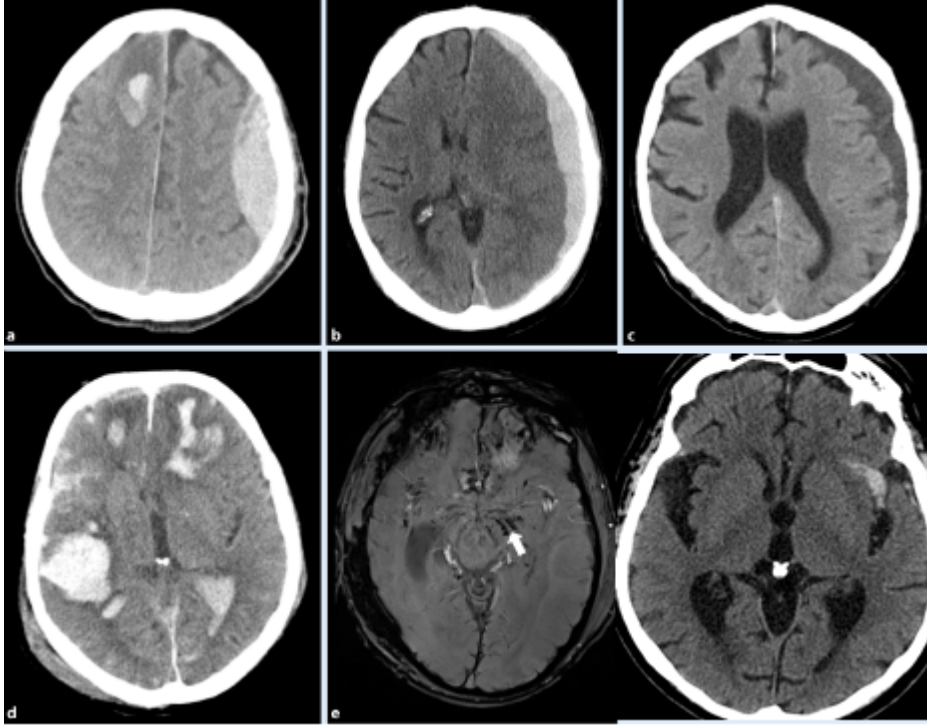
2.3.1.3. Kontüzyon

Kontüzyonlar, travmadan sonra beyin korteksinde ortaya çıkan ve etrafında ödem oluşan mikrokanamalardır. Kontüzyonlar çoğunlukla travma esnasında beynin kemiklerle yakın temas eden bölgelerinde (frontal lob, inferior temporal lob) oluşmaktadır [38]. Kontüzyonlar tipik olarak etkilenen alana bağlı olarak değişken derecelerde nörolojik defisitlere neden olur. Nadiren kontüzyonlar, çevreleyen beyin dokusu ödemi ve hematom nedeniyle kitle etkisine neden olabilirler [24].

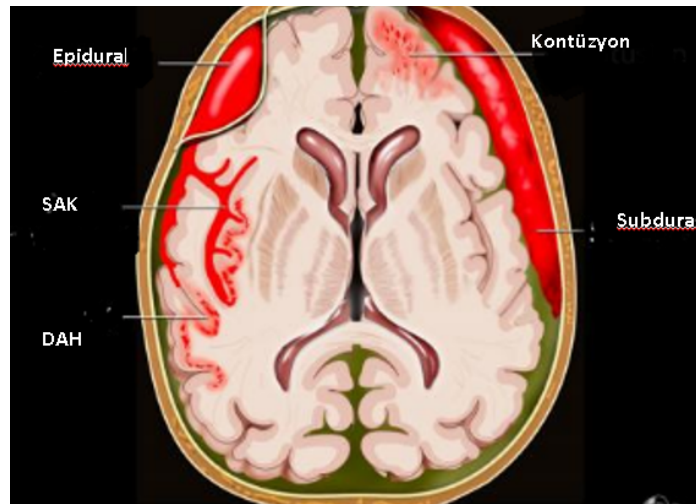
2.3.1.4. İntraserebral Hematom

İntraserebral hematomlar (İSH); tüm travmatik intrakraniyal hematomların %20’sini oluşturup genellikle büyük lobar kontüzyonlarla birlikte görülürmektedir. İyi sınırlı homojen görünümde hemorajik lezyonlarda öncelikle İSH düşünülmelidir. İSH’lerin çoğu temporal ve orbitofrontal loblarda görülmektedir. İSH’ler en sık ateşli silah yaralanması, delici travmalar ve kafatasının çökme kırıkları gibi fokal kafa travmalarında görülür. Kronik antikoagülan tedavi almakta olan hastalarda hafif kafa travmasıyla bile İSH gelişmesi riski vardır [39].

Ağır travmalarda, hematomun içerdiği kanın 50 ml’den fazla olması, yüksek mortalite ile ilişkilidir [40].



Şekil 2.2. Epidural hematom, **b.** Subdural hematom, **c.** Kronik subdural hematom, **d.** intraserebral hemoraji, **e.** Diffüz aksonal hasar, **f.** Travmatik SAK



Şekil 2.3. İntrakranial kanama türleri (Amber Bucker, <https://radiologyassistantant.com>.)

2.3.2. Diffüz Beyin Hasarı: Diffüz beyin yaralanmaları TBH'nin en sık görülen tipidir.

2.3.2.1. Diffüz Aksonal Hasar

Diffüz aksonal hasar (DAH), travmatik beyin hasarının (TBH) en yaygın ve önemli patolojik özelliklerinden biri olarak ortaya çıkmıştır. Beyaz cevherdeki aksonlar, TBH sırasında beyin mekanik yüklenmesi nedeniyle yaralanmaya karşı özellikle savunmasız gibi görünmektedir. Yaralanmanın şiddetine göre, bilinç kaybı veya konfüzyon olarak ortaya çıkabilir ve koma veya kognitif işlev bozukluğu olarak devam edebilir. Diffüz aksonal hasar (DAH), travmadan sonra gelişen persistan komadan sorumludur ve morbidite ve mortalitenin en önemli sebeplerden biridir [41].

Tablo 2.5. Diffüz aksonal hasarın nöropatolojik sınıflandırması

DERECE	LEZYONUN YERİ
I	Serebral hemisferlerin parasagittal beyaz cevherinin aksonal hasarı
II	Grade I'e ek olarak korpus kallosumda fokal lezyon
III	Grade II'ye ek olarak serebral pedinkülde fokal lezyon

2.3.2.2. Konküzyon

Konküzyon, diffüz beyin hasarının en hafif formudur. Belirgin bir mekanik temas olmaksızın kafanın rotasyonel akselerasyonu nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Klasik formunda hastalarda geçici bilinç kaybı görülür. Hasarın mekanizması tam olarak bilinmemektedir, fakat travma esnasında aksonlardaki gerilmeye bağlı akson iyon kanalları disfonksiyonları suçlanmaktadır [34, 42].

2.4. Travmatik Beyin Hasarında Görüntüleme Yöntemleri

Bilgisayar tomografisi (BT) ile görüntüleme ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG) TBH hastaların başlangıç değerlendirmelerinde önemlidir. BT, diffüz aksonal yaralanma, kortikal

kontüzyonlar ve beyin sapı yaralanmaları gibi nonhemorojik lezyonların saptanmasında daha yararlıdır. BT ve MR; diffüz aksonal yaralanmanın şiddetini, vasküler kesinti ve anoksik beyin yaralanması gibi sekonder komplikasyonların şiddeti hususunda kısıtlı bilgi verir. Diffüzyon-ağırlıklı MR görüntüleme su diffüzyonun doğrultusu tayin edilerek, beyaz cevher traktuslarının lokalizasyonu, yönü ve bütünlüğü belirlenir. Bu yöntemin serebral ödem ile karakterize metabolik veya hipoksik ensefalopatilerde ve TBH'de klinik uygulamaları mevcuttur. Perfüzyon MRG'de kan volumü ve akım hızı tayini yapılır. Yanı sıra lezyon yayılımını, şiddeti ve iyileşmeyi değerlendirme olanağı verir, reversibl/irreversibl beyin hasarının ayırt edilmesini sağlar [43] .

Fonksiyonel MRG'de oksijenize olan ve olmayan kan akımlarının yarattığı manyetik özelliklerin farklılığından yararlanılarak bölgesel kan akımının incelenmesi yoluyla haritalanması sağlanır. Fonksiyonel MRG akut ve uzun süreli defisit ile ilişkili olan nöropatolojik değişiklikler ve bilinç hasarı olan hastalarda fonksiyonel iyileşme ve rezidüel engelliliğin derecesi arasında ilişki kurabilir [44] .

Brenner ve arkadaşları proton MRS (spektroskopi) kullanılarak uzun dönem nörolojik ve nöropsikolojik sonuçların tahmin edilebilirliğini araştırmışlar, yaralanma sonrası proton MRS sonucu 1-7 yıl sonrası nörolojik, entellektüel ve nöropsikolojik testler ile karşılaştırılmış ve proton MRS'nin infant ve çocuklarda TBH sonrası uzun dönem sonuçlarında doğru tahmin yapılmasına yardımcı olduğu bildirilmiştir. Proton MRS'nin klinik uygulaması beyin yaralanmasında sonucun tahminini de içermektedir. Proton MRS özellikle TBH'de iskemi şiddetini değerlendirmede (özellikle sonuç tahmini ile ilişkili olarak) faydalı görülmektedir [45, 46]

2.5. Yapılan Çalışmalara Göre Travmatik Beyin Hasarında Önerilen Tedaviler

Travmadan sonra tedavi 3 basamaktan oluşmaktadır; basit, orta ve ağır tedavi. Basit tedaviler, olay yerinde yapılması gereken uygulamalardır (hava yolu sağlanması, ventilasyon, sıvı replasmanı, hipotansiyon ve hipoperfüzyondan kaçınılması). Orta tedaviler, hiperventilasyon, mannitol ve hipertonic salin gibi tedavileri içermektedir. Ağır tedavi ise barbitürat koması ve dekompresyon kraniyektomi den ibarettir [47].

2.5.1. Hipertonik salin

TBH tedavisinde ilk kez 1919'da kullanılmıştır. Sodyumun kan-beyin bariyerinden düşük geçirgenliği vardır. Aynı zamanda kan viskozitesini azaltır. Bu, serebral kan akışını sürdürmek için kompensatuar vazokonstriksiyona yol açarak serebral kan hacmini ve kafa içi basıncını azaltır [48] .

2.5.2. Mannitol

Mannitol bazen beynin akut şişmesini azaltmak için kullanılır, fakat şiddetli TBH'nin tedavisinde mannitolün devam edip etmemesi hala tartışmalıdır [49] . Yapılan bir çalışmada, mannitol, sıçanlarda nöroinflamatuvar yanıtı ve kalpın aktivitesini önemli ölçüde azalttığı görülmüştür, ama bu etki hipertonik saline göre daha az bulunmuştur [50] .

2.5.3. Magnezyum

Magnezyum, NMDA-reseptörleri, kalsiyum kanalları ve nöron membranları üzerindeki aktivitesi nedeniyle potansiyel bir terapötik araçtır [51] . Hayvan çalışmaları, magnezyumun TBH sonrası kognitif ve sensorimotor fonksiyonlarının üzerindeki yararlı etkilerini göstermiştir. Fakat insanlar üzerine etkili olduğu daha ispat edilmemiştir [52] .

2.5.4. Steroidler

Kortikosteroidler, İKB'yi azalttığı düşünüldüğü için yaklaşık 30 sene kafa yaralanmalarını tedavi etmek için kullanıldı [53] . Fakat sonradan kortikosteroidlerin TBH'de etkili olmadığı ve rutin olarak kullanılmaması gerektiği ispat edilmiştir [54, 55] .

2.5.5. Kalsiyum Kanal Blokerleri

Kalsiyum kanal blokerleri (kalsiyum antagonistleri) yaralanma sonrası serebral vazospazmı önleyerek beynin kan akışını korumak için kullanılmıştır [56]. Nimodipin bu ailenin en ünlü ve üzerine en fazla çalışılan üyesidir. Bu ilacın etkisi hala tartışmalıdır [57] .

2.5.6. Dekompresif Kraniotomi ve Kraniektomi

Dekompresif kraniotomi, konvansiyonel tedavi yöntemlerine cevap vermeyen yüksek İKB tedavisinde kullanılır. Kraniumun bir kısmının cerrahi olarak çıkarılmasıyla, travma sonrası İKB artışının tedavisi için efektif bir strateji olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır [58] .

2.5.7. Barbitüratlar

İKB artışı, ağır TBH'nin önemli bir komplikasyonudur ve yüksek mortalite ile ilişkilidir. Barbitüratlar, serebral metabolizmayı baskılayarak İKB'yi azaltır, böylece serebral metabolizmayı ve serebral kan hacmini azaltır. Bununla birlikte, barbitüratlar kan basıncını azalttığı için serebral perfüzyonu olumsuz etkileyebilir [59] .

2.5.8. Diğer İlaçlar

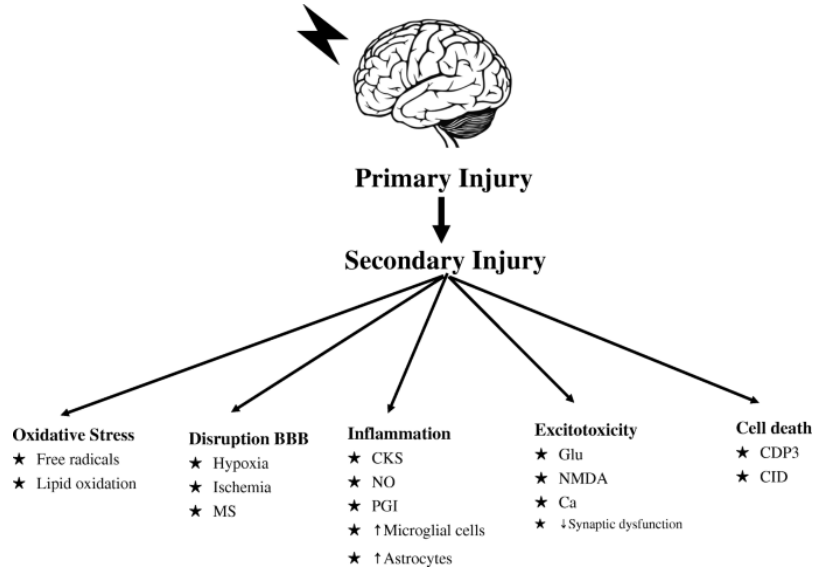
Beta 2 reseptörleri, progesteron, hipotermi, rekombinant faktör VIIa, serbest radikal temizleyiciler, monoaminerjik agonistler (metilfenidat).

Bu ilaçların olumlu ve olumsuz etkileri tartışmalıdır [60-67] .

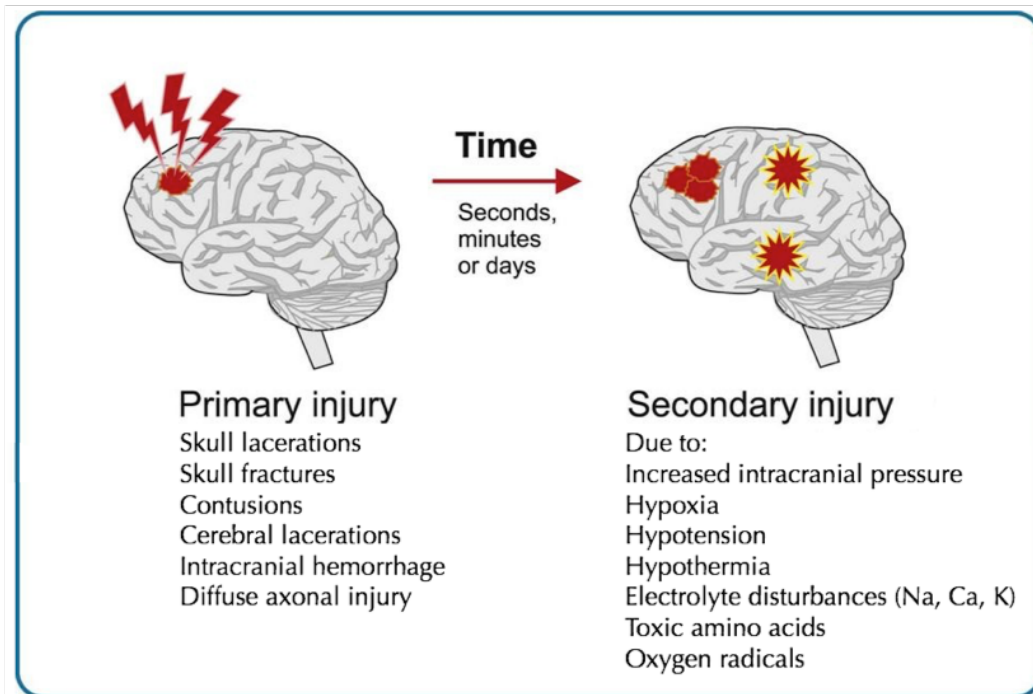
2.6. Travmatik Beyin Hasarının Mekanizması

TBH'ye neden olan mekanizmalar hasarın boyutu ve tipini belirler. Travma, kabaca künt (açık/kapalı) ve penetran olmak üzere ikiye ayrılabilir. Kuvvetin doğası, yaralanmanın tipi, darbenin büyüklüğü ve süresi önemlidir. TBH'lerde, genellikle birden fazla mekanizmayla hasar ortaya çıkmaktadır [39] .

Kafa travması sonrası prognoz 2 ayrı mekanizma tarafından belirlenmektedir. Travma esnasında gelişen hasar primer hasar olarak bilinmektedir. Travma esnasında başlayan ve geç dönem nörolojik disfonksiyonlarına sebep olan hasar ise ikincil hasar olarak bilinmektedir. Bu fazda hasta hipoksi, hipotansiyon, beyin ödemi ve artmış kafa içi basıncının etkileri sonucu ortaya çıkan ikincil hasarla karşı karşıya gelir [68] .



Şekil 2.4. TBH'nin patofizyolojisi [69]



Şekil 2.5. TBH'de primer ve sekonder hasar [69]

2.6.1. Primer (Birincil) Hasar

Primer beyin hasarı travma esnasında oluşur. En sık sebep olan mekanizmalar; doğrudan darbe, ani akselerasyon deselerasyon, delici ve patlayıcı yaralanmadır. Bu mekanizmalar heterojen olsa da dış kuvvetlerin etkisiyle kafa içi yaralanmaya neden olmaktadır. Hasar, kontüzyon ve hematomlar ve diffüz aksonal hasar ile serebral ödem ve şişme ile sonuçlanır [31] .

Kontüzyonlar, en sık karşılaşılan lezyonlardır. Kontüzyonlar, özellikle akselerasyon deselerasyon mekanizmasıyla oluşur ve frontal ve temporal bölgelerde sık görülür.

Diffüz aksonal hasar, beyaz cevher yollarında çoklu küçük lezyonlar şeklinde görülür. Ağır diffüz aksonal hasar durumunda hastalar tipik olarak kafa içi basınç artmaksızın koma durumunda olur ve çoğunlukla prognoz kötü seyretmektedir.

Ekstraaksiyal hematomlar ise genellikle yüzeysel serebral katmanları ilgilendirir; subdural, epidural ve subaraknoid kanama (SAK). Epidural hematomlar (EDH) hemen her zaman kafatası kırığına bağlı orta meningeal arter yaralanmasına sekonder ortaya çıkar ve çoğunlukla bikonveks şeklidir [32] .

Subdural hematomlar (SDH), kortikal yüzeylelerden geçen dural venöz sinüslere açılan köprü venlerin yaralanmasına sekonder ortaya çıkar. Bu kanamalar yarım ay şekillidir [36] .

Subaraknoid kanama (SAK), küçük pial damarların yaralanması sonucu oluşur ve sıklıkla sylvian fissür ile interpedinküler sistemlerde görülür [27, 70] .

2.6.2. Sekonder (İkincil) Hasar

Birincil hasarın sonuçlanmasıyla etkisi saatler, günler hatta aylar süren karmaşık biyokimyasal, fizyolojik olayları içeren ve travma sonrası nörolojik fonksiyon kayıplarına önemli ölçüde neden olan ikincil hasar süreci başlar [71] .

TBH sonrası öncelikle doku hasarı, beyin kan akımında ve metabolizmasında bozulma görülür. Gelişen iskeminin sonucunda anaerobik glikolizin devreye girmesiyle birlikte dokuda laktat birikir, hücre zarı geçirgenliği bozulur ve ödem meydana gelir. Anaerobik metabolizma devreye girdiği için mevcut ATP depoları tüketilir ve enerji bağımlı iyon pompaları çalışmaz. Patofizyolojik kaskadın ikinci aşaması ise eksitatuvar nörotransmitterlerde (ör: glutamat,

aspartat) aşırı salınım, N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin ve voltaj bağımlı kalsiyum ve sodyum kanallarının aktivasyonu sonucu ortaya çıkan terminal membran depolarizasyonu ile karakterizedir.

