

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
ADLİ TIP ANABİLİM DALI

TEKRARLANAN TRAVMATİK BEYİN HASARI
VE
ERKEN DÖNEM APOPTOZ SÜRECİ

Dr. Mehmet Ali MALKOÇ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nadir ARICAN

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL
2014

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
ADLİ TIP ANABİLİM DALI

TEKRARLANAN TRAVMATİK BEYİN HASARI
VE
ERKEN DÖNEM APOPTOZ SÜRECİ

Dr. Mehmet Ali MALKOÇ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nadir ARICAN

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL
2014

TEŞEKKÜR

Sağlıklı ve bağımsız bir düşünce yapısıyla derin bir bilgi birikimine sahip olduğuna inandığım; benim gözümde otoriteden çok uzak bir öğretmen ve “üstat” olan İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı Başkanı ve aynı zamanda tez danışman hocam Prof. Dr. Nadir Arıcan’a,

Kürsümüzdeki hocaları ve biz yeni nesilleri yetiştiren, çalışma azmine hayran olduğum hocaların hocası, uluslararası boyutta bir akademisyen olan Prof. Dr. Şebnem Korur Fincancı’ya,

Her zaman güler yüzü ile çevresine pozitif enerji dağıtan, bir gün olsun sinirlendiğini görmediğim ve kendisinden çok şey öğrendiğim Prof. Dr. Şevki Sözen’e,

Yaptığımız hataları dahi savunmamız ve karakterli davranmamız gerektiğini düşünen ve çizgisinden bir gün olsun ödün vermediğine şahit olduğum Prof. Dr. Nevzat Alkan’a,

İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Müdürü olduğu için kendisi ile fazla bir klinik deneyim yaşayamadığım ancak deneysel çalışmalara başlarken bilgisinden oldukça faydalandığım Prof. Dr. İmdat Elmas’a,

Uzun bir dönem Adli Tıp Kurumu Başkanlığı görevini üstlendiği için sadece son bir yıl beraber çalıştığımız, deneyim ve bilgilerini bizlerle paylaşan Prof. Dr. Haluk İnce’ye,

Adli Tıp Anabilim Dalı’mızda çalışan ve ruhsal travma konusunda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığımız Klinik Psikolog Doç. Dr. Ufuk Sezgin’e,

Asistanlığımız boyunca birlikte çalıştığımız Uzm. Dr. Birgül Tüzün, Uzm. Dr. Cüneyt Destan Cenger, Uzm. Dr. Atiye Sözen’e,

Çalışma arkadaşlarım, canlarım, dostlarım; İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı’nın lokomotifleri olduğunu düşündüğüm Dr. Erenç Dokudan, Dr. Burcu Zengin, Dr. Zuhale Uzunyayla, Dr. Mustafa Göktepe, Dr. Muhammed Er ve Dr. Bilgin Payze’ye; Psikolog arkadaşlarımız Merve Çakıroğlu, Burcu Buğu ve Birgül Haznedaroğlu’na,

Tez danışman hocam ile adli tıp anabilim dalı laboratuvarında deneysel çalışmalar yapan; kendisini ilme, bilime, araştırmaya adanmış, benim gözümde sabır timsali, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mehmet Kaya’ya,

Laboratuvarında birlikte çalıştığımız dostum, sırdaşım, çalışkanlığını her zaman takdir ettiğim, üzgün anlarımda yüzümü güldüren, deneyleri birlikte yaptığımız DETAE Sinirbilim Anabilim Dalı’nın değerli taze hocası Dr. Nurcan Orhan’a, birlikte çok vakit geçirdiğimiz ve deneylerde yardımlarını eksik etmeyen Arş. Gör. Canan Uğur Yılmaz’a,

Çalışmamıza verdikleri destekler için; İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Bülent Ahışhalı ve onun değerli öğrencileri Dr. Sümeyye Özyaman ve Dr. Hüseyin Ümit Özdemir ‘e, Patoloji Anabilim Dalı’nın çok değerli ve güler yüzlü hocası Prof. Dr. Bilge Bilgiç’e,

Onlarla birlikte çok kıymetli bilgi ve tecrübeler edindiğim, Adli Tıp Uzmanları Derneği çatısı altında tanıdığım Prof. Dr. Ümit Biçer başta olmak üzere tüm adli tıp uzman ve hocalarına çok teşekkür ederim.

Tezimi, beraber olduğumuz günden beri beni her zaman anlayan, bana her konuda destek olan biricik eşim Ezgi Malkoç ve biricik evladımız Eren Ali Malkoç’a ithaf etmek isterim.

Bu çalışma, İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 41052

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ŞEKİLER LİSTESİ.....	IV
RESİMLER LİSTESİ.....	V
GRAFİK VE TABLOLAR LİSTESİ.....	VI
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Travmatik Beyin Hasarı.....	6
2.1.1. Epidemiyoloji.....	6
2.1.2. Çocuklarda Travmatik Beyin Hasarı.....	7
2.1.3. Travma Şiddeti ve Travmatik Beyin Hasarı İlişkisi.....	8
2.1.4.Kafa Travmasının Fizyopatolojisi.....	10
2.2. Apoptoz.....	12
2.2.1. Apoptotik Süreç.....	13
2.2.2. Apoptozun Regülasyonu.....	16
2.3. Travmatik Beyin Hasarı ve Apoptoz İlişkisi.....	17
2.3.1. Travmatik Beyin Hasarı Kliniği'nde Apoptoz.....	18
2.3.2. Adli Tıbbi Açıdan Travmatik Beyin Hasarında Apoptoz.....	19
2.3.3. Travmatik Beyin Hasarı, Apoptoz ve Epileptogenez İlişkisi.....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	22
3.1. Deney Grupları.....	22
3.2. Kafa Travması Modeli.....	22
3.3. Düşük Doz Pentilentetrazol Uygulaması.....	23
3.4. Nöbet Aktivitesinin Değerlendirilmesi.....	23
3.5. Beyin Doku Fiksasyonu.....	23
3.6. Hematoksilen Eozin Boyama ile Morfolojik İnceleme.....	23
3.7. İmmunhistokimyasal Yöntemler.....	23
3.7.1. TUNEL İmmunhistokimyasal Boyama.....	23
3.7.2. Kaspaz-3, Bcl-2, GFAP ve c-fos immunhistokimyasal Boyama.....	24

3.8. Gen Ekspresyonu.....	25
3.8.1. Total RNA İzolasyonu.....	25
3.8.2. Total RNA'dan Komplementer DNA Sentezi.....	25
3.8.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	26
3.8.4. İstatistiksel Değerlendirme	26
4. BULGULAR.....	27
4.1. Nöbet Aktivitesinin Değerlendirilmesi.....	27
4.2. Hematoksilen Eozin Boyama ile Morfolojik Değerlendirme.....	27
4.3. İmmunhistokimyasal Değerlendirme.....	28
4.3.1. TUNEL İmmunhistokimyasal Boyanmanın Değerlendirilmesi.....	28
4.3.2. Kaspaz-3 İmmunhistokimyasal Boyanmanın Değerlendirilmesi.....	30
4.3.3. Bcl-2 İmmunhistokimyasal Boyanmanın Değerlendirilmesi.....	32
4.3.4. GFAP İmmunhistokimyasal Boyanmanın Değerlendirilmesi.....	34
4.3.5. c-fos İmmunhistokimyasal Boyanmanın Değerlendirilmesi.....	36
4.4. Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi.....	38
4.4.1. Kaspaz-3 Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi.....	38
4.4.2. Bcl-2 Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi.....	39
5. TARTIŞMA.....	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	48
KAYNAKLAR.....	50
ÖZGEÇMİŞ	63
KATILDIĞI KONGRE, SEMPOZYUM, EĞİTİM VE ÇALIŞMALAR.....	64

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Kapalı kafa travmasının şematik gösterimi (Hickey JV. 2014).....	10
Şekil 2: Morfolojik olarak nekroz ve apoptozun şematik karşılaştırılması (Borgens ve Liu-Snyder, 2012).....	12
Şekil 3: Apoptoz mekanizması (Bayır ve Kagan. 2008).....	13
Şekil 4: Apoptotik süreçte Fas-FasL etkileşimi (Zhao ve ark. 2009).....	14
Şekil 5: CAD bağımlı apoptotik DNA fragmentasyonu (Nagata, 2000).....	15
Şekil 6: Mitokondri membran geçirgenliği (MMG) (Hagberg ve ark. 2009).....	16
Şekil 7: Travmatik beyin hasarı patogenezi (Kurul ve Gülmez. 2007).....	17
Şekil 8: İstemi, TBH ve nöbetin Bcl-2 ailesi üzerine etkisi (Engel ve ark. 2011).....	21
Şekil 9: Kafa Travması Modeli.....	22
Şekil 10: Kaspaz-3 gen ekspresyon amplifikasyon ve standart eğrileri.....	38
Şekil 11: Bcl-2 gen ekspresyon amplifikasyon ve standart eğrileri.....	39

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1: Deney gruplarına ait beyin kesitlerinin korteks bölgelerinde H&E boyama (4X)...	27
Resim 2: Beyin korteks bölgelerinde TUNEL immun boyanma görüntüleri (100X).....	28
Resim 3: Beyin hipokampus bölgelerinde TUNEL immun boyanma görüntüleri (100X)....	29
Resim 4: Beyin korteks bölgelerinde kaspaz-3 immun boyanma görüntüleri (100X).....	30
Resim 5: Beyin hipokampus bölgelerinde kaspaz-3 immun boyanma görüntüleri (100X)....	31
Resim 6: Beyin korteks bölgelerinde Bcl-2 immun boyanma görüntüleri (100X).....	32
Resim 7: Beyin hipokampus bölgelerinde Bcl-2 immun boyanma görüntüleri (100X).....	33
Resim 8: Beyin korteks bölgelerinde GFAP immun boyanma görüntüleri (100X).....	34
Resim 9: Beyin hipokampus bölgelerinde GFAP immun boyanma görüntüleri (100X).....	35
Resim 10: Beyin korteks bölgelerinde c-fos immun boyanma görüntüleri (100X).....	36
Resim 11: Beyin hipokampus bölgelerinde c-fos immun boyanma görüntüleri (40X).....	37

GRAFİK VE TABLolar LİSTESİ

Grafik 1: Deney gruplarına ait kaspaz-3 gen ekspresyon düzeyleri.....	38
Grafik 2: Deney gruplarına ait Bcl-2 gen ekspresyon düzeyleri.....	39
Tablo 1: Deney gruplarına ait TUNEL immunboyanma şiddeti.....	29
Tablo 2: Deney gruplarına ait kaspaz-3 immunboyanma şiddeti.....	31
Tablo 3: Deney gruplarına ait Bcl-2 immunboyanma şiddeti.....	33
Tablo 4: Deney gruplarına ait GFAP immunboyanma şiddeti.....	35
Tablo 5: Deney gruplarına ait c-fos immunboyanma şiddeti.....	37

ÖZET

Amaçlar: Tekrarlanan Travmatik Beyin Hasarı (T-TBH) sonrası beyin korteks ve hipokampus bölgelerinde meydana gelen apoptotik hücre ölümlerinin araştırılması, TBH'ya sekonder nöbetler ile apoptoz ilişkisinin aydınlatılması amaçlanmaktadır.

Gereç ve yöntemler: Çalışmada 28 günlük Sprague Dawley yavru sıçanlar kullanıldı. Sham, T-TBH, düşük doz Pentilentetrazol (dd-PTZ) ve T-TBH+dd-PTZ grupları oluşturuldu. T-TBH sonrası düşük doz PTZ ile sıçanlarda nöbet gelişip gelişmediği değerlendirildi. Tüm grupların beyin kesitlerinde Hematoksilen Eozin boyama ile birlikte; TUNEL, kaspaz-3, Bcl-2, GFAP ve c-fos immunhistokimyasal boyamalar yapıldı. Beyin korteks bölgeleri izole edilerek Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile kaspaz-3 ve Bcl-2 gen ekspresyon düzeyleri tayin edildi. İmmunhistokimyasal boyanmalar yarı kantitatif olarak değerlendirilerek gruplar arası karşılaştırma yapıldı. Gen ekspresyon düzeyleri SPSS 21 programı ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

Bulgular: Yavru sıçanlarda normalde nöbetlere sebep olmayan dd-PTZ sonrası Racine Skorlamasına göre ortalama 3.3 değerinde nöbetler gözlemlendi. T-TBH ve dd-PTZ uygulaması sonrasında alınan beyin kesitlerinde TUNEL, kaspaz-3 ve Bcl-2 immunreaktivitesinin arttığı; kaspaz-3 ve Bcl-2 gen ekspresyon düzeylerinin sham grubuna göre anlamlı düzeyde yükseldiği belirlendi. T-TBH sonrası beyin korteks ve hipokampusta apoptotik hücre ölümlerinin meydana geldiği ve dokuda apoptoza cevap olarak Bcl-2 üretiminin yükseldiği tespit edildi. T-TBH+dd-PTZ grubunda ise paradoksal olarak hem immunreaktivitelere hem de gen ekspresyon düzeylerinde azalma meydana geldi. GFAP ve c-fos immunreaktivitesi değerlendirildiğinde sham grubuna göre diğer tüm gruplarda boyanmanın arttığı, hipokampus bölgesindeki nöronların travmaya ve travma sonrası nöbetlere daha hassas olduğu tespit edildi. Hem korteks hem de hipokampus bölgelerinde travmaya sekonder olarak astrosit ve nöronal hücre aktivasyonun arttığı tespit edildi.

Sonuç: T-TBH yavru sıçanlarda nöbet eşiğini düşürmekte; beynin korteks ve hipokampus bölgelerinde apoptotik hücre ölümlerine sebep olmaktadır.

Anahtar kelimeler: Apoptoz, Bcl-2, kaspaz-3, travmatik beyin hasarı, nöbet, PTZ, TUNEL

ABSTRACT

AIMS: This study aims to research the apoptotic cell death that occurs in brain cortex and hippocampus region following repetitive traumatic brain injuries (R-TBI) and to brighten the relationship between secondary seizure after TBI and apoptosis.

Materials and Methods: Sprague Dawley 28 daily young rats are used in this study. The groups of Sham, R-TBI, low concentration pentylenetetrazole (lc-PTZ) and R-TBI+lc-PTZ are formed. Whether convulsion occurs or not on rat low concentrated PTZ post R-TBI is evaluated. The staining of hematoxyline and eosin as well as TUNNEL, caspase-3, Bcl-2, GFAP and c-fos immunohistochemistry staining are applied. After the extraction of brain cortex region, Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), *Caspase-3* and *Bcl-2* gene expression levels are detected. Immunohistochemistry stainings are compared as semi-quantitative evaluating between the groups. Gene expression levels are analyzed with the SPSS21 statistical programme.

Findings: According to Racine scores young rats are observed the average 3.3 which normally not causative for convulsion in post lc-PZT. On the brain sections that are gotten after the application of R-TBI and lc-PTZ, the increase of TUNNEL, *caspase-3*, *Bcl-2* immunoreactivity and also observed the significant increase of caspase3 and Bcl-2 gene expression levels according to Sham group are determined. The increase of Bcl-2 production is detected the occurrence of the apoptotic cell deaths and as a response of the apoptosis in brain cortex and hippocampus in post R-TBI. Nevertheless immunoreactivities and the gene expression levels are paradoxically decreased in R-TBI + dd-PTZ group. When we evaluate GFAP and c-fos immunoreactivity, it is detected the increase of the staining in all groups according to Sham group and the neurons in hippocampus region are more sensitive for the convulsion trauma and post trauma. It is fixed the increase of astrocyte and neuronal cell activation as secondary in either cortex or hippocampus region trauma.

Result: R-TBI decreases seizure threshold in young rats and causes apoptotic cell deaths in cortex and hippocampus region of the brain.

Key Words: Apoptosis, Bcl-2, Caspase-3, Traumatic brain injury, seizure, PTZ, TUNNEL.

1 – GİRİŞ ve AMAÇ

Travma, uygulamada sık karşılaşılan, farklı açılardan bir çok tıp disiplinini ilgilendiren ve multidisipliner yaklaşım gerektiren durumlardandır. Kafaya yönelik travmalar, sık görülen travma tiplerinden olup hem tıbbi (klinik, laboratuvar çalışmaları ve adli tıp uygulamalarında) hem de sosyal ve ekonomik boyutu ile güncelliğini korumakta ve bu konuda araştırmalar sürmektedir.

Trafik kazaları, ateşli silah yaralanmaları, yüksekten düşme, aile içi şiddet, kadına yönelik şiddet, kafa travması şeklinde çocuk istismarı, sarsılmış bebek sendromu, iş kazaları, afetler gibi birçok orijini olması nedeniyle TBH, hastane kliniklerinde sıkça karşılaşılan sağlık sorunlarındandır. Ağırılık derecesine (ağır, orta, hafif), açık veya kapalı olmasına, yaygın doku harabiyeti meydana getirip getirmediğine bağlı olarak çok geniş bir klinik prezentasyonla karşımıza çıkmaktadır (Broska ve ark., 2013; Mauritz ve ark., 2014; Wui ve ark., 2014)

TBH, adli tıp açısından değerlendirildiğinde, hem klinik adli tıbbi uygulamalarının hem de post-mortem adli patolojik incelemelerin önemli konularından ve sorun alanlarından biridir. TBH, acil servise kafa travması ile başvuran adli olguların raporlandırılması, kafa travması şeklinde fiziksel istismara maruz kalan bebek, çocuk ve yaşlı bireylerin saptanması (Richardson ve ark., 2012; Cheng ve ark., 2014) otopside kafa travmalarının makroskobik ve mikroskobik bulgularının değerlendirilmesi (Bisht ve ark., 2013; Smith ve ark., 2013) travma zamanı ile lezyon yaşının karşılaştırılması (Hausmann ve ark., 2004; Dressler ve ark., 2007), adli antropolojide kafa kemiklerindeki lezyonların tespiti (Fleming-Farrell ve ark., 2013; Messina ve ark. 2013), kemik kırıklarının TBH'ya sebep olup olmadıklarının araştırılması (Chattopadhyay ve ark., 2010), maluliyet oranlarının hesaplanması, geç döneme etkilerinin değerlendirilmesine kadar (Misic-Pavkov ve ark., 2012) adli tıbbi uygulamalar içinde çok geniş bir yelpazede araştırma konusudur. Dolayısıyla, TBH tespitinin yanı sıra ağırılık derecesi, erken ve geç dönem etkilerinin de adli tıp açısından değerlendirilmesi gerekmektedir.

TBH, travmanın post-mortem incelemelerde makroskobik olarak tespit edilemeyen, ileri incelemelerle tespit edilebilen ve histopatolojik incelemeler sonucu belirlenebilen minör

kontüzyona da sebep olması nedeniyle, beyin otopsilerinde detaylı olarak araştırılması gerekmektedir. (Bigler, 2004; Karayel ve ark., 2008; Coughlin ve ark., 2014)

Hayvanlarda tekrarlanan travma modelleri ile T-TBH'nın motor koordinasyonda ve lokomotor aktivitelerde bozulmalara neden olduğu; histopatolojik değerlendirmelerde astrosit aktivasyonu, mikrogliyal hücre proliferasyonu, kan beyin bariyerinde (KBB) hasar ve beyin dokuda yaygın ödeme yol açtığı bildirilmiştir (Kane ve ark., 2012). Boks ve Amerikan futbolu gibi tekrarlanan travmalara sebep olan kontakt sporlar, ilerleyen dönemlerde kronik travmatik ensefalopatiye neden olmaktadır (Solomon ve Zuckerman, 2014; Tartaglia ve ark., 2014). T-TBH'na maruz kalan insanlar uzun dönem hafıza kayıplarıyla, emosyonel zorluklarla, ileri kognitif yetersizliklerle başetmek zorunda kalmaktadır (Lehman, 2013; Coughlin ve ark., 2014).

Uygulamada ön planda kafa travması dışı nedenlerin bulunduğu ölüm olgularında makroskobik bulgular mevcut olmadığı için hafif TBH neticesinde meydana gelen mikroskobik hasarlar atlanabilmektedir (Karayel ve ark., 2008). Post-mortem incelemelerde, TBH'nın araştırılmasında makroskobik bulguların yanısıra konvansiyonel yöntemlerden hematoksilen-eozin yöntemi ile yapılan histopatolojik incelemenin yeterli olup olmadığı tartışılmakta, geçmişteki travma izlerinin ve hafif nitelikteki akut TBH'nın saptanabilmesi için konvansiyonel yöntemler dışında ileri immunhistokimyasal boyalar kullanarak travma varlığı ortaya konulmaya çalışılmaktadır (Hausmann ve ark., 2004; Dressler ve ark., 2007; Karayel ve ark., 2008). Özellikle fiziksel istismar nedeniyle ölen bebek ve çocukların ölüm sebebi araştırılırken beyin otopsilerinin titiz bir şekilde yapılmasının, kafa travması şeklinde maruz kaldıkları fiziksel istismarın da gün yüzüne çıkarılmasına önemli katkıları olduğu bildirilmektedir (Gill ve ark., 2009; Schoppe ve Lantz, 2013)

Kafa travmalarında erken ve geç dönem etkileri kapsamında araştırma alanlarından biri de travma ve apoptoz ilişkisidir. Normalde organizmada yaşlı ve tamiri mümkün olmayan DNA hasarı meydana gelmiş hücrelerin yok edilmesini; embriyolojik süreçte doku farklılaşmasını sağlayan apoptoz (Morrison ve ark., 2000; Alberts ve ark., 2002; Danaila ve ark., 2013). TBH gibi patolojik durumlar sonrasında da indüklenmekte ve istenmeyen hücresel düzeyde kayıplara sebep olmaktadır. TBH sonrası meydana gelen nekrotik doku kaybının yanında apoptotik hücre ölümleri de sekonder yaralanmayı artırmaktadır. Hatta hafif

TBH’da nekrotik doku kaybı olmaksızın tek başına apoptoz ile beyin dokuda hasar ve buna bağlı klinik bulguların oluştuğu bildirilmektedir (Itoh ve ark., 2011; Itoh ve ark., 2013).

Gerek insan çalışmaları, gerekse hayvanlarda farklı travma modelleri kullanılarak gerçekleştirilen araştırmalarda, farklı beyin bölgeleri üzerinde moleküler düzeyde araştırmalar sürdürülmekte, bu kapsamda amaca ve mekanizmayı aydınlatmaya yönelik farklı proteinlere ait gen ekspresyon analizleri ile gen düzeyindeki değişimler de saptanabilmektedir (Clark ve ark., 1997; Hinkle ve ark., 1997; Zhang ve ark., 2003; Shacka ve Roth, 2005; Huerta ve ark., 2007; Dressler ve ark., 2009). Apoptoz saptanmasına yönelik birçok yöntem kullanılmakta ve aynı zamanda farklı yollar üzerinden ilerleyen apoptoz sürecinde mekanizmaya özgü değerlendirmeler de yapılmaktadır. Çalışmalarda, apoptoz tespitinde, TUNEL, kaspaz ailesi üyeleri, AIF, sitokrom-c, fas-fas ligand immunhistokimyasal boyama yöntemleri, western blot analizleri vs kullanılmaktadır. TBH sonrası indüklenen apoptozun tespit edilmesi için TUNEL immunboyama ile apoptoza özgü DNA kırıkları saptanmakta (Negoescu ve ark., 1996; Smith ve ark., 2000; Loo, 2011), apoptoza özgü proteazlar olan kaspazların ve Bcl-2 ailesi üyesi modülatör proteinlerin tayini ile apoptozun varlığı ve dokuda TBH’ya reaktif anti-apoptotik cevap belirlenebilmektedir (Ng ve ark., 2000; Nathoo ve ark., 2004; Uzan ve ark., 2006; Cheng ve Zhang, 2014).

Apoptoza yönelik araştırmalar sayesinde TBH sonrası travma zamanı ve lezyon yaşı hakkında fikir elde edilebileceği anlaşılmıştır (Hausmann ve ark., 2004; Dressler ve ark., 2007). Ayrıca beynin farklı bölgelerinde apoptoz derecelerinin karşılaştırılmasının, bazı ölüm sebepleri arasında da (akut asfiksi, uzamış asfiksi, CO intoksikasyonu gibi) ayrıcı tanıya gitmeye yardımcı olacağı bildirilmiştir (Piantadosi ve ark., 1997; Nakatome ve ark., 2002; Suarez-Penaranda ve ark., 2002)

Bu çalışmada, uygulandığında tek başına beyinde belirgin bir morfolojik bulguya neden olmayan hafif şiddetteki kafa travması modelinin, tekrarlayıcı biçimde uygulandığında (T-TBH) erken dönemde apoptoza yol açıp açmadığı ve çalışma sınırları kapsamında apoptoz mekanizmasının aydınlatılması amaçlanmaktadır. Ayrıca, T-TBH’in sebep olduğu DNA kırılmalarının saptanması, kaspaz-3 aktivasyonunun belirlenmesi, beyin dokuda travmaya sekonder anti-apoptotik cevabın irdelenmesi; apoptoz yanı sıra TBH sonrası astrositlerin ve nöronal hücre aktivasyonları, dolayısıyla travmaya bağlı olası nöbet aktivitelerinin değerlendirilmesi de amaçlanmaktadır.

2 - GENEL BİLGİLER

2.1. TRAVMATİK BEYİN HASARI

2.1.1. Epidemiyoloji

Travma, özellikle de ilk sıralarda yer alan kafa travmaları birçok tıp disiplini yakından ilgilendirmekte, medikal açıdan birçok soruna neden olurken, sosyal ve ekonomik boyutu ile de güncelliğini koruyan bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır.

