



T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANA BİLİM DALI

DENEYSEL KAFA TRAVMASI OLUŞTURULAN
SIÇANLARDA PENTOKSİFİLİN VE
2-METOKSİÖSTRADİOL'ÜN HİF-1 ALFA, TNF-ALFA,
APOPİTOZİS VE TELOMERAZ AKTİVİTESİ İLE
İLİŞKİLİ GENLER ÜZERİNE ETKİLERİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Abdalbaki YÜCEER

KAYSERİ-2015



T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANA BİLİM DALI

DENEYSEL KAFA TRAVMASI OLUŞTURULAN
SIÇANLARDA PENTOKSİFİLİN VE
2-METOKSİÖSTRADİOL'ÜN HİF-1 ALFA, TNF-ALFA,
APOPİTOZİS VE TELOMERAZ AKTİVİTESİ İLE
İLİŞKİLİ GENLER ÜZERİNE ETKİLERİ

TIPTA UZMANLIK

Dr. Abdalbaki YÜCEER

Danışman

Prof. Dr. Ali KURTSOY

Bu Çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından TTU-2014-5309 No'lu Kod ile Desteklenmiştir.

KAYSERİ-2015

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın alt yapısının oluşturulmasında, çalışmalarımın yönlendirilmesinde değerli yardımlarını esirgemeyen, bana her konuda ve her zaman bilgi ve deneyimleri ile destek veren, gösterdiği ilgi ve sabrından dolayı başta değerli tez danışmanı hocam Sayın Prof. Dr. Ali KURTSOY, kliniğimiz bölüm başkanı Sayın Prof. Dr. İ. Suat ÖKTEM, Prof. Dr. Ahmet SELÇUKLU, Prof. Dr. Ahmet MENKÜ, Doç. Dr. Bülent TUCER, Yrd. Doç. Dr. Halil ULUTABANCA, Yrd. Doç. Dr. Abdülfettah TÜMTÜRK, Öğr. Gör. Dr. Ahmet KÜÇÜK hocalarıma ve tüm çalışma arkadaşlarıma;

Değerli önerileri ile tezimin gelişmesinde ve gerçekleşmesinde destek olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Halil ULUTABANCA, Sayın Yrd. Doç. Dr. Serpil TAHERİ'ye ve biyolog Sayın Fadime ÖZDEMİR'e.

Bugüne kadar yaşamımın her döneminde olduğu gibi tez çalışmam boyunca da manevi-maddi anlamda hep yanımda olan ve haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim Babam Prof. Dr. İsa YÜCEER, Annem Zeliha YÜCEER, abim Yrd. Doç. Dr. Muhammed YÜCEER, kardeşlerim Fatma YÜCEER YAVÇIN ve Abdüsselam YÜCEER'e;

Her zaman yanımda olan ve desteğini esirgemeyen, güler yüzü ve anlayışı ile bu süreçte tezime yoğunlaşma yönünde ellerinden geleni yapan değerli Eşim Nilay YÜCEER'e ve hayatıma değer katan oğlum Abdüssamed YÜCEER ve kızım Kevser Rana YÜCEER'e,

En içten teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Dr. Abdulbaki YÜCEER

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1 KAFA TRAVMASI.....	6
2.1.1. Tanım	6
2.1.2. Epidemiyoloji.....	6
2.1.3 Sınıflama	7
2.1.4. Kafa Travmasında Fizyopatoloji.....	8
2.1.5. Kafa Travmasında Enflamasyon	11
2.2. HİPOKSİ İLE İNDÜKLENEN FAKTÖR-1 α (HIF-1 α).....	12
2.2.1. HIF-1 Genleri, Proteinleri ve İşlevleri	13
2.2.2. HIF-1'in Hedef Genleri.....	16
2.3 TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR- α (TNF- α)	18
2.3.1 TNF- α 'nın fizyolojik rolü:	19
2.3.2 İnflamatuvar yanıtta TNF- α 'nın etkisi:	20
2.4 TELOMERAZ ENZİMİ.....	21
2.5. PENTOKSİFİLİN	23
2.6. 2-METOKSİÖSTRADİOL (2-ME).....	26