Katabolik süreç tetiklenir. Kalsiyum, lipid peroksidaz, proteaz ve fosfolipazları aktive eder ve serbest yağ asitleri ile hücre içi serbest oksijen radikali artışı görülür. Buna ek olarak kaspazların, translokazların ve endonükleazların aktivasyonu hücre membranında ve nükleozomal DNA’larda DNA fragmantasyonu ve DNA tamir mekanizmalarında bozulmalar gibi yapısal değişikliklere neden olur. Bu mekanizmalara bağlı olarak damar ve hücre yapılarında bozulmayla birlikte nekrotik veya programlanmış hücre ölümü (apoptoz) ortaya çıkar [72, 73] .

Tablo 2.6. Sekonder beyin hasarından sorumlu olaylar

Sistemik	İntrakraniyal
Hipoksemi	Hematom (ekstradural, subdural, intraparenkimal)
Arteriyel hipotansiyon	Beyin ödemi
Hiperkapni	İntrakraniyal hipertansiyon
Şiddetli hipokapni	Serebral vazospasm
Ateş	İntrakraniyel enfeksiyon
Hiponatremi	Epilepsi / nöbet
Anemi	Serebral iskemi
Dissemine intravasküler koagülopati	Hematomun genişlemesi, yeni hematomlar

2.7. Travmatik Beyin Hasarının Spesifik Patofizyolojisi

2.7.1. Serebral Kan Akımı

Daha önce yapılan çalışmalarla, travmadan sonra gelişen sistemik hipotansiyon ile kötü prognoz arasındaki ilişki ortaya konmuştur. Hipotansiyon ataklarının sayısı ve süresi ne kadar artarsa, mortalite ve morbidite o kadar artmaktadır [74].

Serebral iskeminin mevcut olduğu zaman, toplam iskemik alan beyin hacminin %10'undan az bile olsa, ölüm veya vejetatif durum gibi kötü nörolojik sonuçlarla ilişkilidir [72].

TBH ve iskemik serebrovasküler olayın (SVO) patofizyolojisi benzerlikler gösterse de ikisi arasında majör farklılıklar bulunmaktadır. TBH'li hastalarda doku hasarına neden olan serebral kan akımı (SKA) değeri 15 ml/100g/dk iken iskemik inmede 5-8.5 ml/100g/dk'dır. Serebral iskemi daha çok metabolik stres ve iyonik değişikliklere neden olurken, kafa travması ek olarak beyin dokusunda nöronlar, astrositler, mikroglialar ve serebral mikrovasküler ve endotelial düzeylerde hasarlanmaya neden olur [72].

Serebral kan akımı travmatik beyin hasarını takip eden günlerde belirgin değişiklik gösterir. TBH'a yanıt vakadan vakaya farklılık gösterse de temel olarak tanımlanmış 3 farklı hemodinamik dönem bulunmaktadır [75].

2.7.1.1. Hipoperfüzyon Fazı (Faz 1, ilk gün)

TBH'yi takip eden ilk 24 saat serebral hipoperfüzyon ile karakterizedir. Her ne kadar SKA azalsa da transkraniyal doppler ile bakılan orta serebral arter kan akımı hızı, arteriovenöz oksijen farkı, oksijen içeriği ve arterio-jugular fark normaldir. Hipoperfüzyon fazı esnasında oksijenin serebral metabolik hızı (SMHO₂), normalin yaklaşık %50'sidir. Azalan kan akımından patolojik mikrosirkülatur direncin sorumlu olduğu düşünülmektedir. AVFO₂'nin (arteriovenöz oksijen farkı) normal olması, bu fazda serebral kan akımı ile serebral metabolizma hızının dengede olduğunu göstermektedir [76].

2.7.1.2. Hiperperfüzyon Fazı (Faz 2, 1-3 gün arası)

Birinci günden sonra serebral kan akımı artar. AVFO₂ 'de düşüş ve juguler bulbus oksijen saturasyonunda artma görülür. Motor skorda düşüş başlar. Bu fazda rölatif kan akımı gereksinime bağlı olarak hem rölatif hiperemi, hem de serebral kan akımı normal değerin üzerinde olduğu için kesin hiperemi vardır. Orta serebral arter kan akım hızı artar.

2.7.1.3. Vazospazm Fazı (Faz 3, 4-15 gün arası)

Travma sonrası serebral vazospazm, hastanın nihai prognozunu belirleyen önemli bir faktördür. Travma sonrası vazospazm ile hipoperfüzyonun zamansal profili ve kapsamı, anevrizmal subaraknoidal kanamadan sonra meydana gelen vazospazmdan farklıdır. Post travmatik vazospazm 2-15 günler arasında ortaya çıkabilir ve hastaların %50 sinde hipoperfüzyon görülmektedir.

Azaltılmış potasyum kanal aktivitesine bağlı kronik vasküler düz kas depolarizasyonu, nitrik oksitte azalmaya bağlı endotelin salgısı, vasküler düz kasta siklik GMP tükenmesi, prostaglandin kaynaklı vazokonstriksiyonun kuvvetlendirilmesi ve serbest radikal oluşumu, vazospazmın mekanizmaları olarak düşünülmektedir [72].

2.7.2. Serebrovasküler Otoregülasyon ve CO₂ Reaktivitesi

Yeterli serebral kan akımı (SKA) sağlamak için iki mekanizma bulunmaktadır; serebrovasküler otoregülasyon ve vasküler reaktivite (CO₂-reaktivitesi). TBH'de, bu mekanizmaların bozulduğu duruma sekonder beyin hasarının riski artmaktadır. Serebral perfüzyon basıncı 50-150 mmHg seyrettiği halde SKA sabit seyretmektedir [72] .

Travmatik beyin hasarı sonrası SKA otoregülasyon mekanizması serebral perfüzyon basıncını arttırmak veya azaltmak için vasküler yapılarda daralma veya genişleme mekanizmaları sağlamaktadır. Bu mekanizmalar TBH sonrasında bozulur ve bu hatalı serebral kan akımı otoregülasyonu travmadan hemen sonra veya zaman içerisinde gelişebilir ve travmanın şiddetinden bağımsız olarak geçici veya kalıcı olabilir. Otoregülatuar vazokonstriksiyon,

vazodilasyona göre tedaviye daha dirençlidir ve bu nedenle düşük serebral perfüzyon basıncına bağlı hasarlar daha sık görülmektedir [77] .

Şiddetli beyin travmalı ve prognozu kötü olan hastalarda CO₂ reaktivitesi travma sonrası erken dönemde bozulmuş iken, hiperemik durumlarda çoğu kez artmıştır ki bu durum intrakranial basınç tedavisinde alternatif oluşturmaktadır [78] .

2.7.3. Serebral Vazospazm

Serebral vazospazm travmanın bir sonucu olup morbidite ve mortaliteyi önemli ölçüde etkilemektedir. Vakaların 1/3'ünde görülür ve şiddetli parankimal harabiyete sebep olur. Travma sonrası vazospazm ile hipoperfüzyonun zamansal profili ve kapsamı, anevrizmal subaraknoidal kanamadan sonra meydana gelen vazospazmdan farklıdır. Post travmatik vazospazm 2-15 günler arasında ortaya çıkabilir ve hastaların %50 sinde hipoperfüzyon görülmektedir [73] .

2.7.4. Serebral Oksijenizasyon

Travmatik beyin hasarı sonrası serebral perfüzyon ve oksijenizasyonun bozulması hipoksiye sebep olur ve bu süreç uzun sürerse sonuç geri dönüşü olmayan enfarktör [79] . TBH'li hastalarda beyin dokusu oksijen basıncı (PtO₂) kritik düzeyi 15-10 mmHg olup daha altındaki değerlerde nöral doku enfarktör oluşur. Bu nedenle beynin optimal oksijenizasyonunun devamını sağlamak kritik önem taşımaktadır [80] .

2.7.5. Serebral Metabolik Disfonksiyon

Glukoz beynin kullanabildiği en önemli enerji kaynağıdır. Beyin tüm vücut glukozunun yaklaşık %25'ini kullanır. ATP olarak oluşturulan bu enerji oksidatif fosforilasyon olarak bilinir ve gerçekleşmesi için glukoz, oksijen ve serebral perfüzyon basıncının dengede olması gerekmektedir. Arteriyel kandaki oksijen düzeyinin düşmesi veya serebral kan akımının azalması

gibi durumlarda oksidatif metabolizma yerine beyinde anaerobik glikoliz ortaya çıkar. Anaerobik glikoliz esnasında ortaya çıkan laktat nedeniyle fizyolojik pH bozulur ve asidoza bağlı vazodilatasyon meydana gelir. Bu mekanizma ile serebral kan akımı arttırılmaya çalışılır. Her ne kadar başlangıçta faydalı gibi görülsede uzun dönemde bu mekanizma beynin aleyhine çalışmaya başlar [81] .

2.7.6. Serebral Ödem

Travmatik beyin hasarının ardından beyin ödemi sık görülen bir durumdur. Sitotoksik ödem, astrositlerin ve mikrogliaların intrasellüler kompartmanlarında su birikimi ile karakterizedir. Sitotoksik ödem, iyonlar için artan hücre zarı geçirgenliği, enerji azlığına bağlı iyonik pompa arızası ve osmotik olarak aktif çözünen maddelerin hücreye geri alımı sonucu meydana gelir[82]. Vazojenik beyin ödemi, beyin damarlarının endotelial hücre tabakasının mekanik, otoimmün veya fonksiyonel olarak bozulmasıyla karakterizedir. Serebral vasküler endotelial duvarın bütünlüğünün bozulması intravasküler kompartmandan ekstrasellüler kompartmana kontrolsüz iyon ve protein transferine neden olur ve su birikimi ile sonuçlanır [83] . TBH sonrası hastalarda sitotoksik ödem vazojenik ödeme göre daha sık görülmektedir [83] .

2.7.7. Nekroz ve Apoptoz

TBH sonrasında iki farklı hücre ölümü görülür; nekroz ve apoptoz (programlanmış hücre ölümü). Nekroz, mekanik veya iskemik/hipoksik doku hasarı ile aşırı artmış nörotransmitterler ve metabolik disfonksiyon durumuna sekonder meydana gelir. Sonrasında fosfolipazlar, proteazlar ve lipid peroksidazlar biyolojik zarları otolize uğratar. Ortaya çıkan hücre kalıntıları antijen olarak tanınır, inflamatuvar süreçlerle ortadan kaldırılır ve geriye skar dokusu kalır. Ancak apoptoza giden nöronlar, travma sonrasında morfolojik olarak intakt olup fizyolojik membran potansiyeli oluşturabilecek yeterli ATP üretimine sahiptirler. Apoptoz primer hasardan saatler veya günler sonra belirginleşir. Hücre içinde oluşan apoptotik cisimcikler şişen hücrelerden ekzositoz ile uzaklaştırılır. Apoptozun doğası genellikle enerji desteği ve doğal olarak meydana gelen pro- ve antiapoptotik proteinler arasındaki dengesizliği gerektirir. Kaspazların ardışık aktivasyonu ve deaktivasyonu programlanmış hücre ölümünün en önemli mediatörleridir [84, 85]

2.7.8. İnflamasyon

TBH, iskemi-reperfüzyon hasarına benzerlik gösteren karmaşık bir dizi immünolojik ve inflamatuvar doku yanıtını indükler. Hem birincil hem de ikincil hasar, proinflamatuvar sitokinler, prostaglandinler ve serbest radikallerin salınmasını aktive eder [86, 87].

Tümör nekroz faktörü, interlökin-1 β ve interlökin-6 gibi proinflamatuvar enzimler, yaralanmadan sonraki saatler içinde artış gösterir. Doku hasarının ilerlemesi ile birlikte nörotoksik mediatörler doğrudan salınır veya indirekt olarak nitrik oksit ve sitokinlerin salınımını artırır. Vazokonstriktörlerin (prostaglandinler ve lökotrienler) artışına ek olarak, lökositlerin ve trombositlerin adhezyonu, kan-beyin bariyerin bozulması ve ödem oluşumu ikincil beyin hasarını daha da arttırır [72]

2.7.9. İntrakranial Basınç (İKB) Artışı

İntrakranial basınç artışı primer travmaya bağlı olabileceği gibi ikincil hasar sonrasında da meydana gelebilir. Yatar pozisyonda normal sağlıklı bir erişkinde İKB 7-15 mmHg aralığındadır. Ortalama 10 mmHg civarındadır ve nadir olarak 10 mmHg'yi geçer [88, 89].

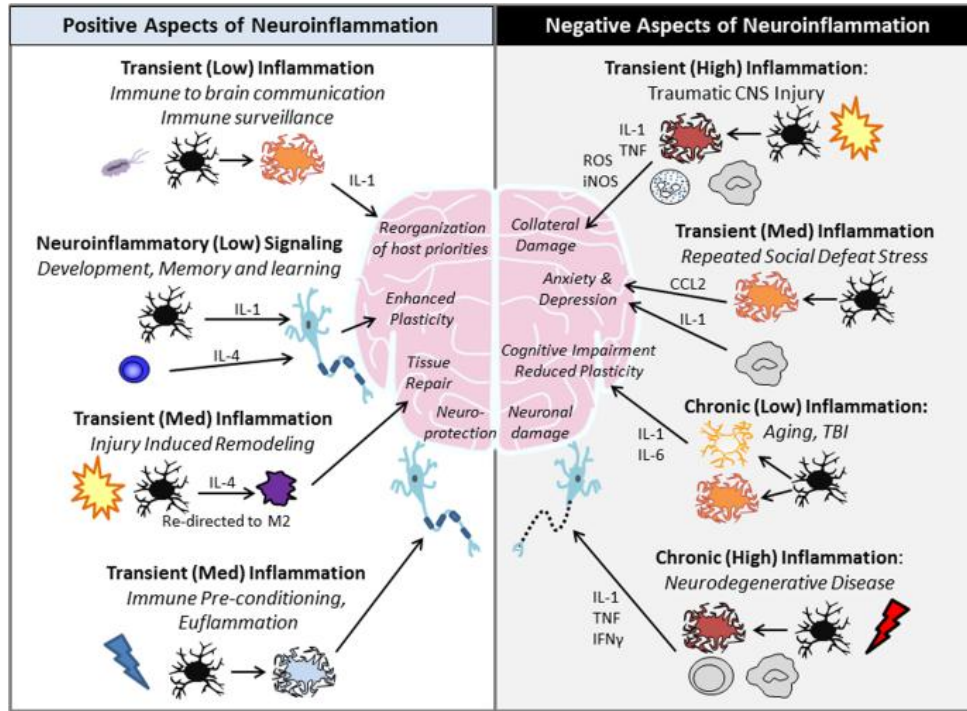
SPB = OAB – İKB (serebral perfüzyon basıncı = ortalama arteriyel basınç – intrakranial basınç) formüle göre, kafa içi basıncı artışı sonrası serebral perfüzyon basıncı azaldığı için serebral iskemi ortaya çıkar. Kafa içi basınç artışı serebral iskemiyle beraber herniasyonlara da sebep olur. Beyin dokusunun elastik yapısı ve kafatasının rijit yapısından dolayı beyin, kafa içi oluşumlardaki hacim değişikliklerini belirli bir seviyeye kadar tolere edebilir [90] .

İKB artışı olduğu zaman, hangi noktada tedavinin başlatılması konusunda kesin doğrular olmamakla birlikte, 20 mmHg'yi aşan durumlarda tedaviye başlanması gerektiği düşünülmektedir. Yeterli serebral perfüzyonun korunması çok önemli bir noktadır.

Yapılan çalışmalara göre göre İKB artışının 20-25 mmHg civarında seyretmesi travmatik beyin yaralanmasında daha kötü bir prognozla sonuçlanmaktadır [91-94] .

2.8. Nöroinflamasyon

Nöroinflamasyon, beyin veya omurilikte inflamatuvar bir cevap olarak tanımlanır. Bu iltihaplanma, sitokinler, kemokinler, reaktif oksijen türleri üretimi ile gerçekleşir. Bu mediatörler, glia (mikroglia ve astrositler), endotel hücreleri ve periferik bağışıklık hücreleri tarafından üretilmektedir. İnflamasyon, immün hücrelerinin toplanmasına, ödem, doku hasarı ve potansiyel olarak hücre ölümüne yol açabilir [95].



Şekil 2.6. İnflamasyonun olumlu ve olumsuz etkileri [96]

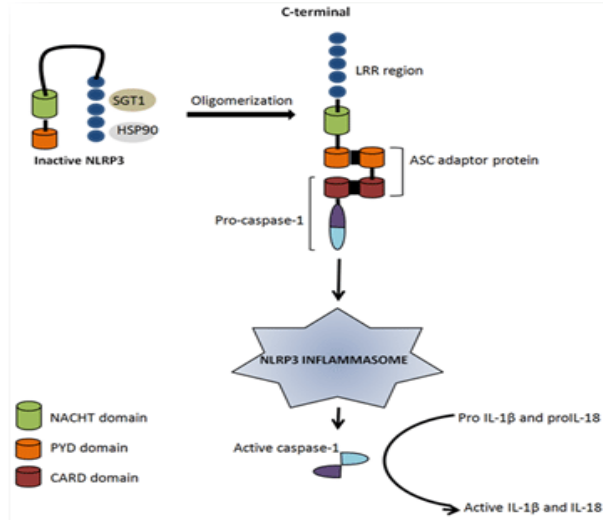
2.8.1. İnflamasyon Tanımı

İnflamasyonlar ilk kez *Martinon ve ark.* tarafından tanımlanmış olup inflamasyonun mekanizmasında ve ilişkili hastalık paternlerinde oynadığı rolle büyük ilgi çekmiştir. *Pattern tanıma reseptörleri* (PRR'ler), *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) ve *damage-associated molecular patterns*'lerin (DAMP) tanıtılması yoluyla immün yanıtta önemli bir rol oynar. Bunlar öncelikle beyindeki glial hücreler, makrofajlar ve oligodendrositler tarafından

eksprese edilir. İnflamazom; NLRP1, NLRP3, NLRC4, NLRP6, NLRP7, NLRP12 ve NLR olmayan inflamazom reseptörü olarak bilinmektedir [97] .

Bu NLRP'ler, *apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activating recruitment domain [CARD]* ve efektör molekülü bir sistein proteaz olan prokaspaz-1 ile inflamazom adı verilen multiprotein kompleksi oluşturur. NLRP, *C-terminal leucine-rich repeat (LRR)* domain, santral yerleşimli *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD or NACHT)* ve *N-terminal pyrin-only domain (PYD)*'den oluşur. LRR parçası, PAMPs ve diğer ligandları tanır, NLRP'nin inaktif halde kalmasını sağlar ve protein- protein etkileşimlerine aracılık eder. NACHT parçası, ATPaz aktivitesi ile proteinin kendi kendine oligomerize olmasını, PYD ise NLRP ile ASC adaptör proteini arasında protein-protein homotipik etkileşimi sağlar [98] .

İnflamazomların aktive olması, inaktif olan prokaspaz-1'i, proteolitik etkisi olan aktif form kaspaz-1'e çevirir. Aktif kaspaz-1 immatür formlar olan prointerlökin-1 β (IL-1 β) ve 18(IL-18)'in matür formlarının oluşumunu sağlar. IL-1 β ve IL-18'in ise makrofaj, mikroglia ve astrosit gibi nöroinflamatuvar hücre proliferasyonuna neden olduğu bilinmektedir [99] .