Kafa travmaları, sosyo-ekonomik farklılıklara, yaş, ırk ve cinsiyete göre değişim göstermektedir. Özellikle gelişmiş ülkelerde 45 yaş altı ölüm ve sakatlıkların en yaygın sebebinin oluşturan TBH'nın batılı sanayileşmiş ülkelerde ölümlerin başta gelen nedenlerinden biri olduğu düşünülmektedir (Mauritz ve ark., 2014; Wui ve ark., 2014) Sosyoekonomik seviyesi düşük toplumlarda kafa travması görülme oranı daha yüksek olmakla birlikte travma sonrası prognoz da ekonomik durumla doğrudan ilişkili olduğu belirtilmektedir (Dhandapani ve ark., 2012). Amerika'da yapılan bir çalışmada ölümcül olmayan TBH'lı bireylerin sıklıkla erkek, siyahi, eğitim düzeyi düşük ve işsiz olduğu; Afrika kökenli Amerikalılarda ateşli silah yaralanmasına bağlı TBH'dan ölme riskinin diğer ırklara göre daha fazla olduğu bildirilmiştir (Greenwald ve ark., 2003).

Araştırmalar, 15-25 yaş aralığındaki kişilerin en riskli grubu oluşturduğunu göstermektedir. İnsidans 25-60 yaş grubunda düşme eğilimi gösterirken, 60 yaş sonrasında tekrar yükselme eğilimi göstermektedir (Lagvas ve ark., 2013; Agoda ve Ozoilo, 2014; Hicks ve ark., 2014; Mauritz ve ark., 2014) Yaş ilerledikçe mortalite artmakta ve intrakranial lezyonlardan en fazla subdural hematom görülmektedir. Bunama, kognitif bozukluk, çoklu ilaç kullanımı, denge bozukluğu, alt ekstremitte zayıflığı, görme bozukluğu ve önceden düşme öyküsü en önemli risk faktörleridir (Greenwald ve ark., 2003). Kara ve arkadaşlarının yapmış olduğu araştırmada ise hastaneye yatırılma riskinin alt ekstremitte ve omurga kırıkları ile intrakranial yaralanmalarla doğrudan ilişkili olduğu bildirilmiştir (Kara ve ark., 2014)

Çalışmalar, tedavi edilen beyin yaralanmalarının %70-90'ının hafif olduğunu ve hafif TBH ile hastanede tedavi edilen hastaların yaklaşık popülasyonun 100-300/100.000'i olduğunu göstermektedir. Öte yandan, birçok hafif TBH'lı hasta hastaneye başvurmamaktadır

ve gerçek popülasyon tabanlı oranın 600/100.000'den fazla olduğu tahmin edilmektedir (Cassidy ve ark., 2004).

TBH sonrası mortalite ve morbiditeyi etkileyen çok sayıda faktör söz konusu iken hasta yaşı bunlar içinde çok önemli faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Araştırmalar ciddi beyin hasarı sonrası yaşlılardaki ölüm oranının gençlere göre iki kat fazla olduğunu göstermiştir. Hatta 12 yaşından sonra, TBH sonrası mortalitenin, yaşla sıkı bir ilişki halinde arttığı vurgulanmaktadır (Greenwald ve ark., 2003; Mauritz ve ark., 2014; Wui ve ark., 2014). Ayrıca erken erişkinlikte yaşanan ciddi kafa travmasının ileri yaştaki demans riskini arttırabileceği, buna karşın ileri yaştaki kafa travmasının demans riskini arttırıp arttırmadığının bilinmediği belirtilmektedir (Luukinen ve ark., 2005).

TBH'nın tek başına en yaygın indirekt nedeni olan alkol tüketimi de gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde önemli faktörler arasında yer almakta, aynı zamanda TBH'nın tanı, tedavi ve iyileşme süreçlerini de etkilemektedir (Gururaj, 2004).

2.1.2. Çocuklarda Travmatik Beyin Hasarı

Çocuklarda kafa travması sebepleri arasında düşme, motorlu araç kazaları ve çocuk ihmal ve istismarları ilk sırada yer almaktadır (Udoh ve Adeyemo, 2013). Travmalar şiddetine göre sınıflandırıldığında sıklıkla hafif düzeyde görüldüğü belirtilmektedir. Amerika'da yapılan epidemiyolojik çalışmaya göre künt kafa travması ile hastaneye başvuran 43.400 çocuk olgu içerisinde %98 kadarının hafif düzeyde travmaya maruz kalmış olduğu saptanmıştır. Yaş dağılımı incelendiğinde iki yaş altı çocuklarda daha fazla kafa travması görüldüğü belirlenmiştir. Sıklık sırasına göre subdural hematoma, subaraknoidal kanama ve serebral kontüzyon saptanmıştır (Quayle ve ark., 2014). Kafa travması ile hastaneye başvuran çocukların en sık 0-4 yaş arasında olduğu görülmektedir. 0-1 yaş arası çocukların değerlendirilmesinde kafa travması sebepleri arasında %72 oranla düşmelerin geldiği, onu %22 oranla çocuk istismarının izlediği belirtilmektedir (Thurman, 2014).

Ülkemizdeki araştırma sonuçlarına göre, kafa travması ile hastaneye başvuran 851 olgunun değerlendirildiği bir çalışmada; erkeklerde iki kat daha fazla kafa travması görüldüğü, travma sebepleri arasında düşmenin %70 oranla ilk sırada yer aldığı, şiddetine göre en çok hafif kafa travması görüldüğü, en sık ölüm sebebinin trafik kazaları ve yüksekten düşmeler olduğu belirtilmektedir (Işık ve ark., 2011). Çocuklarda düşme sebebiyle hastaneye

getirilen olgular içinde kafa travması en sık başvuru sebebi olarak görülmektedir (Güzel ve ark., 2007). Hafif kafa travması ile hastaneye başvuran 314 çocuk olgunun değerlendirildiği başka bir çalışmada, yine erkeklerde kafa travmasının iki kat fazla görüldüğü, travmanın en sık iki yaş altı (%44) çocuklarda görüldüğü tespit edilmiştir. Travma sebepleri arasında düşmenin başta geldiği (%88), onu trafik kazası (%11) ve az sıklıkla da spor yaralanmalarının izlediği bildirilmiştir. Hafif kafa travmasına bağlı olarak bulantı, kusma, baş ağrısı, uykuya eğilim ve mental motor değişiklik gibi semptomların yanında epidural, subdural, intrakranial kanamalar da görülebilmektedir (Er ve ark., 2013).

Travmanın ölüme yol açacak düzeyde şiddetli olmasa dahi, farklı mekanizmalar ile beyinde hasar oluşturabileceği bildirilmektedir. Somatik veya kognitif alana kıyasla duygusal ve davranışsal alanda etkilenme olduğu, bu nedenle çocuklarda TBH'nin nöropsikolojik değerlendirmesinde bu semptomların dikkatle yorumlanması gerektiği bildirilmektedir (Couch ve Leathem, 2011). Çocukluk çağı kafa travmalarının uzun dönem etkileri travmanın şiddeti ile ilişkili bulunmuştur. Orta ve ağır düzeyde travmaya maruz kalan çocuklarda ileriki yıllarda depresyon ve anksiyete görülme sıklığı daha fazla belirlenmiştir (Andruszkow ve ark., 2014). Yıllar sonra bile bu kişilerde saptanan kognitif yetersizliklerin frontal korteks lezyonları ile ilişkili olduğu, IQ düşüklüğü, motor hafıza ve mental kapasite yetersizliklerinin çocukken maruz kaldıkları travmalarla ilişkili olabileceği vurgulanmıştır (Stipanovic ve ark., 2008). İleriki yıllarda bir sürü sağlık problemine neden olması sebebiyle çocukluk çağındaki kafa travmalarının patofizyolojisinin aydınlatılması büyük önem taşımaktadır. Sarsılmış bebek sendromunda travmalar sonrası ortaya çıkan patolojik değişimleri izah etmek için hayvan deneylerinde hafif T-TBH modeli oldukça önemli bir araç olarak önerilmektedir (Bandak, 2005).

2.1.3. Travma Şiddeti ve Travmatik Beyin Hasarı İlişkisi

Kişinin maruz kaldığı travmanın şiddeti ile doğru orantılı olarak kafaiçi değişimler de farklılık göstermektedir. Orta ve ağır şiddette travmaya bağlı ilk 24 saat içinde beyin ödeminin görüldüğü ve 30 gün sonunda da kortikal nekrozun bulunduğu bildirilmiştir (Sutton ve ark., 1993). Ayrıca hayvan deney modelleri ile orta-ağır TBH'nin KBB hasarına neden olduğu, hipoterminin TBH sonrası KBB geçirgenliği üzerine olumlu etkilerde bulunduğu da bildirilmiştir (Arıcan ve ark., 2006)

Orta düzeyde hasara maruz kalan beynin, takip eden konküzyon düzeyindeki hasara oldukça hassas hale geldiği ve tekrarlanan konküzyonların paralizi, beyin ödemi, subdural hematom, artmış beyin içi basıncı, beyinde beta amiloid birikmesi ve oksidatif stresi arttırdığı ve nadir de olsa ölümle sonuçlanabildiği hem klinik (Cantu, 1996; Bailes ve Cantu, 2001; Uryu ve ark., 2002; Cantu ve Mueller, 2003) hem de hayvan modellerinde (Laurer ve ark., 2001; DeRoss ve ark., 2002; Longhi ve ark., 2005) gösterilmiştir.

Hafif TBH sonrası 24. saatte uygulanan 2. hafif TBH'yı takiben beynin ikincil travmaya karşı daha hassas olduğu gösterilmiş ve hatta beynin bazı bölgelerinde KBB geçirgenliğinde de artışa neden olduğu ileri sürülmüştür (Laurer ve ark., 2001). Hafif şiddette tekrarlanan bu travmalarda görülen değişimin aksine, tekrarlanan orta şiddette kafa travmasına maruz bırakılan fare beyin dokusunda KBB de dâhil olmak üzere belirgin bir patolojik değişimin bulunmadığını bildiren çalışmalar da söz konusudur (DeFord ve ark., 2002).

Orta ve ağır şiddette bir kafa travması, beyinde hücre hasarına ve ölüme neden olurken, hafif şiddetli kafa travmasında hücresel düzeyde hasar daha az sıklıkla görülmektedir (Dixon ve ark., 1991; Hinkle ve ark., 1997; Scheff ve ark., 1997; DeFord ve ark., 2002). Ancak, kafa travması sonucu oluşan hasarın derecesi ne olursa olsun erken ve geç dönemde tanı, tedavi ve yarattığı iş gücü kaybı nedeniyle ekonomik maliyeti oldukça ağır olmaktadır. Her yıl TBH'ya maruz kalan milyonlarca olgunun %90'ını hafif TBH oluşturmaktadır (Thornhill ve ark., 2000).

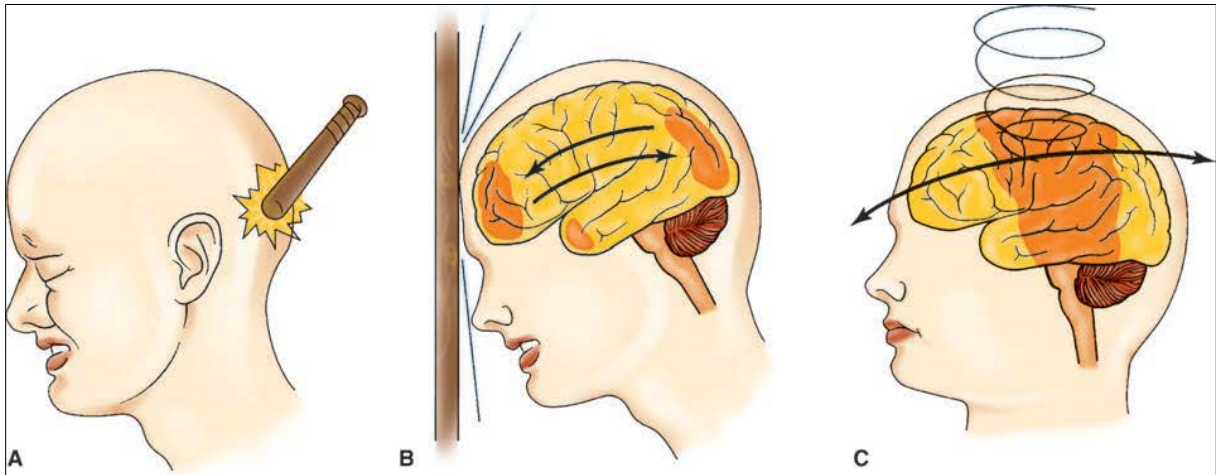
Düşmelerden sonra, trafik kazaları hafif TBH'nın en yaygın sebebidir. Tedavi edilen beyin hasarı olgularının %70 ile %90 kadarının hafif TBH olduğu, gelişmiş ülkelerde hastanede tedavi edilen hafif TBH olgularının 100-400/100.000 oranında bulunduğu tahmin edilmektedir. Hafif TBH, trafik kazası nedeniyle yaralanan insanların neredeyse dörtte birini etkiler. Genelde ortalama iyileşme süresi 100 gündür, ancak %23 kadar vakanın 1 yıl geçmesine rağmen hücresel düzeyde iyileşmeyi tamamlayamadığı saptanmıştır. (Cassidy ve ark., 2014).

Hafif TBH çeşitli nörolojik ve kognitif problemlerle ilişkili olmasına rağmen nedenselliği çok da net değildir (Mouzon ve ark., 2014). Post-travmatik sendromun (PTS) yaygın sinir hasarının bir sonucu olduğu varsayılmıştır. Ancak, toplumda yaygın olarak görülen PTS semptomlarının beyin hasarına spesifik olmadığı, hafif TBH yaşayanlarda

yaygın olduğu gibi PTS'nin kranial yaralanma içermeyen fiziksel travma mağdurlarında da sık görüldüğü, yaralanma öncesi anksiyete ve duygudurum bozukluğu gibi faktörlerin PTS gelişimini arttırdığı, düşük kognitif fonksiyonların da hafif TBH için bir risk faktörü olduğu vurgulanmıştır (Welch ve Derry, 2014).

2.1.4 Kafa Travmasının Fizyopatolojisi

TBH'nın fizyopatolojisi kapalı veya açık kafa travmalarında ve penetran kafa travmalarında farklılık gösterir. TBH'ya yol açan mekanizmalar primer ve sekonder yaralanma olarak sınıflandırılabilir. Primer mekanizmalar yaralanma anında olduğu halde sekonder yaralanma, primer mekanizmalara organizmanın yanıtıdır ve her ikisi de fokal veya diffüz olabilir. Fokal yaralanmalar direkt darbelerle, diffüz yaralanma ise akselerasyon-deselerasyon ve rotasyonel güçlerle ortaya çıkar (Greenwald ve ark., 2003; Hickey, 2014).



Şekil 1: Kapalı kafa travmasının şematik gösterimi (Hickey, 2014).

- Sert bir cismin kafaya çarpması sonucu oluşan hasar.
- Kafatasının ani ileri geri hareketinde meydana gelen karşılıklı hasar.
- Kafatasının rotasyonel ani hareketlerinde meydana gelen hasar.

Çalışmalarda, TBH'nın nörodejeneratif hastalıkların artmış riski ile bağlantılı olduğu ifade edilmiştir (Solomon ve Zuckerman, 2014; Tartaglia ve ark., 2014). TBH'yı takip eden akut faz dönemi bulguları, mikroglialar ve inflamatuvar mediatörler salgılayan astrositleri de içeren karışık bir nöroinflamatuvar cevapla ilişkilidir. Bu akut faz yanıtının uzun dönem patolojik değişimlere sebep olduğu kabul edilmiş olsa da, son zamanlarda sıklıkla kalıcı/dirençli inflamasyonun geç dönem nörodejeneratif sonuçlarla olan ilişkisi vurgulanmaktadır. Bunu desteklemek üzere sporcuların beyin otopsilerinde yapılan

incelemede TBH'dan sonra kalıcı nöroinflamasyonun yıllar sonra bile devam ettiği gösterilebilmiştir (McKee ve ark., 2009).

Travmanın tipi mekanik distorsiyonun lokalizasyonu ve şiddeti ile belirlenir. Buna göre travma fokal ya da diffüz olabilir. Travmada etkilenen yapılara bağlı olarak primer travmatik etkiler beynin nöral dokusu ve vasküler dokusu ya da her ikisini de içerir. Bu etkiler daha geç ortaya çıkan sekonder olaylardan etkilenebilirler. Fokal beyin hasarına sebep olan olayların fizyopatolojik kaskadı diffüz beyin hasarında farklılık gösterir. Fokal beyin hasarında travmatik kontüzyon ya da hematomlar lokal kitle etkisi oluşturur, bu da beyinde şifte, herniasyonlara ve beyin sapı basılarına neden olur (Werner ve Engelhard, 2007; Brunswick ve ark., 2012; Mary Kan ve ark., 2012).

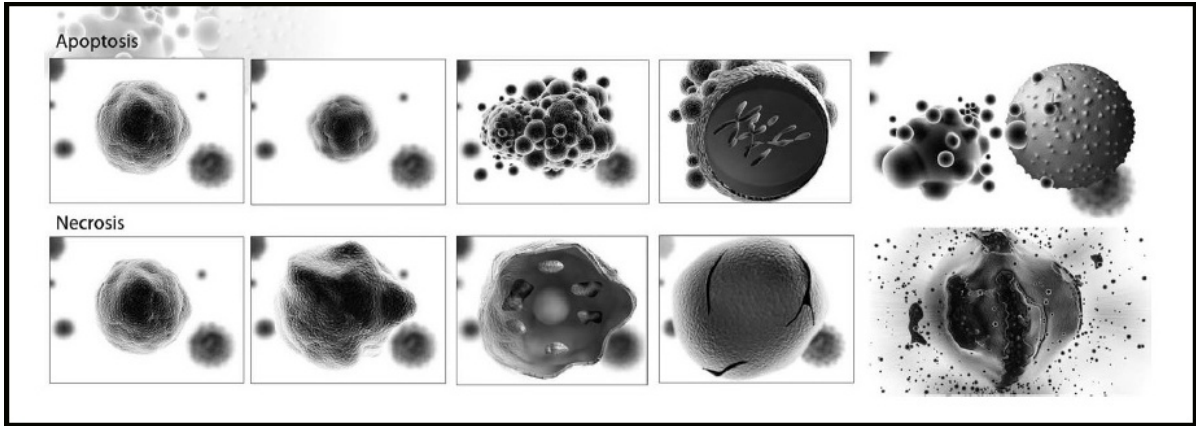
Travma sonrası ortaya çıkan iskemik/hipoksik durum, sekonder hasara neden olarak nöronal ölümle sonuçlanan patofizyolojik bir döngüyü harekete geçirir. Sekonder hasarın ilk aşamasında anaerobik glikoliz sonucu biriken laktik asit zar geçirgenliğinin artmasıyla ödem oluşmasına yol açar. İkinci aşamada uyarıcı nörotransmitterler salınır ve voltaj bağımlı sodyum (Na^+) ve kalsiyum (Ca^{+2}) iyon kanalları aktive olur. Ca^{+2} iyonu lipid peroksidaz, proteaz ve fosfolipaz gibi hücre içinde serbest yağ asitleri ve serbest radikalleri arttıran enzimleri aktive eder. Bu olaylar damar ve hücre yapılarının membranlarında dejenerasyon, dokuda nekroz ve apoptoz ile sonuçlanır (Marshall, 2000; Unterberg ve ark., 2004; Werner ve Engelhard, 2007).

TBH ve omurilik hasarında küçük hücre popülasyonları mekanik etkiden zarar görür ve ölüme ilerler. Bu tür ilk hücre ölümü sınırlı ve lokalizedir. Yaralanma bölgesinde hemoraji ve iskemi hücre ölümüne katkıda bulunmaktadır. Travmadan sonra prekontüzyonel bölgedeki sağlıklı hücreler de sekonder hasar mekanizmaların aracılık ettiği ikinci bir hücre ölüm dalgasına yenik düşer (Borgens ve Liu-Snyder, 2012).

2.2. APOPTOZ

Apoptoz terimi ilk olarak 1972’de J.F.K. Kerr tarafından ökaryotik hücrelerin intrinsik ölüm mekanizmasını ifade etmek için kullanılmıştır (Kerr ve ark., 1972). Organizmada apoptoz bir denge halinde sürekli devam etmektedir. Denge, apoptoz oranının azalması yönünde değişirse hücre sayısı artar. Aksine apoptoz oranında patolojik düzeyde bir artış söz konusu olursa istenmeyen doku tahribatları meydana gelir. Nekroz sadece patolojik durumlarda meydana gelmesine karşın, apoptoz fizyolojik bir süreçtir fakat bazen patolojik durumlarda kontrolden çıkmaktadır (Morrison ve ark., 2000; Alberts ve ark., 2002).

Apoptoz, genel olarak hücre büzüşmesi, hücre yüzey kabarcıkları, DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması, ana makrofajların tehlikeli hücrelere saldırısı ve nekrozdan en önemli farkı olan inflamasyon olmadan fagositik yutma ile karakterizedir (Itoh ve ark., 2011; Itoh ve ark. 2013). Diğer taraftan nekrozda ise hücre şişmesi, hücre membran ve organel harabiyeti, inflamatuvar cevap ile ilişkili olarak hücrenin parçalanması söz konusudur. Nekrotik hücre zarı dağılır ve hücre içeriği çevreye saçılarak inflamatuvar yanıtları başlatır. Oysa apoptotik hücreler inflamatuvar reaksiyonu başlatmadan ölür (Şekil 2) (Borgens ve Liu-Snyder, 2012).



Şekil 2: Morfolojik olarak nekroz ve apoptozun şematik karşılaştırılması (Borgens ve Liu-Snyder, 2012).

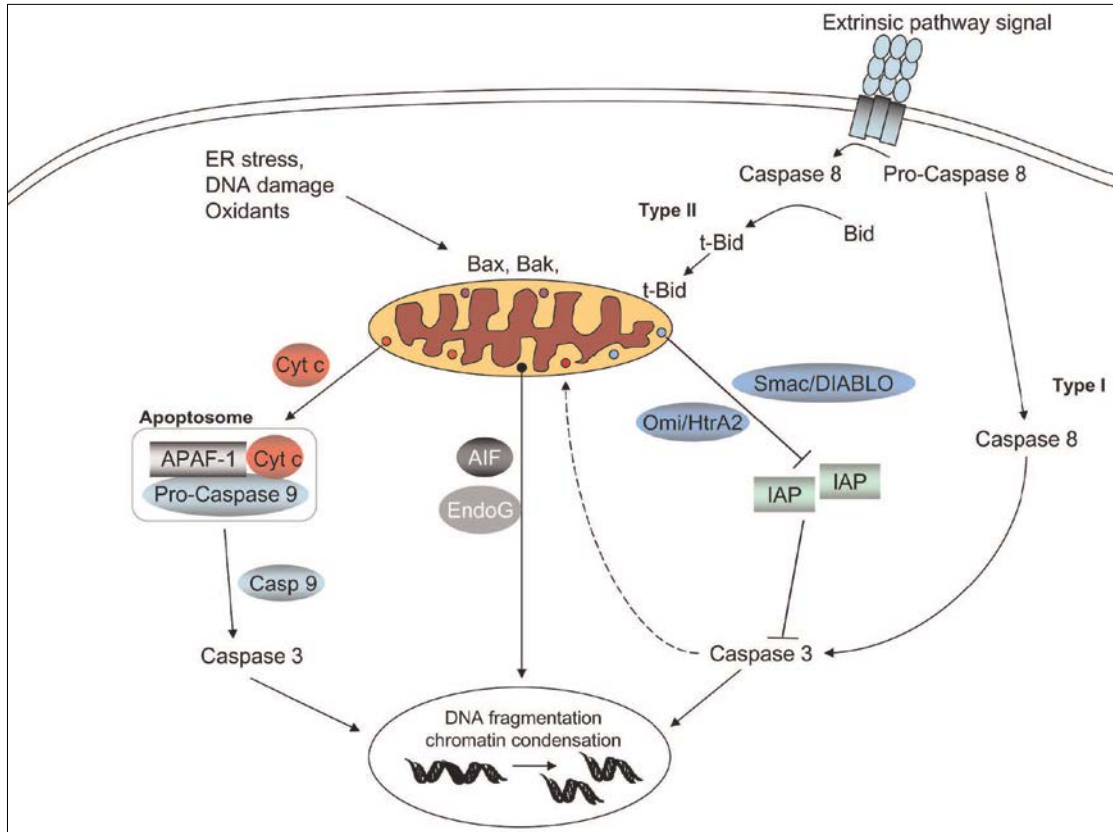
Çalışmalar, Ca^{+2} infüzyonu, nitrik oksit (NO), sitokinler, oksidatif stres ve glutamat eksitotoksitesi gibi bazı uyaranların hem apoptoza hem de nekroza neden olduğunu göstermiştir. Nekrozun yaygın olduğu doku komşuluğunda apoptoz indüklenerek hücre

kaybına katkıda bulunmaktadır. DNA hasarı ve hasarlı proteinlerin birikimi apoptoz ile kontrol edilen hücre ölümüne, oysa ATP depleasyonu ve hücre membran hasarı nekroz yoluna ilerler (Kuwana ve Newmeyer, 2003; Danalia ve ark., 2013).