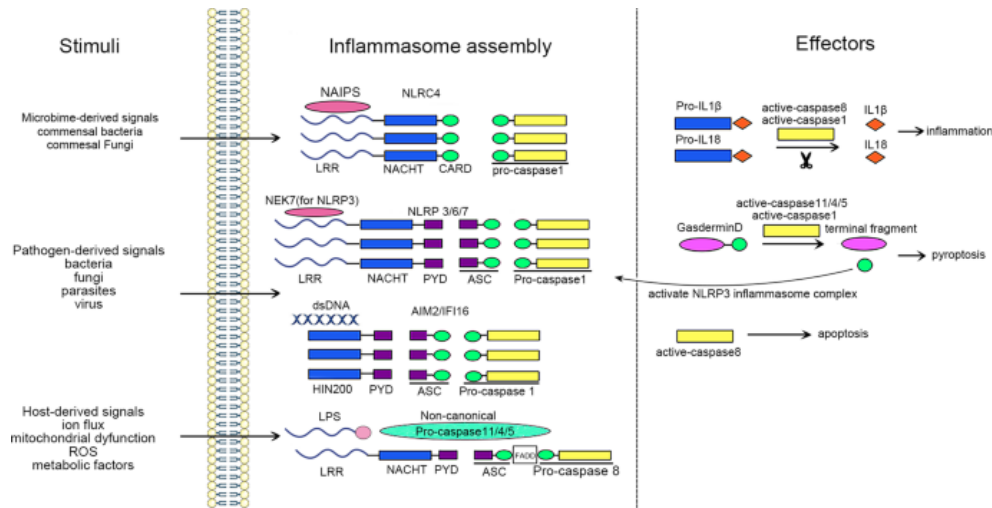


Şekil 2.7. İnflamazom aktivasyonunun nöroinflamasyon üzerine etkileri [100]

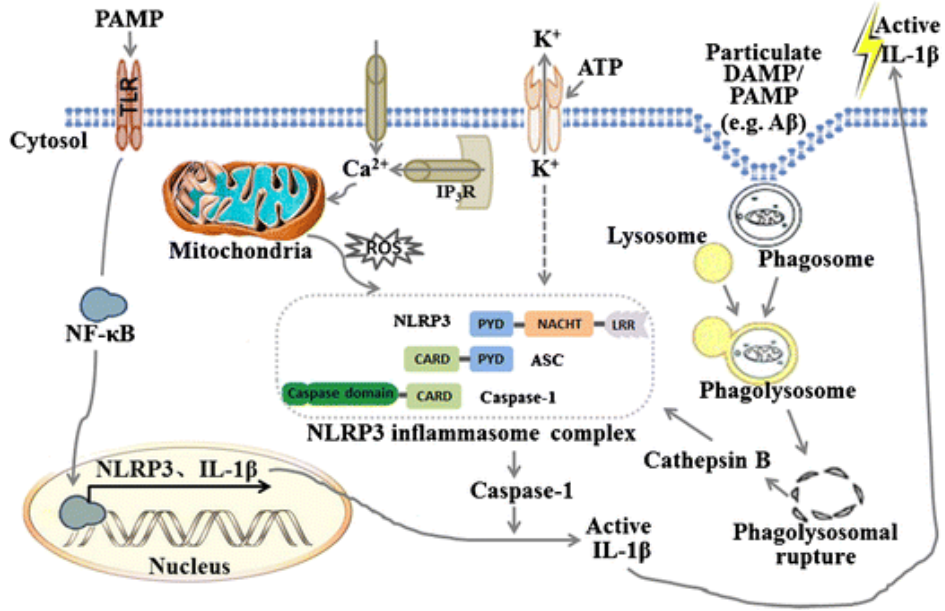
2.8.2. İnflamazom Aktivasyonu ve Regülasyonu

İnflamomomların en göze çarpan fonksiyonlarından biri, hücre içinde karşılaşılan çeşitli endojen veya ekzojen, steril veya enfeksiyöz uyarınları tespit etmek ve algılamak ve hücrel cevapları ve efektör mekanizmaları indüklemektir. İnflamazomlar, bakteriler, mantarlar, parazitler, virüsler, mitokondriyal disfonksiyon ve metabolik faktörler dahil olmak üzere çok sayıda enfeksiyöz ve steril uyarıcı sinyalleri aktive edebilir [101] .

Başlatıcı sinyal, NF-kappaB sinyal yolağının aktivasyonu ve nükleer translokasyonu ile transkripsiyonel olarak NLRP3 ve pro IL-1 β ekspresyonunu da artırır. Ardından PAMPs, agreg olmuş ve yanlış katlanmış proteinler, ATP ve kristalin gibi endojen ve ekzojen NLRP3 aktive edici ajanlar inflamazom kompleks oluşumunu desteklemektedir [102] .



Şekil 2.8. İnflamazomun işlevi [100]



Şekil 2.9. NLRP3 inflamazom işlev mekanizması[103]

2.8.3. İnflamazom Aktivasyonunun Nöroinflamasyon Üzerine Etkileri

NLRP3/kaspaz-1/IL-1 aksı, SSS'nde bulunan doğal bağışıklık sisteminde kritik öneme sahip bir sinyal yolağıdır. SSS enfeksiyonu, travmatik beyin hasarı ve nörodejeneratif hastalıklarda hastaların beyin-omurilik sıvısında (BOS), beyin dokusunda ve plazmalarında yüksek düzeyde IL-1 β ve IL-18 saptanmıştır. IL-1 β ve IL-18'in mikroglia, astrosit, nöron ve endotelial hücrelerde bulunan reseptörlerine bağlanması çok sayıda inflamasyonla ilişkili genlerin ekspresyonu ile sonuçlanır [104].

IL-18 esas olarak yardımcı T hücre (TH) aracılı immün yanıtı stimüle eder. Mikroglialardaki sinyal yollarını aktive ederek kaspaz-1 ekspresyonunu ve matris metalloproteinaz (MMP) ve proinflamatuvar sitokin üretimini artırır. Ek olarak glial hücrelerde Fas ligand ekspresyonunu artırarak Fas aracılı nöronal hücre ölümünü şiddetini artırır [105].

IL-1 β ise inflamatuvar reaksiyonların başlamasında ve devam etmesinde majör rol oynamaktadır. Kan beyin bariyerindeki (KBB) devamlılığı modüle ederek periferik dolaşımdaki bağışıklık sistemi hücrelerinin SSS'ye infiltrasyonunu sağlar. Aynı zamanda astrosit, mikroglia ve T

hücrelerini aktive eder ve IL-6 ve TNF- α gibi diğer proinflamatuvar mediatörlerin salınımının sağlanmasında sorumludur [106, 107] .

Travma sonrası, DAMPs ekstraselüler mesafeye salınır ve SSS'deki hücrelerde bulunan patern tanıma reseptörleri (PRPs) ve sitokin reseptörleri tarafından tanınır. Böylece sitokin ve kemokin üretimi ve sonrasında hasarlı bölgeye immün sistem hücrelerinin göçü ile sonuçlanır. Travmaya inflamatuvar yanıtta beyne sistemik dolaşımdan gelen ilk immün hücreler nötrofillerdir. Saatler içinde ilk olarak subaraknoid mesafede ve vasküler boşluklarda görülürler ve travma sonrası ilk 24 saatte beyin parankimine infiltre olurlar. 3.-5. günlerde sayıca azalarak yerlerini diğer periferik immün sistem hücrelerine ve mikroglia ve astrositlere bırakırlar. 3.-5. günler arasında esas görev alan hücreler monositler olmasına rağmen ilerleyen günlerde hasarlı bölgede T lenfositler, doğal öldürücü (NK) ve dendritik hücreler görülmeye başlar [108].

IL-1, potent proinflamatuvar bir sitokindir ve aşırı üretimi nöroinflamasyon ve nörodejenerasyonla sonuçlanır. IL-1 α 'nın aksine IL-1 β biyolojik inaktif formda bulunur ve aktive olmasında inflamazom protein komplekslerinde bulunan kaspaz-1'in aktifleşmesi esas rol oynar. Travma sonrası nöroinflamasyonda IL-1 β erken dönemde ilk artan mediatördür, kan beyin bariyeri geçirgenliğini artırır, glial hücreleri aktive eder ve immün sistem hücrelerinin hasarlı bölgeye migre olmasını sağlar. Yapılan çalışmalarda IL-1 β 'nin nötralize edilmesiyle özellikle travma sonrası ilk 7 günde nötrofil, makrofaj/mikroglia ve T lenfosit sayısında azalma olduğu gösterilmiştir. TBH sonrası IL-1 üretiminde major rol oynayan inflamazomlar (NLRP1, NLRP2, NLRP3 ve AIM2), mikroglialarda, nöronlarda ve astrositlerde eksprese olur. Son yapılan TBH çalışmaları, inflamazom ve komponentlerinin travma sonrası ilk 24 saatte arttığını ve 7 güne kadar bu artışın devam ettiğini göstermektedir. IL-1 β piki ise travma sonrası yaklaşık 6. saatte olmaktadır ve IL-18'e göre daha hızlı düşerek 7. güne kadar devam etmektedir [109, 110]

2.8.4. Nörolojik Hastalıklarda İnflamazomlar

2.8.4.1. Multiple Skleroz (MS)

Multiple skleroz, demyelinizan, nöroinflamatuvar ve heterojen patolojiye sahip olan bir hastalıktır. *Relapsing-remitting* ve *progresif* (primer veya sekonder) olmak üzere 2 temel formu vardır. Etiyolojisi belirsiz olmasına rağmen klinik çalışmalar kaspaz-1, IL-1 β ve IL-18

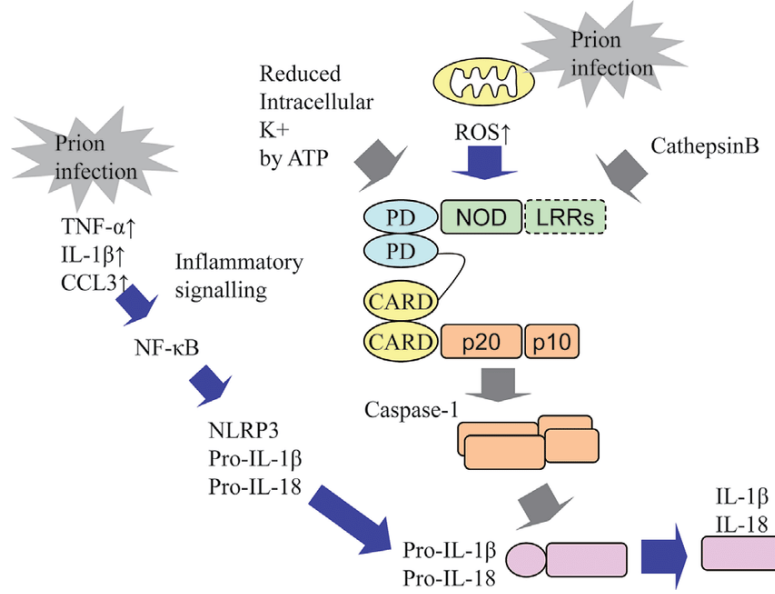
ekspresyonunda artışın hastalığın ciddiyeti ve progresyonu ile ilişkili olabileceğini göstermiştir. Patofizyolojisinde kan beyin bariyerinde bozulma, demyelinizasyon, oligodendroglia ve nöronlarda defekt olduğu bilinmektedir [6]. İnflamasyonların demyelinizan hastalıklardaki etkilerini açıklayan çalışmalar vardır. Örneğin MS tedavisinde etkileyici bir ilaç olarak kullanılan IFN β 'nın etkisini NLRP1 ve 3 inflamazomlarını ve sonuç olarak IL-1 β üretimini inhibe ederek gösterdiği düşünülmektedir [111-113] .

2.8.4.2. Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS)

Yanlış katlanmış protein agregatlarının oluşumuna sebep olan süperoksit dismutaz 1 (SOD1) mutasyonu, ALS patogenezinde önemli role sahiptir [114] . *Transactive response DNA-binding protein-43 (TDP-43)* , mikroglialardaki NLRP3 inflamazom aktivasyonunu tetikleyerek motor nöronda hasara neden olan proinflamatuvar sitokin salınımına yol açar [115] . NLRP3, IL-1 β , IL-18 ve aktif kaspaz-1'in yüksek olduğu ALS'li hastalarda bilinmektedir [116] .

2.8.4.3. Prion Hastalığı

Hücrel prion proteininin (PrP^c), patolojik izoform olan PrP^{sc}'ye dönüştürülmesi, prion hastalığının patolojisi olarak bilinmektedir [117]. PrP^{sc}, mikroglia ve astrositlerin aktivasyonuna yol açar, bu da pro-inflamatuvar sitokinlerin ve nörotoksik faktörlerin salınımına neden olur. PrP^c mikroglialarda NLRP3'ün aktivasyonuna neden olur ve IL-1 β 'nın üretimini artırır [118] .



Şekil 2.10. Prion hastalığında inflamazom aktivasyonu[103]

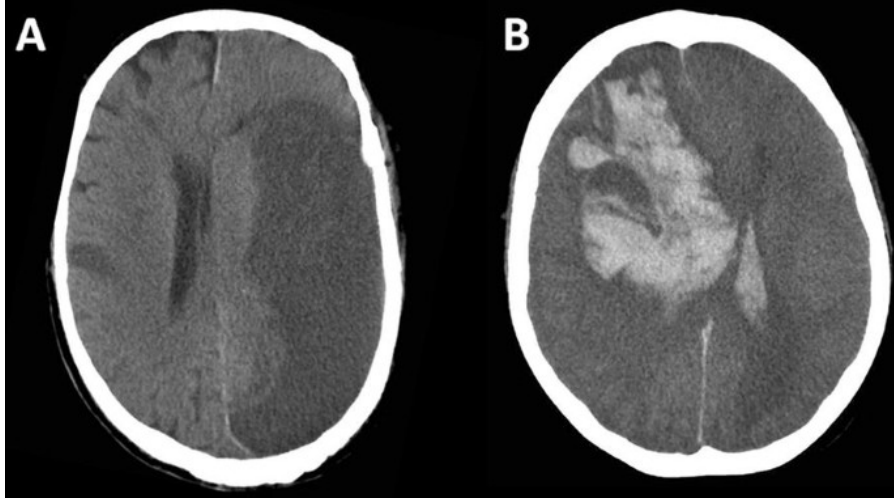
2.8.4.4. İskemik SVO

Deneysel iskemik SVO modellerinde NLRP3 artışıyla birlikte yüksek IL-1β ve IL-18 düzeyleri ve nöronal ve glial hücre ölümü görülmektedir. Yapılan çalışmalarda NLRP3 aktivasyonuna yönelik yapılan müdahalelerde, enfarkt hacminde ve nörovasküler hasarda azalma gösterilmiştir [119].

2.8.4.5. Hemorajik SVO

Tüm inmeler içinde en yüksek mortaliteye sahip serebrovasküler hastalık subaraknoid kanamadır. SAK gelişiminde nöroinflamasyonun izlendiği erken beyin hasarı önemli bir rol oynamaktadır. Hayvan SAK modellerinde NLRP3 inflamazom aktivasyonu gösterilmiştir [120].

İntraserebral hemoraji oluşturulmuş hayvan modelinde NLRP3 ekspresyonunda artış tespit edilmiştir. NLRP3'ün inhibisyonu ile, nöroinflamasyonda azalma ve nörolojik fonksiyonlarda iyileşme gösterilmiştir [121].



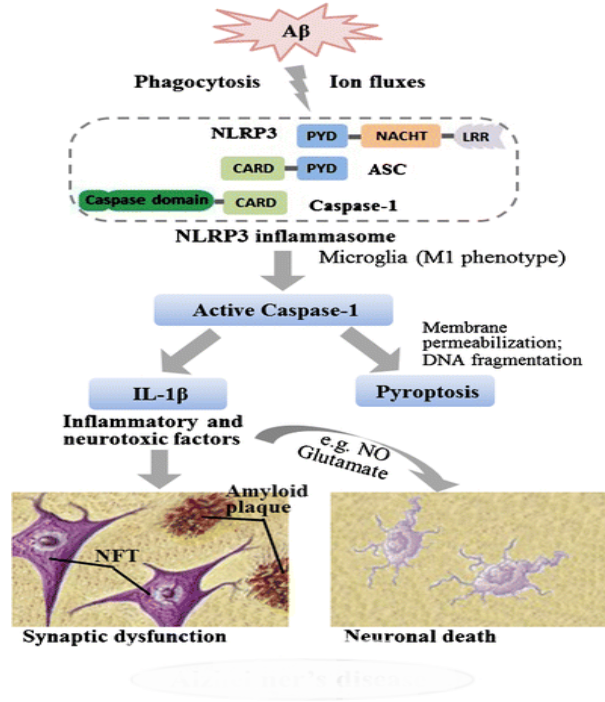
Şekil 2.11. İskemik SVO (A), hemorajik SVO

2.8.4.6. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı, demansın en sık görüldüğü formudur. Bu hastalık amyloid β ($A\beta$) plaklarının ekstraselüler matrikste, hiperfosforile *Tau* proteinlerinin ve nörofibriler yumakların ise intraselüler alanda birikimi ile karakterizedir [122].

$A\beta$ konsantrasyonunun eşik düzeyin üzerine çıkması, $A\beta$ oligomerlerinin oluşumu ve depolanması ile senil plak oluşumuna neden olur. Bu aşamada akümüle olmuş $A\beta$ 'nın oligomerik veya fibriler formları DAMP gibi algılanır ve mikrogliaları aktive eder. Doğal immün yanıt ise bu oligomerik veya fibriler yapıdaki $A\beta$ 'nın NLR'ler tarafından tanınması ve aktive olmasıyla uyarılır [123].

$A\beta$ proteinleri mikroglia tarafından fagosite edilince lizozoma girer ve bu daima lizozomun harabiyetine neden olur. Rüptüre lizozomlardan salgılanan katepsin-B, NRLP3'ün aktivasyonunu tetikler. NRLP3 tarafından da kaspaz-1 ve IL-1 β salgılanır [123]. Hayvan modellerinde inflamazom aktivasyonunun inhibisyonu ile nöron ölümünün engellendiği ve böylece kognitif disfonksiyondan korunduğu gösterilmiştir [124].



Şekil 2.12. Alzheimer hastalığında inflamazom aktivasyonu [125]

2.8.4.7. Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı, dopaminerjik nöronların ölümüne neden olan ve böylece hastaların normal hareketlerini bozan nörolojik bir hastalıktır. Parkinson hastalığı nöronların sitoplazmasında alfa-sinüklein proteininin birikmesi ile karakterizedir. NLRP3 bu proteinin agregasyonunu sağlar [126]. Yapılan çalışmalarda, Parkinson hastalığının patojenezinde NLRP3'ün rolü tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada, farelerde NLRP3'ün inhibisyonu ile dopaminerjik nöron kaybı engellenmiştir [127].

2.9. Travmatik Beyin Hasarında İnflamasyon

TBH'den sonra aktifleşen nöroinflamasyon yolağı, mikroglialar tarafından üretilen pro ve antiinflamatuvar sitokinler ve kemokinler tarafından regüle olur [128]. Yaralanmayı takiben mikroglia'nın erken aktivasyon profili ile uyumlu olarak, saatler içerisinde proinflamatuvar IL-1β'de hızlı bir yükselme izlenmiştir. IL-1β'nin zararlı etkilerine, mikroglia ve nöronlar üzerinde eksprese edilen interlökin 1 reseptör tip 1 (IL-1RI) aracılık eder. Deneysel TBI modellerinde, IL-

1 β 'nin inhibe edilmesi, nöroprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir [129]. IL-1 β 'nin güçlü nörotoksik etkilerinin, TNF- α varlığında sinerjistik olarak arttığı izlenmiştir.

TBH'li hastaların serum ve beyin omurilik sıvısında, travmadan 1 saat sonra TNF- α 'nın seviyesi yükselmeye başlar, 3-8 saat sonra pik yapar ve 24 saat sonra normale döner [130]. Yapılan bir çalışmada, TNF- α fonksiyonunun TBI sonrası akut ve gecikmiş fazda farklılık gösterdiğini farkedilmiştir; Yaralanmadan hemen sonra TNF- α , güçlü bir inflamatuvar mediatör olarak işlev görür, ancak daha sonra nöroproteksiyon ve onarım için gerekli olan nörotrofik bir faktördür [131]. Kazanılmış bağışıklık, patojenlerin antijen spesifik yanıt oluşturarak hücresel veya humoral yolla elimine edilmesidir. B ve T lenfositler tarafından sağlanır. Deneysel travma modellerinde T hücrelerinin beyin parankimini infiltre etmesi bifaziktir: primer hasardan hemen sonra kan beyin bariyerinin bozulması sonucu ve geç dönemde antijen spesifik T hücrelerin infiltrasyonu. TBH sonrası T hücre infiltrasyonu 3-14 gün arasında görülür ve 6 aya kadar devam eder (121). Kazanılmış bağışıklık, inflamatuvar yanıtta T hücre aktivasyonu ile hem patojenik hem de onarıcı süreçlere aracılık eder. Th1 yanıt ile proinflamatuvar olayları ve beyin hasarını agra ve ederken Th2 yanıt antiinflamatuvar ve nörotrofik etkiler ile hasarı hafifletir.

2.9.1. Lökosit

Lökositlerin inflamasyonun başlamasında ve devam etmesinde önemli rolü vardır. Lökosit infiltrasyonunda, artış beyin hasarına, kan beyin bariyerinde bozulmaya ve vazojenik ödem oluşumuna neden olur. Diğer nörolojik hastalıklarda olduğu gibi IL-1 β ve IL-18'in, TBH patogenezi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [132]. Proinflamatuvar etkisi olan IL-1 α ve IL-1 β ve antiinflamatuvar etkisi olan sitokin IL-1 reseptör antagonisti (IL-1ra) IL-1 sitokin'nin 3 komponentidir. IL-1ra, inflamatuvar cevabın regülasyonunda ve proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler arasındaki dengeyi sağlamaktadır. IL-1 α ve IL-1 β , TBH sonrası nörodejenerasyona sebep olan inflamasyonun başlamasından sorumlu iken, IL-1ra'nın ise nöroprotektif etkileri vardır [133].

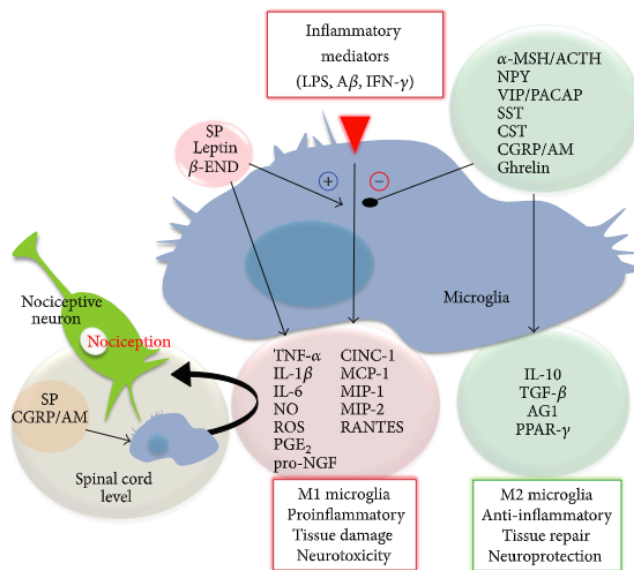
2.9.2. Astrosit

Santral sinir sisteminde birçok temel fonksiyonuna ek olarak, astrositler SSS hasarına astrogliazis adı verilen bir süreçle yanıt verir [134] .

Astrogliazis ve skar oluşumu bazen SSS üzerine zararlı olduğu ve bu nedenle geniş ölçüde inhibe edilmesi gerekli olduğu düşünülmüştür. Fakat bu düşünceye karşı yapılan başka çalışmalarda astrogliazisin yara kapanması, nöronal koruma, kan-beyin bariyerinin onarımı ve SSS inflamasyonunun kısıtlanması gibi faydalı etkeli olduğu ispat edilmiştir [135, 136] .

2.9.3. Mikroglia

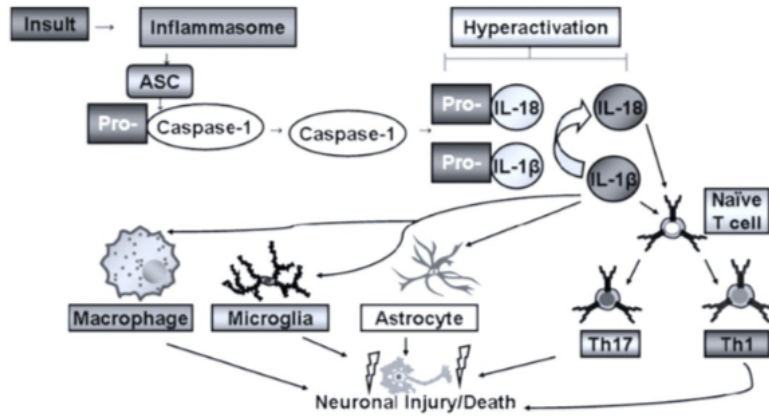
Mikroglialar, santral sinir sistemine ait tolan makrofajlardır. Mikroglialar M1 fenotipi hasarla karşılaştığı zaman, TNF- α , IL-1 β , nitrik oksit, IL-12 ve prostaglandin salgılar. Bunun aksine, M2 fenotipi ise Arjinaz-1 (AG1), IL-10 ve TGF- β gibi antiinflamatuvar mediatörler salınımı ile nöroprotektif etkisi vardır. M2 mikrogliaların aynı zamanda yara iyileşmesini, anjiogenez ve doku onarımından sorumlu olduğu bilinmektedir [137, 138] .



Şekil 2.13. İnflamasyonda mikrogliaların rolü [139]

2.9.4. İnflamazom

İnflamazomun, TBH sonrası gelişen ikincil hasarda önemli rolü vardır [140]. Isı şok proteinleri (HSP), potasyum, ürik asit ve nükleik asitler gibi steril inflamasyonlarda hasarlı hücreler tarafından salınan ve inflamatuvar yanıtı başlatan DAMPs tarafından aktif hale gelirler. DAMPs, sitoplazmanın sitozolünde bulunan NOD-benzeri reseptörler (NLRs) tarafından tanınır. İnflamazomların aktive olmasıyla prokaspaz-1, proteolitik etkisi olan kaspaz-1'e dönüşür. Kaspaz-1 de prointerlökin-1 β ve 18'in matür formlarının üretimini sağlar. NLRP1 ve NLRP3, TBH'de bilinen en önemli inflamazomlardır [141].



Şekil 2.14. TBH'de primer hasar sonrası oluşan nöroinflamasyon kaskadı [6]

2.10. Doksisisiklin

Tetrasiklinin ikinci kuşak türevi olan doksisisiklin, antimikrobiyal etkilerinden bağımsız olarak antiinflamatuvar etkilere de sahiptir. İlk kez 1967 FDA tarafından onaylanmış olup oral, intramuüsküler ve intravenöz formları vardır. Bu ilacın kan-beyin bariyerinden çok iyi geçişi vardır [142, 143].

Gonore, sifiliz, gonokokal üretrit, akut pelvik inflamatuvar hastalık, epididimit, orşit, Lyme hastalığı, üst solunum yolu enfeksiyonu, cilt veya yumuşak doku enfeksiyonları doksisisiklin kullanımı için bilinen endikasyonlardır [144].

Doksisiklin, tetrasiklin'den daha lipofilik olduğu için doku penetrasyonu daha iyidir ve bu nedenle tetrasikline göre daha etkileyici bir antimikrobiyaldir [145] .

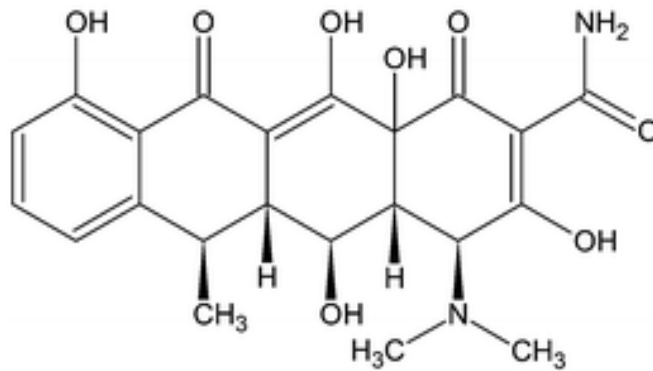
Doksisiklin, gram pozitif ve gram negatif bakteriler, klamidya, mikoplazmalar, riketsiya ve protozoan parazitler dahil olmak üzere çok çeşitli mikroorganizmalara karşı aktif geniş spektrumlu bir antibiyotiktir.

Tetrasiklin ile karşılaştırıldığında, doksisiklin oral olarak kullanıldığında birinci nesil tetrasiklinlerden daha iyi bir farmakokinetik profil göstererek daha uzun yarılanma ömrü ve mükemmel doku penetrasyonuna sahiptir

Son yıllarda doksisiklin üzerine yapılan araştırmalarda, bu ilacın antiinflamatuvar etkileri de ortaya konulmuştur.

Antiinflamatuvar etkileri tam bilinmemekle birlikte, son zamanlarda hücrel strese bağlı salgılan matriks metalloproteinaz-3 ü ve buna bağlı gelişen apoptozu inhibe ettiği, mikroglia da MMP-3 ü (matriks metalloproteinaz-3) azaltmasının da nitrik oksit (NO), TNF alfa, IL-1, IL-6, IL-8 ve siklooksijenaz 2 (COX 2) üzerinde inhibitör etkileri olduğu da ortaya çıkmıştır [146-149].

Yapılan çalışmalarda bu ilacın nörodejeneratif hastalıklarında (Multiple Skleroz, Parkinson hastalığı, Prion hastalığı) nöroprotektif etkisi olduğu ispat edilmiştir [14, 150, 151]. Yapılan bir çalışmada, doksisiklin'in NLRP3 üzerine inhibitör etkiye sahip olduğu farkedilmiştir [152, 153] . Sıçanlar üzerine yapılan bir çalışmada, doksisiklin tarafından orta serebral arter oklüzyonuna bağlı beyin hasarının azaldığı görülmüştür [154] .



Şekil 2.15. Doksisiklinin kimyasal yapısı [155]

Yapılan bir çalışmada, şiddetli COVID-19 hastalığına bağlı hayatını kaybeden hastaların kanında yüksek IL-6 seviyeleri gözlemlenmiştir, bu da ölüm oranının viral kaynaklı hiperinflamasyona ve sitokin fırtınasına bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

Doksisiklin, dang hemorajik ateşi olan hastalarda IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinleri azaltarak ölüm oranı doksisiklin ile tedavi edilen grupta %46 daha düşük bulunmuştur. Bununla birlikte bahsedilen çalışmada COVID-19 tedavisinde doksisiklinin etkili bir ilaç olarak kullanılabileceği düşünülmüştür [156].

Lyme hastalığında doksisiklinin antiinflamatuvar etkisi olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada doksisiklin, IL-6, IL-8 ve TNF'yi suprese ederek TH-1 ve glial hücreler üzerine antiinflamatuvar etkiye sahip olduğu ispat edilmiştir [157]

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları ve Barınma Koşulları

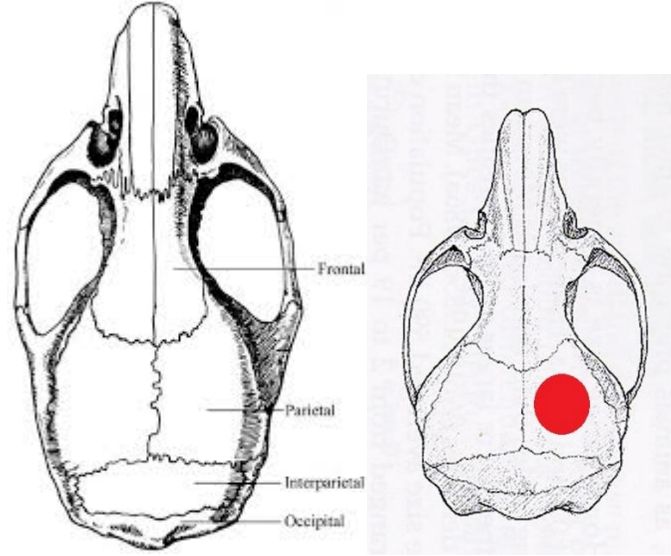
Bu araştırma, Hacettepe Üniversitesi Nörolojik Bilimler ve Deney Hayvanları Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir. Deneylede, ağırlığı 25–35gram arasında olan toplam 20 adet erişkin *Swiss Albino* erkek fare kullanılmıştır. Standart barınak koşullarında, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık döngüsünde, 21-23°C sıcaklıkta, % 30-55 nem oranı ve su ile yiyeceğe sınırsız erişim (*ad libitum*) sağlanmıştır. Fareler üzerinde uygulanan deney protokolü, ulusal ve uluslararası hayvan deneyleri mevzuatına ve kılavuzlarına uygun olup; **Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu** tarafından **30.04.2019** tarih ve **2019/04-02** karar numarası ile onaylanmıştır.

3.2. Deney Grupları ve Protokol

Çalışmada toplam 20 adet fare kullanılmıştır. 4 ayrı grup ve her grupta 5 fare (n=5) olacak şekilde gruplandırma yapılmıştır. 5 denek *sham* grubu, 5 denek kontrol grubu, 5 denek düşük doz (10 mg/kg) ve 5 denek yüksek doz (100 mg/kg) doksisiklin grubu olarak ayrılmıştır. Deneklere

11 cm yükseklikten 75 gr serbest ağırlık düşürülerek kafa travması modeli oluşturulmuştur. Deneklerin gruplara göre dağılımı şu şekildedir:

- **Grup 1: Sham grubu (skalp insizyonu) (n=5):** İzofluran anestezisi verildikten sonra, bu gruptaki farelerin skalpine orta hat insizyonu yapılarak kranium, sağ frontal ve parietal kemikler ve sagittal sütür ekspoze edilmiştir. Ardından 4.0 ipek dikiş ile skalp insizyonları suture edilerek fareler kafeslerine alınmıştır.
- **Grup 2: Kafa travması sonrası kontrol (n=5):** İzofluran anestezisi altında, farelerin skalpine orta hat insizyonu yapılarak kranium, sagittal sütür ve sağ frontal ve parietal kemikler ekspoze edilmiştir. Hayvanlar sırasıyla ağırlık düşürme (travma) düzeneğine yerleştirilerek 11 cm yükseklikten 75 gr ağırlığında silindirik ağırlık sağ parietal kemik üzerine düşürülmüştür. Sedasyon altında 4.0 ipek dikiş ile skalp insizyonları suture edilen fareler kafeslerine alınmıştır. Travmadan 30 dakika sonra farelere intraperitoneal serum fizyolojik enjeksiyonu yapılmıştır.
- **Grup 3: Kafa travması sonrası düşük doz intraperitoneal doksisisiklin (DOX) (10 mg/kg) (n=5):** İzofluran anestezisi altında, farelerin skalpine orta hat insizyonu yapılarak kranium, sagittal sütür ve sağ frontal ve parietal kemikler ekspoze edilmiştir. Hayvanlar sırasıyla ağırlık düşürme (travma) düzeneğine yerleştirilerek 11 cm yükseklikten 75 gr ağırlığında silindirik ağırlık sağ parietal kemik üzerine düşürülmüştür. Sedasyon altında 4.0 ipek dikiş ile skalp insizyonları suture edilen fareler kafeslerine alınmıştır. Travmadan 30 dakika sonra farelere 8 saat arayla 48 saat boyunca (6 kez) intraperitoneal 10 mg/kg DOX enjeksiyonu yapılmıştır.
- **Grup 3: Kafa travması sonrası yüksek doz intraperitoneal DOX (100 mg/kg) (n=5):** İzofluran anestezisi altında, farelerin skalpine orta hat insizyonu yapılarak kranium, sagittal sütür ve sağ frontal ve parietal kemikler ekspoze edilmiştir. Hayvanlar sırasıyla ağırlık düşürme (travma) düzeneğine yerleştirilerek 11 cm yükseklikten 75 gr ağırlığında silindirik ağırlık sağ parietal kemik üzerine düşürülmüştür. Sedasyon altında 4.0 ipek dikiş ile skalp insizyonları suture edilen fareler kafeslerine alınmıştır. Travmadan 30 dakika sonra farelere 8 saat arayla 48 saat boyunca (6 kez) intraperitoneal 100 mg/kg DOX enjeksiyonu yapılmıştır.



Şekil 3.1. Travma modelinde ağırlık sağ parietal kemikte işaretlenen alana düşürülmüştür.

3.3. Yaşamsal Bulguların Takibi ve Anestezi

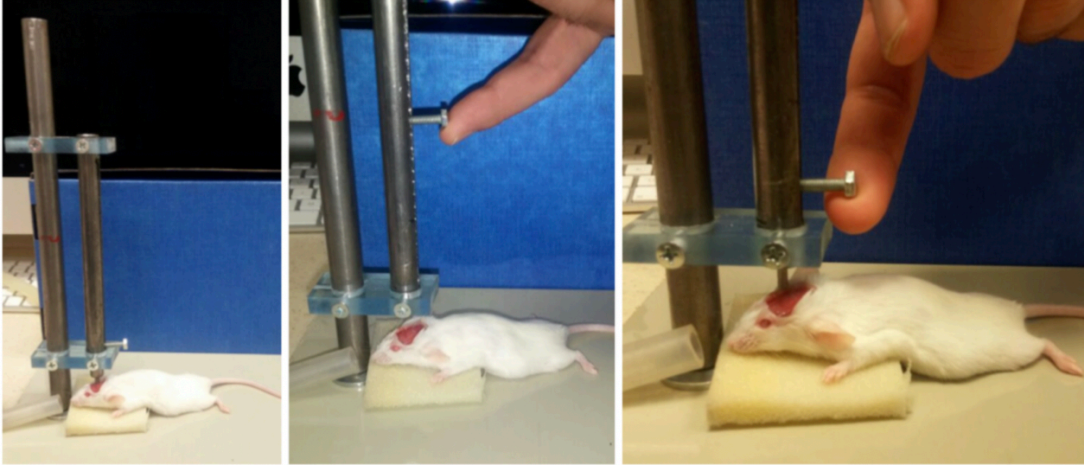
Deney başlangıcında farelerin ağırlık ölçümü yapıldıktan sonra, genel anestezi indüksiyonu %5'lik izofloran inhalasyonu ile gerçekleştirilmiş ve idame %2'lik izofloran ile (tüm işlemler süresince) sağlanmıştır. Arka ayak sıkıştırma yöntemi ile anestezi derinliği kontrol edildikten sonra fareler yüz üstü pozisyonda ağırlık düşürme düzeneğine yerleştirilmiştir. Deneğe yüz maskesi ile deney süresince oksijen desteği ve izofloran anestezisi uygulanmıştır. Tüm işlemler boyunca ortalama 2 L/dk oksijen desteği sağlanmış ve fare kendiliğinden solunumu devam eder vaziyette takip edilmiştir. Rektal sıcaklık probu ve homeotermik battaniye yardımı ile (Harvard Apparatus Limited, İngiltere) vücut sıcaklığı $37.0 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 'de tutulmuştur. Belirli aralıklarla (10-15 dk) kuyruk/parmak sıkıştırma ve göz kırpma refleksi kontrol edilerek anestezi derinliği takip edilmiştir. Deney esnasında sürekli olarak kalp atım sayısı ve kan oksijen satürasyonu pulse oksimetre ile (*V3304 Digital Table-Top Pulse Oximeter, SurgiVet, ABD*) monitörize edilmiştir.

3.4. Kafa Travmasının Oluşturulması

Anestezi altında, skalp orta hat insizyonu ile açılarak kranium, frontal, parietal ve oksipital kemikler görülecek şekilde ortaya konulmuştur. Kranium ekspozisyonu sağlandıktan sonra hayvanlar travma düzeneğine alınmıştır. Serbest ağırlık düşürme düzeneğinin altına denek, sağ parietal kemik silindirik ağırlığın temas yüzeyine denk gelecek şekilde yerleştirilmiş ve izofluran ve O2 desteği altında 75 gram'lık elik ağırlık 11 cm yükseklikten düşürülmüştür. Travmanın hemen sonrasında skalp insizyonları 4.0 ipek ile sture edilmiştir. Fareler ayıldıktan ve anestezinin etkisi geçtikten sonra kafeslerine alınmıştır.



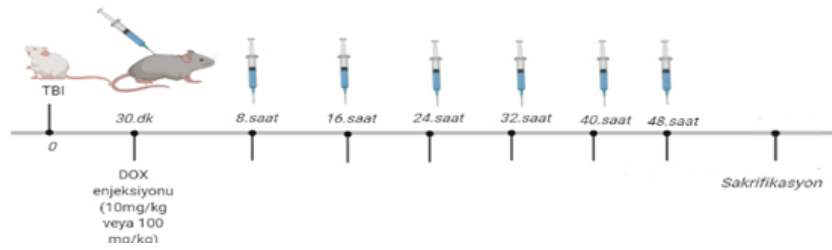
şekil 3.2. Kraniumun ortaya konulması



Şekil 3.3. Ağırlık düşürme düzeneği ile kafa travmasının oluşturulması. Silindirik tüp içerisine vertikal olarak yerleştirilmiş 6 mm çaplı (temas eden ucu 3 mm çaplı), 11 cm uzaklığından 75gram ağırlığında metal ağırlık, üzerindeki horizontal kol yardımıyla istenilen yükseklikten düşürülmüştür.

3.5. Doksisisiklinin Hazırlanması ve İntraperitoneal Yolla Verilmesi

100 mg'lık kapsül şeklinde bulunan DOX, %0.9'luk sodyum klorür'de eritilerek travmadan 30 dakika sonra grup 3 (10 mg/kg) ve 4'e (100 mg/kg) 8 saat arayla 6 kez intraperitoneal olarak verilmiştir.



Şekil 3.4. DOX verme zamanlaması

3.6. Sakrifikasyon, Beyinlerin Çıkarılması ve Fiksasyon

Travmayı takiben 72'inci saatte, fareler immünohistokimyasal ve histopatolojik çalışma için örneklerin alınması amacı ile sakrifiye edilmiştir. Bunun için yüksek doz kloralhidrat anestezisi

altındaki hayvanlara torakotomi yapılarak kalp ortaya konulduktan sonra sol ventrikülden hayvanın karaciğeri beyazlaşmaya kadar heparinli solüsyon verildi, sonrasında hayvanın vücudu sertleşinceye kadar %4 paraformaldehit (0,1 mol/L sodyum fosfat tamponu içinde, pH: 7,4) ile damarlar perfüze edilerek doku fiksasyonu yapıldı. Ardından hayvanlar dekapite edilerek beyinleri çıkarıldı ve formaldehit solüsyonunda bekletilerek fikse edildi. Fikse edilmiş beyinler oda sıcaklığında muhafaza edildi.