2.2.1. Apoptotik Süreç

Apoptotik sürece giren hücrede yüzlerce kırılma meydana gelir ve DNA onarımı yapılamaz. Hücreler DNA hasarını tamir edebilen mekanizmalara sahip olmalarına rağmen hasar şiddetli ise apoptoz mekanizması ile kendini ölüme götürebilir (Nagata ve ark., 2003).

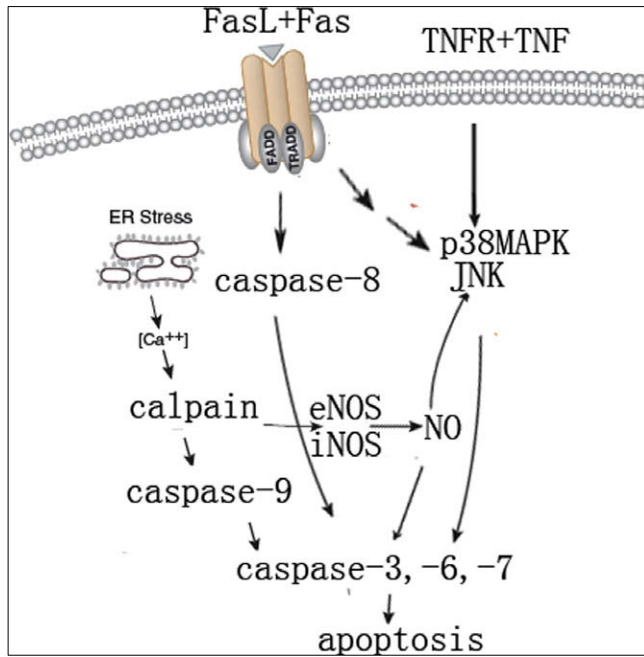
Apoptoz, uyarıya bağlı olarak iç veya dış yolaklardan gerçekleştirilebilir (Nicolson ve Thornberry, 2003; Bayır ve Kagan, 2008). Hücre dışı sinyaller (sitokinler, TNF-alfa, Fas ligand vs) hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak kaspaz 8 aktivasyonuna sebep olan hücre içi sinyalleri tetikler. Kaspaz 8'de iki farklı yol kullanarak apoptozu başlatabilir. Ya direkt kaspaz 3 aktivasyonu yapar ve DNA fragmentasyonu ve kromatin yoğunlaşması aktive edilir -ki bu yolak tip 1 olarak isimlendirilir- ve bu yol üzerinden apoptozun yürütülmesi mitokondrinin anlamlı bir katkısı olmadan gerçekleşir. Diğer taraftan, tip 2 yolakta mitokondri de sürece katılır (Şekil 3) (Bayır ve ark., 2008).



Şekil 3: Apoptoz mekanizması (Bayır ve Kagan, 2008).

Mitokondriye gelen sinyaller sonrası sitokrom c, EndoG, AIF, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 gibi moleküller sitoplazmaya salıverilir. Sitokrom c sitozole salındığı andan itibaren Apoptoz Proteaz Aktivatör Faktör-1'e (APAF-1) bağlanır. Bu yapıya ATP de eklenir ve prokaspas-9 ile birlikte yapı apoptozom adını alır. Takiben, prokaspaz 9 aktive olur. Aktive olan kaspas 9, prokaspas 3'ü aktifleştirir. Aktif kaspaz 3 ile DNA fragmentasyonu ve kromatin yoğunlaşması başlatılır (Vernagen ve Vaux, 2002; Nicholson ve Thornberry, 2003; Bayır ve Kagan, 2008).

Kaspazlar pro-enzim şeklinde sentezlenen 14 üyeli özelleşmiş proteaz ailesidir. Kaspaz 8, 9, 10 öncü; 3, 6, 7 ise sonlandırıcı kaspazlar olarak sınıflandırılmıştır. Apoptotik süreçte aktif forma dönüştürülen kaspazlar hücre iskeleti yıkımı ve DNA fragmentasyonu gerçekleştirir (Zhang ve ark., 2005).



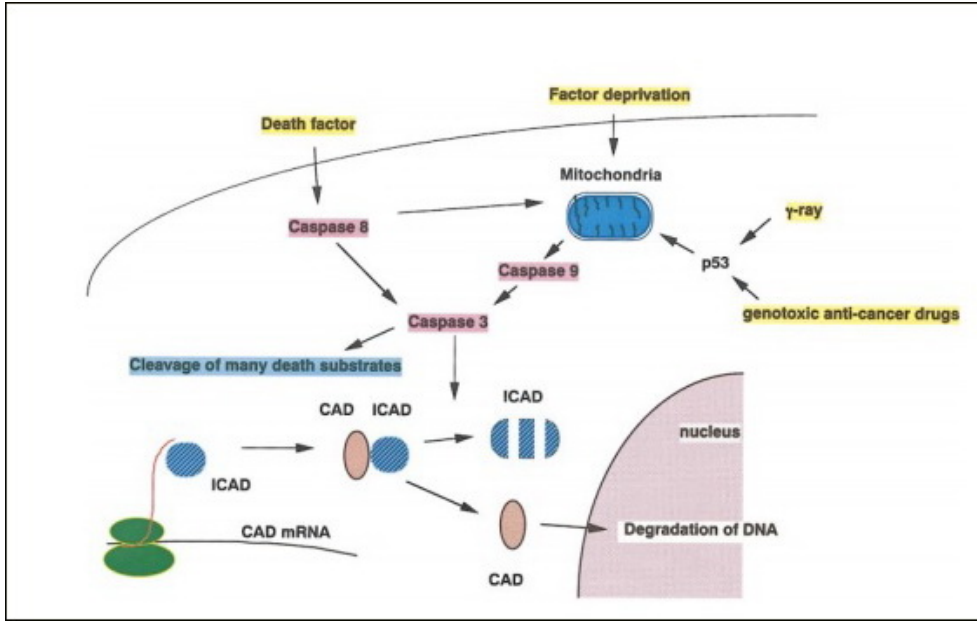
Şekil 4: Apoptotik süreçte Fas-FasL etkileşimi (Zhao ve ark., 2009).

Dış yol, yüzeylerinde FasL olarak tanımlanan ve hedef hücre yüzeyinde Fas reseptörlerine bağlanan; hücre yüzey bağlantıları olan sitotoksik T hücreleri tarafından kullanılır. Fas/FasL sistemi, daha sonra kaspaz sistemini aktive ederek apoptozun iç yoldaki gibi ilerlemesini sağlar (Şekil 4) (Zhao ve ark., 2009). Fas ve FasL etkileşiminin TBH sonrası

apoptotik hücre kaybında önemli rolü olduğuna dair kanıtlar vardır. TBH oluşturulan taraf kortikal nöronlarda Fas ve FasL ekspresyonları artar. Fas-FasL sistemi; TBH sonrası apoptotik hücre ölümündeki önemli rolü nedeniyle tedavi araştırmaları için hedef haline gelmiştir (Wong ve ark., 2005; Uzan ve ark., 2006).

Nükleozomlar halinde DNA parçalanmaları apoptotik hücre ölümü için işarettir ve apoptotik uyarılar sonucu ortaya çıkar. Bu sürecin moleküler mekanizması, DNA'da kırılmalara sebep olan kaspaz-bağımlı DNaz (CAD) isimli spesifik bir DNaz ile

tanımlanmıştır. CAD normalde tek başına değil de CAD inhibitörü (ICAD) ile bağlı halde bulunmaktadır. Hücreler apoptotik sürece girdiğinde ve kaspazlar aktive olduğunda (özellikle kaspaz-3), CAD-ICAD kompleksini birbirinden ayırır ve CAD'ın kromozomal DNA'yı parçalamasına izin verir (Şekil 5) (Nagata, 2000). CAD moleküler sürecinden ayrı olarak da mitokondriden sitozole salıverilen AIF, DNA'ya bağlanarak kromatin yoğunlaşmasını ve DNA fragmentasyonu tetikleyebilir ve bu mekanizma kaspaz-bağımsız apoptotik süreç olarak tanımlanmaktadır (Zhang ve ark., 2005; Vega-Nerado ve ark., 2015).



Şekil 5: CAD bağımlı apoptotik DNA fragmentasyonu (Nagata, 2000).

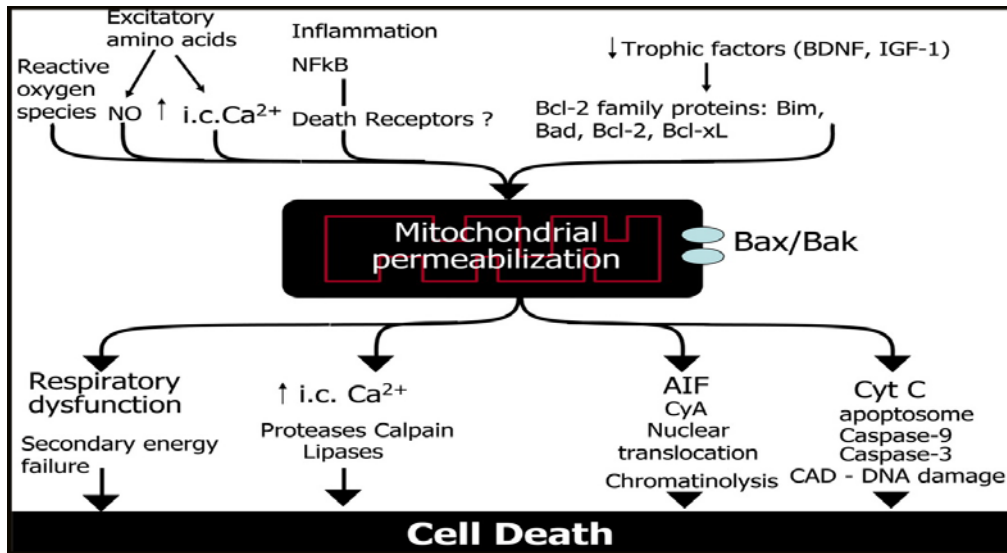
Hücre içi veya dışı nedenlerle DNA hasarı oluştuğunda aktive olan bazı genler de hücrenin apoptoza gitmesine neden olur. Bu genlerden en önemlisi p53 genidir. İnsan tümörlerinin %50'den fazlasında mutasyona uğradığı tespit edilen p53 geninin, kanser oluşumunu önlemede kritik rol oynadığı kabul edilmektedir. Hücre hasarının tamiri başarılı olmaz ise p53 geni Bax proteinini aktive ederek mitokondri aracılığı ile hücrenin apoptoz ile ölmesini sağlar. Böylece DNA hasarlı hücre ortadan kaldırılmış olur (Morrison ve ark., 2000). Mutant p53 nedeniyle apoptoz gerçekleştirilemez ve istenmeyen hücre çoğalmaları ve doku tümörleri oluşur (Pflaum ve ark., 2014)

DNA kırılmaları ve kromatin yoğunlaşmasının yanında hücre zarında meydana gelen değişiklikler ile apoptotik süreç tamamlanmaktadır. Fosfolipitler, yani iç tabakada bulunan fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamin ile dış tabakada bulunan fosfatidilkolin normalde

asimetrik olarak dağılmışlardır. Apoptoz sırasında enzim sistemlerinin aktivasyonu sonucu fosfolipidlerin dış yüzey tabakaya yerleşir. Bu durum apoptotik cisimciğin fagositozu için iyi bir uyarıdır. Apoptotik cisimcikler, sitokin salgılanmasını ve inflamasyon oluşmasını uyarmaksızın makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosit edilir (Fadok ve ark., 2001; Fadeel ve ark., 2010; Preta ve Fadeel, 2012).

2.2.2. Apoptozun Regülasyonu

Apoptozun regülasyonunda mitokondri membran geçirgenliği (MMG) merkezi bir role sahiptir. MMG'nin artması sitokrom c, EndoG, AIF, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 gibi proteinlerin sitozole salınmasına ve apoptozun gerçekleşmesine neden olduğu için MMG'nin kontrolü apoptozun regülasyonunu sağlamaktadır (Şekil 6) (Ferri ve Kroemer, 2001; Cheng ve ark., 2012; Vega- Naredo ve ark., 2015).



Şekil 6: Mitokondri membran geçirgenliği (MMG) (Hagberg ve ark., 2009).

Hasar şiddetli olup ATP tükendiğinde, mitokondrial yetersizlik sonucu hücre nekroz ile ölür. Apoptoz çok dinamik bir süreçtir ve bu olayda birçok kimyasal faktör rol oynadığı için yeterli ATP düzeyi gerekmektedir. Bu nedenle apoptotik süreçte mitokondrinin önemi büyüktür (Wong ve ark., 2005; Borgens ve Lis-Snyder, 2012).

Apoptoz düzenlenmesinde Bcl-2/Bax gen ailesi önemli rol oynar. Bu ailenin ondan fazla üyesi tanımlanmış olmakla birlikte, bunlardan bazıları apoptoz inhibitörü (anti-apoptotik), bazıları da apoptozu uyarıcı (pro-apoptotik) olarak görev alır (Czabotar ve ark.,

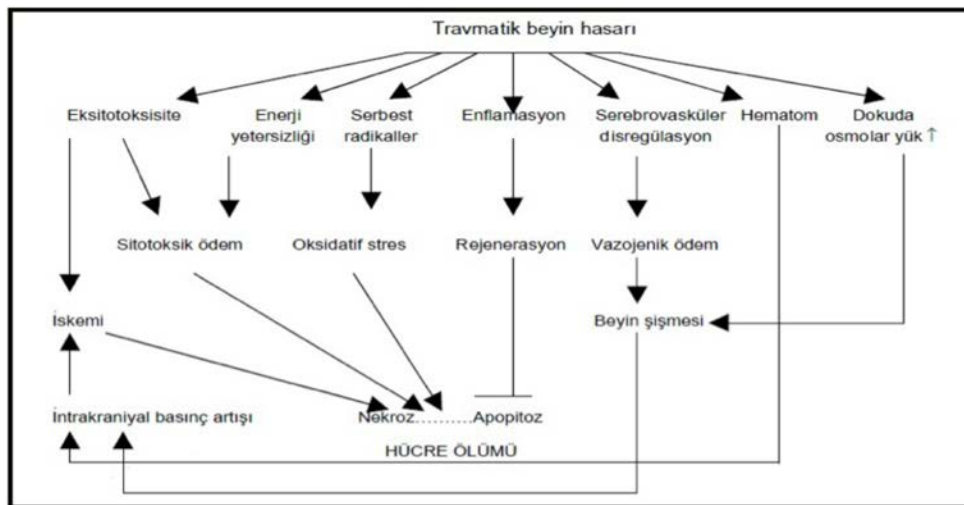
2014). Apoptotik sinyalin alınmasından sonra pro-apoptotik proteinler mitokondri zarının geçirgenliğini artırır. Zardaki bu değişiklikler nedeniyle mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplazmaya geçer ve apoptoz kaskadı hızla çalışır (Kuwana ve Newmeyer, 2003). Bcl-2 ailesi proteinlerin üretimi, inme, akut nörodejeneratif hastalıklar ve TBH'da artar. Periferik sinir hasarı ve TBH'da Bcl-2 ailesi üyelerinin değişen ekspresyon düzeyleri sıklıkla apoptotik nöronal hücre ölümü ile ilişkilendirilmiştir (Shacka ve Roth, 2005). Ayrıca Bcl-2 ailesi üyeleri endoplazmik retikulumdan salıverilen Ca^{+2} seviyelerini etkileyerek, hücre içi artan serbest Ca^{+2} iyonlarının mitokondriye aşırı yük getirmesine ve hücrenin ölümüne neden olabileceği belirtilmektedir (Kuwana ve Newmeyer, 2003; Cheng ve ark., 2012).

Bcl-2 ailesi proteinleri

Antiapoptotik	Proapoptotik
Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w Boo/Diva Mcl-1	Bax, BOK, BAK, BİM, BİD BAD, BNip, Hrk/DP5 Bcl-xS, Noxa, Puma

2.3. TRAVMATİK BEYİN HASARI VE APOPTOZ İLİŞKİSİ

Travmatik beyin hasarının patogenezinde de hipoksik-iskemik hasara benzer şekilde enerji yetmezliği, serbest radikallerin artışına bağlı oksidatif stres, eksitotoksisite ve ayrıca serebrovasküler disregülasyon sonucu bir yandan iskemi diğer yandan vazojenik ödem ve beyin şişmesine sekonder gelişen intrakranial basınç artışı hücre ölümünden sorumludur (Şekil 7) (Kurul ve Gülmez, 2007).



Şekil 7: Travmatik beyin hasarı patogenezi (Kurul ve Gülmez, 2007).

Direkt mekanik etki ile oluşan TBH merkezi sinir sistemi dejenerasyonu ve nöronal hücre ölümünü tetikler (Chirumamilla ve ark., 2002; Rice ve ark., 2003). İlk mekanik etkiyi takiben, iskeminin sebep olduğu dolaşım bozukluğu nedeniyle KBB zedelenmesi, eksitotoksik hasar, nöronal dejenerasyon ve apoptotik hücre ölümünü içeren sekonder etkiler artar (Azbill ve ark., 1997; Xiong ve ark., 1997; Springer 2002). Nekroz nedeniyle dokuda arkan serbest radikaller, eksitator aminoasitler, sitokinler, Ca^{+2} nedeniyle apoptoz indüklenmektedir (Werner ve ark., 2007; Danalia ve ark., 2013). Geçmişte, TBH’da nöronal ve glial hücre kaybının, inflamatuvar hücreler ile nekrozun sonucu olduğu düşünülürken, son yıllarda yapılan araştırmalar apoptozu ön plana çıkartmaktadır. Sıçanlarda TBH sonrası erken dönemde, nöronlarda apoptotik hücre ölümünün indüklendiği ve bu nedenle serebral disfonksiyonun uzadığı belirtilmiştir (Itoh ve ark., 2011; Itoh ve ark., 2013) Ayrıca apoptozun, TBH ile ilişkili sekonder hasarın ve sonrasında gelişen morbiditeye önemli katkısı olduğu bildirilmiştir (Sun ve ark., 2013). TBH gibi periferik sinir hasarı da apoptotik nöronal hücre ölümüne neden olmaktadır (Shacka ve Roth, 2005). Ayrıca TBH ve fokal serebral iskemi sonrası mitokondrial yolların indüklendiği de gösterilmiş (Irving ve Bamford, 2002).

2.3.1. Travmatik Beyin Hasarı Kliniğinde Apoptoz

Kafa travması sonrası preiskemik zonda apoptotik hücre ölümünün nörolojik bulguları etkilediği bilinmektedir. Pro-apoptotik faktörlerin yükselmesinin, anti-apoptotik faktörlerin düşmesinin; apoptoz oranının yüksek olmasının TBH sonrası prognozu olumsuz etkilediği bildirilmektedir (Minambres ve ark., 2008).

Kafa travmasından sonra iskemik doku çevresinde Bax, kaspaz-3 ve Bcl-2 ekspresyonlarının arttığı; yüksek Bcl-2 seviyelerine sahip hastaların takiplerde daha iyi nörolojik sonuçlar sergilediği tespit edilmiştir (Ng ve ark., 2000; Nathoo ve ark., 2004). TBH hayvan modellerinde de, TBH sonrası çocuk ve infantların BOS’larında Bcl-2 yüksekliği saptanmıştır (Clark ve ark., 1999; Clark ve ark., 2000).

Tedavi amacıyla dekompresif kraniotomi uygulanan TBH hastalarından alınan yaralı beyin doku örneklerinde TUNEL ile DNA fragmentasyonu ve kaspaz bağımlı apoptoz kanıtı olarak da kaspaz 1 ve kaspaz 3 artışı gösterilmiştir (Clark ve ark., 1999).

TBH sonrası insan beyinde kaspaz-8'in transkripsiyonel ve translasyonel seviyelerinde artış olduğu gösterilmiştir. Kaspaz 8 artışı, Fas ölüm reseptörü protein seviyeleri ile ilişkili bulunmuştur. Bu durum, TBH sonrası apoptozun hücre dışı yolla aktive edildiğine, Fas-FasL mekanizmasına kanıt olarak yorumlanmıştır (Zhang ve ark., 2003). Uzan ve arkadaşları TBH mağduru kişilerin BOS'larında pro-apoptotik sFas ve kaspaz-3 ile anti-apoptotik Bcl-2 seviyelerini yüksek bulmuş ve özellikle kaspaz-3 aktivasyon derecesinin yaralanma şiddeti ile ilişkili olabileceğini öne sürmüşlerdir (Uzan ve ark., 2006). Ayrıca TBH sonrası hastaların BOS'unda yükselmiş Fas-FasL seviyeleri ile intrakranial basınç ilişkili bulunmuştur (Ertel ve ark., 1997; Lenzlinger ve ark., 2002).

Kontüze beyin dokuda Bax ve Bcl-2'nin araştırıldığı klinik bir çalışmada, sadece Bax'ın tespit edilebildiği hastalarda nörolojik sonuçların daha kötü olduğu görülmüş ve Bcl-2'nin nöronal hücreleri koruma yeteneğine vurgu yapılmıştır (Ng ve ark., 2000). Bcl-2'nin bu özelliği nedeniyle çeşitli farmakolojik ajanlarla üretimi arttırılmaya çalışılmaktadır (Indharty, 2013).

Ayrıca; sitokrom c, Fas ve kaspaz-1'in TBH'lı çocukların BOS'unda yükseldiği, çocuk istismarı tanısı almış TBH'lı çocuklarda ise sitokrom c ile tespit edilen apoptozun belirgin olduğu tespit edilmiş; sitokrom c'nin kafa travmasının bulunduğu çocuk istismarı için ayrııcı tanıya gitmede yardımcı olabileceği vurgulanmıştır (Satchell ve ark., 2005).

2.3.2. Adli Tıbbi Açıdan Travmatik Beyin Hasarında Apoptoz

Adli tıp pratiğine henüz doğrudan yansımamış olsa da; travma, yara yaşı, vitalite, miyokard enfarktüsü, entoksikasyon, asfiksi gibi sık karşılaşılan olgular üzerinde yapılan çalışmalarda, hasarın tespiti üzerinde apoptoz konusuna yoğunlaşan araştırmalar söz konusudur. Apoptoz araştırmalarının özellikle ciltte yara yaşı tahmini üzerine yoğunlaştığı görülmektedir (Suarez-Penaranda ve ark., 2002; Zhao ve ark., 2009).

Bilindiği gibi adli tıp uygulamasında yara yaşı tahmini ve yaranın canlılık belirtilerinin saptanması yapılacak yorumlarda oldukça önemlidir. Cilt yaralarında 3 dk ile 8 saat arasında zaman bağımlı yapılan bir araştırmanın sonuçlarına göre apoptotik keratinositler, 120 dk'dan genç yaralarda ve sağlıklı deride görülmemektedir. Bulgular postmortem incelemede, cilt yaralarının intravital oluşup oluşmadığının belirlenebileceği şeklinde yorumlanmıştır (Suarez-Penaranda ve ark., 2002). Ayrıca, apoptotik süreçteki faktörlerin zamana bağlı ifadeleri de

incelenerek ciltte yara yaşı hakkında yorum yapılabileceği de savunulmuştur (Zhao ve ark., 2009).

Nakatome ve arkadaşları, miyokard dokuda TUNEL immunhistokimyasal boyama yöntemi ile akut miyokard infarktüsünü (AMI), karbonmonoksit (CO); tetradoksin, alkol intoksikasyonlarından, kafa travması, kardiyak yaralanma ve miyokarditten ayırabildiklerini ve TUNEL pozitif hücrelerin AMI erken safhası için tanı koydurucu olabileceğini savunmuştur (Nakatome ve ark., 2002).

Ayrıca serebral hipoksi ve asfiksi durumlarında ve CO intoksikasyonunda beyin dokuda apoptozun indüklendiği gösterilmiştir. Piantadosi ve arkadaşları, CO intoksikasyonunun erken belirtisi olarak globus pallidumda nöronal apoptoz saptamışlardır (Piantadosi ve ark., 1997). Akut asfiksi ile ani kardiyak ölümlerde beyinde spesifik bir bulgu meydana gelmiyor olsa da uzamış asfikside alt parietal bölgelerde GFAP pozitifliği ve apoptozun göstergesi olarak yoğun kırılmış DNA'lar tespit edilmiştir (Wang ve ark., 2011).

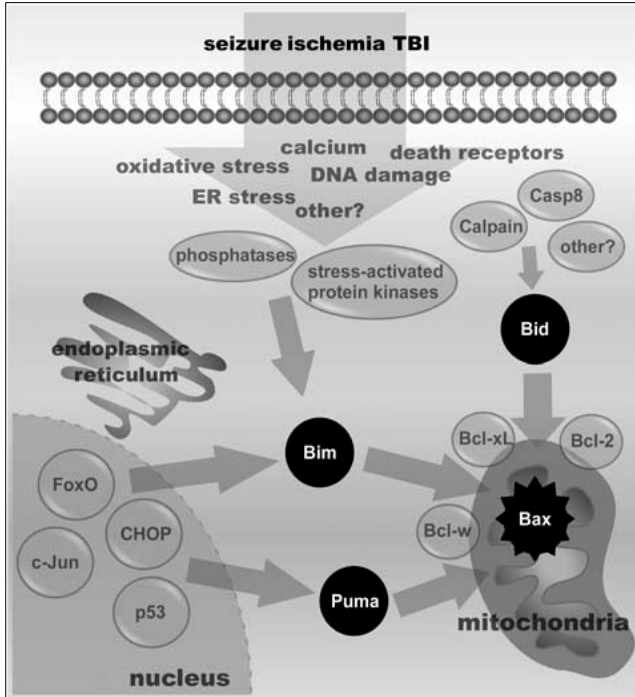
Klinik çalışmalar ile yaralanmadan sonra apoptozun akut fazına ışık tutuluyor olmasına karşın apoptoz uzun dönemde de devam etmektedir. Yaralanmalarından 12 ay sonra ölen insanlar üzerinde yapılan bir araştırmada, beyinde TUNEL pozitif hücreler tespit edilebilmiştir (Williams ve ark., 2001). Otopsi çalışmalarında apoptotik TUNEL pozitif hücrelerinin kontüzyon ve pre-kontüzyon alanlarında yoğun olduğu gösterilmiş (Smith ve ark., 2000; Dressler ve ark., 2007). Minambres ve arkadaşları elde ettikleri bulguları apoptoz oranının 6 aylık bir sürede ölüm ile ilişkili bağımsız bir faktör olduğu şeklinde yorumlamıştır (Minambres ve ark., 2008).

Hausmann ve arkadaşları TBH olan 103 olguluk otopsi serisinde apoptozun travmadan bir gün sonra pik yaptığını ve 22 hafta devam ettiğini tespit etmiş; apoptotik hücreleri değerlendirmenin, kafa travmasında travma zamanının tespitine katkıda bulunabileceğini savunmuştur (Hausmann ve ark., 2004). Dressler ve arkadaşları da TBH sonrası yaşam süreleri bilinen (birkaç dk. dan 126 güne kadar) 56 olguya yaptıkları beyin otopsi serisinde TUNEL ve kazpaz-3 immunhistokimyasal boyanma sonuçları ile granülositlerin, CD3+ T lenfositlerin, CD68+ aktive mikrogial hücrelerin histolojik bulgularını birlikte değerlendirerek TBH yaşını %87 doğruluk payı ile belirleyebildiklerini savunmuştur (Dressler ve ark., 2007).

2.3.3. Travmatik Beyin Hasarı, Apoptoz ve Epileptogenez İlişkisi

Posttravmatik epilepsi (PTE), sıklıkla TBH sonucu meydana gelen ve kronik olarak seyreden nöbetlerdir. TBH'ya maruz kalmış hastaların %5'inde PTE'nin ortaya çıktığı bildirilmiştir (Kharatishvili ve Pitkanen, 2010). Posttravmatik epileptogenezin ortaya çıkışı ile ilgili en önemli risk faktörünün TBH olduğu ve aynı zamanda riskin de TBH'nın şiddeti ile ilişkili olduğu ileri sürülmüş (Annegers ve Coan, 2000; Shaw, 2002; Frey, 2003). Ancak, TBH sonrası PTE'ye yol açan hücresel ve moleküler mekanizmalar tam olarak izah edilememiştir.

Deneyisel hayvan modelleri ile kısa ve uzun dönem nöbetlerin hipokampusta apoptotik hücre ölümlerine neden olduğu ve apoptotik sürece yönelik farmakolojik ve genetik müdahaleler ile nöbet sonrası DNA fragmentasyonu ve nöronal hücre ölümünün etkilendiği de bilinmektedir (Engel ve Henshall, 2009). Sıçanlarda PTZ ile gerçekleştirilen nöbet sonrası hipokampusta Fas ve kaspaz-3 immunreaktivitelerinin kontrol grubuna göre çok daha fazla arttığı gösterilmiştir (Cheng ve Zhang, 2014). Temporal lob epilepsili (TLE) çocukların serum Bcl-2 seviyeleri sağlıklı gruba göre yüksek bulunmuş; nöbet sıklığı, hastalığın şiddeti ve süresi ile ilişkili olduğu iddia edilerek TLE'li çocukların takiplerinde Bcl-2'nin kullanılabileceği savunulmuştur (Kilany ve ark., 2012).



Şekil 8: İskemi, TBH ve nöbetin Bcl-2 ailesi üzerine etkisi (Engel ve ark., 2011).

Klinik ve deneysel çalışmalar sayesinde hem TBH hem de epilepsi nedeniyle apoptoz mekanizmasının indüklendiği; hem pro-apoptotik hem anti-apoptotik modülatörlerin seviyelerinde yükselmeler olduğu bilinmektedir. Bu nedenle hem TBH, hem de epilepsi patofizyolojisinin aydınlatılması için apoptotik sürecin araştırılması önem taşımaktadır.

3 – GEREÇ VE YÖNTEMLER

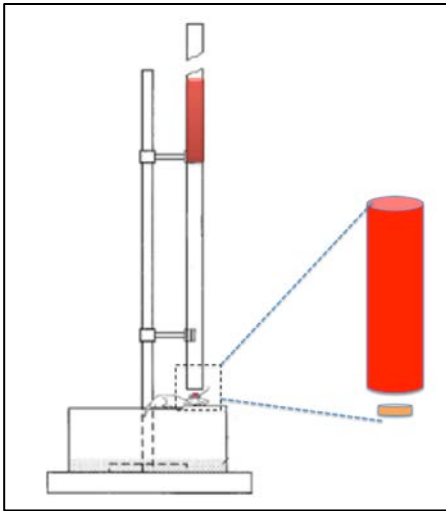
Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından incelenerek 146 karar no ile onaylanan çalışmanın devamı niteliğinde olup, 30.01.2014 tarih, 2014/01 sayılı karar ile etik kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

3.1. Deney Grupları

Çalışmada İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nden (DETAE) temin edilen 28 günlük Sprague Dawley dişi yavru sıçanlar kullanıldı. Sıçanların bakımları DETAE'de gerçekleştirildi. Deney grupları;

- Sham
- Tekrarlanan Travmatik Beyin Hasarı (T-TBH)
- Düşük Doz Pentilentetrazol (dd-PTZ)
- T-TBH + dd-PTZ şeklinde oluşturuldu.

3.2. Kafa Travması Modeli



Kafa travması oluşturmak için Marmarou ve arkadaşlarının uyguladığı “Ağırlık Düşürme Metodu” modifiye edilerek kullanıldı (Marmarou ve ark., 1994) (Şekil 9).

TBH oluşturulmadan önce hayvanlara intraperitoneal (İ.P) olarak 40 mg/kg ketamin anestezisi yapıldı. Anesteziyi takiben, hayvan yüzüstü köpük üzerine yatırıldı ve kafa derisi açıldıktan sonra bregmanın hemen üzerine 1 cm çapında bir disk yerleştirildi. Bu disk üzerine 1 cm çapında ve 150 g ağırlığındaki metal disk 60 cm’lik mesafeden düşürülerek hafif TBH oluşturuldu. Bu işlem günde bir kez olmak üzere dört gün boyunca uygulandı ve böylece T-TBH modeli oluşturuldu. Son TBH uygulamasından iki gün sonra beyin doku örnekleri alındı.

3.3. Düşük Doz Pentilentetrazol Uygulanması

İlgili deney gruplarındaki sıçanlara dd-PTZ, 30 mg/kg dozunda İP olarak enjekte edildi.

3.4. Nöbet Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Deney sonrasında nöbet aktivitesindeki değişiklikleri belirlemek için Racine metoduna göre 0 ile 4 derece arasında skorlama yapıldı. Konvulziyon skalası 0 = Normal, 1 = Donup Kalma, 2 = Baş sallama, 3 = Vücutta yüzeysel klonik hareket, 4 = Ön ekstremitelerde bilateral klonus (piyano çalma), 5 = Jeneralize tonik-klonik nöbet ve yana doğru düşme şeklinde belirlenmiştir (Racine, 1972).

3.5. Beyin Doku Fiksasyonu

Hematoksilen Eozin ve immunhistokimyasal boyamalar için ketamin (60 mg/kg) anestezisi altında yaklaşık 100 ml %4 paraformaldehit ile sol ventrikülden perfüze edilerek beyin dokularının fiksasyonu sağlandı. Fiksasyon sonrasında beyinler çıkarılıp aynı fiksatifte +4°C’de bir gece tutulduktan sonra parafine gömüldü.

3.6. Hematoksilen Eozin Boyama ile Morfolojik İnceleme

Parafin bloklardan pozitif yüklü lamalar üzerine alınan 3 µm’lik kesitler 10 dk sürelerle ksilol içerisinde bekletildi. Deparafinize edilen kesitler sırasıyla absolu alkol, %90’lık alkol, %80’lik alkol ve %70’lik alkolden 10’ar dk süreyle geçirildi. Dokular hematoksilene alınıp 5-6 dk boyunca tutuldu. Hematoksilenden çıkarılan dokular çeşme suyunda yaklaşık olarak 3 dk boyunca yıkandı. Yıkanan dokular asit alkol içinde birkaç saniye soluk mavi renk alana kadar tutuldu ve ikinci yıkamaya alındı. 5-10 dk kadar çeşme suyunda yıkandı. İkinci yıkamaya tabi tutulan dokular eozin boyası içinde 10-15 dk tutuldu. Dokulardaki fazla eozini uzaklaştırmak için sırasıyla %70, %80, %90 ve absolu alkolden geçirildi. Sonra dokular birkaç dk dışarıda kurumaya bırakıldı ve 10’ar dk 3 tane ksilolden geçirildi. Kesitler kapatma solüsyonu kullanılarak lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda incelendi.

3.7. İmmunhistokimyasal Yöntemler

3.7.1. TUNEL İmmunhistokimyasal Boyama

Boyamada, S7101, millipore, MA, ABD kiti kullanıldı. Parafin bloklardan pozitif yüklü lamalar üzerine alınan 3 µm’lik kesitler 1 gece 56 °C’lik etüvde tutularak parafini giderildi ve ardından toluolde 30 dk bekletilerek parafinden iyice arındırıldıktan sonra azalan

alkol serilerinden (sırasıyla %100, %96, %90, %70) 2 kez geçirilip distile suya indirilerek rehidrate edildi. Beş dk distile suda tutulan kesitlere daha sonra antijen iyileştirme amacıyla 15 dk oda ısısında proteinaz K solüsyonu (Millipore 21627) uygulandı ve distile su ile yıkanan kesitler endojen peroksidazı bloklamak için metanolde hazırlanan %3'lük H_2O_2 'de 20 dk karanlıkta bekletildi. Distile su ve PBS ile çalkalandıktan sonra lam üzerindeki kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle çizilerek havuz oluşturuldu ve kesitlere 5 dk oda ısısında dengeleme tamponu uygulandı. Daha sonra kesitler 37 °C'de terminal deoksinükleotidil transferaz enziminde 1 saat bekletildikten sonra durdurma/yıkama tamponuyla 15 saniye çalkalandı ve oda ısısında 10 dk bekletildi. Üç kez PBS'de yıkanan kesitlere oda ısısında 30 dk antidigoksinjenin-peroksidaz konjüguatı uygulandı ve 3 kez PBS ile yıkama sonrasında 10 dk AEC kromojen solüsyonu uygulaması yapıldı. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra 45 saniye Mayer hematoksilen uygulanarak zıt boyama yapıldı, ardından çeşme suyu ve iki kez distile su ile yıkama sonrasında 20 saniye amonyak solüsyonunda bekletildi. Tekrar çeşme suyu ve iki kez distile su ile yıkanan kesitler kapatma solüsyonu konarak lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda apoptotik hücrelerinin boyanma şiddeti ve yaygınlığı yarı kantitatif olarak değerlendirildi.

3.7.2. Kaspaz-3, Bcl-2, GFAP ve c-fos İmmunhistokimyasal Boyama

Beyin kesitlerinde bu proteinlerin varlığını göstermek için parafin kesitlere deparafinizasyon ve hidrasyon işlemleri uygulandı. Ardından her antikor için uygun antijen iyileştirme işlemine geçildi. Antijen iyileştirme işlemi için, GFAP ve kaspaz-3 antikorları çalışılan kesitler sitrat tamponu (pH 6) içinde düdüklü tencerede 1 Atm basınç altında 1 dk; c-fos çalışılan kesitlerin iyileştirme işlemi için kesitler EDTA tamponu (pH 8) içinde mikrodalga fırında 4 defa beşer dk; Bcl-2 çalışılan kesitlerin iyileştirme işlemi için kesitler sitrat tamponu (pH 6) içinde mikro dalga fırında 4 defa ikiler dk tutularak kaynatıldı. Takiben endojen peroksidaz inhibisyonu için, fosfat tamponu ile yıkanan tüm kesitlere nemli ortam içinde %3'lük H_2O_2 10 dk süreyle uygulandı. Sonra araştırılan proteine uygun antikorlar uygulandı. Antikorlar sırasıyla Bcl-2 için rabbit poliklonal anti-Bcl-2 (1/100 sulandırma oranı; Abcam, USA) 60 dk oda ısısında, kaspaz-3 için rabbit monoklonal anti-aktifkaspaz-3 (1/300 sulandırma oranı; Cell Signaling, USA) GFAP için mouse monoklonal anti-GFAP (1/100 sulandırma oranı; Santa Cruz, USA) 30 dk oda ısısında; c-fos proteini için poliklonal rabbit anti-c-fos antikor (1/400 sulandırma oranı; Santa Cruz, USA) 60 dk oda ısısında inkübe edildi. Primer antikor sonrası antipoliklonal biyotinli sekonder antikorlar 20 dk süresince uygulandı. Daha sonra kesitlere streptavin peroksidaz enzimi 20 dk süre ile uygulandı

(Skytek, USA). Takiben kesitlere aminoetil karbazol (AEC) kromojen damlatılarak 5-10 dk içinde renklenme sağlandı. Kromojen işlemi sonrasında kesitler 3-5 dk mayer hematoksilen boyası ile muamele edilerek zıt boyanma sağlandı. Işık mikroskopunda hücrelerinin boyanma şiddet ve yaygınlığı yarı kantitatif olarak değerlendirildi. Deney gruplarındaki hayvanların beyin kesitlerinde TUNEL, kaspaz-3, Bcl-2, GFAP ve c-fos boyanmaları, deney grupları bilinmeden iki kişi tarafından boyanma şiddetleri “+” ile sıfırdan üçe kadar derecelendirilen değerler ile skorlandı.

3.8. Gen Ekspresyonu

3.8.1. Total RNA İzolasyonu

Deney gruplarından alınan beyin dokuları ekspresyon çalışması için öncelikle ribonükleik asit (RNA) bütünlüğünün korunması için RNA later (*Sigma-Aldrich; Kat. No: R0901*) içerisine alındı. RNA izolasyonu yapılacağı zamana kadar -80 °C’de muhafaza edilen doku örnekleri çalışma için homojenize edildi (*MagNa Lyser, Roche Diagnostics, Almanya*). Doku örneklerinden elde edilen üst sıvıdan total RNA izolasyon kiti (*MagNa Pure Compact RNA İsolatıon Kit, Roche Diagnostics, Almanya*) kullanılarak robot aracılığı ile (*Magna Pure Compact, Roche Diagnostics, Almanya*) izolasyon yapıldı. RNA izolasyonuna başlamadan önce kullanılacak olan aletler RNaz içermeyecek şekilde temizlendi. Elde edilen RNA’nın NanoDrop2000 (*Thermo Scientific, USA*) cihazı ile konsantrasyonu ve kalitesi ölçüldü. RNA’lar komplementer DNA sentezi yapılacağı güne kadar -80 °C’de muhafaza altına alındı.

3.8.2. Total RNA’dan Komplementer DNA Sentezi

Total RNA’lardan komplementer DNA (cDNA) sentezi cDNA kiti ile (*Transcriptor First Strand cDNA Syn. Kit, Roche Diagnostics, Almanya*) tüm aşamalarda RNaz içermeyen malzemeler kullanılarak yapıldı. Tüplere 1 µg içerecek hacimde RNA konuldu ve 2 µl random heksamer eklendikten sonra RNaz içermeyen su ile 11,4 µl hacme tamamlandı. 65 °C’de 10 dk ve ardından 4 °C’de iki dk inkübasyonu takiben herbir RNA örneği üzerine 8,6 µl hazırlanan reaksiyon karışımı eklendi.

Reaksiyon Karışımı	Ters transkriptaz reaksiyon	4 µl
	RNaz inhibitörü	0,5 µl
	Deoksinukleotid karışımı	2 µl
	DTT	1 µl
	Ters transkriptaz	1,1 µl

saklandı.

Hazırlanan örneklerden 50°C’de 30 dk, 85°C’de 5 dk ardından 4°C’de iki dk inkübasyon sonunda elde edilen cDNA örnekleri kullanılabilecek kadar -20°C’de saklandı.

3.8.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real time PCR), LightCycler®480 (Roche Diagnostics, Almanya) cihazı ile, sıçan beta-Aktin geni referans gen olarak kullanılarak, kaspaz-3 ve Bcl-2 genleri için yapıldı.

Kaspaz-3 ve Bcl-2 genleri için primer ve problemleri birarada olan özel dizayn edilmiş Real Time Primer-Prob setleri (RealTime Ready, Roche Diagnostics, Almanya) kullanıldı. Çalışılan tüm genler için elde edilen cDNA'lar 200 ng olacak şekilde ayarlanarak Real Time PCR, Master miks (LightCycler®480 Probes Master, Roche Diagnostics, Almanya) kullanılarak hazırlanan reaksiyon karışımı ile yapıldı.

Reaksiyon Karışımı	Primer prob karışımı	1 µl
	Su	4 µl
	LC 480 Probe Master Mix	10 µl
	cDNA	5 µl

Örnek sayısına göre hazırlanan primer-UPL prob içeren karışım 96'lık beyaz mikrokuyucuklu plaka içindeki kuyulara 15µl

olacak şekilde dağıtılıp her kuyuya 5 µl cDNA eklenerek Real Time PCR işlemi aşağıdaki PCR koşulları ile çalışıldı.

PCR Koşulları		
95	10 dk	1 döngü
94	10 sn	
58	30 sn	45 döngü
72	1 sn - okuma	
40	30 sn	1 döngü

Real Time PCR analizi LightCycler®480 cihazında yapılarak kaspaz-3 ve Bcl-2 genlerinin ekspresyon düzeyleri referans gen olarak alınan beta-Aktin ile karşılaştırıldı.

Göreceli ekspresyon düzeyleri (Hedef gen ekspresyonu/referans gen ekspresyonu) formülü kullanılarak hesaplanan sonuçlar, standart örneklerden yararlanılarak çizilen standart eğri üzerinden hesaplanan göreceli nicel değerler üzerinden yorumlandı.

3.8.4. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistik değerlendirmelerinde SPSS for Windows (ver. 21) yazılımı (İstanbul Üniversitesi sertifikalı ürün) kullanıldı. Grup ortalamaları arasında anlamlılık one way ANOVA'yı takiben Tukey ile test edildi. $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi. Değerler, ortalama±standart sapma olarak belirtildi. Sonuçlar tablo ve grafikler ile gösterildi.

4 – BULGULAR

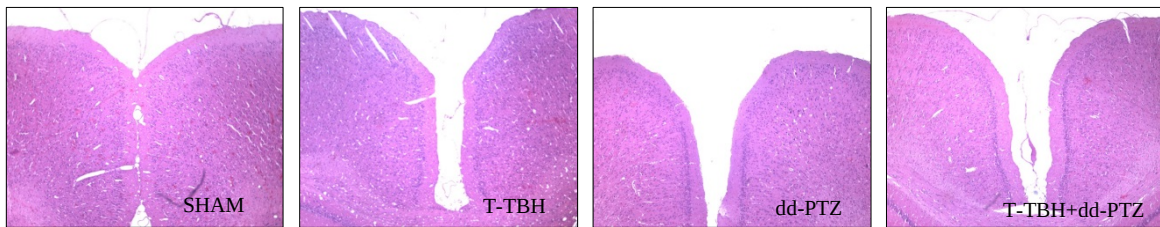
Her grupta (Sham, T-TBH, dd-PTZ, T-TBH+dd-PTZ) sekiz sıçanın kullanıldığı bu çalışmada; gerek hafif düzeyde tekrarlayan travma, gerekse birlikte düşük doz PTZ uygulanan gruplarda belirgin solunum ve dolaşım yetmezliği bulunan sıçanlar ve deney sırasında exitus olan hayvanlar çalışma dışı bırakıldı. Çalışma dışı bırakılan sıçanların toplam oranı %5'in altında idi.

4.1. Nöbet Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Deney gruplarında nöbet aktivitesinin değerlendirmesi için yapılan skorlamada; T-TBH sonrasında nöbet eşiğinde bir değişiklik olup olmadığını belirlemek için düşük dozda (30 mg/kg, ip) tonik ve klonik nöbetler ortaya çıkarmadığı bilinen PTZ dozu seçilmiştir. dd-PTZ grubunda uygulama sonrası hiçbir sıçanda nöbet aktivitesi gözlenmezken son T-TBH uygulanmasından 48 saat sonra PTZ enjeksiyonu yapılan grupta ise (T-TBH+dd-PTZ) Racine skorlamasına göre ortalama 3,3 şiddetinde nöbetlerin ortaya çıktığı gözlemlendi.

4.2. Hematoksilen Eozin Boyama İle Morfolojik Değerlendirme

Bu çalışmada kullanılan travma modelinde oluşan hasar (hafif düzeyde kapalı kafa travması), beyin parankiminde konvansiyonel yöntemlerle tespit edilebilen doku hasarı meydana getirmeyecek düzeydedir. Beyin koronal kesitlerinin Hematoksilen-Eozin boyası ile boyanması sonrası yapılan değerlendirmede de, travma ya da dd-PTZ uygulanan gruplarda dahil olmak üzere morfolojik olarak kanama, kontüzyon ve inflamasyon lehine patolojik bir değişim saptanmadı.

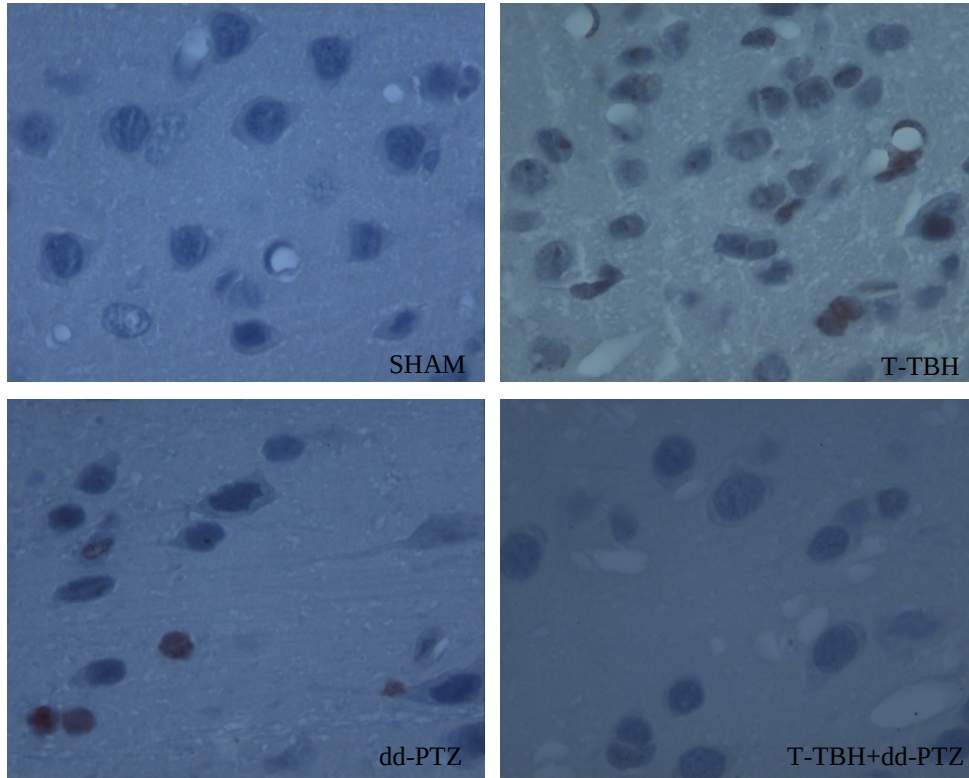


Resim 1. Deney gruplarına ait beyin kesitlerinin korteks bölgelerinde Hematoksilen-Eozin boyama (4X).