Şekil 3.5. Sakrifiye edilen farenin kafatası

3.7. Kesitlerin Alınması ve İmmünohistokimyasal ve Histopatolojik Değerlendirme

3.7.1. İmmünoperoksidaz İşaretleme

Cerrahi olarak çıkartılan denek beyinleri 48 saat tamponlu formalinle fikse edildi. Kasetlenen dokular otomatik takip cihazıyla (Leica TP 1020) takip edilerek gömülmeye hazır hale getirildi. Takip sonrası parafin bloklara gömülen dokulardan 4 mikrometre kalınlığında kesitler, sliding mikrotom (Leica SM2000R) kullanılarak pozitif yüklü lamlara alındı. Kesitler deparafinizasyon ve rehidratasyon sonrası PBS ile yıkanıp, 10 dakika %0.3 H₂O₂ ile endojen peroksidaz blokajı

yapıldıktan sonra oda sıcaklığında primer antikorlar (Anti IL-6 [abcam ab6672, 1/500]; Anti Iba1 [Wako 019-19741, 1/250]; Anti CD3 [Sigma C7930, 1/200]) ile 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 3 kere 5'er dakika fosfat tamponunda (PBS) yıkanıp, ardından uygun sekonder antikor (Peroxidase-AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG [H+L] [Jackson Immuno Research 711-035-152, 1:1000]) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından PBS ile yıkanıp distile sudan geçirildi ve diaminobenzidin (DAB) kromojeni kullanıldı. DAB boyaması sonrası PBS ile yıkanan preparatlar çekirdek boyanması için hematoksilin ile inkübe edildi. Sonrasında akar suda yıkanan kesitler dereceli alkollerle dehidrate edilip, ksilolde şeffaflaştırıldıktan sonra entellan ile kapatılıp mikroskopta incelenmeye hazır hale getirildi.

Hazırlanan preparatlardan rastgele seçilen beş farklı korteks alanı dijital kamera (Leica DFC 7000T) eklentili mikroskop (Leica DM6B) ile x40'lık büyütmede görüntülendi. IL-6 için her görüntüdeki tüm nöron ve glialar H-skor yapılacak şekilde skorlandı. Hiç boyanmayan hücreler 0, en çok boyanan hücreler ise 3 olacak şekilde 0'dan 3'e skor verildi. CD-3 ve Iba-1 için ise yine 40X'lik büyütmede rastgele görüntülenen 5'er alanda tüm pozitif hücreler sayıldı. Sayım işlemi ImageJ programının (Version 1.53a for Mac; NIH, ABD) CellCounter eklentisi ile gerçekleştirildi.

3.7.2. TUNEL Yöntemi ile Apoptotik Hücrelerin İşaretlenmesi

Hazırlanan parafin bloklardan alınan 4 mikrometre kalınlığındaki kesitler pozitif yüklü lamlara alındıktan sonra, deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinin ardından TUNEL boyaması için hazır hale getirildi. Beyinin korteks bölgesinde apoptoz tayini, DNA sarmal kırıklarının enzimatik olarak terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT)-aracılıklı deoksiüridin trifosfat ile işaretlenmesi (TUNEL) ile Hücre Ölümü Deteksiyon kiti (Chemicon® ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit) kullanılarak gerçekleştirildi.

Kesitlerin deparafinizasyon işlemi 3 saat 60°C sıcaklıkta etüve konularak gerçekleştirildi. Ardından oda sıcaklığına getirilen kesitler ksilolle üç kere 5'er dakika muamele edilerek deparafinizasyon tamamlandı. Dereceli alkollerle rehidrate edilen kesitlerde 15 dakika Proteinaz K ile antijen geri çağırma işlemi yapıлып, %3 lük hidrojen peroksitle 5 dakika peroksidaz blokajı yapıldı. Yıkanan kesitler apoptoz kitinde bulunan solüsyonlar kullanılarak, yöntemde belirtilen prosedüre uygun olarak TUNEL boyaması gerçekleştirildi. Metil green kullanılarak çekirdekler boyanıp, yıkama sonrası yine dereceli alkollerden geçirilerek dehidrate edildi. Ardından kesitler

ksilolle şeffalaştırılıp entellan ile kapatılarak mikroskopta incelemeye hazır hale getirildi. Hazırlanan preparatlarda rastgele seçilmiş en az beş farklı korteks alanı dijital kamera (Leica DFC 7000T) eklentili mikroskop (Leica DM6B) ile x40'lık büyütmede görüntülendi. Her alandaki tüm nöron ve glialar sayılarak pozitif hücre oranları belirlendi. Sayım işlemi ImageJ programının (Version 1.53a for Mac; NIH, ABD) CellCounter eklentisi ile gerçekleştirildi.

3.8. İstatistiksel Değerlendirme

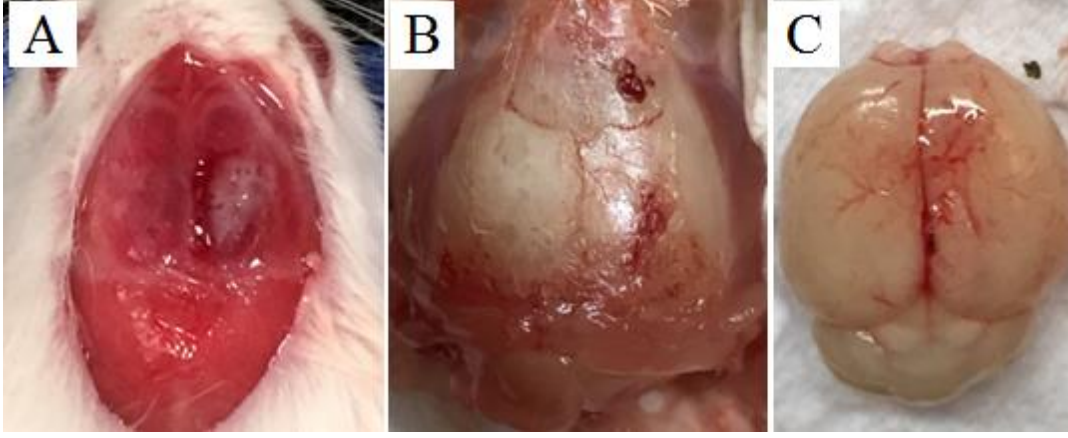
Çalışmada elde edilen verilerin değerlendirilmesi için ImageJ programının (*Version 1.53a for Mac; NIH, ABD*) CellCounter eklentisi kullanıldı. İki den fazla sayıda bağımsız grubun ortalamalarının karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi, iki bağımsız grubun ortalamalarının karşılaştırılmasında ise *Mann Whitney U* testi kullanıldı. $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Travma Şiddetinin Etkisi

15 Fare üzerine oluşturulan kafa travması modelinde mortalite izlenmemiştir. 1 farede kafatası kırığı meydana gelmiştir.

Deney esnasında sürekli olarak kalp atım sayısı ve kan oksijen saturasyonu pulse oksimetre ile monitörize edilmiştir. İşlem sırasında hiçbir deneyde saturasyon düşüşü izlenmemiştir.



Şekil 4.1. Travma sonrası kafa tası kırığı (A-B). Travmaya bağlı SAK (C)

4.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

4.2.1. T-Lenfositlerin İncelenmesi: CD-3

Kazanılmış bağışıklık, patojenlerin antijen spesifik yanıt oluşturarak hücresel veya humoral yolla elimine edilmesidir. B ve T lenfositler tarafından sağlanır. Deneysel travma modellerinde T hücrelerinin beyin parankimini infiltre etmesi bifaziktir: primer hasardan hemen sonra kan beyin bariyerinin bozulması sonucu ve geç dönemde antijen spesifik T hücrelerin infiltrasyonu. TBH sonrası T hücre infiltrasyonu 3-14 gün arasında görülür ve 6 aya kadar devam eder (121). Kazanılmış bağışıklık, inflamatuvar yanıtta T hücre aktivasyonu ile hem patojenik hem de onarıcı süreçlere aracılık eder. Th1 yanıt ile proinflamatuvar olayları ve beyin hasarını ağırlaştırırken Th2 yanıt antiinflamatuvar ve nörotrofik etkiler ile hasarı hafifletir.

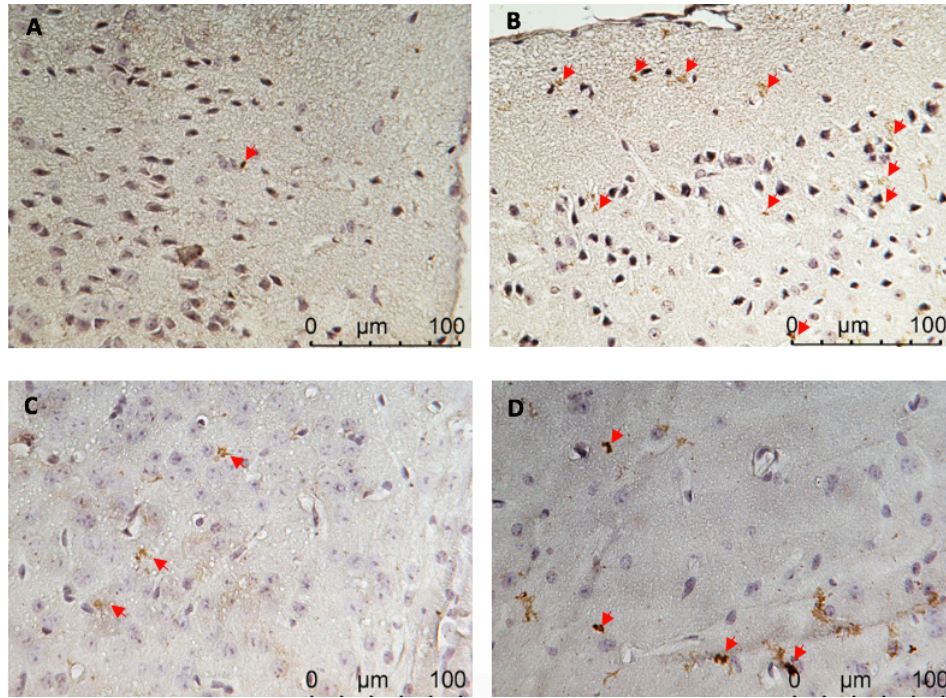
İnflamatuvar sürecin önemli bileşenlerinden T hücrelerinin belirteci olan CD-3 işaretlemesinde, sham grubunda belirgin olarak az sayıda CD-3 pozitif hücre izlendi. Bununla beraber travma grubunda sham grubuna oranla yaklaşık beş kat artış görüldü. Pozitif hücreler daha çok vasküler alan etrafında izlendi (Şekil 4.2).

CD-3 pozitifliği, sham grubunda standart sapma 1.94 (n=5/grup), kontrol travma grubunda 3.20 (n=5/grup), 10 mg/kg DOX verilen grupta 3.76 ve 100 mg/kg DOX verilen grupta 2.36 (n=5/grup) olarak bulundu.

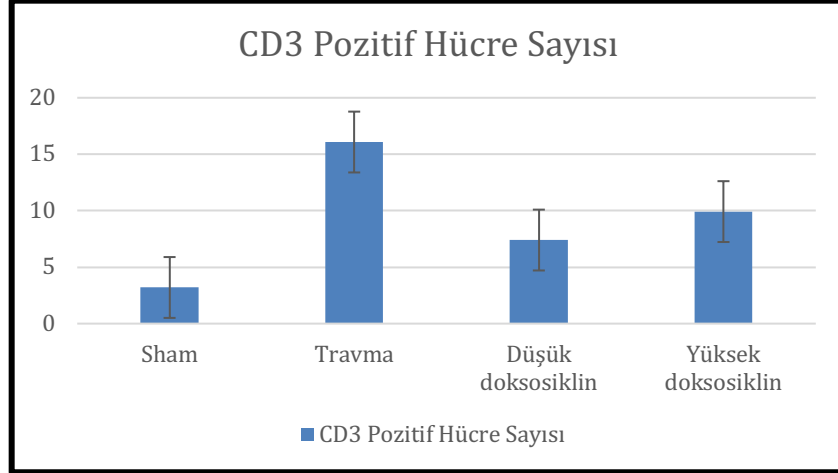
Kontrol grubu, 10 mg/kg DOX verilen grup ile karşılaştırıldığında, CD-3 sinyali ilaç verilen grupta azalmış olup bu düşüş anlamlı bulundu ($p=0.00001$; n=5/grup). Aynı anlamlılık, 100 mg/kg DOX verilen grup için de bulundu ($p=0.003$). Doksisisiklinin, travma sonrası beyin dokusundaki inflamasyonun belirteç hücresi olan CD-3 üzerinde azaltıcı etkisi olduğu görülmektedir.

Düşük doz ve yüksek doz doksisisiklin verilen grupların birbirleri arasında belirgin fark olmamasına rağmen ilaç verilmeyen travma grubuna oranla pozitif hücre oranında belirgin azalma tespit edildi (Şekil 4.3).

Bu sonuç doksisisiklinin, travmatik beyin dokusunda T hücre infiltrasyonunu sınırladığını göstermiştir.



Şekil 4.2. CD3 pozitif hücrelerin mikrografları; A: Sham grubu, B: Travma grubu, C: Düşük doz doksisisiklin grubu, D: Yüksek doz doksisisiklin grubu. Kırmızı okla işaretli hücreler CD3 pozitif hücreleri göstermektedir (immünperoksidaz işaretleme, DAB, hematoxilen 40x büyütme, 72'nci saat).

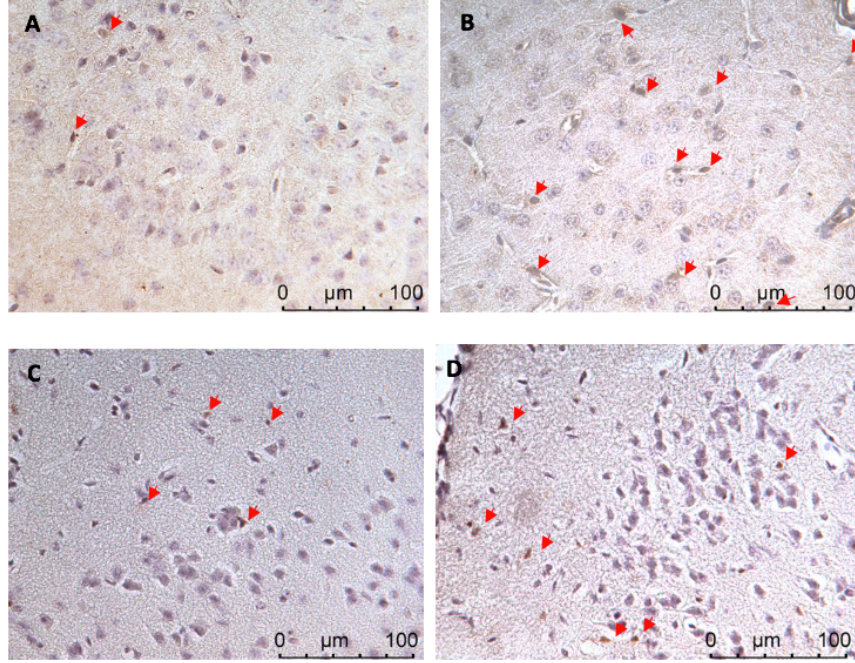


Şekil 4.3. İmmünohistokimya ile CD-3 pozitif hücrelerin gruplara göre sayı dağılımı.

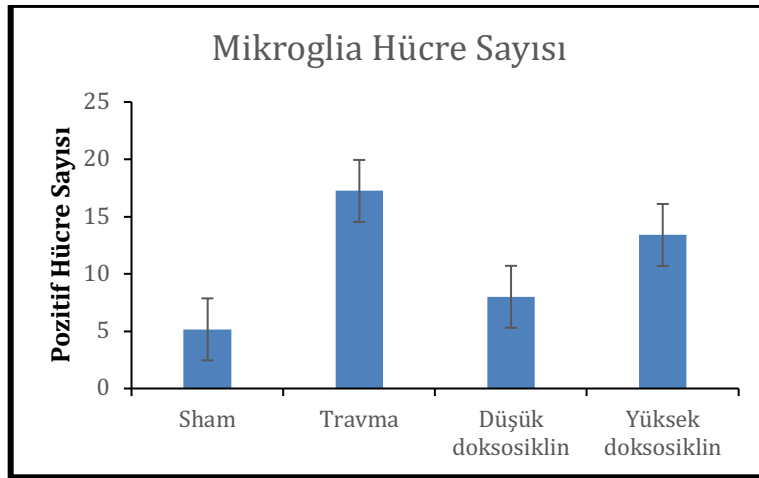
4.2.2. Iba1 ile Mikrogliaların İşaretlenmesi

Mikrogliaların, inflamatuvar sitokin üretimiyle ilişkisi ve dolayısıyla dejenerasyona gidişteki etkisinin, en önemli belirteci olan Iba1 ile immunohistokimyasal işaretlemeler yapıldı (Şekil 4.4), Travma grubuyla karşılaştırılınca sham grubunda belirgin olarak az sayıda hücre pozitif olarak izlendi (Şekil 4.5). Düşük doz doksosiklin verilen grupta, sham grubuna kıyasla daha fazla pozitif hücre gözlenirken; ilaç verilmeyen travma grubuna oranla yarısından daha az Iba-1 pozitif hücre vardı. Yüksek doz doksosiklin verilen grupta ise, travma grubuna göre Iba-1 pozitif hücre sayısının belirgin olarak azaldığı gözlemlendi. Fakat düşük doz doksosiklin verilen gruba oranla daha fazla mikroglia hücresi izlendi. CD3 işaretlemesine benzer şekilde pia mater ve vasküler yapıların etrafında Iba-1 pozitif hücre artışı görüldü (Şekil 4.4). Iba-1 ile işaretlenen tüm mikroglialar incelendiğinde, sham grubunda standart sapma 1.14 (n=5/grup), kontrol travma grubunda 1.67 (n=5/grup), 10 mg/kg DOX verilen grupta 1.92 ve 100 mg/kg DOX verilen grupta 2.88 (n=5/grup) olarak bulunmuştur. Kontrol grubu, 10 mg/kg DOX verilen grup ile karşılaştırıldığında, Iba-1 sinyali ilaç verilen grupta azalmış olup bu düşüş anlamlı bulunmuştur (p=0.0001; n=5/grup).

Aynı anlamlılık, 100 mg/kg DOX verilen grup için de bulunmuştur (p=0.003). Doksosiklinin, travma sonrası beyin dokusundaki inflamasyonun belirteç hücresi olan mikroglialar üstünde azaltıcı etkisi olduğu görülmektedir.



Şekil 4.4. Iba-1 ile mikroglial hücrelerin işaretlenmesi. A: Sham grubu, B: Travma grubu, C: Düşük doz doksisisiklin grubu, D: Yüksek doz doksisisiklin grubu. Kırmızı okla işaretli hücreler mikroglia hücrelerini göstermektedir (immünperoksidaz işaretleme, DAB, hematoxilen 40x büyütme, 72'nci saat).



Şekil 4.5. İmmünohistokimya ile mikroglia hücrelerinin gruplara göre sayı dağılımı.