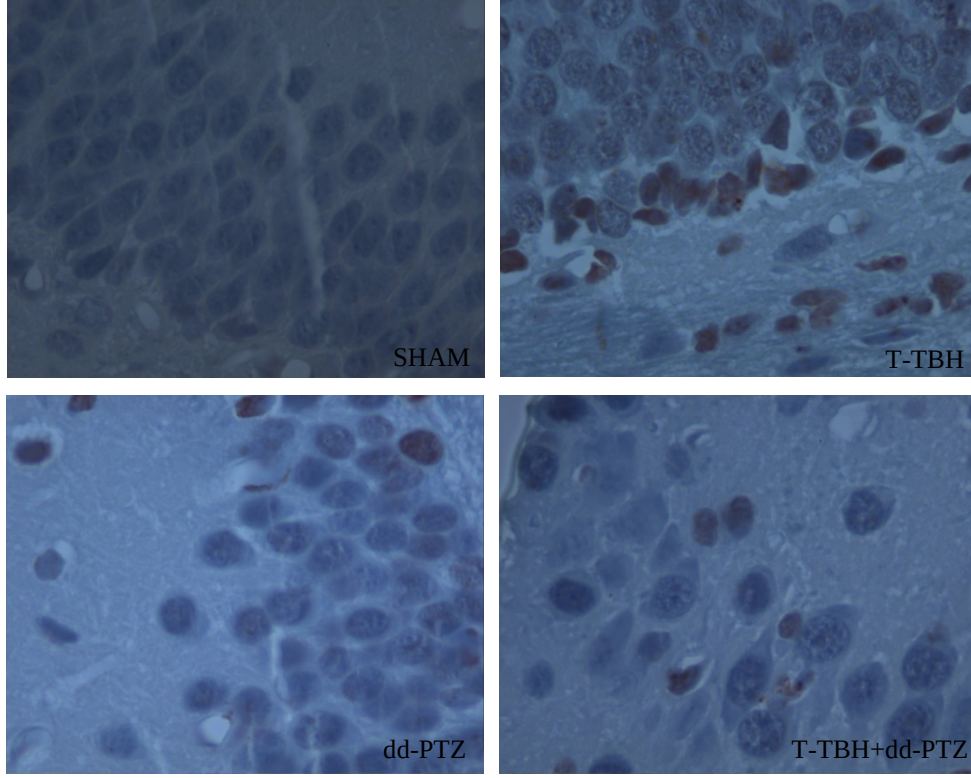
4.3. İmmunhistokimyasal Değerlendirme

4.3.1. TUNEL İmmunhistokimyasal Boyanmanın Değerlendirilmesi

Sham grubuna ait beyin kesitlerinde korteks ve hipokampus bölgelerinde TUNEL boyanmanın negatif (-) olduğu tespit edildi. T-TBH ve dd-PTZ grubunda boyanma şiddetinin hem korteks hem de hipokampusta diğer gruplara göre daha yoğun olduğu (T-TBH grubu hipokampal bölgede ++ düzeyinde) saptandı. T-TBH sonrası dd-PTZ uygulanan grupta ise beklenenin aksine kortekste boyanma saptanmazken, hipokampal bölgede TUNEL (+) saptandı. Elde edilen bulgular ile tek başına T-TBH'nın ve dd-PTZ gruplarında belirgin olmak üzere düşükdoz PTZ uygulamasının kortikal ve hipokampal bölgelerde TUNEL boyası ile saptanabilen ve apoptozu işaret eden DNA kırılmalarına neden olduğu tespit edildi.



Resim 2: Beyin korteks bölgelerinde TUNEL immün boyanma görüntüleri (100X).



Resim 3: Beyin hipokampus bölgelerinde TUNEL immun boyanma görüntüleri (100X).

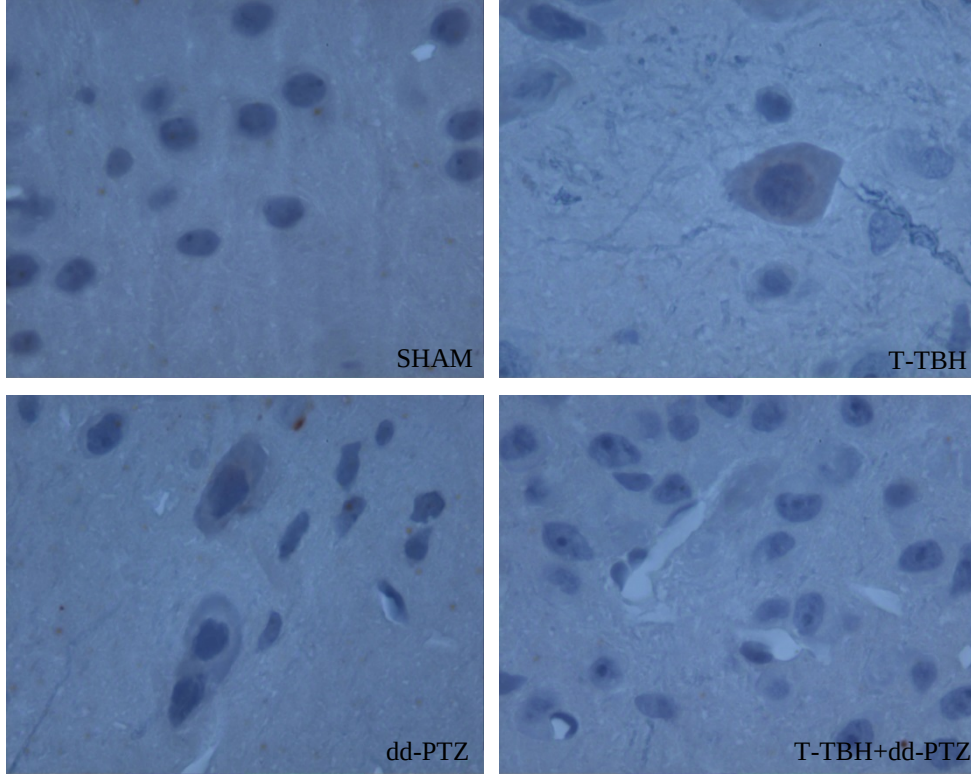
Deney grubundaki hayvanların beyin korteks ve hipokampus bölgelerinde apoptoza özgü DNA kırıklarını gösteren TUNEL immun boyanma şiddetindeki değişiklikler Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1: Deney gruplarına ait TUNEL immunboyanma şiddeti

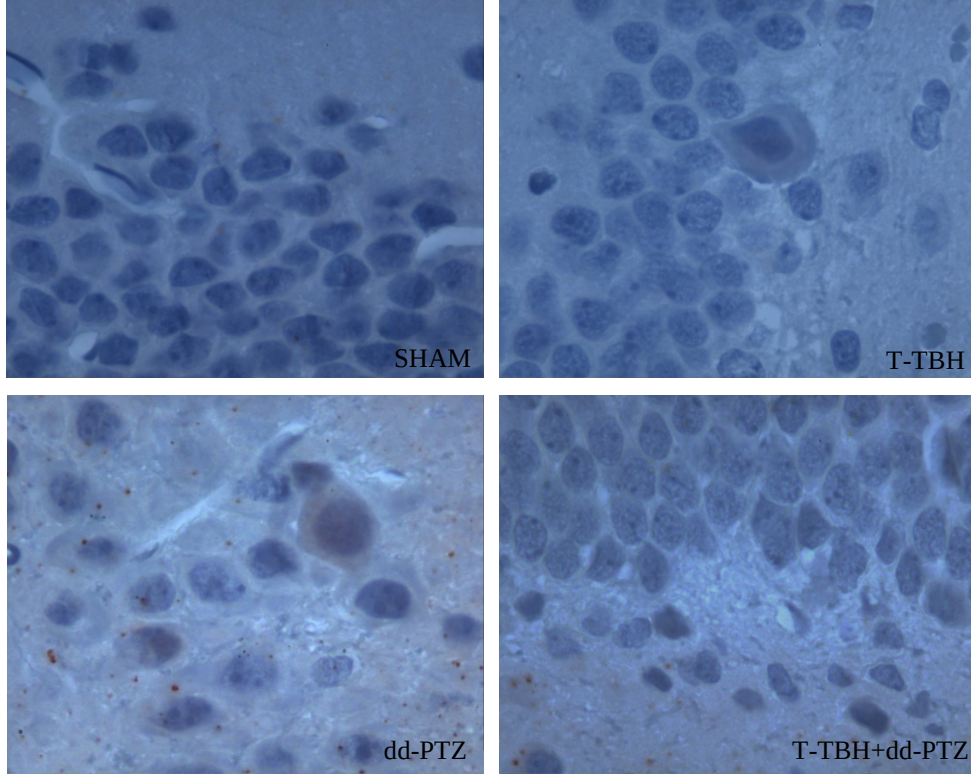
Gruplar	Korteks	Hipokampus
Sham	-	-
T-TBH	+	++
dd-PTZ	+	+
T-TBH + dd-PTZ	-	+

4.3.2. Kaspaz-3 İmmunhistokimyasal Boyanmanın Değerlendirilmesi

Sham ve T-TBH+dd-PTZ gruplarına ait beyin kesitlerinde korteks ve hipokampus bölgelerinde kaspaz-3 immün boyanmanın (-) olduğu tespit edildi. T-TBH ve dd-PTZ gruplarında hem korteks hem de hipokampus bölgelerinde kaspaz-3 pozitif hücreler görüntülendi.



Resim 4: Beyin korteks bölgelerinde kaspaz-3 immün boyanma görüntüleri (100X).



Resim 5: Beyin hipokampus bölgelerinde kaspaz-3 immün boyanma görüntüleri (100X).

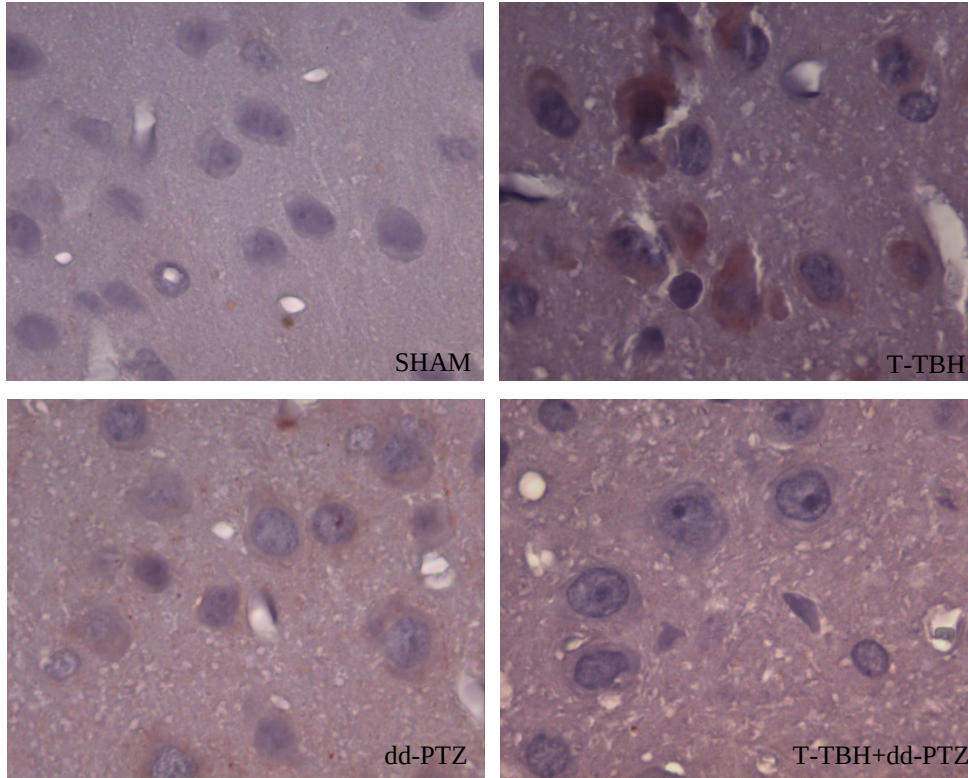
Deney grubundaki hayvanların beyin korteks ve hipokampus bölgelerindeki apoptoz belirteci olan kaspaz-3 immün boyanma şiddetindeki değişiklikler Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2: Deney gruplarına ait Kaspaz-3 immünboyanma şiddeti

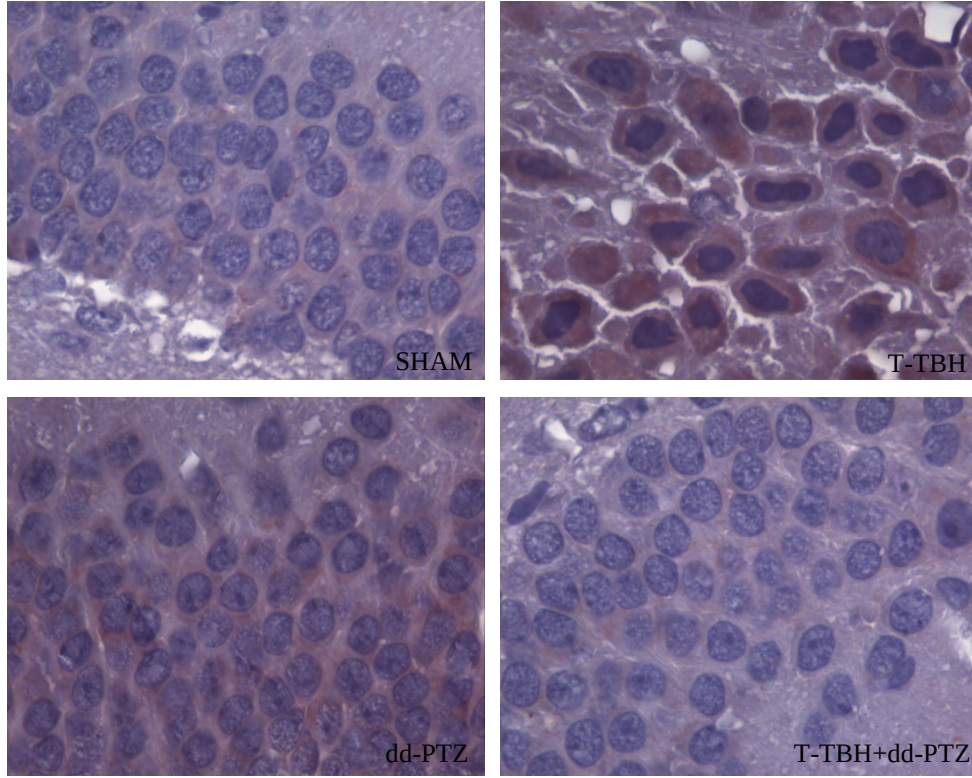
Gruplar	Korteks	Hipokampus
Sham	-	-
T-TBH	+	+
dd-PTZ	+	+
T-TBH + dd-PTZ	-	-

4.3.3. Bcl-2 İmmunhistokimyasal Boyanmanın Değerlendirilmesi

Bcl-2 immün boyanma şiddetleri değerlendirildiğinde, Sham ve T-TBH+dd-PTZ grubu sıçanların beyin korteks ve hipokampus bölgelerinde boyanma olmadığı (-) tespit edildi. dd-PTZ grubu hayvanların hem korteks hem de hipokampus bölgelerinde pozitiflik tespit edilmiş olmakla birlikte T-TBH grubu sıçanların beyin korteks ve hipokampus bölgelerinde tüm gruplara göre belirgin ve şiddetli Bcl-2 reaktivitesi saptandı.



Resim 6: Beyin korteks bölgelerinde Bcl-2 immün boyanma görüntüleri (100X).



Resim 7: Beyin hipokampus bölgelerinde Bcl-2 immün boyanma görüntüleri (100X).

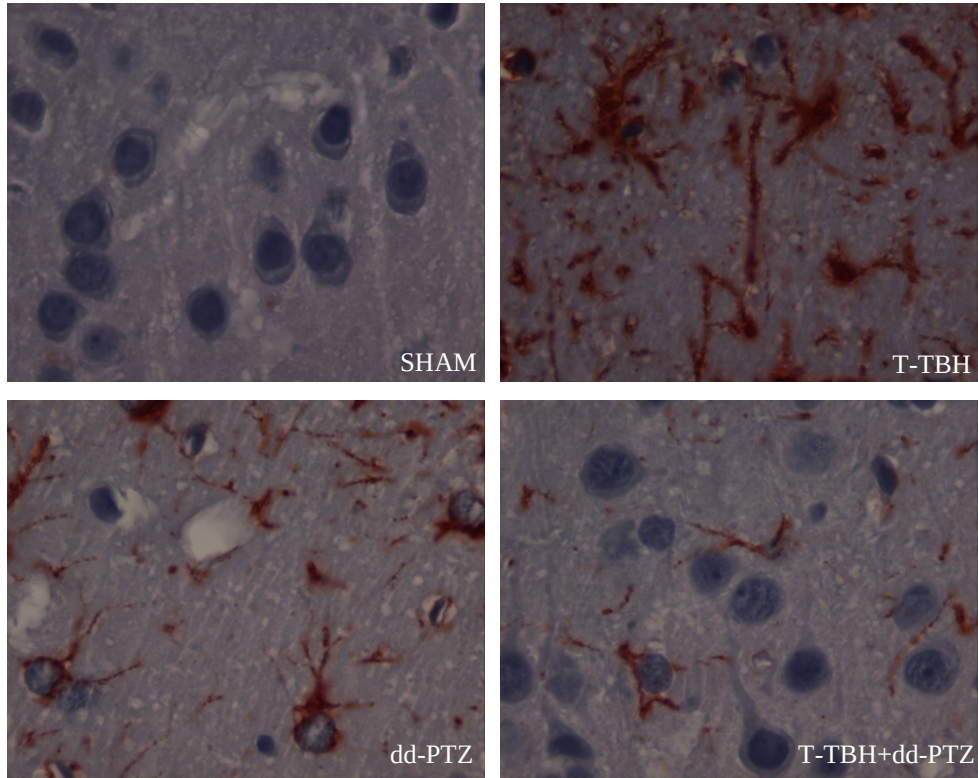
Deney grubundaki hayvanların beyin korteks ve hipokampus bölgelerindeki anti-apoptotik cevabı gösteren Bcl-2 immün boyanma şiddetindeki değişiklikler Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3: Deney gruplarına ait Bcl-2 immünboyanma şiddeti

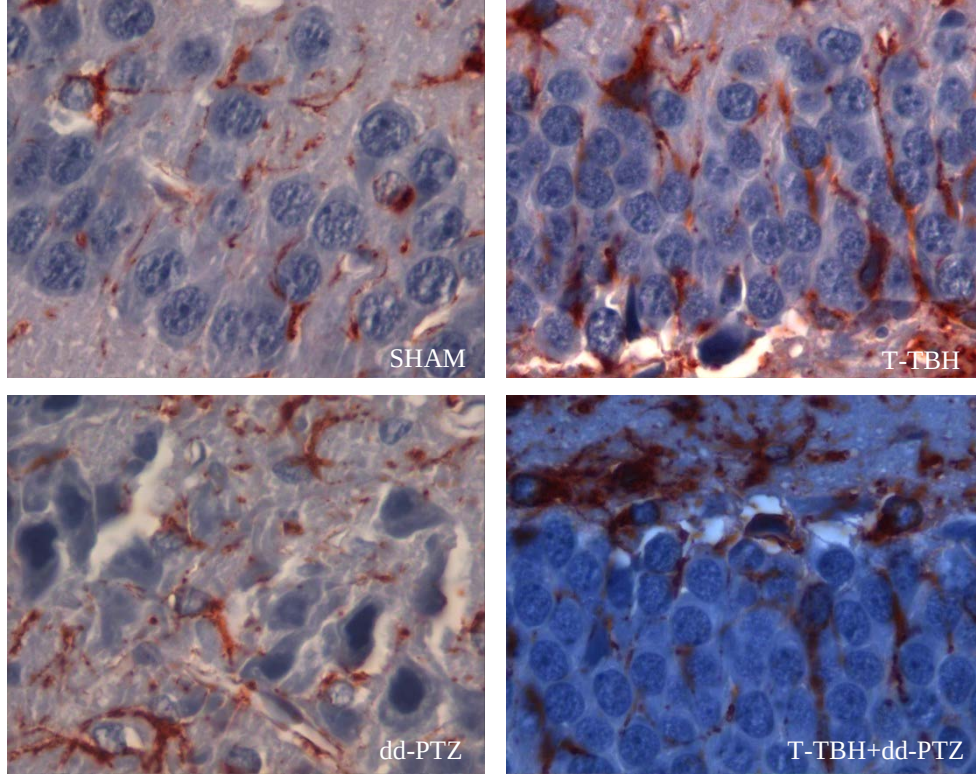
Gruplar	Korteks	Hipokampus
Sham	-	-
T-TBH	++	+++
dd-PTZ	+	+
T-TBH + dd-PTZ	-	-

4.3.4. GFAP İmmunhistokimyasal Boyanmaların Değerlendirilmesi

GFAP immün boyanma şiddetleri karşılaştırıldığında, T-TBH, dd-PTZ, T-TBH+dd-PTZ gruplarındaki hayvanların beyin korteks ve hipokampus bölgelerinde yoğun boyanmalar meydana geldiği tespit edildi. Tekrarlanan travmanın tek başına her iki bölgede de yoğun boyanmalara sebep olması astrositlerin travmaya sekonder olarak belirgin aktivasyon gösterdiklerine işaret etmektedir.



Resim 8: Beyin korteks bölgelerinde GFAP immün boyanma görüntüleri (100X).



Resim 9: Beyin hipokampus bölgelerinde GFAP immun boyanma görüntüleri (100X).

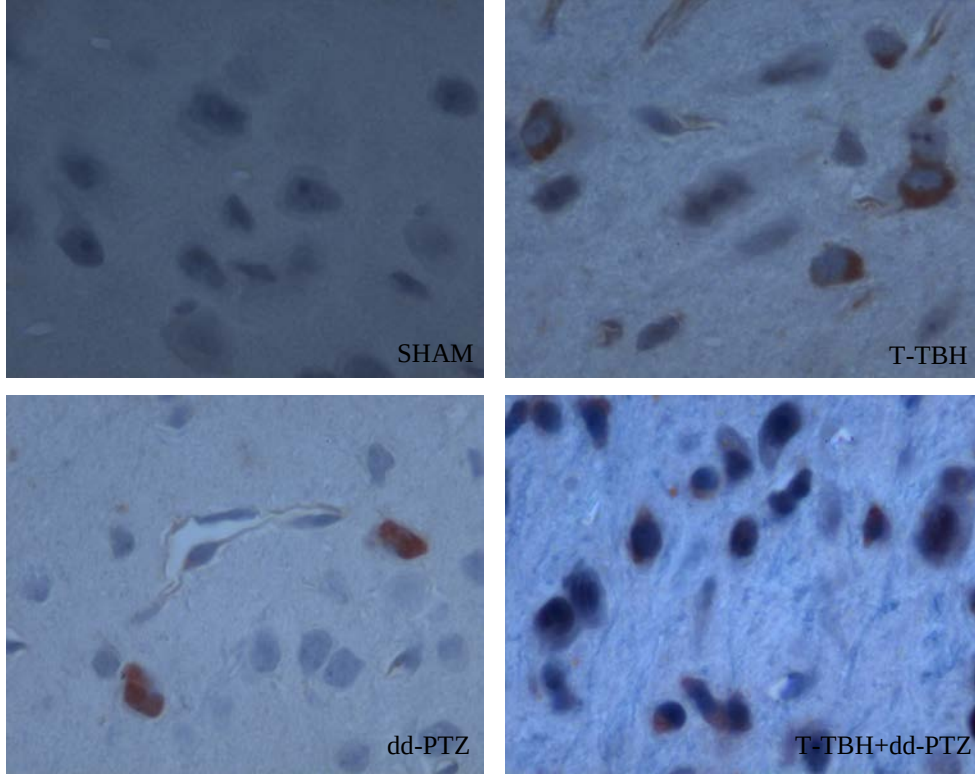
Deney grubundaki hayvanların beyin korteks ve hipokampus bölgelerindeki GFAP immun boyanma şiddetindeki değişiklikler Tablo 4’te gösterilmiştir.

Tablo 4: Deney gruplarına ait GFAP immunboyanma şiddeti

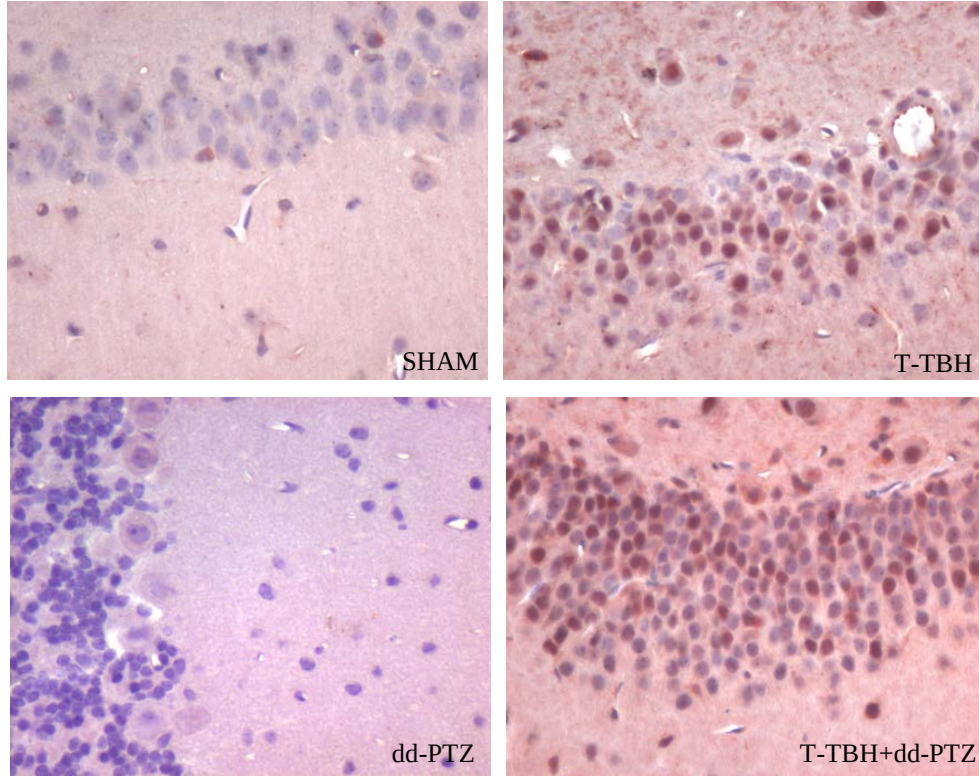
Gruplar	Korteks	Hipokampus
Sham	-	+
T-TBH	+++	+++
dd-PTZ	++	++
T-TBH + dd-PTZ	+	+++

4.3.5. c-fos İmmunhistokimyasal Boyanmanın Değerlendirilmesi

c-fos proteinine ait immunhistokimyasal boyanma sonuçları değerlendirildiğinde; kortekste, T-TBH, dd-PTZ ve en yoğun olarak TBH+dd-PTZ grubunda tespit edildi. Benzer şekilde T-TBH ve T-TBH+dd-PTZ gruplarındaki beyin bölgelerinden özellikle dentat girus ve hipokampus bölgelerindeki nöronların çekirdeklerinde c-fos yapımında artış izlendi.



Resim 10: Beyin korteks bölgelerinde c-fos immun boyanma görüntüleri (100X).



Resim 11: Beyin hipokampus bölgelerinde c-fos immun boyanma görüntüleri (40X).

Deney grubundaki hayvanların serebral korteks ve hipokampus bölgelerindeki c-fos immun boyanma şiddetindeki değişiklikler Tablo 5’te gösterilmiştir.

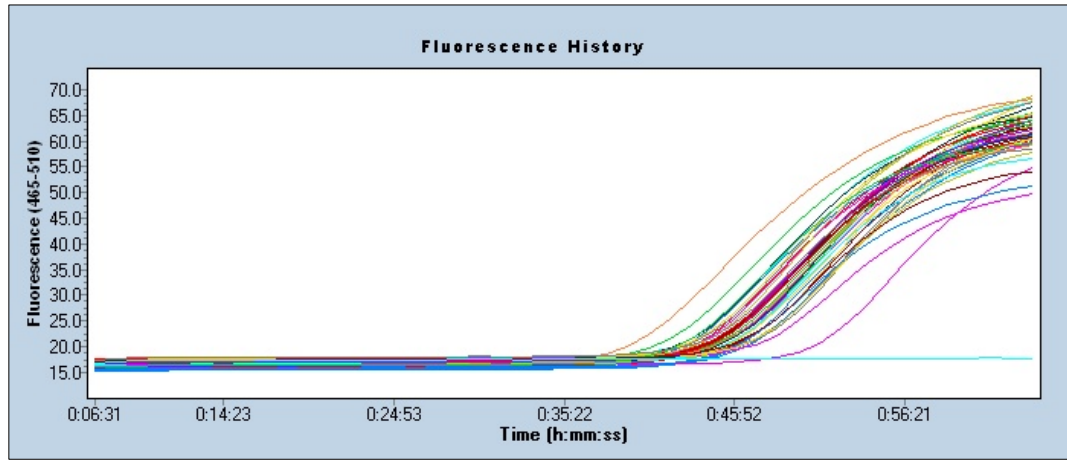
Tablo 5: Deney gruplarına ait c-fos immunboyanma şiddeti

Gruplar	Korteks	Hipokampus
Sham	+	+
T-TBH	+	++
dd-PTZ	+	++
T-TBH + dd-PTZ	++	+++

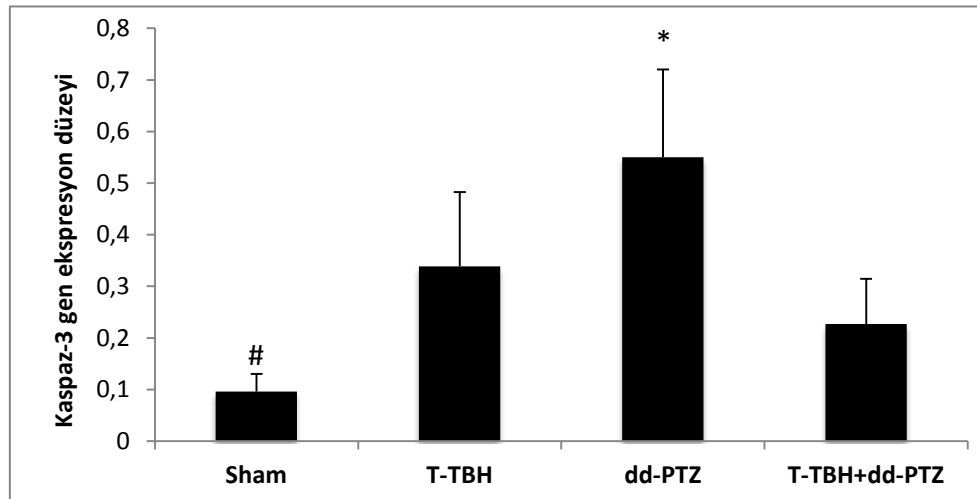
4.4. Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi

4.4.1. Kaspaz-3 Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Deney gruplarındaki hayvanların beyin korteks dokularında kaspaz-3 gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde; tekrarlayan travmaların ve düşük doz PTZ uygulamasının kaspaz-3 gen ifadesini arttırdığı ancak paradoksal bir şekilde T-TBH sonrası PTZ ile meydana getirilen nöbetlerin kaspaz-3 gen ifadesinde düşüşe sebep olduğu ve sham grubuna benzer patern gösterdiği tespit edildi.



Şekil 10: Kaspaz-3 gen ekspresyon amplifikasyon ve standart eğrileri.

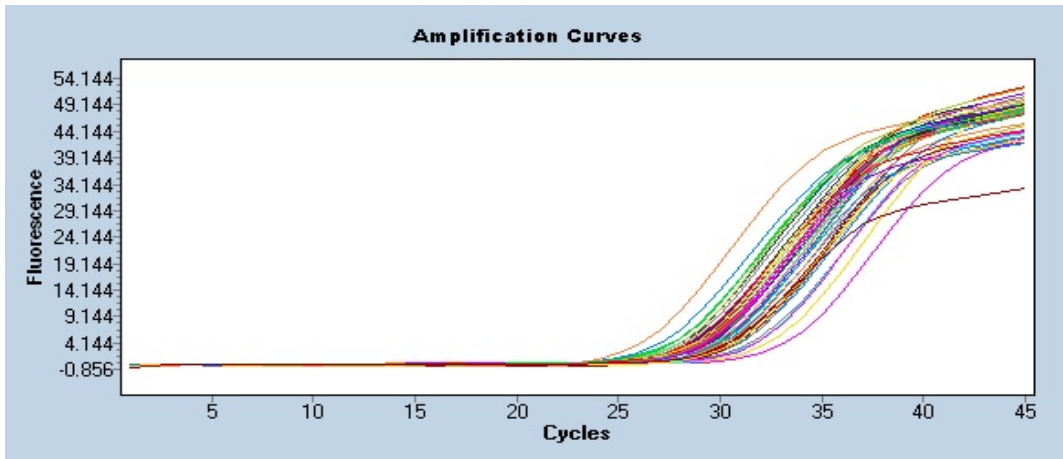


Grafik 1: Deney gruplarına ait kaspaz-3 gen ekspresyon düzeyleri.

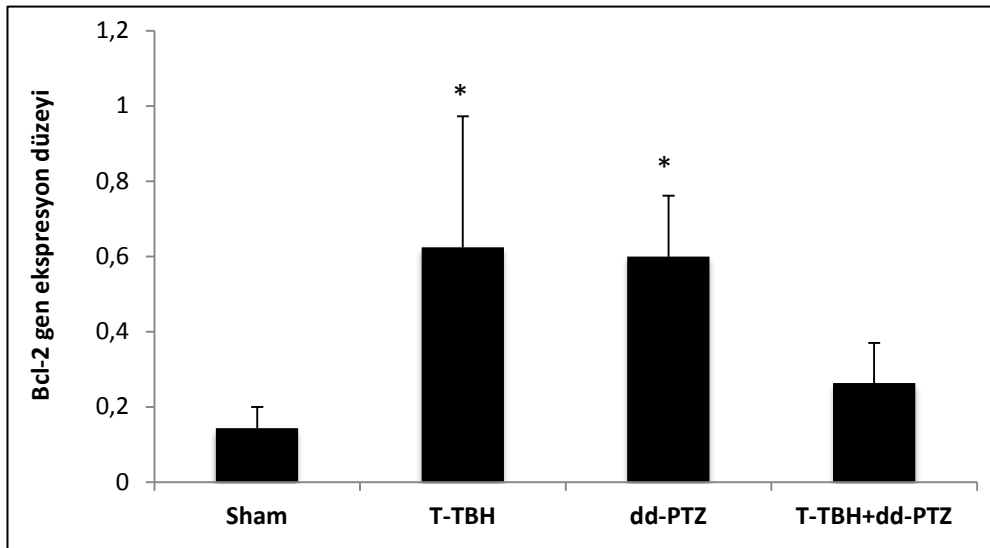
* $p < 0.001$ – diğer gruplarla karşılaştırıldığında, # $p < 0.01$ T-TBH ve dd-PTZ ile karşılaştırıldığında

4.4.2. Bcl-2 Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Deney gruplarındaki hayvanların beyin korteks dokularında Bcl-2 gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde; tekrarlayan travmaların ve düşük doz PTZ uygulamasının Bcl-2 gen ifadesini arttırdığı ancak paradoksal bir şekilde T-TBH sonrası PTZ ile meydana getirilen nöbetlerin Bcl-2 gen ifadesinde düşüşe sebep olduğu ve sham grubuna benzer patern gösterdiği tespit edildi.



Şekil 11: Bcl-2 gen ekspresyon amplifikasyon ve standart eğrileri.



Grafik 2: Deney gruplarına ait Bcl-2 gen ekspresyon düzeyleri.

* $p < 0.05$ – Sham ve T-TBH+dd-PTZ grupları ile karşılaştırıldığında

5 – TARTIŞMA

Kafa travması görülme sıklığı yaş gruplarına göre farklılık göstermekle birlikte, tüm yaş gruplarında önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Kafa travmalarının diğer bölge yaralanmalarına oranla mortalitesinin fazla oluşu, travma sonrası dönemde kişilerin ve yakınlarının başatmak zorunda kaldıkları medikal, sosyal, ekonomik sorunlar konunun önemini daha da arttırmaktadır. 15-25 yaş aralığında belirgin bir artış söz konusu olup, çocukluk çağında da zarara yol açan nedenler arasında ön sıralardadır. Konu, fiziksel istismar, spor yaralanmaları gibi tekrarlanan durumlarda ya da kaza sonucunda ortaya çıkan olası erken ve geç komplikasyonları ile güncelliğini korumakta ve araştırmalar sürdürülmektedir.

Travma sonrası oluşan hasarın tespitinin yanı sıra, olası değişimlerin patofizyolojisinin iyi anlaşılması, tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından da konunun önemini ortaya koymaktadır (Jennett, 1996; Dikmen ve ark., 2003; Vural ve Berker, 2012). Travma sonrası primer ya da sekonder etkilerle kafa içi yapılarda görülen morfolojik ya da ultrastrüktürel değişimlerde rol oynayan süreçlerin anlaşılması, doğrudan tedavi protokollerini etkileyecek, bu mekanizmaların aydınlatılması ile de morbidite ve mortalite oranlarının azalmasına katkıda bulunacaktır.

TBH, ortaya çıkan değişimler açısından primer ve sekonder beyin hasarı olarak ikiye ayrılır. Primer mekanik yaralanma ve doku hasarı ile gerçekleşen süreçlerden oluşmaktadır. Mekanik doku hasarından kaynaklanan primer hasar, nekrotik hücre ölümü ile sonuçlanabilmektedir. Sekonder hasar ise yaralanma ile tetiklenen bir olaylar kaskadı, endojen hücre ölümü yollarının aktivasyonunun gerçekleşmesi süreci olarak tanımlanır (Werner ve Engelhard, 2007). Deneysel ve klinik araştırmalar, travma sonrası hasarın ilerlemesini önlemek ya da azaltmak ve hasar bölgesindeki nöronları korumaya yönelik olarak gerçekleştirilmektedir.

Çalışmalar, erişkinlerde hafif olarak tanımlanan kafa travması oranının %14,7 düzeyinde olduğu (Lagbas ve ark., 2013), çocuklarda ise %74'e kadar yükseldiği bildirilmiştir (Işık ve ark., 2011). Hafif şiddetteki kafa travmaları ile uygulamada sık karşılaşılmakta, hem tanı ve tedaviye yönelik tıp disiplinleri açısından, hem de adli tıp değerlendirmelerinde karşılaşılabilecek sorunlar ve yapılacak değerlendirmeler açısından önemini korumaktadır. Oluşan zararın tespiti, düzeyi ve olası geç etkiler açısından dikkate alınması gereken bir

travma tipidir. Kafa travması şiddetine bağlı olarak yaygın hasar söz konusu olduğunda tanı ve yapılacak değerlendirmeler görece daha kolayken, hasar yaygın olmadığına, tanı ve sekonder etkilerin araştırılması ve önlenmesine yönelik çalışmalarda problemlerin yaşanması da kaçınılmaz bir sorun alanı olarak uygulamada yer almaktadır. Yaygın beyin hasarına neden olmayan hafif düzeydeki travmaların, ödem ve dolaşım yetersizliği nedeniyle moleküler bozukluklara, gen hasarlarına ve bunlara sekonder nöronal hücre ölümlerine neden olabileceği de bildirilerek, hücresel ve moleküler düzeydeki zararın tespiti ve değerlendirilmesi gerektiği vurgulanmıştır (Werner and Engelhard, 2007; Kharatishvili ve Pitkanen, 2010; Itoh ve ark., 2013) ve bu konuda çalışmalar artarak devam etmektedir.

Sarsılmış bebek sendromu olgularında santral sinir sistemindeki patolojik değişimleri izah etmek için hafif T-TBH modeli önerilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda Marmarou ve arkadaşlarının açıklamış olduğu “ağırlık düşürme metodu” modifiye edilerek uygulanmış ve hafif düzeyde TBH oluşturulmuştur. Sarsılmış bebek sendromu olgularında intrakranial kanamalar, subdural hematomlar, retinada ve sklerada hemorajiler gelişebileceği gibi tekrarlayan hafif travmalar sebebiyle diffüz aksonal hasar da meydana gelebilmekte; patolojik değişimler her zaman makroskobik boyutta olmayıp mikroskobik hatta moleküler düzeyde de kalabilmektedir. Bu olgularda hafif nitelikte tekrarlanan travma sonucu oluşacak değişimleri araştırmak için ağırlık düşürme metodu deneysel hayvan çalışmalarında uygun bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Bonnier ve ark., 2004; Bandak, 2005).

Kafa travması modellerinde, travmatik etki tek taraflı olsa bile nörodejenerasyonun her iki hemisferde de görülebildiği ifade edilmektedir (Tashlykov ve ark., 2007 ve 2009). Bu çalışmada, bregmanın hemen üstünden merkezi biçimde uygulanan travmanın morfolojik bulgularını tespitine yönelik olarak konvansiyonel yöntemlerden olan Hematoksilen-Eozin ile beyin kesitlerinde yapılan boyamada, her iki hemisferde de belirgin morfolojik değişim saptanmamıştır. Söz konusu değişimin saptanmamış olması, oluşturulan travmanın çalışmanın amacına yönelik olarak hematoksilen eozin ile bulgunun saptanamadığı hafif düzeyde oluşturulduğunun bir göstergesi olarak da kabul edilmiştir.

Travma sonucu farklı mekanizmaların birlikte çalışarak nörobiyolojik olayları tetiklediği ve epileptogeneze neden oldukları ileri sürülmektedir (Pitkanen ve Sutula, 2002; Vezzani ve ark., 2011). İnsan ve hayvan çalışmalarında TBH’yı takiben hipokampus hasarının meydana geldiği gösterilmiştir (Tate ve Bigler, 2000; Swartz ve ark., 2006). Hipokampus atrofisinin PTE ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Vespa ve ark., 2010). Jeneralize status

epileptikus (SE) nedeniyle hipokampusta ve kortekste yaygın skleroz geliştiği; apoptozun da nöbetlerden 24-48 saat sonra indüklendiği tespit edilmiştir (Ebert ve ark., 2002). Hipokampustaki apoptotik hücre ölümlerinin travmanın şiddeti ve travmanın uygulanma süresi ile doğrudan ilişkili olduğu da bildirilmiştir (Chen ve ark., 2013). Bunun yanında PTE riskinin de travma şiddeti ile doğrudan ilişkili olduğunu savunan çalışmalar mevcuttur (Annegers ve Coan, 2000; Shaw, 2002; Frey, 2003). Bu kapsamda, TBH sonrası beyinde apoptotik hücre ölümleri ve bu değişimin yansımalarının, araştırılması ve tartışılması gereken bir konu olduğunu düşündürmektedir.

Bu çalışmada, apoptoz tespitine yönelik DNA kırılmasını gösteren TUNEL immunhistokimyasal boyama ile yapılan değerlendirmede; hafif düzeyde T-TBH'nın ve düşük doz PTZ uygulamasının beyin korteks ve hipokampus bölgelerinde DNA kırılmalarına neden olduğu tespit edilmiştir. Bu apoptotik değişim özellikle T-TBH grubu hipokampus bölgesinde yoğunlaşmış, TUNEL pozitif hücreler tespit edilmiştir. Hayvan çalışmaları, hafif TBH'nın beyin kortikal ve hipokampal bölgelerinde TUNEL pozitif apoptotik hücre ölümlerine neden olduğunu (Raghupathi ve ark., 2002), insan çalışmaları yaralı beyin dokuda TUNEL pozitifliğin arttığını göstermiştir (Clark ve ark., 1999; Smith ve ark., 2000; Dressler ve ark., 2007). TBH'dan aylar sonra ölen insanların beyin dokularında TUNEL pozitifliğinin tespit edilebildiğini savunan çalışmalar olsa da (Williams ve ark., 2001), hayvan deney modelleri TUNEL pozitifliğinin TBH sonrası 12-24 saat aralığında pik yaptığını ve ortalama 48-72 saat sonra düşüş sergilediğini vurgulamaktadır (Raghupathi ve ark., 2002; Chen ve ark., 2013). Bu araştırmada, tekrarlayan travmaların 48 saat sonrasında dekapitasyon yapılmış ve doku örnekleri alınmıştır. Hem PTZ hem de T-TBH grubunda TUNEL + boyama saptanması, her iki etkinin de apoptozu indükleyici özellikte olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, hafif düzeyde TBH'nın dahi apoptotik hücre ölümleri ile nöronal hasara neden olduğu görülmektedir. Ancak PTZ uygulaması için farklı görüşler de söz konusudur. Sıçanlarda PTZ ile meydana getirilen nöbetlerden sonra hipokampus bölgesinde TUNEL pozitif apoptotik hücre tespit edilmediği (Pineau ve ark., 1998; Pavyola ve ark., 2005) ancak lityum pilokarbin ile oluşturulan status epileptikus sonrası beynin korteks bölgesinde yoğun TUNEL pozitif hücreler tespit edildiği bildirilmiştir (Pineau ve ark., 1998). Çalışmamızda da dd-PTZ grubu sıçanların beyin korteks ve hipokampus bölgelerinde TUNEL pozitif boyanmalar saptanmıştır. T-TBH sonrası uygulanan dd-PTZ grubunda belirgin, hatta artmış boyanma olmaması beklenenin aksine şaşırtıcı bir bulgu olmuştur. Bulgular, oluşturulan travma

koşulları sonrasında uygulanan PTZ'ye bağlı nöbetlerin, apoptoz sürecini maskeleyiğini düşündürmektedir.

Deney gruplarında kaspaz-3 ve Bcl-2 boyanma dereceleri değerlendirildiğinde; TUNEL boyanmaya benzer bir şekilde T-TBH ve PTZ grubunda immunreaktivitenin arttığı, T-TBH+dd-PTZ grubunda ise immunreaktivitenin düştüğü görülmektedir. Bcl-2 ailesi proteinleri apoptotik sürecin modülatörleridir ve TBH sonrası hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyelerinde artış meydana gelmektedir (Strauss ve ark., 2004). Pro-apoptotik Bax artışının apoptozu artırarak TBH sonrası nörolojik sonuçları olumsuz etkilediği; anti-apoptotik Bcl-2'nin ise nöroprotektif etkide bulunduğu vurgulanmıştır (Ng ve ark., 2000; Nathoo ve ark., 2004). Kaspazlar ise apoptoza özgü proteazlar olarak çalışan; normalde pro-enzim formunda olan ve apoptoz indüklendiğinde aktif hale gelen enzimlerdir. TBH sonrası özellikle kaspaz-3'ün beyin dokuda artış gösterdiği hem hayvan hem de insan çalışmalarında gösterilmiştir (Clark, 1999; Dressler ve ark., 2007). Sıçanlarda PTZ ile gerçekleştirilen nöbet sonrası beyin hipokampus bölgesinde kaspaz-3 boyanma artışı da bildirilmiştir (Cheng ve Zhang, 2014). Ayrıca TLE'li çocukların serum Bcl-2 seviyesinin hasta olmayan çocuklara göre çok yükseldiği; Bcl-2 düzeylerinin hastalığın süresi, frekansı ve ağırlığı ile korele olduğu saptanmıştır (Kilany ve ark., 2012). Hafif TBH sonrası sıçanlarda hipokampus bölgesinde TUNEL pozitif ve kaspaz-3 immunreaktivitelerinin arttığı; boyanma düzeyleri ile kognitif bozulmanın bağlantılı olduğu vurgulanmıştır (Park ve ark., 2014). Tweedie ve arkadaşları sıçanlarda hafif TBH sonrası hipokampusta apoptoz biyobelirteçlerinden prokaspaz-3, bax, sitokrom-c, AIF'nin yükseldiğini, bu yüksekliğin travmanın şiddeti ile doğru orantılı bulunduğunu, TBH'lı sıçanlarda davranış problemleri saptadıklarını ve bütün bunlardan dolayı apoptotik hücre ölümlerinin TBH sonrası hipokampusta ciddi hasar meydana getirdiğini belirtmiştir (Tweedie ve ark., 2007). Anti-apoptotik gen Bcl-2 ve onun ürünü olan proteinin, sıçanlarda TBH'dan sonra korteks ve hipokampusta arttığı, Bcl-2 eksprese eden hücrelerin morfolojik olarak normal görüldüğü bildirilmiştir (Clark ve ark., 1997). Bcl-2 ekspresyonu, yara almış ama hayatta kalmaya devam eden hücrelerde görülür. Bcl-2 overekspresyonu olduğu zaman, nöronlar iskemik yaralanmaya direnç kazanmaktadır. Bu nedenle Bcl-2 ekspresyonu travmadan sonra yaralanmış nöronları hayatta tutmak için önemli bir faktördür (Clark ve ark., 1999). Ayrıca Bcl-2 ekspresyonunun düşmesi ve pro-apoptotik bir protein olan Bax'ın yükselmesinin nöronal ve glial apoptotik hücre ölümünü arttırdığı bildirilmiştir (Dorszewska ve ark., 2004). Sıçan beyinlerinde cerrahi hasar sonrası lezyon çevresinde yoğun nöronal ölüm gerçekleştiği, nöronların ilk günlerde nekroz ve apoptoz ile

ölüme giderken dördüncü günden itibaren apoptozun hakim olduğu, apoptotik hücrelerin pro-apoptotik Bax ve kaspaz-3 ile yoğun immunboyanma reaktivitesi gösterdiği; kortikal bölgede lezyon çevresinde astrositlerin migrasyon ve aktivasyonunda artış olduğu, astrositlerin hipertrofik hal aldıkları, hasarın ilerleyen dönemlerinde astrositlerin de apoptoz üzerinden ölüme gittiği bildirmiştir (Sulejczak ve ark., 2008).

Çalışmamızda immunhistokimyasal boyamaların yanısıra kaspaz-3 ve Bcl-2'nin gen ekspresyon düzeyleri de ilgili deney gruplarının beyin korteks bölgelerinden alınan örneklerde incelenmiştir. Her iki biyobelirteç için de boyanma şiddetleri ile gen ekspresyon düzeylerinin korele olduğu saptanmıştır. T-TBH + dd-PTZ gruplarında hem immunreaktivitenin (TUNEL, kaspaz-3, Bcl-2) hem de gen ifadelerinin (kaspaz-3 ve Bcl-2) paradoksal bir şekilde sham grubuna benzer bir patern göstermesi; travma sonrası meydana gelen nöbetlerin başka bir fizyopatolojik mekanizma üzerinden ilerlediğine, hem apoptozun hem de anti-apoptotik cevabın downregüle olduğuna işaret etmektedir. Bilindiği gibi apoptoz oldukça kompleks ve enerji gerektiren bir süreçtir ve enerji yetmezliği durumlarında apoptoz yürütülemeyecektir (Wong ve ark., 2005). Chen ve arkadaşları, hafif-orta ve ağır düzeyde, yedi gün süre ile uyguladıkları kafa travmalarından sonra sıçan hipokampusundaki TUNEL pozitif apoptotik hücrelerin üçüncü güne kadar yükselmesine rağmen daha sonra hızlı bir şekilde düşüş göstermesini; travmanın ağırlaştıkça nöronal dokuda enerji yetersizliğine sebep olabileceği şeklinde yorumlayarak uygulanan enerjinin dokunun kompanse edebileceğinden fazla olduğu zaman nekroz ile ölen hücre sayısının artacağı hipoteziyle açıklamıştır (Chen ve ark., 2013). Çalışmamızda, tekrarlanan travmadan 48 saat sonra eklenen koşulun (dd-PTZ uygulaması) yukarıda tanımlanan ve apoptoz için gerekli olan ATP kullanımında yetersizlik yaratabileceği, ve apoptozun maskelenmesi olasılığının da göz önünde bulundurulması gerektiğini düşündürmektedir. Nöbetleri takiben apoptozun oluşmasında kaspaz ve Bcl-2 gibi düzenleyici proteinlerin oldukça önemli role sahip olduğu bildirilmektedir (Fujikawa, 2005). Deneysel olarak yapılan bir çalışmada SE indüklendikten sonra kaspaz inhibitörleri verilmiş ve bu inhibitörlerin verilmesinden önce ve sonraki apoptotik hücre ölümü değerlendirildiğinde hücre ölümünün azaldığı ve nöbetlerin engellendiği görülmüştür. Sonuçta, nöronal dejenerasyonda kaspazların özellikle de kaspaz-3'ün oldukça önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir (Bengzon ve ark., 2002; Kondratyev ve Gale, 2000). Kaspaz inhibitörleri ile hücre dejenerasyonunu engellemek, alternatif yeni bir sağıltım seçeneği olarak düşünülmektedir (Bengzon ve ark., 2002).