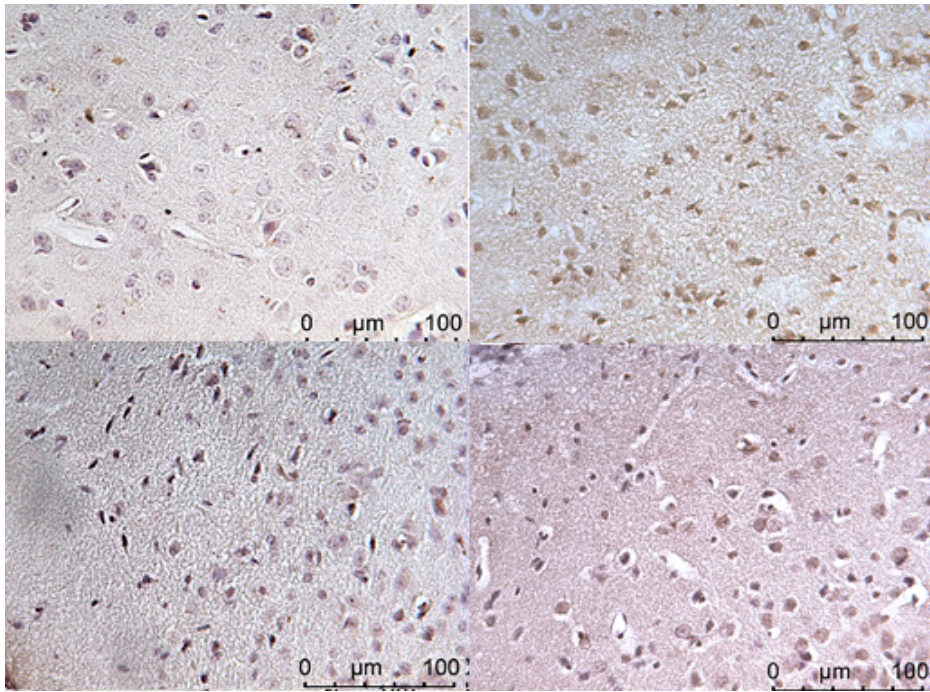
4.2.3. Proinflamatuvar sitokin incelemesi: IL-6

Proinflamatuvar sitokinlerden olan IL-6'nın sham grubundaki ifadesi hem nöronlarda hem de glialarda düşükken, travma grubunda bu oran her iki hücre grubunda yüksek olarak izlendi (Şekil

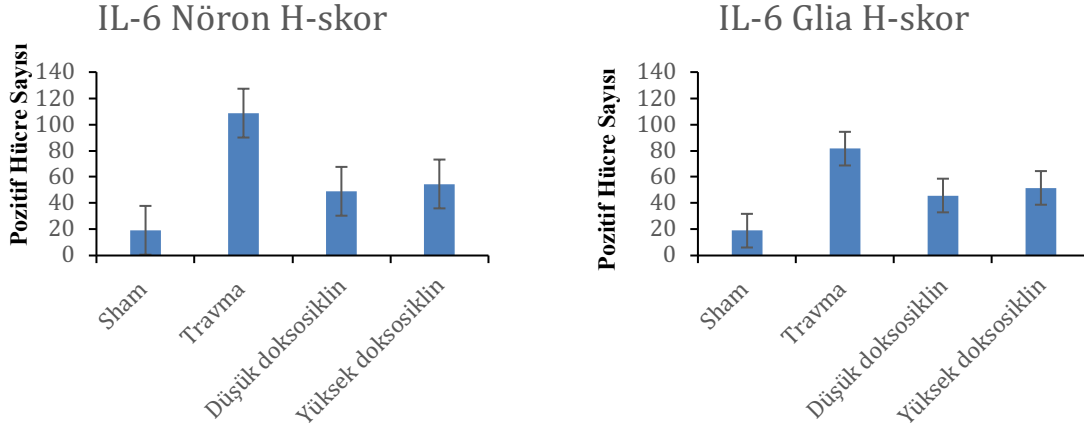
4.7). Düşük ve yüksek doksisisiklin gruplarında birbirine benzer oranda izlenen H-skorları belirgin şekilde travma grubundan düşük olarak saptandı (Şekil 4.6).

IL-6 sinyal pozitifliğinin sham grubunda standart sapması 2.07 (n=5/grup), kontrol travma grubunda 1.92 (n=5/grup), 10 mg/kg DOX verilen grupta 2.19 ve 100 mg/kg DOX verilen grupta 2.60 (n=5/grup) olarak bulundu.

Kontrol grubu, 10 mg/kg DOX verilen grup ile karşılaştırıldığında IL-6 sinyali ilaç verilen grupta azalmış olup anlamlı bulundu ($p=0.003$; n=5/grup). Ancak kontrol grubuna göre 100 mg/kg DOX verilen gruptaki pozitif boyanan hücre sayısı düşüş göstermesine rağmen, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.58$; n=5/grup).



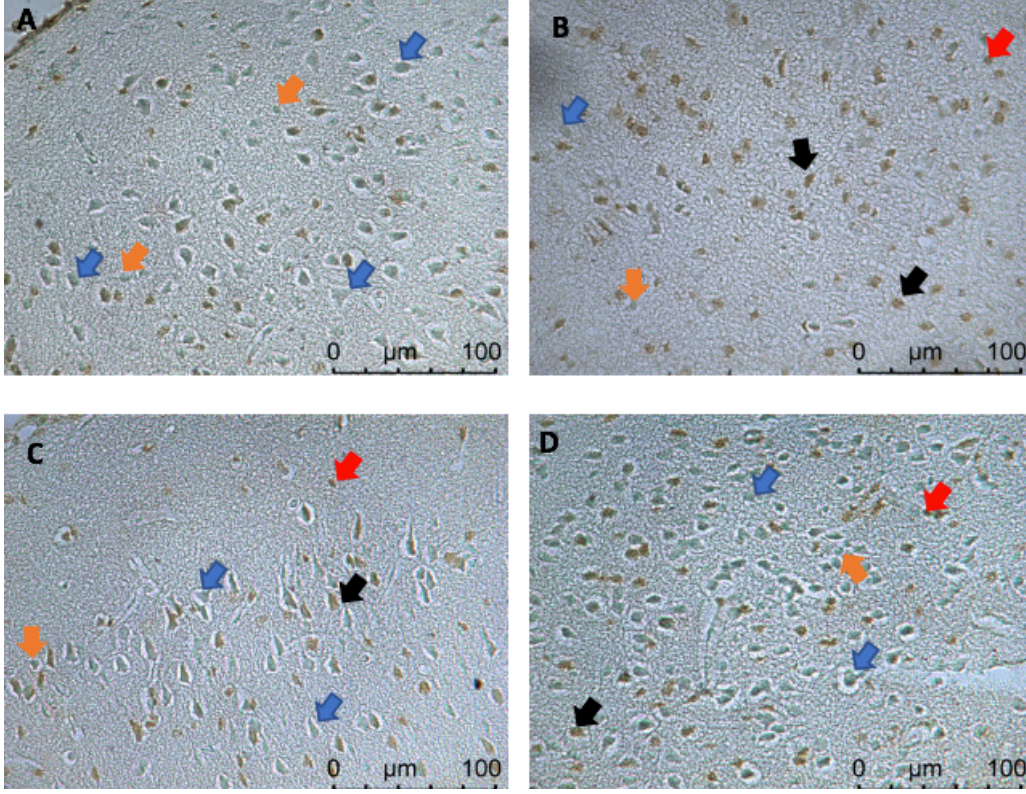
Şekil 4.6. IL-6 işaretlemesinin gruplara göre mikrografları; A: Sham grubu, B: Travma grubu, C: Düşük doz doksisisiklin grubu, D: Yüksek doz doksisisiklin grubu (immünperoksidaz işaretleme, DAB, hematoxilen 40x büyütme, 72'nci saat).



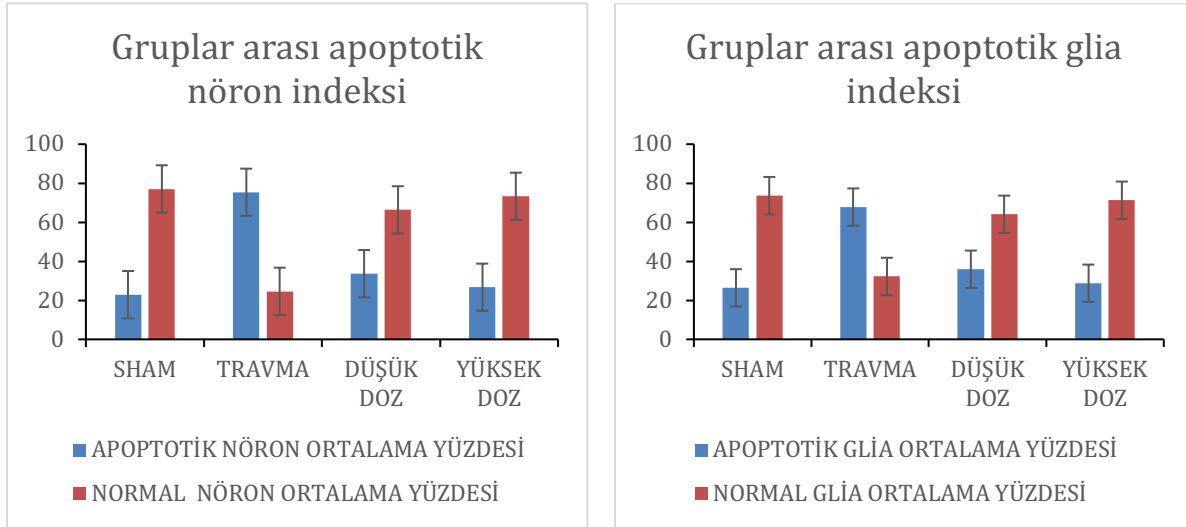
Şekil 4.7. İmmünohistokimyasal olarak nöron ve glialarda IL-6'nın immünperoksidaz işaretlemesinin gruplara göre H-skor analizleri.

4.2.4. TUNEL Sonuçları

Apoptoza giden hücrelerin işaretlemesinde kullanılan TUNEL yöntemi gruplara uygulandığında; travma grubunda hem nöron hem de glialar için yüksek oranda TUNEL pozitif hücre izlendi. Sham grubunda az sayıda hem nöron hem de glia hücrelerinde pozitiflik mevcuttu. Yüksek doksosiklin verilen travma grubunda, ilaçsız travma grubuna oranla 3 kattan daha yüksek oranda negatif yani apoptoza gitmeyen nöron ve glia oranları vardı (Şekil 4.9). Düşük doksosiklin grubunda yine benzer şekilde TUNEL (+) nöron ve glia sayılarının travma grubuna oranla belirgin şekilde azaldığı saptandı, ancak yüksek doksosiklin grubundan daha yüksek pozitiflik izlendi. Bu sonuçlarla beyin dokusunda travmaya sekonder gelişen apoptoza gidişte doksosiklin uygulanmasının etkin olduğu izlenmiştir.



Şekil 4.8. Gruplara göre TUNEL işaretleme mikrografları; A: Sham grubu, B: Travma grubu, C: Düşük doz doksisisiklin grubu, D: Yüksek doz doksisisiklin grubu. Mavi oklar TUNEL (-) nöronları, turuncular TUNEL (-) gliaları; siyah oklar TUNEL (+) nöronları, kırmızılar ise TUNEL (+) gliaları göstermektedir (DAB, metil green; 40x büyütme, 72'inci saat).



Şekil 4.9. TUNEL işaretlemesi sonrası pozitif ve negatif nöron ve gliaların gruplara göre sayı dağılımı.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, serbest ağırlık düşürme yöntemiyle farelerde oluşturulan kafa travması sonrası düşük (10 mg/kg) ve yüksek dozlarda (100 mg/kg) verilen intraperitoneal DOX'in, 3. günde inflamasyon üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Birincil beyin hasarı travma anında ortaya çıkar. Yaygın mekanizmalar arasında doğrudan darbe, hızlı akselerasyon/deselerasyon, delici yaralanma ve patlama dalgaları bulunur. Travma anında oluşan primer beyin hasarından sonra aylar veya yıllar süren kronik inflamatuvar süreçlerin olaya eklenmesi, hücre ölümü, nörodejenerasyon ve nörolojik disfonksiyonlar ile sonuçlanır [158].

Hasar oluşumunu takiben ilk 24 saatte serbest oksijen radikallerinin üretimi, mitokondri fonksiyonlarının bozulması, hasarlı hücrelerdeki (mikroglia, astrosit ve nöronlar) potasyum ve genetik materyalin hücre dışına çıkması ile beyin dokusunun özelleşmiş makrofajları olan mikroglialar aktifleşir. Aktifleşen mikroglialar tarafından TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler salgılanır [159].

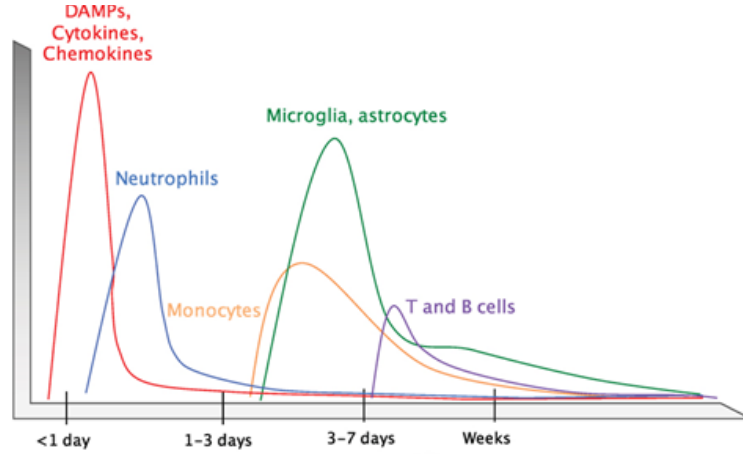
Bu aşamada beyne mekanik temas sonucu direkt hasar meydana gelir. TBH'ye karşı oluşan immün yanıt nöroproteksiyonu ve doku tamirini sağlar ancak immün sistemde disregülasyon gerçekleşirse uygunsuz yanıt oluşur. İmmün sistemin uygun kontrol edilmemesi, doku hasarında ikinci aşamanın başlaması ve nöroinflamasyon ile sonuçlanır.

Akut dönemin ardından, doğal bağışıklık sisteminin parçası olan ve çoklu protein kompleksinden oluşan inflamazomlar (NLRP3) aktive olur. Bunun sonucunda inaktif formda bulunan kaspaz enzimi NLRP3 kompleksi tarafından proteolitik yıkıma uğratılarak aktif formuna dönüşür. Aktifleşen kaspaz-1 ise inflamatuvar olaylarda rolü olan IL-1 β ve IL-18 sitokinlerinin salınımını uyarır. Bunun yanı sıra geç dönemde lenfosit, makrofaj aktivasyonu ve mikroglialarda birtakım morfolojik değişiklikler izlenmektedir [160].

Primer hasarın aksine sekonder hasar diffüz ve uzun sürelidir. Hastaların hastaneye başvurusu, tanı konması ve tedavisinin başlanmasına kadar geçen süre göz önünde bulundurularak DOX, farelere travmadan 30 dakika sonra verilmiştir.

Travma sonrası, DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*) ekstraselüler mesafeye salınır ve SSS'deki hücrelerde bulunan patern tanıma reseptörleri (PRPs) ve sitokin reseptörleri tarafından tanınır. Böylece sitokin ve kemokin üretimi ve sonrasında hasarlı bölgeye immün sistem hücrelerinin göçü ile sonuçlanır. Travmaya inflamatuvar yanıtta beyne sistemik dolaşımdan

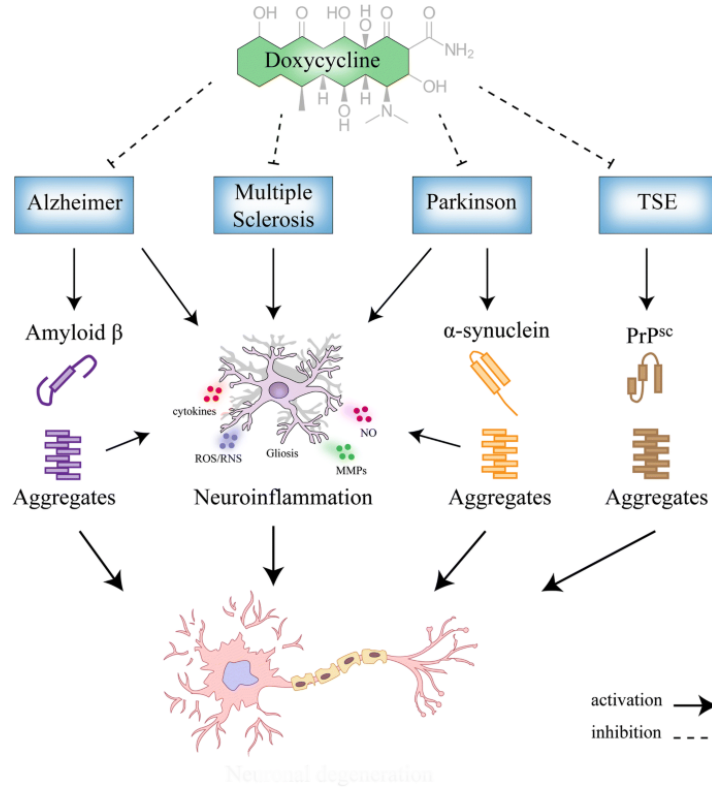
gelen ilk immün hücreler nötrofillerdir [161]. Saatler içinde ilk olarak subaraknoid mesafede ve vasküler boşluklarda görülürler ve travma sonrası ilk 24 saatte beyin parankimine infiltre olurlar [162, 163]. 3.-5. günlerde sayıca azalarak yerlerini diğer periferik immün sistem hücrelerine ve mikroglia ile astrositlere bırakırlar. 3.-5. günler arasında esas görev alan hücreler monositler olmasına rağmen ilerleyen günlerde hasarlı bölgede T lenfositler, doğal öldürücü (NK) ve dendritik hücreler görülmeye başlar [164, 165]



Şekil 5.1. Travmatik beyin hasarında immün yanıtta yer alan mediatörlerin zamansal dağılımı[23]

IL-1, potent proinflamatuvar bir sitokindir ve aşırı üretimi nöroinflamasyon ve nörodejenerasyonla sonuçlanır. TBH sonrası IL-1 üretiminde major rol oynayan inflamazomlar (NLRP1, NLRP2, NLRP3), mikroglialarda, nöronlarda ve astrositlerde eksprese olur. TBH de, inflamazom ve komponentlerinin travma sonrası ilk 24 saatte arttığını ve 7 güne kadar bu artışın devam ettiğini düşünülmektedir [162, 166] .

Yapılan çalışmalarda doksisisiklinin antiinflamatuvar etkileri nörodejeneratif hastalıklarında (Multiple Skleroz, Parkinson hastalığı, Prion hastalığı) incelenmiş olup, özellikle multiple sklerozda IFN- β ve MMP 'yi inhibe ettiği ispat edilmiş, özellikle yan etkileri kullanılan diğer ilaçlara göre daha az olduğu için son zamanlarda antimikrobiyal etkisi ile birlikte antiinflamatuvar bir ilaç olarak da ilgi çekmiştir [12-15, 150, 167] .



Şekil 5.2. Nörodejeneratif hastalıklarında doksisisiklinin etkileri [168]

Yapılan başka bir çalışmada, doksisisiklinin proinflamatuvar sitokinlerin ve reaktif azot ve oksijen türlerinin üretimini azaltılması yoluyla mikroglial hücre aktivasyonu üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olduğunu gösterilmiştir. Doksisisiklinin bu etkilerinin, MAP kinaz p38 ve NF-kappa B sinyal yollarının inhibisyonu aracılığı ile olduğu düşünülmektedir [169].

Başka bir çalışmada, TBH sonrası doksisisiklin ile tedavi edilen farelerde davranışsal ve motor fonksiyonların iyileştiği görülmüştür [170]. Tavşanlarda oluşturulan bir serebral reperfüzyon-iskemi modelinde, santral sinir sisteminde doksisisiklinin reperfüzyon hasarını azalttığı bulunmuştur [154].

Literatürde çeşitli deneysel hayvan modellerinde, doksisisiklinin düşük ve yüksek doz arasında antiinflamatuvar etkinliği açısından düşük dozun daha etkili olduğu ve yan etki bakımından daha uygun olduğu görülmüştür [15].

Bu çalışmada kafa travması oluşturulduktan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin beyin dokularında Iba-1 immünreaktivitesi gösteren mikroglial hücreler ve morfolojilerine göre aktif mikroglialar değerlendirildiğinde ilaç verilen deney gruplarında mikroglial göçün ve

aktivasyonun azaldığı görülmüştür. Doksisisiklinin, travma sonrası beyin dokusundaki inflamasyonun belirteç hücresi olan mikroglialar üstünde azaltıcı etkisi olduğu görülmüştür.

Travma sonrası mikroglial hücre aktivasyonunun gösterilmesi için mikroglia/makrofaj spesifik kalsiyum bağlayıcı bir protein olan iyonize kalsiyum bağlayıcı adaptör molekül-1 (Iba-1) tercih edilmiştir [171, 172]. Travma sonrası oluşan inflamasyonda mikroglial hücrelerin aktive olmasıyla hücrelerin morfolojileri, gen ekspresyonları ve fonksiyonları değişmektedir. Morfolojik olarak dallanmış, ince uzantıları olan mikroglialar doku hasarı veya patojen invazyonu söz konusu olduğunda buna yanıt olarak infiltre olmuş makrofajlardan zor ayırt edilebilen, hipertrofik ve ameboid bir hal alırlar [172, 173]

Iba-1 ile işaretlenen tüm mikroglialar incelendiğinde, sham grubunda standart sapma 1.14 (n=5/grup), kontrol travma grubunda 1.67 (n=5/grup), 10 mg/kg DOX verilen grupta 1.92 ve 100 mg/kg DOX verilen grupta 2.88 (n=5/grup) olarak bulundu. Kontrol grubu, 10 mg/kg DOX verilen grup ile karşılaştırıldığında, Iba-1 pozitifliği ilaç verilen grupta azalmış olup bu düşüş anlamlı bulundu (p=0.0001; n=5/grup). Aynı anlamlılık, 100 mg/kg DOX verilen grup için bulundu (p=0.003). Fakat düşük doz doksisisiklin verilen gruba oranla daha fazla mikroglia hücresi izlendiği için, düşük doz DOX'in daha fazla antiinflamatuvar etkiye sahip olduğu anlaşıldı.