Nöronal aktivasyon belirteçlerinden biri olan c-fos protein yapımının TBH sonrasında ve nöbetler sırasında arttığı bilinmektedir (Seiffert ve ark., 2004; Finnie ve ark., 2005; Harvey ve Sloviter, 2005; Marchi ve ark., 2007). Çalışma bulgularımız, T-TBH sonucunda c-fos aktivite artışının nöronları daha duyarlı ve kolay uyarılabilir hale getirdiğini göstermekte ve bu koşullarda uygulanan düşük doz PTZ sonrasında nöbetlerin ortaya çıktığını göstermektedir.

Morfolojik ve fonksiyonel olarak değerlendirilmesi gereken yapılardan biri de astrositlerdir. Astrositlerin, beyindeki potasyum (K^+) iyonlarının fazlasını kana atarak, anormal K^+ varlığı ile nöronal aktivasyon sonucu oluşabilecek epilepsi kaynaklı nörolojik bozuklukların önlenmesine ve beyin doku hücrelerarası alanın pH kontrolünün sağlanmasına yardım ettiği bilinmektedir (Santos ve ark., 2005). Bu hücreler, aynı zamanda anjiyogenez sırasında KBB'nin gelişmesi ve korunmasında önemli role sahiptir (Santos ve ark., 2005; Neuwelt ve ark., 2008). GFAP ayrıca, normalde beyaz madde ve serebral korteksin alt zonlarında tespit edilebilmesine rağmen, adli nöropatolojide beyin hasarına sekonder farklılaşmış olan astrositlerin morfolojik ve fonksiyonel değişikliklerini tespit etmek üzere de kullanılabileceği bildirilmiştir (Liedtke ve ark., 1996; Oehmichen ve ark., 2003 ve 2009). Astrositlerin sitoplazmasında mikofilament yapıdaki GFAP varlığı bu hücrelerin tanınmasında ve aktivitesinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılır. GFAP boyanmasındaki artışın, ödemden dolayı glial filament demetlerinin ayrılmasından veya sentezindeki artışından dolayı olduğu düşünülmektedir (Eng ve Ghirnikar, 1994). Çalışmamızda deney gruplarındaki sıçanların beyin korteks ve hipokampus bölgelerindeki GFAP immunhistokimyasal boyanma dereceleri incelendiğinde sham dışındaki gruplarının tamamında artış saptanmıştır. Elde edilen bulgular, hafif TBH'nın; düşük doz PTZ uygulamasının ve TBH sonrası düşük doz PTZ ile oluşan nöbetlerin beyin korteks ve hipokampus bölgelerinde astrosit aktivitesini arttırdığına işaret etmektedir. Itoh ve arkadaşları, TBH sonrasında sıçan beyin korteksinde GFAP immunreaktivitesinin arttığını, DNA kırılmaları meydana getirdiğini, egzersizin hem GFAP boyanma derecesini düşürerek hem de DNA'daki kırılmaları azaltarak nöronal dokuda iyileşmeye katkıda bulunduğunu bildirmiştir (Itoh ve ark. 2011). GFAP ve nöronal apoptozun immunhistokimyasal biyobelirteçleri ileri yıllarda adli nöropatolojinin rutin araştırma protokolleri arasında yerini alabileceği ileri sürülmektedir (Aufiero ve ark., 2006; Wang ve ark., 2012).

Çalışmada, tek başına uygulandığında nöbet oluşturmeyen hafif düzeydeki kafa travmasının, tekrarlayan biçimde uygulandığında T-TBH'nın sıçanlarda nöbet eşiğini

düşürdüğü tespit edilmiştir. Normalde sıçanlarda düşük dozda nöbete sebep olmadığı bilinen PTZ (30 mg/kg, ip), T-TBH sonrası sıçanlara uygulandığında Racine skorlamasına göre ortalama 3 şiddetinde nöbet meydana getirmiştir. Saptanan bu bulgu, nöronal aktivitenin travma sonrasında uygulanan PTZ ile arttığını göstermektedir. Bu klinik gözlem aynı zamanda nöronlarda ve astrositlerde saptanan aktivite artışını destekler niteliktedir.

Karmaşık ve aynı sonuca yönelik birden fazla mekanizmanın rol aldığı, aynı zamanda bilinmeyen çok olduğu merkezi sinir sistemi üzerinde, tek bir mekanizma ile gelişen olayları açıklamak ya da dışlamak araştırmacıları yanıltıcı sonuçlara götürebilecektir. Dolayısıyla, saptanan her bir değişim için olası mekanizmaların ayrıntılı olarak değerlendirilmesi gerektir. Dış etki sonucu oluşan apoptoz bu çember içinde dikkate alınması gereken mekanizmalardan sadece biridir. Bu bağlamda, TBH sonrası farklı yollardan ilerleyen mekanizmaların unutulmaması gerekir. Göz önünde bulundurulması gereken değişimlerden biri de KBB değişimleridir. PTE gelişen insanlarda KBB’de bir yetmezlik ortaya çıktığı, yapı bütünlüğünün bozulduğu MRI bulguları ile gösterilmiş (Tomkins, 2001 ve 2008) ve kafa travmasına maruz kalan hastalarda nöbetlerin KBB hasarı sonucu ortaya çıktığı, nöbetlerin de KBB yıkımına yol açtığı bildirilmiştir (Oby ve Janigro, 2006; Tomkins ve ark., 2008). Bu çalışmalarda da tek başına KBB hasarına yönelik çalışmaların PTE fizyopatolojisini aydınlatmaya yeterli olmadığı; TBH sonrası hipokampusta meydana gelen apoptotik hücre ölümlerinin de araştırılması gerektiği vurgulanmıştır. Dolayısıyla sistemlerin birbirinden bağımsız olmadığı gözetilerek, koşullara göre değişebilen fizyopatolojik süreçlerin tanımlanmasına ihtiyaç vardır. Elde edilen bilgi ve bulgular, bu alanda yapılmış araştırmalar kafa travması sonrası meydana gelen değişimlerin fizyopatolojisinde apoptoz mekanizması, moleküler değişimler ve gen hasarı günümüz ve gelecekte araştırmaların ilgi odağı olmaya devam edeceğini göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışma bulgularıyla; hafif düzeyde T-TBH’nın erken dönemde beyin korteks ve hipokampus bölgelerinde apoptotik hücre ölümlerine neden olduğu, mikrogial hücre proliferasyonunu arttırdığı, nöronal hücrelerde nöbet eşiğini düşürdüğü ve travmaya sekonder olarak nöronal dokuda anti-apoptotik cevabın da yükseldiği; ayrıca travma sonrası PTZ ile indüklenen nöbet sonrası akut dönemde apoptozun ve anti-apoptotik cevabın downregüle olduğu saptanmıştır.

Tek bir anti-apoptotik biyobelirteç kullanılmış olması (Bcl-2), (BAX ve AIF’nin de kullanılarak değişimleri izlemenin mekanizmanın aydınlatılmasında yararlı olacağı), gen

ekspresyon düzeyinin bir bölgeden alınan örneklerde çalışılması, travma sonrası sadece erken döneme ait bulguların elde edilmiş olması, yavru sıçanlar uzun dönem izlenemediğinden tekrarlayan travma koşullarının geç dönemde hafıza, öğrenme vb davranışsal değerlendirmelere nasıl yansıtacağı belirlenmemiş olması da çalışmanın sınırlılıkları arasında sayılabilir.

5 – SONUÇ VE ÖNERİLER

- Kafa travmaları tüm yaş gruplarında önemli bir sorundur. Diğer bölge yaralanmalarına oranla mortalitesinin fazla oluşu, travma sonrası dönemde kişilerin ve yakınlarının başetmek zorunda kaldıkları medikal, sosyal, ekonomik sorunlar konunun önemini arttırmaktadır. Fiziksel istismar, spor yaralanmaları gibi tekrarlanan durumlarda ya da kaza sonucunda ortaya çıkan olası erken ve olası geç komplikasyonları ile güncelliğini korumaktadır
- Travma sonrası primer ya da sekonder etkilerle oluşan kafa içi değişimlerin ve bu değişimlere neden olan mekanizmaların anlaşılması, doğrudan tedavi protokollerini etkileyecek, bu mekanizmaların aydınlatılması ile de morbidite ve mortalite oranlarının azalmasına katkıda bulunacaktır.
- Kafa travması şiddetine bağlı olarak yaygın hasar söz konusu olduğunda tanı ve yapılacak değerlendirmeler görece daha kolayken, hafif düzeydeki travmaların, sekonder etkilerle moleküler bozukluklara, gen hasarlarına ve bunların sonucunda nöronal hücre ölümlerine neden olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.
- Hafif düzeydeki kafa travması hipokampal bölgede daha belirgin olmak üzere apoptoza neden olmaktadır.
- Çalışmanın beklenmeyen sonuçlarından biri de T-TBH sonrası dd-PTZ uygulanan grupta apoptotik hücre varlığının az oluşudur. Parametreler (Bcl-2 ve kaspaz-3) immunhistokimyasal ve gen ekspresyonu açısından birbiri ile örtüşmektedir.
- Bulgular, oluşturulan travma koşulları sonrasında uygulanan PTZ'nin mekanizma açık olmamakla birlikte nöroprotektif bir etki ile apoptoz sürecini maskeleydiğini düşündürmektedir. Apoptoz sürecinin ATP'ye bağımlı enerji gerektiren bir zincir olduğu dikkate alındığında, deney koşullarının enerji yetersizliği yaratarak apoptoz mekanizmasını engelleyebileceği de düşünülerek konunun bu yönü ile de araştırılması gerekmektedir.

- T-TBH sonucunda nöronlar daha duyarlı ve kolay uyarılabilir hale gelip, bu koşullarda uygulanan düşük doz PTZ sonrasında nöbetler ortaya çıkmaktadır.
- Karmaşık ve aynı sonuca yönelik birden fazla mekanizmanın rol aldığı, aynı zamanda bilinmeyen çok olduğu merkezi sinir sistemi üzerinde, olayları tek bir mekanizma ile açıklamak ya da dışlamak araştırmacıları yanıltıcı sonuçlara götürebilecektir. Dolayısıyla, saptanan her bir değişim için olası mekanizmaların ayrıntılı olarak değerlendirilmesi gerekir.
- Bu araştırmaların sınırlılıkları da dikkate alındığında, hafif düzeydeki kafa travmalarının erken ve geç dönem hem hücresel hem de klinik yansımalarını kapsayacak şekilde genişletilmesi, mekanizmanın aydınlatılmasına dolayısıyla adli tıp açısından nedensellik bağının ortaya konmasına, elde edilen verilerle de mortalite ve morbidite oranlarının düşmesine katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

- Adoga AA, Ozoilo KN. The epidemiology and type of injuries seen at the accident and emergency unit of a Nigerian referral center. *J Emerg Trauma Shock*. 2014; 7(2): 77-82.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, ve ark. Programmed Cell Death (Apoptosis). In: *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26873/>
- Andruszkow H, Deniz E, Urner J, Probst C, Grün O, Lohse R ve ark. Physical and psychological long-term outcome after traumatic brain injury in children and adult patients. *Health Qual Life Outcomes*. 2014; 12: 2-8
- Annegers JF, Coan SP. The risks of epilepsy after traumatic brain injury. *Seizure* 2000; 9(7): 453-457.
- Arıcan N, Kaya M, Yorulmaz C, Kalaycı R, İnce H, Küçük M ve ark. Effect of hypothermia on blood-brain barrier permeability following traumatic brain injury in chronically ethanol-treated rats. *Int J Neurosci*. 2006; 116(11): 1249-1261.
- Aufiero BM, Tsokos GC, Tsokos M, Wong HK. Apoptosis in Tissue Injury. In: *Forensic Pathology Reviews Volume 4*, 2006, pp 331-351.
- Azbill RD, Mu X, Bruce-Keller AJ, Mattson MP, Springer JE. Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. *Brain Res*. 1997; 765(2): 283-290.
- Bailes JE, Cantu RC. Head injury in athletes. *Neurosurgery* 2001; 48(1): 26-45.
- Bandak FA. Shaken baby syndrome: a biomechanics analysis of injury mechanisms. *Forensic Sci Int*. 2005; 151(1): 71-79.
- Bayır H, Kagan VE. Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis--there is nothing more practical than a good theory. *Crit Care*. 2008; 12(1): 206.
- Bengzon J, Mohapel P, Ekdahl CT, Lindvall O. Neuronal apoptosis after brief and prolonged seizures. *Prog Brain Res* 2002;135:111-9.
- Bigler ED. Neuropsychological results and neuropathological findings at autopsy in a case of mild traumatic brain injury. *J Int Neuropsychol Soc*. 2004; 10(5): 794-806.
- Bisht A, Garg K, Agarwal D, Singh PK, Satyarthee GD, Gupta D, ve ark. Histological changes in thalamus in short term survivors following traumatic brain injury: an autopsy study. *Neurol India*. 2013; 61(6): 599-605.

- Bonnier C, Mesples B, Gressens P. Animal models of shaken baby syndrome: revisiting the pathophysiology of this devastating injury. *Pediatr Rehabil.* 2004; 7(3): 165-71.
- Borgens RB, Liu-Snyder P. Understanding secondary injury. *Q Rev Biol.* 2012; 87(2): 89-127.
- Broska CA Jr, de Folchini AB, de Ruediger RR. Comparative study of trauma in the elderly and non-elderly patients in a University Hospital in Curitiba. *Rev Col Bras Cir.* 2013; 40(4): 281-6.
- Brunswick AS, Hwang BY, Appelboom G, Hwang RY, Piazza MA ve Connolly ES. Jr. Serum biomarkers of spontaneous intracerebral hemorrhage induced secondary brain injury. *J Neurol Sci.* 2012; 321(1-2): 1-10.
- Cantu RC. Head injuries in sport. *Br J Sports Med.* 1996; 30(4): 289-96.
- Cantu RC, Mueller FO. Brain injury-related fatalities in American football, 1945-1999. *Neurosurgery* 2003; 52(4): 846-52.
- Cassidy JD, Boyle E, Carroll LJ. Population-based, inception cohort study of in mild traumatic brain injury after motor vehicle collisions. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 2014; 95(3 Suppl 2): 278-285.
- Cassidy JD, Carroll LJ, Peloso PM, Borg J, von Holst H, Holm L, ve ark. Incidence, risk factors and prevention of mild traumatic brain injury: results of the WHO Collaborating Centre Task Force on Mild Traumatic Brain Injury. *J Rehabil Med.* 2004; 43: 28-60
- Chattopadhyay S, Tripathi C. Skull fracture and haemorrhage pattern among fatal and nonfatal head injury assault victims - a critical analysis. *J Inj Violence Res.* 2010; 2(2): 99-103.
- Chen R, Wang J, Jiang B, Wan X, Liu H, Liu H, Yang X, Wu X, Zou Q, Yang W. Study of cell apoptosis in the hippocampus and thalamencephalon in a ventricular fluid impact model. *Exp Ther Med.* 2013; 6(6): 1463-1468.
- Cheng G, Kong RH, Zhang LM, Zhang JN. Mitochondria in traumatic brain injury and mitochondrial-targeted multipotential therapeutic strategies. *Br J Pharmacol.* 2012; 167(4): 699-719.
- Cheng PL, Lin HY, Lee YK, Hsu CY, Lee CC, Su YC. Higher mortality rates among the elderly with mild traumatic brain injury: a nationwide cohort study. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2014; 28: 22-27.
- Cheng XL, Zhang JJ. Effect of edaravone on apoptosis of hippocampus neuron in seizures rats kindled by pentylenetetrazole. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014; 18(6): 769-774.

- Chirumamilla S, Sun D, Bullock MR, Colello RJ. Traumatic brain injury induced cell proliferation in the adult mammalian central nervous system. *J Neurotrauma*. 2002; 19(6): 693-703.
- Clark RSB, Chen J, Watkins SC, Kochanek PM, Chen M, Stetler RA, ve ark. Apoptosis-suppressor gene Bcl-2 expression after traumatic brain injury in rats. *J Neurosci*. 1997; 17: 9172-9182
- Clark RSB, Kochanek PM, Chen M, Watkins SC, Mraion DW, Chen J, ve ark. Increases in Bcl-2 and cleavage of caspase-1 and Caspase-3 in human brain after head injury. *FASEB J* 1999; 13: 813-821
- Clark RS, Kochanek PM, Adelson PD, Bell MJ, Carcillo JA, Chen M ve ark. Increases in bcl-2 protein in cerebrospinal fluid and evidence for programmed cell death in infants and children after severe traumatic brain injury. *J Pediatr*. 2000; 137(2): 197-204.
- Couch CM, Leathem JM. An initial study to establish symptom base rates of traumatic brain injury in children. *Arch Clin Neuropsychol* 2011; 26: 349-355
- Coughlin JM, Wang Y, Munro CA, Ma S, Yue C, Chen S ve ark. Neuroinflammation and brain atrophy in former NFL players: An in vivo multimodal imaging pilot study. *Neurobiol Dis*. 2014; 74C: 58-65.
- Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15(1): 49-63.
- Danaila L, Popescu I, Pais V, Riga D, Riga S, Pais E. Apoptosis, paraptosis, necrosis, and cell regeneration in posttraumatic cerebral arteries. *Chirurgia (Bucur)*. 2013; 108(3): 319-324.
- DeFord SM, Wilson MS, Rice AC, Clausen T, Rice LK, Barabnova A ve ark. Repeated mild brain injuries result in cognitive impairment in B6C3F1 mice. *J Neurotrauma* 2002; 19(4): 427-438.
- DeRoss AL, Adams JE, Vane DW, Russell SJ, Terella AM, Wald SL. Multiple head injuries in rats: effects on behavior. *J Trauma* 2002; 52(4): 708-714.
- Dhandapani SS, Manju D, Mahapatra AK. The economic divide in outcome following severe head injury. *Asian J Neurosurg*. 2012; 7(1): 17-20.
- Dikmen,SS, Machamer JE, Powel JM. ve Temkin NR. Outcome 3 to 5 years after moderate to sever traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil*. 2003; 84: 1449-1457.
- Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghmai AA, Hayes RL. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods* 1991; 39(3): 253-262.
- Dorszewska J, Adamczewska-Goncerzewicz Z, Szczech J. Apoptotic proteins in the course of aging of central nervous system in the rat. *Respir Physiol Neurobiol*. 2004; 139(2): 145-155.

- Dressler J, Hanisch U, Kuhlisch E, Geiger KD. Neuronal and glial apoptosis in human traumatic brain injury. *Int J Legal Med.* 2007; 121(5): 365-375.
- Dressler J, Vemuganti R. Apoptosis and gene expression after TBI. *Leg Med (Tokyo).* 2009; 11 Suppl 1: S54-5.
- Ebert U, Brandt C, Löscher W. Delayed sclerosis, neuroprotection, and limbic epileptogenesis after status epilepticus in the rat. *Epilepsia.* 2002; 43(5): 86-95.
- Engel T, Henshall DC. Apoptosis, Bcl-2 family proteins and caspases: the ABCs of seizure-damage and epileptogenesis? *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2009; 30(2): 97-115.
- Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol.* 1994; 4(3): 229-237.
- Er A, Akman C, Alataş İ, Ünlü HB, Ceylan I, Gün C, Canaz H. Minör Kafa Travması Olan Çocuklarda Rutin Olarak BT Yapmalı mıyız?. *JOPP Derg* 2013; 5(3): 131-135.
- Ertel W, Keel M, Stocker R, Imhof HG, Leist M, Steckholzer U, ve ark. Detectable concentrations of Fas ligand in cerebrospinal fluid after severe head injury. *J Neuroimmunol.* 1997; 80(1-2): 93-96.
- Fadok VA, Xue D, Henson P. If phosphatidylserine is the death knell, a new phosphatidylserine-specific receptor is the bellringer. *Cell Death and Differentiation.* 2001; 8: 582-587.
- Fadeel B, Xue D, Kagan V. Programmed cell clearance: Molecular regulation of the elimination of apoptotic cell corpses and its role in the resolution of inflammation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010; 396: 7-10.
- Ferri KF, Kroemer G. Mitochondria--the suicide organelles. *Bioessays.* 2001; 23(2): 111-5.
- Finnie J, Manavis J, Jones N, Blumbergs P. Topography of c-fos immunoreactivity in an ovine headimpact model. *Journal of Clinical Neuroscience* 2005; 12(7): 799-803.
- Fisher MD. Pediatric traumatic brain injury. *Crit. Care Nursing* 1997; 20: 36-51.
- Fleming-Farrell D, Michailidis K, Karantanas A, Roberts N, Kranioti EF. Virtual assessment of perimortem and postmortem blunt force cranial trauma. *Forensic Sci Int.* 2013; 10: 229(1-3):162.e1-6.
- Frey LC. Epidemiology of posttraumatic epilepsy: a critical review. *Epilepsia* 2003; 44(10): 11-7.
- Fujikawa DG. Prolonged seizures and cellular injury: Understanding the connection. *Epilepsy Behav* 2005; 7 (Suppl 3): S3-11.
- Gill JR, Goldfeder LB, Armbrustmacher V, Coleman A, Mena H, Hirsch CS. Fatal head injury in children younger than 2 years in New York City and an overview of the shaken baby syndrome. *Arch Pathol Lab Med.* 2009; 133(4): 619-627.

- Greenwald BD, Burnett DM, Miller MA. Congenital ve Acquired Brain Injury. 1. Brain Injury; Epidemiyoloji and Pathophysiology. Arch Phys Med Rehabil 2003; 84(1): 3-7.
- Gururaj G. The effect of alcohol on incidence, pattern, severity and outcome from traumatic brain injury. J Indian Med Assoc 2004; 102: 157-160.
- Güzel A, Karasalihoğlu S, Küçükuğurluoğlu Y. Çocuk Acil Ünitimize düşme nedeniyle başvuran travma olgularının değerlendirilmesi. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg 2007; 13(3): 211-216
- Hagberg H, Mallard C, Rousset CI, Wang X. Apoptotic Mechanisms in the Immature Brain: Involvement of Mitochondria. J Child Neurol. 2009; 24(9): 1141-1146.
- Harvey BD and Sloviter RS. Hippocampal Granule Cell Activity and c-Fos Expression during Spontaneous Seizures in Awake, Chronically Epileptic, Pilocarpine-Treated Rats: Implications for Hippocampal Epileptogenesis. J. Comparative Neurology 2005; 488: 442-463.
- Hausmann R, Biermann T, Wiest I, Tübel J, Betz P. Neuronal apoptosis following human brain injury. Int J Legal Med. 2004; 118(1): 32-36.
- Hickey JV. The Clinical Practice of Neurological and Neurosurgical Nursing, 7th ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2014: 353.
- Hicks CW, Hashmi ZG, Velopulos C, Efron DT, Schneider EB, Haut ER, Cornwell EE 3rd, Haider AH. Association between race and age in survival after trauma. JAMA Surg. 2014; 149(7): 642-647.
- Hinkle DA, Baldwin SA, Scheff SW, Wise PM. GFAP and S100 beta expression in the cortex and hippocampus in response to mild cortical contusion. J Neurotrauma 1997; 14(10): 729-738.
- Huerta S, Goulet E.J, Yepez S.H. Livingston E.H. Screening and Detection of Apoptosis. Journal of Surgical Research. 2007; 139: 143-156
- Indharty RS. The increase of serum Bcl-2 concentration in moderate head injury outcome: The role of ACTH4-10Pro(8)-Gly(9)-Pro(10.). Asian J Neurosurg. 2013; 8(2): 83-89.
- Irving EA, Bamford M. Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury J Cereb Blood Flow Metab. 2002; 22(6): 631-647.
- Işık HS, Gökyar M, Yıldız Ö, Bostancı U, Özdemir C. Çocukluk çağı kafa travmaları, 851 olgunun retrospektif değerlendirilmesi: Epidemiyolojik bir çalışma. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg 2011; 17(2): 166-172
- Itoh T, Imano M, Nishida S, Tsubaki M, Hashimoto S, Ito A ve ark. Exercise inhibits neuronal apoptosis and improves cerebral function following rat traumatic brain injury. J Neural Transm. 2011; 118(9): 1263-1272.

- Itoh T, Imano M, Nishida S, Tsubaki M, Mizuguchi N, Hashimoto S ve ark. Increased apoptotic neuronal cell death and cognitive impairment at early phase after traumatic brain injury in aged rats. *Brain Struct Funct.* 2013; 218(1): 209-220.
- Jennet, B. Historical perspective on head injury. *Neurotrauma.* Mc Graww Hill: New York; 1996; pp 3-12.
- Kane MJ, Angoa-Pérez M, Briggs DI, Viano DC, Kreipke CW, Kuhn DM. A mouse model of human repetitive mild traumatic brain injury. *J Neurosci Methods.* 2012; 203(1): 41-49.
- Kara H, Bayir A, Ak A, Akinci M, Tufekci N, ve ark. Trauma in elderly patients evaluated in a hospital emergency department in Konya, Turkey: a retrospective study. *Clin Interv Aging.* 2014; 9: 17-21.
- Karayel F, Sav A. Kafa Travmalarında Diffuz Akson Hasarı: Tanıda B-APP'nin yeri. *Adli Tıp Bülteni.* 2008; 13(1): 30-37
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
- Kharatishvili I, Pitkanen A. Association of the severity of cortical damage with the occurrence of spontaneous seizures and hyperexcitability in an animal model of posttraumatic epilepsy. *Epilepsy Res.* 2010; 90(1-2): 47-59.
- Kilany A, Raouf ER, Gaber AA, Aloush TK, Aref HA, Anwar M, ve ark. Elevated serum Bcl-2 in children with temporal lobe epilepsy. *Seizure.* 2012; 21(4): 250-253.
- Kondratyev A, Gale K. Intracerebral injection of caspase- 3 inhibitor prevents neuronal apoptosis after kainic acid- evoked status epilepticus. *Brain Res Mol Res.* 2000; 75: 216-24.
- Kurul S, Gülmez Ö. Nöroproteksiyon ve Nöron Koruyucu Ajanlar. *DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2007; 21(2): 119-130.
- Kuwana T, Newmeyer DD. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol.* 2003; 15(6): 691-699.
- Lagbas C, Hezaji SB, Shaheen M, Kermah D, Pan D. Traumatic Brain Injury Related Hospitalization and Mortality in California. *Biomed Res Int.* 2013; 143092. doi:10.1155/2013/143092.
- Laurer HL, Bareyre FM, Lee VM, Trojanowski JQ, Longhi L, Hoover R, ve ark. Mild head injury increasing the brain's vulnerability to a second concussive impact. *J Neurosurg.* 2001; 95(5): 859-870.
- Lehman EJ. Epidemiology of neurodegeneration in American-style professional football players. *Alzheimers Res Ther.* 2013; 5(4): 34.

- Lenzlinger PM, Marx A, Trentz O, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. Prolonged intrathecal release of soluble Fas following severe traumatic brain injury in humans. *J Neuroimmunol* 2002; 122: 167-174.
- Liedtke W, Edelmann W, Bieri PL, Chiu FC, Cowan NJ, Kucherlapati R ve ark. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron* 1996; 17(4): 607-615.
- Longhi L, Saatman KE, Fujimoto S, Raghupathi R, Meaney DF, Davis J ve ark. Temporal window of vulnerability to repetitive experimental concussive brain injury. *Neurosurgery* 2005; 56(2): 364-374.
- Loo DT. TUNEL assay. An overview of techniques. *Methods Mol Biol.* 2002; 203: 21-30.
- Luukinen H, Viramo P, Herala M, Kervinen K, Kesaniemi YA, Savola O ve ark. Fall-related brain injuries and the risk of dementia in elderly people: a population-based study. *Eur J Neurol* 2005; 12: 86-92
- Marchi N, Angelov L, Masaryk T, Fazio V, Granata T, Hernandez N, Hallene K, Diglaw T, Franic L, Najm I, Janigro D, Seizure-promoting effect of blood-brain barrier disruption. *Epilepsia* 2007; 48: 732-742.
- Marmarou A, Montasser A, Abd-Elfattah F ve ark. A New model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg.* 1994; 80: 291-300.
- Marshall LF. Head injury: recent past, present, and future. *Neurosurgery.* 2000; 47: 546-561.
- Mary Kan E, Ling EA, Lu J. Microenvironment changes in mild traumatic brain injury. *Brain Research Bulletin*, 2012; 87: 359-372.
- Mauritz W, Brazinova A, Majdan M, Leitgeb J. Epidemiology of traumatic brain injury in Austria. *Wien Klin Wochenschr.* 2014; 126(1-2): 42-52.
- McKee AC, Cantu RC, Nowinski CJ, Hedley-Whyte ET, Gavett BE, Budson AE ve ark. Chronic traumatic encephalopathy in athletes: progressive tauopathy after repetitive head injury. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009; 68(7): 709-735.
- Messina AD, Carotenuto G, Miccichè R, Sineo L. Fatal cranial injury in an individual from Messina (Sicily) during the times of the Roman Empire. *J Forensic Leg Med.* 2013; 20(8): 1018-1023.
- Minambres E, Ballesteros MA, Mayorga M, Marin MJ, Muñoz P, Figols J ve ark. Cerebral apoptosis in severe traumatic brain injury patients: an in vitro, in vivo, and postmortem study. *J Neurotrauma* 2008; 25(6): 581-91.

- Misic-Pavkov G, Novovic Z, Bozic K, Kolundzija K, Kovacevic SI, Drakip D ve ark. Forensic aspect of late subjective complaints after traumatic brain injury. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012; 16(13): 1806-1813.
- Morrison RS, Kinoshita Y, Johnson MD, Ghatan S, Joseph. Neuronal Survival and Cell Death Signaling Pathways. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6319/>
- Mouzon BC, Bachmeier C, Ferro A, Ojo JO, Crynen G, Acker CM ve ark. Chronic neuropathological and neurobehavioral changes in a repetitive mild traumatic brain injury model. *Ann Neurol.* 2014; 75(2): 241-54
- Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res.* 2000; 256(1): 12-8.
- Nagata S, Nagase H, Kawane K, Mukae N, Fukuyama H. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ.* 2003; 10(1): 108-116.
- Nakatome M, Matoba R, Ogura Y, Tun Z, Iwasa M, Maeno Y ve ark. Detection of cardiomyocyte apoptosis in forensic autopsy cases. *Int J Legal Med.* 2002; 116(1): 17-21.
- Nathoo N, Narotam PK, Agrawal DK, Connolly CA, van Dellen JR, Bannett GH ve ark. Influence of apoptosis on neurological outcome following traumatic cerebral contusion. *J Neurosurg* 2004; 101: 233-240.
- Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C ve ark. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem.* 1996; 44(9): 959-968.
- Neuwelt E, Abbott NJ, Abrey L, Banks WA, Blakley B, Davis T ve ark. Strategies to advance translational research into brain barriers. *Lancet Neurol.* 2008; 7(1): 84-96.
- Ng I, Yeo TT, Tang WY, Soong R, Ng PY, Smith DR. Apoptosis occurs after cerebral contusions in humans. *Neurosurgery* 2000; 46(4): 949-956.
- Nicholson DW, Thornberry NA. Life and death decisions. *Science* 2003; 299: 2014-2215.
- Oby E, Janigro D. The blood–brain barrier and epilepsy. *Epilepsia* 2006; 47: 1761-1774.
- Oehmichen M, Meissner C. Routine techniques in forensic neuropathology as demonstrated by gunshot injury to the head. *Leg Med (Tokyo).* 2009; 11(1): 50-53.
- Oehmichen M, Meissner C, von Wurmb-Schwark N, Schwark T. Methodical approach to brain hypoxia/ischemia as a fundamental problem in forensic neuropathology. *Leg Med (Tokyo).* 2003; 5(4): 190-201.
- Park MS, Oh HA, Ko IG, Kim SE, Kim SH, Kim CJ, Kim HB, Kim H. Influence of mild traumatic brain injury during pediatric stage on short-term memory and hippocampal apoptosis in adult rats. *J Exerc Rehabil.* 2014; 10(3): 148-154.

- Pavlova T, Stepanichev M, Gulyaeva N. Pentylentetrazole kindling induces neuronal cyclin B1 expression in rat hippocampus. *Neurosci Lett*. 2006; 392(1-2): 154-8.
- Pflaum J, Schlosser S, Müller M. p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Front Oncol*. 2014; 4: 285.
- Piantadosi CA, Zhang J, Levin ED, Folz RJ, Schmechel DE. Apoptosis and delayed neuronal damage after carbon monoxide poisoning in the rat. *Experimental Neurology*. 1997; 147(1): 103-114.
- Pineau N, Charriaut-Marlangue C, Motte J, Nehlig A. Pentylentetrazol seizures induce cell suffering but not death in the immature rat brain. *Brain Res Dev Brain Res*. 1999; 112(1): 139-144.
- Pitkänen A, Sutula TP. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *Lancet Neurol*. 2002; 1(3): 173-181.
- Preta G, Fadeel B. AIF and Scythe (Bat3) Regulate Phosphatidylserine Exposure and Macrophage Clearance of Cells Undergoing Fas (APO-1)-Mediated Apoptosis. *PLoS One*. 2012; 7(10): e47328
- Quayle KS, Holmes JF, Kuppermann N, Powell EC, Mahajan P, Hoyle JD Jr ve ark. Epidemiology of blunt head trauma in children in U.S. emergency departments. *N Engl J Med*. 2014; 371(20): 1945-1947.
- Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalogr. Clin Neurophysiol*. 1972; 32: 281-294.
- Raghupathi R, Conti AC, Graham DI, Krajewski S, Reed JC, Grady MS, Trojanowski JQ, McIntosh TK. Mild traumatic brain injury induces apoptotic cell death in the cortex that is preceded by decreases in cellular Bcl-2 immunoreactivity. *Neuroscience*. 2002; 110(4): 605-616.
- Rice AC, Khaldi A, Harvey HB, Salman NJ, White F, Fillmore H, Bullock MR. Proliferation and neuronal differentiation of mitotically active cells following traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2003; 183(2): 406-417.
- Richardson NC, Rappaport DI. Pediatric head trauma: abuse or not? *Hosp Pediatr*. 2012; 2(4): 247-248.
- Santos S, Fonseca LL, Monteiro MA, Carrondo MJ, Alves PM. Culturing primary brain astrocytes under a fully controlled environment in a novel bioreactor. *J Neurosci Res*. 2005; 79(1-2): 26-32.

- Satchell MA, Lai Y, Kochanek PM, Wisniewski SR, Fink EL, Siedberg NA ve ark. Cytochrome c, a biomarker of apoptosis, is increased in cerebrospinal fluid from infants with inflicted brain injury from child abuse. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005; 25(7): 919-927.
- Scheff SW, Baldwin SA, Brown RW, Kraemer PJ. Morris water maze deficits in rats following traumatic brain injury: lateral controlled cortical impact. *J Neurotrauma* 1997; 14(9): 615-27.
- Schoppe CH, Lantz PE. Are peripapillary intrascleral hemorrhages pathognomonic for abusive head trauma? *J Forensic Sci.* 2013; 58(1): 228-231.
- Seiffert E, Dreier JP, Iven S, Bechmann I, Tomkins O, Heinemann U, Friedman A. Lasting blood-brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. *J. Neurosci.* 2004; 24: 7829-7836.
- Shacka JJ, Roth KA. Regulation of neuronal cell death and neurodegeneration by members of the Bcl-2 family: therapeutic implications. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2005; 4(1): 25-39.
- Shaw NA. The neurophysiology of concussion. *Prog Neurobiol.* 2002; 67(4): 281-344.
- Smith C, Gentleman SM, Leclercq PD, Murray LS, Griffin WS, Graham DI ve ark. The neuroinflammatory response in humans after traumatic brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2013; 39(6): 654-66.
- Smith FM, Raghupathi R, MacKinnon MA, McIntosh TK, Saatman KE, Meaney DF ve ark. TUNEL-positive staining of surface contusions after fatal head injury in man. *Acta Neuropathol.* 2000; 100(5): 537-545.
- Solomon GS, Zuckerman SL. Chronic traumatic encephalopathy in professional sports: Retrospective and prospective views. *Brain Inj.* 2014; 14: 1-7.
- Springer JE. Apoptotic cell death following traumatic injury to the central nervous system. *J Biochem Mol Biol.* 2002; 35(1): 94-105.
- Stipanivic A, Nolin P, Fortin G, Gobeil MF. Comparative study of the cognitive sequelae of school-aged victims of Shaken Baby Syndrome. *Child Abuse Negl.* 2008; 32(3): 415-428.
- Strauss KI, Narayan RK, Raghupathi R. Common Patterns of Bcl-2 Family Gene Expression in Two Traumatic Brain Injury Models. *Neurotox Res.* 2004; 6(4): 333-342.
- Suárez-Penaranda JM, Rodríguez-Calvo MS, Ortiz-Rey JA, Muñoz JI, Sánchez-Pintos P, Da Silva EA ve ark. Demonstration of apoptosis in human skin injuries as an indicator of vital reaction. *Int J Legal Med.* 2002; 116(2): 109-112.
- Sulejczak D, Grieb P, Walski M, Frontczak-Baniewicz M. Apoptotic death of cortical neurons following surgical brain injury. *Folia Neuropathol.* 2008; 46(3): 213-219.

- Sun D, McGinn M, Hankins JE, Mays KM, Rolfe A, Colello RJ. Aging- and injury-related differential apoptotic response in the dentate gyrus of the hippocampus in rats following brain trauma. *Front Aging Neurosci.* 2013; 5: 95.
- Sutton RL, Lescaudron L, Stein DG. Unilateral cortical contusion injury in the rat: vascular disruption and temporal development of cortical necrosis. *J Neurotrauma* 1993; 10(2): 135-149.
- Swartz BE, Houser CR, Tomiyasu U, Walsh GO, DeSalles A, Rich JR, Delgado-Escueta A. Hippocampal cell loss in posttraumatic human epilepsy. *Epilepsia* 2006; 47(8): 1373-1382.
- Tartaglia MC, Hazrati LN, Davis KD, Green RE, Wennberg R, Mikulis D ve ark. Chronic traumatic encephalopathy and other neurodegenerative proteinopathies. *Front Hum Neurosci.* 2014; 8: 30.
- Tashlykov V, Katz Y, Gazit V, Zohar O, Schreiber S, Pick CG. Apoptotic changes in the cortex and hippocampus following minimal brain trauma in mice. *Brain Res.* 2007; 1130(1): 197-205.
- Tashlykov V, Katz Y, Volkov A, Gazit V, Schreiber S, Zohar O ve ark. Minimal traumatic brain injury induce apoptotic cell death in mice. *J Mol Neurosci.* 2009; 37(1): 16-24.
- Tate DF, Bigler ED. Fornix and hippocampal atrophy in traumatic brain injury. *Learn Mem.* 2000; 7(6): 442-6.
- Thornhill S, Teasdale GM, Murray GD, McEwen J, Roy CW, Penny KI. Disability in young people and adults one year after head injury: prospective cohort study. *BMJ.* 2000; 320: 1631-1635.
- Thurman DJ. The Epidemiology of Traumatic Brain Injury in Children and Youths: A Review of Research Since 1990. *J Child Neurol.* 2014; pii: 0883073814544363.
- Tomkins O, Kaufer D, Korn A, Shelef I, Golan H, Reichenthal E, Soreq H, Friedman A. Frequent blood-brain barrier disruption in the human cerebral cortex. *Cell Mol Neurobiol.* 2001; 21(6): 675-91.
- Tomkins O, Shelef I, Kaizerman I, Eliushin A, Afawi Z, Misk A, Gidon M, Cohen A, Zumsteg D, Friedman A. Blood-brain barrier disruption in post-traumatic epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008; 79(7): 774-7.
- Tweedie D, Milman A, Holloway HW, Li Y, Harvey BK, Shen H ve ark. Apoptotic and behavioral sequelae of mild brain trauma in mice. *J Neurosci Res.* 2007; 85(4): 805-15.
- Udoh DO, Adeyemo AA. Traumatic brain injuries in children: A hospital-based study in Nigeria. *Afr J Paediatr Surg.* 2013; 10(2): 154-159.

- Unterberg AW, Stover J, Kress B. ve Kiening KL. Edema and brain trauma. *Neuroscience*. 2004; 129: 1021-1029.
- Uryu K, Laurer H, McIntosh T, Praticò D, Martinez D, Leight S ve ark. Repetitive mild brain trauma accelerates Abeta deposition, lipid peroxidation, and cognitive impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer amyloidosis. *J Neurosci*. 2002; 22(2): 446-454.
- Uzan M, Erman H, Tanriverdi T, Sanus GZ, Kafadar A, Uzun H. Evaluation of apoptosis in cerebrospinal fluid of patients with severe head injury. *Acta Neurochir (Wien)*. 2006; 148(11): 1157-1164.
- Vega-Naredo I, Cunha-Oliveira T, Serafim TL, Sardao VA, Oliveira PJ. Analysis of Pro-apoptotic Protein Trafficking to and from Mitochondria. *Methods Mol Biol*. 2015; 1241: 163-80.
- Vernagen AM, Vaux DL. Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis* 2002; 7: 163-166.
- Vespa PM, McArthur DL, Xu Y, Eliseo M, Etchepare M, Dinov I ve ark. Nonconvulsive seizures after traumatic brain injury are associated with hippocampal atrophy. *Neurology*. 2010; 75(9): 792-798.
- Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol*. 2011; 7(1): 31-40.
- Vural, M. ve Berker, E. Travmatik beyin yaralanmasında klinik tabı ve değerlendirme. *Bakırköy Tıp Dergisi*. 2012; 8, 53-59.
- Wang Q, Ishikawa T, Michiue T, Zhu BL, Maeda H. Evaluation of human brain damage in fire fatality by quantification of basic fibroblast growth factor (bFGF), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and single-stranded DNA (ssDNA) immunoreactivities. *Forensic Science International Forensic Sci Int*. 2011; 211(1-3): 19-26
- Wang Q, Tomomi Michiue, Hitoshi Maeda. Immunohistochemistry of Neuronal Apoptosis in Fatal Traumas: The Contribution of Forensic Molecular Pathology in Medical Science. In: *Apoptosis and Medicine*, Dr. Tobias Ntuli (Ed.); 2012, ISBN: 978-953-51-0701-9, InTech, DOI: 10.5772/50225. Available from: <http://www.intechopen.com/books/apoptosis-and-medicine/immunohistochemistry-of-neuronal-apoptosis-in-fatal-traumas-the-contribution-of-forensic-molecular-p>
- Welch KA, Derry C. Mild Traumatic brain injury and epilepsy: alcohol misuse may underpin the association. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014; 85: 593
- Werner C. ve Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth*, 2007; 99: 4-9.

- Williams S, Raghupathi R, MacKinnon MA, McIntosh TK, Saatman KE, Graham DI. In situ DNA fragmentation occurs in white matter up to 12 months after head injury in man. *Acta Neuropathol.* 2001; 102(6): 581-590.
- Wong J, Hoe NW, Zhiwei F, Ng I. Apoptosis and traumatic brain injury. *Neurocrit Care.* 2005; 3(2): 177-182.
- Wui LW, Shaun GE, Ramalingam G, Wai KM. Epidemiology of trauma in an acute care hospital in Singapore. *J Emerg Trauma Shock.* 2014; 7(3): 174-179.
- Xiong Y, Gu Q, Peterson PL, Muizelaar JP, Lee CP. Mitochondrial dysfunction and calcium perturbation induced by traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 1997; 14(1): 23-34.
- Zhang X, Chen Y, Jenkins LW, Kochanek PM, Clark RS. Bench-to-bedside review: Apoptosis/programmed cell death triggered by traumatic brain injury. *Crit Care.* 2005; 9(1): 66-75.
- Zhang X, Graham SH, Kochanek PM, Marion DW, Nathaniel PD, Watkins SC ve ark. Caspase-8 expression and proteolysis in human brain after severe head injury. *FASEB J.* 2003; 17(10): 1367-1369.
- Zhao R, Guan DW, Zhang W, Du Y, Xiong CY, Zhu BL ve ark. Increased expressions and activations of apoptosis-related factors in cell signaling during incised skin wound healing in mice: a preliminary study for forensic wound age estimation. *Leg Med (Tokyo).* 2009; 11(1): 155-160.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler			
Adı	Mehmet Ali	Soyadı	Malkoç
Doğum Yeri	Şanlıurfa	Doğum Tarihi	25.02.1984
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	34688262290
E-posta	ali.malkoc@yahoo.com	Tel	0553.204.28.53

Eğitim Düzeyi		Mezuniyet
Tıpta Uzmanlık Eğitimi	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Adli Tıp A.D.	2014
Yüksek Lisans	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi	2009
Lise	Şanlıurfa Anadolu Lisesi	2002
İlköğretim	Şanlıurfa Fevzi Çakmak İ.Ö.O.	1995

İş Deneyimi			
Araştırma Görevlisi	/ İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Adli Tıp A.D.	Aralık 2014	–
Asistan Doktor		Haziran 2010	

Yabancı Dil	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	İyi	İyi
Almanca	Başlangıç	Başlangıç	Başlangıç

Hobiler			
Bağlama Çalmak	Kitap Okumak	Futbol Oynamak	Akvaryum

KATILDIĞI KONGRE, SEMPOZYUM, EĞİTİM VE ÇALIŞMALAR

- Asistan Uyum Eğitim Programı. 21-23 Haziran 2010. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Asistan Uyum Eğitim Koordinasyonu.
- Temel EKG Kursu. 19 Eylül 2010. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Mezuniyet Sonrası Eğitim ve Eşyetkilendirme Komisyonu.
- İstanbul Protokolü Eğitimi. 01-03 Ekim 2010. İstanbul Tabip Odası & Türkiye İnsan Hakları Vakfı & Adli Tıp Uzmanları Derneği & Çağdaş Hukukçular Derneği.
- 9. Adli Bilimler Kongresi. 14-17 Ekim 2010. Adli Tıp Uzmanları Derneği & Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı.
- V. Psikiyatri Atölyeleri. 23-24 Ekim 2010. İstanbul Tıp Fakültesi Psikiyatri Kliniği Vakfı.
- 16. Tıpta Uzmanlık Eğitim Kurultayı. 11-12 Aralık 2010. TTB-UDEK & İstanbul Tabip Odası.
- 1. Tıp Hukuku Günleri Tıbbi Uygulama Hataları. 8 Ocak 2011. Adli Tıp Uzmanları Derneği & İstanbul Tabip Odası & İstanbul Barosu & Hasta ve Hasta Yakını Hakları Derneği.
- 9. Adli Bilimler Sempozyumu. 28-30 Nisan 2011. Adli Tıp Uzmanları Derneği & Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı.
- Ötenazi Sempozyumu. 10 Haziran 2011. İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı.
- Çemişgezek Toplu Mezar Kazı Çalışmaları. 12-13 Ağustos 2011. (22 Ağustos Rapor Hazırlama). Türk Tabipleri Birliği & Adli Tıp Uzmanları Derneği & Çağdaş Hukukçular Derneği & Türkiye İnsan Hakları Vakfı & İnsan Hakları Derneği.

- Deney Hayvanları Kullanım Kursu. 10-21 Ekim 2011. İstanbul Üniversitesi İstanbul tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu & Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı.
- İstanbul Üniversitesi Nif (Olympos) Dağı Araştırma ve Kazı Projesi. 14-18 Ağustos 2012. İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Arkeoloji Bölümü, Klasik Arkeoloji Anabilim Dalı.
- Alman Adli Tıp 91. Yıllık Kongresi ve Sosyal İlişkilerde Kişiler Arası Şiddet 1.Sempozyumu. 18-22 Eylül 2012. Almanya Adli Tıp Uzmanları Derneği.
- Gözlemci Araştırma Görevlisi Uygulamaları. 24 Eylül – 12 Ekim 2012. Almanya Freiburg Üniversitesi Hastanesi Adli Tıp Enstitüsü (Gözlemci Araştırma Görevlisi).
- 2. Tıp Hukuku Günleri, Adli Jinekoloji ve Obstetrik. 6-7 Nisan 2012. Adli Tıp Uzmanları Derneği & İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı & İstanbul Barosu & İstanbul Tabip Odası & Hasta ve Hasta Yakınları Derneği & Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği.
- 10. Adli Bilimler Kongresi. 22-24 Kasım 2012. Adli Tıp Uzmanları Derneği (Kongre Düzenlene Kurulu Üyesi + Katılımcı).
- Proje Döngüsü Yönetimi Eğitimi. 13 Ağustos – 13 Eylül 2013. İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi.
- 3. Tıp Hukuku Günleri, Adli Belge İncelemeleri. 26-27 Eylül 2013. Adli Tıp Uzmanları Derneği & İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı & Adli Tıp Kurumu & İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü & İstanbul Barosu & İstanbul Tabip Odası & Adli Belge İnceleme Derneği.
- Organ Nakli Koordinatörleri Eğitim Semineri, Adli Tıp ve Organ Nakli. 27-29 Ocak 2014. İstanbul Valiliği İl Sağlık Müdürlüğü & Hayata Bağış Derneği. (Eğitmen + Katılımcı).
- Biyoistatistik Kursu. 06-07 Şubat 2014. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Uzmanlık Eğitimi ve Eşyetkilendirme Kurulu.

- 11. Adli Bilimler Kongresi. 23-26 Nisan 2014. Adli Tıp Uzmanları Derneği & Yakın Doğu Üniversitesi.
- 4. Tıp Hukuku Günleri, Adli Toksikoloji. 19-20 Eylül 2014. Adli Tıp Uzmanları Derneği & İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı & Adli Tıp Kurumu & İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü & İstanbul Barosu & İstanbul Tabip Odası & Hasta ve Hasta Yakınları Derneği & Türk Toksikoloji Derneği.
- Maluliyet Değerlendirme Kursu. 20 Aralık 2014. Adli Tıp Uzmanları Derneği.