İnflamatuvar yanıtta görev alan diğer hücre grubu ise geç dönemde görülen ve kazanılmış bağışıklık sisteminin bir parçası olan T lenfositlerdir. Kan-beyin bariyerinin bozulmasıyla inflamatuvar sinyal moleküller kapiller yataklara ekstravaze olur ve başta T lenfositler olmak üzere diğer lökositlerin de mikroglial aktiviteninin olduğu hasarlı bölgeye migre olmasını sağlar. Bu göç travma sonrası 1. günde başlar, 4.-10. günlerde en yüksek seviyeye ulaşır.

CD-3 pozitifliği, sham grubunda standart sapma 1.94 (n=5/grup), kontrol travma grubunda 3.20 (n=5/grup), 10 mg/kg DOX verilen grupta 3.76 ve 100 mg/kg DOX verilen grupta 2.36 (n=5/grup) olarak bulundu.

Kontrol grubu, 10 mg/kg DOX verilen grup ile karşılaştırıldığında, CD-3 sinyali ilaç verilen grupta azalmış olup bu düşüş anlamlı bulundu (p=0.00001; n=5/grup). Aynı anlamlılık, 100 mg/kg DOX verilen grup için de bulundu (p=0.003). Doksisisiklinin, travma sonrası beyin

dokusundaki enflamasyonun belirteç hücresi olan CD-3 üzerinde azaltıcı etkisi olduğu görülmektedir.

Düşük doz ve yüksek doz doksisisiklin verilen grupların birbirleri arasında belirgin fark olmamasına rağmen ilaç verilmeyen travma grubuna oranla CD-3 pozitif hücre oranında belirgin azalma tespit edildi.

Proinflamatuvar sitokinlerden olan IL-6'nın sham grubundaki ifadesi hem nöronlarda hem de glialarda düşükken, travma grubunda bu oran her iki hücre grubunda yüksek olarak izlendi. Düşük ve yüksek doksosiklin gruplarında birbirine benzer oranda izlenen H-skorları belirgin şekilde travma grubundan düşük olarak saptandı. IL-6 sinyal pozitifliği sham grubunda standart sapması 2.07 (n=5/grup), kontrol travma grubunda 1.92 (n=5/grup), 10 mg/kg DOX verilen grupta 2.19 ve 100 mg/kg DOX verilen grupta 2.60 (n=5/grup) olarak bulundu. Kontrol grubu, 10 mg/kg DOX verilen grup ile karşılaştırıldığında IL-6 pozitifliği ilaç verilen grupta azalmış olup anlamlı bulundu (p=0.003; n=5/grup). Ancak kontrol grubuna göre 100 mg/kg DOX verilen gruptaki pozitif boyanan hücre sayısı düşüş göstermesine rağmen, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p=0.58; n=5/grup).

Çalışmamızda, travmadan 72 saat sonra İL-6 hücre pozitifliğine bakılmıştır. Ancak, İL-6 birinci günden itibaren yerini başka mediatörlere bırakmaktadır ve sadece inflamasyonun akut fazında etkisi vardır[174]. Çalışmamızda yüksek doz DOX'in İL-6 seviyeleri üzerine anlamlı etkisi olmaması da bu veriyi destekler niteliktedir.

Apoptoza giden hücrelerin işaretlemesinde kullanılan TUNEL yöntemi gruplara uygulandığında, kontrol grubuna göre hem düşük doz DOX, hem de yüksek doz DOX uygulanan gruplarda, apoptoza giden hücre sayısı belirgin ve anlamlı bir şekilde azalma göstermiştir. Yüksek doz DOX grubunda apoptoza giden hücre sayısı düşük doz DOX'ten daha az olduğu saptanmış olup apoptozun inhibisyonu açısından yüksek dozun daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Literatürde çeşitli deneysel hayvan modellerinde farklı dozlarda verilen DOX, antiinflamatuvar etki göstermektedir. Ancak bu çalışma deneysel kafa travması modelinde DOX'in inflamazom ve apoptoz üzerindeki etkilerinin gösterilmesi açısından ilktir.

Çalışmamızda farelerde kafa travması modeli oluşturulduktan 30 dakika sonra 2 farklı dozda verilen DOX (10 ve 100 mg/kg), 3. günde beyindeki hasar nöroinflamasyon için çeşitli belirteçlerle değerlendirildiğinde literatürdekine benzer şekilde antiinflamatuvar etki göstermektedir.

Düşük doz DOX'in antiapoptotik etkisi yükseğe göre daha az bulunmasına rağmen, literatürdekine benzer şekilde, diğer inflamatuvar markerler üzerine yüksek doza göre daha fazla antiinflamatuvar etkileri vardır. Bu durum, travmanın akut fazında DOX'in düşük dozunun (10 mg/kg) kullanılmasının daha uygun olduğunu desteklemektedir[15, 175, 176]. Fakat travmanın akut fazından sonra bu ilacın nöroprotektif etkilerinden faydalanmak için(antiapoptotik), yüksek dozunun (100 mg/kg) tercih edilmesini öneriyoruz. Aynı tavsiye nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için geçerlidir.

Bu çalışmada 48 saat boyunca verilen doksisisiklinin uzun süreli antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkilerini ortaya koymak için bu ilaç daha uzun sürelerde verilebilir. IL-6 üzerine etkilerine bakmak için travmadan hemen 24 saat sonra pozitif hücre sayısı bakılabilir. Aynı zamanda spinal ve periferik sinir travmalarında bu ilacın etkileri bilinmemektedir ve yeni araştırmalar ve çalışmalara gerek duyulmaktadır.

Sonuç olarak TBH sonrası nöroinflamasyon ve mikroglial aktivasyonu önemli ikincil hasar mekanizmalarıdır. İkincil hasar mekanizmalarının patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması ve hedefe yönelik etkin tedavi seçeneklerinin belirlenebilmesi için yeni deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

SONUÇ

Bu çalışmada Swiss albino farelerde ağırlık düşürme metoduyla oluşturulan kafa travması modelinde iki farklı dozda verilen DOX'in inflamasyon üzerindeki etkileri incelenmiştir.

- 1) Doksisiklin, travmatik beyin hasarında inflamasyonu çeşitli yollarla azaltmaktadır.
- 2) CD3+ T lenfositler, 10 mg/kg ve 100 mg/kg DOX verilen gruplarda anlamlı olarak azalmıştır ($p=0,00001$, $p=0,003$, $n=5$ /grup).
- 3) 10 mg/kg DOX verilen grupta IL-6 salınımı anlamlı olarak azalmıştır ($p=0,003$, $n=5$ /grup). 100 mg/kg DOX verilen grupta IL-6 ile boyanan hücrelerin sayısı azalmıştır, fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,58$, $n=5$ /grup).
- 4) Iba-1 ile mikroglial hücreler değerlendirildiğinde, 10 mg/kg ve 100 mg/kg DOX ile mikroglial göçün anlamlı olarak daha az olduğu görülmektedir ($p=0,0001$, $p=0,0003$, $n=5$ /grup).
- 5) Iba-1 ile boyanan mikroglial hücrelere bakıldığında, düşük doz DOX'in, yüksek dozdan daha etkili olduğu izlenmiştir.
- 9) 10 mg/kg ve 100 mg/kg dozdan DOX verilen gruplarda, apoptoza giden hücre sayısı belirgin bir şekilde azalma göstermiştir.
- 11) Yüksek doz grubunda apoptoza giden hücre sayısı düşük doz DOX'ten daha az olduğu bulunmuş olup apoptoz inhibisyonu açısından yüksek dozun daha etkileyici olduğu düşünülmüştür.

Sonuç olarak, kafa travmasında DOX nöroinflamasyon ve mikroglial aktivasyonu inhibe ederek ve apoptozu azaltarak ikincil hasarın sınırlandırılmasında önemli katkı sağlanmaktadır. Travma sonrası düşük doz ile erken dönem akut nöroinflamasyonun, yüksek doz ile daha geç başlayan apoptozun engellenmesi yönünden daha ileri çalışmaların yapılması en doğru doz ve uygulama zamanı şemasının belirlenmesi için ışık tutacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Pearn, M.L., et al., *Pathophysiology Associated with Traumatic Brain Injury: Current Treatments and Potential Novel Therapeutics*. Cell Mol Neurobiol, 2017. **37**(4): p. 571-585.
2. Menon, D.K., et al., *Position statement: definition of traumatic brain injury*. Arch Phys Med Rehabil, 2010. **91**(11): p. 1637-40.
3. Nizamutdinov, D. and L.A. Shapiro, *Overview of Traumatic Brain Injury: An Immunological Context*. Brain Sci, 2017. **7**(1).
4. Moen, K.G., et al., *A longitudinal MRI study of traumatic axonal injury in patients with moderate and severe traumatic brain injury*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2012. **83**(12): p. 1193-200.
5. Chiu, C.-C., et al., *Neuroinflammation in animal models of traumatic brain injury*. Journal of Neuroscience Methods, 2016. **272**: p. 38-49.
6. Freeman, L.C. and J.P. Ting, *The pathogenic role of the inflammasome in neurodegenerative diseases*. J Neurochem, 2016. **136 Suppl 1**: p. 29-38.
7. Song, L., et al., *NLRP3 Inflammasome in Neurological Diseases, from Functions to Therapies*. Front Cell Neurosci, 2017. **11**: p. 63.
8. Adamczak, S., et al., *Inflammasome proteins in cerebrospinal fluid of brain-injured patients as biomarkers of functional outcome: clinical article*. J Neurosurg, 2012. **117**(6): p. 1119-25.
9. Chaudhry, K., et al., *Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) activation in exercise-reduced neuronal apoptosis after stroke*. Neurosci Lett, 2010. **474**(2): p. 109-14.
10. Nelson, M.L. and S.B. Levy, *The history of the tetracyclines*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1241**: p. 17-32.
11. Domercq, M. and C. Matute, *Neuroprotection by tetracyclines*. Trends Pharmacol Sci, 2004. **25**(12): p. 609-12.
12. Lassmann, H. and J. van Horssen, *The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis*. FEBS Lett, 2011. **585**(23): p. 3715-23.
13. Lazzarini, M., et al., *Doxycycline restrains glia and confers neuroprotection in a 6-OHDA Parkinson model*. Glia, 2013. **61**(7): p. 1084-100.
14. Balducci, C., et al., *Doxycycline counteracts neuroinflammation restoring memory in Alzheimer's disease mouse models*. Neurobiol Aging, 2018. **70**: p. 128-139.
15. Di Caprio, R., et al., *Anti-Inflammatory Properties of Low and High Doxycycline Doses: An *In Vitro* Study*. Mediators of Inflammation, 2015. **2015**: p. 329418.
16. *CDC grand rounds: reducing severe traumatic brain injury in the United States*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2013. **62**(27): p. 549-52.
17. Butcher, I., et al., *Prognostic value of cause of injury in traumatic brain injury: results from the IMPACT study*. J Neurotrauma, 2007. **24**(2): p. 281-6.
18. Mauritz, W., et al., *Epidemiology, treatment and outcome of patients after severe traumatic brain injury in European regions with different economic status*. Eur J Public Health, 2008. **18**(6): p. 575-80.

19. Hyder, A.A., et al., *The impact of traumatic brain injuries: a global perspective*. NeuroRehabilitation, 2007. **22**(5): p. 341-53.
20. Thurman, D.J., et al., *Traumatic brain injury in the United States: A public health perspective*. J Head Trauma Rehabil, 1999. **14**(6): p. 602-15.
21. Summers, C.R., B. Ivins, and K.A. Schwab, *Traumatic brain injury in the United States: an epidemiologic overview*. Mt Sinai J Med, 2009. **76**(2): p. 105-10.
22. Parmeet, K. and S. Saurabh, *Recent Advances in Pathophysiology of Traumatic Brain Injury*. Current Neuropharmacology, 2018. **16**(8): p. 1224-1238.
23. McKee, A.C. and D.H. Daneshvar, *The neuropathology of traumatic brain injury*. Handb Clin Neurol, 2015. **127**: p. 45-66.
24. Adams, J.H., et al., *Diffuse axonal injury in head injury: definition, diagnosis and grading*. Histopathology, 1989. **15**(1): p. 49-59.
25. McCarter, R.J., et al., *PTA testing, the westmead post traumatic amnesia scale and opiate analgesia: A cautionary note*. Brain Injury, 2007. **21**(13-14): p. 1393-1397.
26. Marshall, L.F., et al., *The diagnosis of head injury requires a classification based on computed axial tomography*. J Neurotrauma, 1992. **9 Suppl 1**: p. S287-92.
27. Maas, A.I., et al., *Prediction of outcome in traumatic brain injury with computed tomographic characteristics: a comparison between the computed tomographic classification and combinations of computed tomographic predictors*. Neurosurgery, 2005. **57**(6): p. 1173-82; discussion 1173-82.
28. Liesemer, K., et al., *Use of Rotterdam CT scores for mortality risk stratification in children with traumatic brain injury*. Pediatr Crit Care Med, 2014. **15**(6): p. 554-62.
29. Rosenthal, A.A., et al., *Traumatic Epidural Hematoma: Patient Characteristics and Management*. Am Surg, 2017. **83**(11): p. e438-e440.
30. Chicote Álvarez, E., et al., *Epidemiology of traumatic brain injury in the elderly over a 25 year period*. Rev Esp Anesthesiol Reanim, 2018. **65**(10): p. 546-551.
31. Bonow, R.H., et al., *The Outcome of Severe Traumatic Brain Injury in Latin America*. World Neurosurg, 2018. **111**: p. e82-e90.
32. Burjorjee, J.E., R. Rooney, and M. Jaeger, *Epidural Hematoma Following Cessation of a Direct Oral Anticoagulant: A Case Report*. Reg Anesth Pain Med, 2018. **43**(3): p. 313-316.
33. Zimmerman, R.A. and L.T. Bilaniuk, *Computed tomographic staging of traumatic epidural bleeding*. Radiology, 1982. **144**(4): p. 809-12.
34. Haselsberger, K., R. Pucher, and L.M. Auer, *Prognosis after acute subdural or epidural haemorrhage*. Acta Neurochir (Wien), 1988. **90**(3-4): p. 111-6.
35. Besenski, N., *Traumatic injuries: imaging of head injuries*. Eur Radiol, 2002. **12**(6): p. 1237-52.
36. Bullock, M.R., et al., *Surgical management of acute subdural hematomas*. Neurosurgery, 2006. **58**(3 Suppl): p. S16-24; discussion Si-iv.
37. Echlin, F.A., S.V.R. Sordillo, and T.Q. Garvey, Jr., *ACUTE, SUBACUTE, AND CHRONIC SUBDURAL HEMATOMA*. Journal of the American Medical Association, 1956. **161**(14): p. 1345-1350.
38. Rubin, A.N., E.D. Espiridion, and D.H. Lofgren, *A Sub-acute Cerebral Contusion Presenting with Medication-resistant Psychosis*. Cureus, 2018. **10**(7): p. e2938.
39. Firsching, R., *Coma After Acute Head Injury*. Dtsch Arztebl Int, 2017. **114**(18): p. 313-320.

40. Cepeda, S., et al., *Traumatic Intracerebral Hemorrhage: Risk Factors Associated with Progression*. J Neurotrauma, 2015. **32**(16): p. 1246-53.
41. Johnson, V.E., W. Stewart, and D.H. Smith, *Axonal pathology in traumatic brain injury*. Exp Neurol, 2013. **246**: p. 35-43.
42. Cepeda, S., et al., *Contrecoup Traumatic Intracerebral Hemorrhage: A Geometric Study of the Impact Site and Association with Hemorrhagic Progression*. J Neurotrauma, 2016. **33**(11): p. 1034-46.
43. Lee, B. and A. Newberg, *Neuroimaging in traumatic brain injury*. NeuroRx, 2005. **2**(2): p. 372-83.
44. McDonald, B.C., A.J. Saykin, and T.W. McAllister, *Functional MRI of mild traumatic brain injury (mTBI): progress and perspectives from the first decade of studies*. Brain Imaging Behav, 2012. **6**(2): p. 193-207.
45. Friedman, S.D., et al., *Quantitative proton MRS predicts outcome after traumatic brain injury*. Neurology, 1999. **52**(7): p. 1384-1384.
46. Brenner, T., et al., *Predicting neuropsychologic outcome after traumatic brain injury in children*. Pediatric Neurology, 2003. **28**(2): p. 104-114.
47. Dash, H.H. and S. Chavali, *Management of traumatic brain injury patients*. Korean J Anesthesiol, 2018. **71**(1): p. 12-21.
48. Wisner, D.H., L. Schuster, and C. Quinn, *Hypertonic saline resuscitation of head injury: effects on cerebral water content*. J Trauma, 1990. **30**(1): p. 75-8.
49. Wakai, A., I. Roberts, and G. Schierhout, *Mannitol for acute traumatic brain injury*. Cochrane Database Syst Rev, 2007(1): p. Cd001049.
50. Soustiel, J.F., E. Vlodaysky, and M. Zaaroor, *Relative effects of mannitol and hypertonic saline on calpain activity, apoptosis and polymorphonuclear infiltration in traumatic focal brain injury*. Brain Res, 2006. **1101**(1): p. 136-44.
51. van den Heuvel, C. and R. Vink, *The role of magnesium in traumatic brain injury*. Clin Calcium, 2004. **14**(8): p. 9-14.
52. Hoane, M.R., et al., *The behavioral effects of magnesium therapy on recovery of function following bilateral anterior medial cortex lesions in the rat*. Brain Res Bull, 2003. **60**(1-2): p. 105-14.
53. Gudeman, S.K., J.D. Miller, and D.P. Becker, *Failure of high-dose steroid therapy to influence intracranial pressure in patients with severe head injury*. J Neurosurg, 1979. **51**(3): p. 301-6.
54. Edwards, P., et al., *Final results of MRC CRASH, a randomised placebo-controlled trial of intravenous corticosteroid in adults with head injury-outcomes at 6 months*. Lancet, 2005. **365**(9475): p. 1957-9.
55. Alderson, P. and I. Roberts, *Corticosteroids for acute traumatic brain injury*. Cochrane Database Syst Rev, 2005. **2005**(1): p. Cd000196.
56. Maeda, T., S.M. Lee, and D.A. Hovda, *Restoration of cerebral vasoreactivity by an L-type calcium channel blocker following fluid percussion brain injury*. J Neurotrauma, 2005. **22**(7): p. 763-71.
57. Langham, J., et al., *Calcium channel blockers for acute traumatic brain injury*. Cochrane Database Syst Rev, 2003(4): p. Cd000565.

58. Sahuquillo, J. and F. Arikan, *Decompressive craniectomy for the treatment of refractory high intracranial pressure in traumatic brain injury*. Cochrane Database Syst Rev, 2006(1): p. Cd003983.
59. Roberts, I., *Barbiturates for acute traumatic brain injury*. Cochrane Database Syst Rev, 2000(2): p. Cd000033.
60. Markgraf, C.G., G.L. Clifton, and M.R. Moody, *Treatment window for hypothermia in brain injury*. J Neurosurg, 2001. **95**(6): p. 979-83.
61. Hellal, F., et al., *Detrimental role of bradykinin B2 receptor in a murine model of diffuse brain injury*. J Neurotrauma, 2003. **20**(9): p. 841-51.
62. Goss, C.W., S.W. Hoffman, and D.G. Stein, *Behavioral effects and anatomic correlates after brain injury: a progesterone dose-response study*. Pharmacol Biochem Behav, 2003. **76**(2): p. 231-42.
63. Wright, D.W., et al., *ProTECT: a randomized clinical trial of progesterone for acute traumatic brain injury*. Ann Emerg Med, 2007. **49**(4): p. 391-402, 402.e1-2.
64. Mayer, S.A., et al., *Recombinant activated factor VII for acute intracerebral hemorrhage*. N Engl J Med, 2005. **352**(8): p. 777-85.
65. Stein, D.M., et al., *Recombinant factor VIIa: decreasing time to intervention in coagulopathic patients with severe traumatic brain injury*. J Trauma, 2008. **64**(3): p. 620-7; discussion 627-8.
66. Hall, E.D., *Free radicals and CNS injury*. Crit Care Clin, 1989. **5**(4): p. 793-805.
67. Young, B., et al., *Effects of pegorgotein on neurologic outcome of patients with severe head injury. A multicenter, randomized controlled trial*. Jama, 1996. **276**(7): p. 538-43.
68. Jenkins, L.W., et al., *Increased vulnerability of the mildly traumatized rat brain to cerebral ischemia: the use of controlled secondary ischemia as a research tool to identify common or different mechanisms contributing to mechanical and ischemic brain injury*. Brain Res, 1989. **477**(1-2): p. 211-24.
69. Farrell, D. and A.A. Bendo, *Perioperative Management of Severe Traumatic Brain Injury: What Is New?* Current Anesthesiology Reports, 2018. **8**(3): p. 279-289.
70. Maas, A.I.R., N. Stocchetti, and R. Bullock, *Moderate and severe traumatic brain injury in adults*. The Lancet Neurology, 2008. **7**(8): p. 728-741.
71. Chiu, C.C., et al., *Neuroinflammation in animal models of traumatic brain injury*. J Neurosci Methods, 2016. **272**: p. 38-49.
72. Werner, C. and K. Engelhard, *Pathophysiology of traumatic brain injury*. BJA: British Journal of Anaesthesia, 2007. **99**(1): p. 4-9.
73. Chesnut, R.M., et al., *The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury*. J Trauma, 1993. **34**(2): p. 216-22.
74. Coles, J.P., et al., *Defining ischemic burden after traumatic brain injury using 15O PET imaging of cerebral physiology*. J Cereb Blood Flow Metab, 2004. **24**(2): p. 191-201.
75. Martin, N.A., et al., *Characterization of cerebral hemodynamic phases following severe head trauma: hypoperfusion, hyperemia, and vasospasm*. J Neurosurg, 1997. **87**(1): p. 9-19.
76. Kelly, D.F., et al., *Cerebral blood flow as a predictor of outcome following traumatic brain injury*. J Neurosurg, 1997. **86**(4): p. 633-41.

77. Lee, J.H., et al., *Carbon dioxide reactivity, pressure autoregulation, and metabolic suppression reactivity after head injury: a transcranial Doppler study*. J Neurosurg, 2001. **95**(2): p. 222-32.
78. Hlatky, R., et al., *Dynamic autoregulatory response after severe head injury*. 2002. **97**(5): p. 1054.
79. Stiefel, M.F., et al., *Reduced mortality rate in patients with severe traumatic brain injury treated with brain tissue oxygen monitoring*. J Neurosurg, 2005. **103**(5): p. 805-11.
80. Rose, J.C., T.A. Neill, and J.C. Hemphill, 3rd, *Continuous monitoring of the microcirculation in neurocritical care: an update on brain tissue oxygenation*. Curr Opin Crit Care, 2006. **12**(2): p. 97-102.
81. Verweij, B.H., et al., *Impaired cerebral mitochondrial function after traumatic brain injury in humans*. J Neurosurg, 2000. **93**(5): p. 815-20.
82. Unterberg, A.W., et al., *Edema and brain trauma*. Neuroscience, 2004. **129**(4): p. 1021-9.
83. Udomphorn, Y., W.M. Armstead, and M.S. Vavilala, *Cerebral blood flow and autoregulation after pediatric traumatic brain injury*. Pediatr Neurol, 2008. **38**(4): p. 225-34.
84. Eldadah, B.A. and A.I. Faden, *Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury*. J Neurotrauma, 2000. **17**(10): p. 811-29.
85. Choi, D.W., *Ischemia-induced neuronal apoptosis*. Curr Opin Neurobiol, 1996. **6**(5): p. 667-72.
86. Potts, M.B., et al., *Traumatic injury to the immature brain: inflammation, oxidative injury, and iron-mediated damage as potential therapeutic targets*. NeuroRx, 2006. **3**(2): p. 143-53.
87. Lucas, S.M., N.J. Rothwell, and R.M. Gibson, *The role of inflammation in CNS injury and disease*. Br J Pharmacol, 2006. **147 Suppl 1**(Suppl 1): p. S232-40.
88. Le Roux, P., *Frontiers in Neuroscience Intracranial Pressure Monitoring and Management*, in *Translational Research in Traumatic Brain Injury*, D. Laskowitz and G. Grant, Editors. 2016, CRC Press/Taylor and Francis Group
- © 2016 by Taylor & Francis Group, LLC.: Boca Raton (FL).
89. Farahvar, A., et al., *Increased mortality in patients with severe traumatic brain injury treated without intracranial pressure monitoring*. 2012. **117**(4): p. 729.
90. Nag, D.S., et al., *Intracranial pressure monitoring: Gold standard and recent innovations*. World J Clin Cases, 2019. **7**(13): p. 1535-1553.
91. Bor-Seng-Shu, E., et al., *Decompressive craniectomy: a meta-analysis of influences on intracranial pressure and cerebral perfusion pressure in the treatment of traumatic brain injury*. 2012. **117**(3): p. 589.
92. Vella, M.A., M.L. Crandall, and M.B. Patel, *Acute Management of Traumatic Brain Injury*. Surg Clin North Am, 2017. **97**(5): p. 1015-1030.
93. Schreckinger, M. and D.W. Marion, *Contemporary Management of Traumatic Intracranial Hypertension: Is There a Role for Therapeutic Hypothermia?* Neurocritical Care, 2009. **11**(3): p. 427-436.

94. Berger, S., et al., *Reduction of Post-traumatic Intracranial Hypertension by Hypertonic/Hyperoncotic Saline/Dextran and Hypertonic Mannitol*. Neurosurgery, 1995. **37**(1): p. 98-108.
95. DiSabato, D.J., N. Quan, and J.P. Godbout, *Neuroinflammation: the devil is in the details*. J Neurochem, 2016. **139 Suppl 2**(Suppl 2): p. 136-153.
96. Song, L., et al., *NLRP3 Inflammasome in Neurological Diseases, from Functions to Therapies*. Frontiers in Cellular Neuroscience, 2017. **11**(63).
97. Singhal, G., et al., *Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: a focused review*. Front Neurosci, 2014. **8**: p. 315.
98. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschoopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 417-26.
99. Compan, V., et al., *Apoptosis-Associated Speck-like Protein Containing a CARD Forms Specks but Does Not Activate Caspase-1 in the Absence of NLRP3 during Macrophage Swelling*. The Journal of Immunology, 2014.
100. Zahid, A., et al., *Pharmacological Inhibitors of the NLRP3 Inflammasome*. Frontiers in Immunology, 2019. **10**(2538).
101. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 428-35.
102. Zheng, D., T. Liwinski, and E. Elinav, *Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms*. Cell Discovery, 2020. **6**(1): p. 36.
103. Voet, S., et al., *Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases*. EMBO Molecular Medicine, 2019. **11**(6): p. e10248.
104. Alvarez, J.I., et al., *The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence*. Science, 2011. **334**(6063): p. 1727-31.
105. Bossù, P., et al., *Interleukin-18, from neuroinflammation to Alzheimer's disease*. Curr Pharm Des, 2010. **16**(38): p. 4213-24.
106. Ferrari, C., et al., *Ferrari CC, Depino AM, Prada F, Muraro N, Campbell S, Podhajcer O, Perry VH, Anthony DC, Pitossi FJ. Reversible demyelination, blood-brain barrier breakdown, and pronounced neutrophil recruitment induced by chronic IL-1 expression in the brain*. The American journal of pathology, 2004. **165**: p. 1827-37.
107. Fogal, B., et al., *System x(c)- activity and astrocytes are necessary for interleukin-1 beta-mediated hypoxic neuronal injury*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2007. **27**(38): p. 10094-10105.
108. Liu, H.D., et al., *Expression of the NLRP3 inflammasome in cerebral cortex after traumatic brain injury in a rat model*. Neurochem Res, 2013. **38**(10): p. 2072-83.
109. de Rivero Vaccari, J.P., et al., *Therapeutic neutralization of the NLRP1 inflammasome reduces the innate immune response and improves histopathology after traumatic brain injury*. J Cereb Blood Flow Metab, 2009. **29**(7): p. 1251-61.
110. de Rivero Vaccari, J.P., W.D. Dietrich, and R.W. Keane, *Activation and regulation of cellular inflammasomes: gaps in our knowledge for central nervous system injury*. J Cereb Blood Flow Metab, 2014. **34**(3): p. 369-75.

111. Barclay, W. and M.L. Shinohara, *Inflammasome activation in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)*. Brain Pathol, 2017. **27**(2): p. 213-219.
112. Lang, Y., et al., *Role of Inflammasomes in Neuroimmune and Neurodegenerative Diseases: A Systematic Review*. Mediators Inflamm, 2018. **2018**: p. 1549549.
113. Inoue, M. and M.L. Shinohara, *The role of interferon- β in the treatment of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis - in the perspective of inflammasomes*. Immunology, 2013. **139**(1): p. 11-8.
114. Ioannides, Z.A., et al., *When does ALS start? A novel SOD-1 p.Gly142Arg mutation causing motor neurone disease with prominent premorbid cramps and spasms*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2016. **87**(9): p. 1031-2.
115. Zhou, R., et al., *A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation*. Nature, 2011. **469**(7329): p. 221-225.
116. Johann, S., et al., *NLRP3 inflammasome is expressed by astrocytes in the SOD1 mouse model of ALS and in human sporadic ALS patients*. Glia, 2015. **63**(12): p. 2260-73.
117. Wei, J., et al., *IL-1 beta but not the NALP3 inflammasome is an important determinant of endothelial cell responses to necrotic/dangerous trophoblastic debris*. Placenta, 2015. **36**(12): p. 1385-92.
118. Shi, F., et al., *The NALP3 inflammasome is involved in neurotoxic prion peptide-induced microglial activation*. J Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 73.
119. Yang, F., et al., *NLRP3 deficiency ameliorates neurovascular damage in experimental ischemic stroke*. J Cereb Blood Flow Metab, 2014. **34**(4): p. 660-7.
120. Shao, A., et al., *Hydrogen-Rich Saline Attenuated Subarachnoid Hemorrhage-Induced Early Brain Injury in Rats by Suppressing Inflammatory Response: Possible Involvement of NF- κ B Pathway and NLRP3 Inflammasome*. Mol Neurobiol, 2016. **53**(5): p. 3462-3476.
121. Ma, Q., et al., *NLRP3 inflammasome contributes to inflammation after intracerebral hemorrhage*. Ann Neurol, 2014. **75**(2): p. 209-19.
122. Saresella, M., et al., *The NLRP3 and NLRP1 inflammasomes are activated in Alzheimer's disease*. Molecular Neurodegeneration, 2016. **11**(1): p. 23.
123. Tan, M.S., et al., *The NLRP3 inflammasome in Alzheimer's disease*. Mol Neurobiol, 2013. **48**(3): p. 875-82.
124. Heneka, M.T., et al., *NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice*. Nature, 2013. **493**(7434): p. 674-8.
125. Liu, L. and C. Chan, *The role of inflammasome in Alzheimer's disease*. Ageing Research Reviews, 2014. **15**: p. 6-15.
126. Poewe, W., et al., *Parkinson disease*. Nature Reviews Disease Primers, 2017. **3**(1): p. 17013.
127. Kim, S., et al., *Transneuronal Propagation of Pathologic α -Synuclein from the Gut to the Brain Models Parkinson's Disease*. Neuron, 2019. **103**(4): p. 627-641.e7.
128. Raghavendra Rao, V.L., et al., *Traumatic brain injury-induced acute gene expression changes in rat cerebral cortex identified by GeneChip analysis*. J Neurosci Res, 2003. **71**(2): p. 208-19.

129. Lu, D., et al., *Atorvastatin reduces neurological deficit and increases synaptogenesis, angiogenesis, and neuronal survival in rats subjected to traumatic brain injury*. J Neurotrauma, 2004. **21**(1): p. 21-32.
130. Ross, S.A., et al., *The presence of tumour necrosis factor in CSF and plasma after severe head injury*. British Journal of Neurosurgery, 1994. **8**(4): p. 419-425.
131. Maas, A.I., et al., *Efficacy and safety of dexamethasone in severe traumatic brain injury: results of a phase III randomised, placebo-controlled, clinical trial*. Lancet Neurol, 2006. **5**(1): p. 38-45.
132. Kelso, M.L. and H.E. Gendelman, *Bridge between neuroimmunity and traumatic brain injury*. Curr Pharm Des, 2014. **20**(26): p. 4284-98.
133. Murray, K.N., A.R. Parry-Jones, and S.M. Allan, *Interleukin-1 and acute brain injury*. Front Cell Neurosci, 2015. **9**: p. 18.
134. Sofroniew, M.V., *Astroglialosis*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. **7**(2): p. a020420.
135. Sofroniew, M.V. and H.V. Vinters, *Astrocytes: biology and pathology*. Acta Neuropathol, 2010. **119**(1): p. 7-35.
136. Kang, W. and J.M. Hébert, *Signaling pathways in reactive astrocytes, a genetic perspective*. Mol Neurobiol, 2011. **43**(3): p. 147-54.
137. Carniglia, L., et al., *Neuropeptides and Microglial Activation in Inflammation, Pain, and Neurodegenerative Diseases*. Mediators of Inflammation, 2017. **2017**: p. 5048616.
138. Kumar, A. and D.J. Loane, *Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention*. Brain Behav Immun, 2012. **26**(8): p. 1191-201.
139. Endo, F., O. Komine, and K. Yamanaka, *Neuroinflammation in motor neuron disease*. Clinical and Experimental Neuroimmunology, 2016. **7**(2): p. 126-138.
140. O'Brien, W.T., et al., *The NLRP3 inflammasome in traumatic brain injury: potential as a biomarker and therapeutic target*. Journal of Neuroinflammation, 2020. **17**(1): p. 104.
141. Beschorner, R., et al., *Differential regulation of the monocytic calcium-binding peptides macrophage-inhibiting factor related protein-8 (MRP8/S100A8) and allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) following human traumatic brain injury*. Acta Neuropathol, 2000. **100**(6): p. 627-34.
142. Jantzie, L.L. and K.G. Todd, *Doxycycline inhibits proinflammatory cytokines but not acute cerebral cytotogenesis after hypoxia-ischemia in neonatal rats*. J Psychiatry Neurosci, 2010. **35**(1): p. 20-32.
143. Jantzie, L.L., P.-Y. Cheung, and K.G. Todd, *Doxycycline Reduces Cleaved Caspase-3 and Microglial Activation in An Animal Model of Neonatal Hypoxia-Ischemia*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2005. **25**(3): p. 314-324.
144. Henehan, M., M. Montuno, and A. De Benedetto, *Doxycycline as an anti-inflammatory agent: updates in dermatology*. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2017. **31**(11): p. 1800-1808.
145. Yang, F., et al., *Pharmacokinetics of doxycycline in laying hens after intravenous and oral administration*. British Poultry Science, 2016. **57**(4): p. 576-580.
146. Stechmiller, J., L. Cowan, and G. Schultz, *The role of doxycycline as a matrix metalloproteinase inhibitor for the treatment of chronic wounds*. Biol Res Nurs, 2010. **11**(4): p. 336-44.

147. Huang, Y., et al., *Doxycycline up-regulates the expression of IL-6 and GM-CSF via MAPK/ERK and NF- κ B pathways in mouse thymic epithelial cells*. *Int Immunopharmacol*, 2011. **11**(9): p. 1143-9.
148. Song, X., et al., *Cyclooxygenase-2, Player or Spectator in Cyclooxygenase-2 Inhibitor-Induced Apoptosis in Prostate Cancer Cells*. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 2002. **94**(8): p. 585-591.
149. Amin, A.R., et al., *Post-transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA in murine macrophages by doxycycline and chemically modified tetracyclines*. *FEBS Letters*, 1997. **410**(2): p. 259-264.
150. Paldino, E., et al., *Neuroprotective Effects of Doxycycline in the R6/2 Mouse Model of Huntington's Disease*. *Molecular Neurobiology*, 2020. **57**(4): p. 1889-1903.
151. Ahler, E., et al., *Doxycycline alters metabolism and proliferation of human cell lines*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e64561.
152. Xu, S., et al., *Doxycycline inhibits NAct Leucine-rich repeat Protein 3 inflammasome activation and interleukin-1 β production induced by Porphyromonas gingivalis-lipopolysaccharide and adenosine triphosphate in human gingival fibroblasts*. *Archives of Oral Biology*, 2019. **107**: p. 104514.
153. Zhang, W., et al., *Doxycycline Attenuates Leptospira-Induced IL-1 β by Suppressing NLRP3 Inflammasome Priming*. *Frontiers in Immunology*, 2017. **8**(857).
154. Clark, W.M., et al., *Doxycycline treatment reduces ischemic brain damage in transient middle cerebral artery occlusion in the rat*. *Journal of Molecular Neuroscience*, 1997. **9**(2): p. 103-108.
155. Bonnetblanc, J.M., *[Doxycycline]*. *Ann Dermatol Venereol*, 2002. **129**(6-7): p. 874-82.
156. Malek, A.E., B.P. Granwehr, and D.P. Kontoyiannis, *Doxycycline as a potential partner of COVID-19 therapies*. *IDCases*, 2020. **21**: p. e00864.
157. Bernardino, A.L.F., D. Kaushal, and M.T. Philipp, *The Antibiotics Doxycycline and Minocycline Inhibit the Inflammatory Responses to the Lyme Disease Spirochete Borrelia burgdorferi*. *The Journal of Infectious Diseases*, 2009. **199**(9): p. 1379-1388.
158. Sulhan, S., et al., *Neuroinflammation and blood-brain barrier disruption following traumatic brain injury: Pathophysiology and potential therapeutic targets*. *Journal of Neuroscience Research*, 2020. **98**(1): p. 19-28.
159. Dadas, A., et al., *Biomarkers in traumatic brain injury (TBI): a review*. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2018. **14**: p. 2989-3000.
160. Ma, X., et al., *Animal Models of Traumatic Brain Injury and Assessment of Injury Severity*. *Molecular Neurobiology*, 2019. **56**(8): p. 5332-5345.
161. Kolaczowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(3): p. 159-75.
162. Soares, H.D., et al., *Inflammatory leukocytic recruitment and diffuse neuronal degeneration are separate pathological processes resulting from traumatic brain injury*. *J Neurosci*, 1995. **15**(12): p. 8223-33.
163. Carlos, T.M., et al., *Expression of endothelial adhesion molecules and recruitment of neutrophils after traumatic brain injury in rats*. *J Leukoc Biol*, 1997. **61**(3): p. 279-85.

164. Schwarzmaier, S.M. and N. Plesnila, *Contributions of the immune system to the pathophysiology of traumatic brain injury - evidence by intravital microscopy*. Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 358.
165. Baethmann, A., et al., *Mediators of brain edema and secondary brain damage*. Crit Care Med, 1988. **16**(10): p. 972-8.
166. *Effect of Interleukin-1 on Traumatic Brain Injury–Induced Damage to Hippocampal Neurons*. Journal of Neurotrauma, 2005. **22**(8): p. 885-895.
167. Diomede, L., et al., *Tetracycline and its analogues protect Caenorhabditis elegans from β amyloid-induced toxicity by targeting oligomers*. Neurobiol Dis, 2010. **40**(2): p. 424-31.
168. Santa-Cecília, F.V., et al., *The Neuroprotective Effect of Doxycycline on Neurodegenerative Diseases*. Neurotoxicity Research, 2019. **35**(4): p. 981-986.
169. Santa-Cecília, F.V., et al., *Doxycycline Suppresses Microglial Activation by Inhibiting the p38 MAPK and NF- κ B Signaling Pathways*. Neurotox Res, 2016. **29**(4): p. 447-59.
170. Malek, A.J., et al., *Doxycycline improves traumatic brain injury outcomes in a murine survival model*. Journal of Trauma and Acute Care Surgery, 9000. **Publish Ahead of Print**.
171. Ohsawa, K., et al., *Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity*. J Neurochem, 2004. **88**(4): p. 844-56.
172. Donat, C.K., et al., *Microglial Activation in Traumatic Brain Injury*. Front Aging Neurosci, 2017. **9**: p. 208.
173. Norden, D.M., et al., *Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge*. Glia, 2016. **64**(2): p. 300-316.
174. Tanaka, T., M. Narazaki, and T. Kishimoto, *IL-6 in inflammation, immunity, and disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. **6**(10): p. a016295.
175. Wang, N., et al., *Low dose doxycycline decreases systemic inflammation and improves glycemic control, lipid profiles, and islet morphology and function in db/db mice*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 14707.
176. Krakauer, T. and M. Buckley, *Doxycycline is anti-inflammatory and inhibits staphylococcal exotoxin-induced cytokines and chemokines*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(11): p. 3630-3.