3. MATERİYAL VE METOD	29
3.1. Deney Hayvanları.....	29
3.2. Deney Grupları.....	30
3.3 Kafa Travması Modeli ve Travma Aleti	30
3.4. Cerrahi Hazırlık ve Yöntem	33
3.5. RNA İzolasyonu.....	38
3.5.1. Beyin Dokusundan RNA İzolasyonu	38
3.5.2. Kandan RNA İzolasyonu	39
3.5.3. cDNA Sentezi.....	40
3.5.4. Ekspresyon Çalışması	41
3.6. İstatistiksel Analiz.....	42
4. BULGULAR	43
4.1 Ağırlık	43
4.2 HIF-1 α Grupları	44
4.2.1 Akut Gruplar	44
4.2.2. Kronik Gruplar	46
4.3 TNF- α	47
4.3.1. Akut Gruplar	47
4.4. Tert Enzimi.....	50
4.4.1. Akut Gruplar	50
4.4.2. Kronik Gruplar	52
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇLAR	62
KAYNAKLAR	64
TEZ ONAY SAYFASI.....	81

KISALTMALAR

2-ME	: 2- Metoksiöstradiol
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ARNT	: Aril Hidrokarbon Nükleer Translokator
ATP	: Adenozin trifosfat
bHLH	: İki heliks-loop-heliks protein heterodimeri
DISC	: Death inducing signal complex
EPO	: Eritropoietin
FADD	: Fas assosiye ölüm domain
FIH	: Faktör inhibe edici HIF
GKS	: Glasgow Koma Skalası
GLUT-1	: Glukoz transporter-1
GM-CSF	: Granulosit monosit-koloni stimüle edici faktör
HIF-1α	: Hipoksi ile indüklenen faktör 1 alfa
HRE	: Hipoksi ile regüle olan element (Hipoksi response element)
ICAM	: İntraselluler Adezyon Molekülü
IFN-γ	: İnterferon gama
IL-1	: İnterlökin-1
IPAS	: İnhibitör PAS domeyn proteini
KİB	: Kafa içi basıncı
MAPK	: Mitojen tarafından aktive edilmiş protein kinaz
NFκB	: Nükleer faktör
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentetaz
ODD	: Oksijen bağımlı degregasyon domaini
PAF	: Trombosit aktive edici faktör

PAS	: Per-Arnt-Sim
PDE	: Fosfodiesterazlar
PHD	: Prolin hidroksilaz domain enzim
PMNL	: Polimorfonükleer lökositler
SAK	: Subaraknoid kanama
SSS	: Santral sinir sistemi
TACE	: TNF- α converting enzyme
TBH	: Travmatik beyin hasarı
TERT	: Telomeraz revers transkriptaz
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör-alfa
TNFR	: Tümör Nekroz Faktör Reseptörü
TR	: Core telomeraz protein
TRADD	: TNF reseptör assosiye ölüm domain
TRAF	: TNF reseptör assosiye faktör
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VCAM	: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü
VHL	: von Hippel-Lindau

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Hipoksi ile regüle edilen genler ve tetiklenen cevabın efektörleri (60)	17
Tablo 2: Akut grup ağırlık tablosu	43
Tablo 3. Kronik grup ağırlık tablosu.....	44
Tablo 4. Akut dönemde çalışılan HIF-1 α ile ilgili istatistik sonuçlar.	44
Tablo 5. Kronik dönemde çalışılan HIF-1 α ile ilgili istatistik sonuçlar.....	46
Tablo 6. Akut dönemde çalışılan TNF- α ile ilgili istatistik sonuçlar.	47
Tablo 7. Kronik dönemde çalışılan TNF- α ile ilgili istatistik sonuçlar.	49
Tablo 8: Akut dönemde çalışılan TERT ile ilgili istatistik sonuçlar.....	50
Tablo 9: Kronik dönemde çalışılan TERT ile ilgili istatistik sonuçlar.	52

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1:	HIF-1 α , HIF-1 β heterodimerlerinin HRE'e bağlanması ve aktive olan olaylar.....	15
Şekil 2:	Kontrollü kortikal çarpma uyguladığımız travma aleti	32
Şekil 3:	Farklı boyut ve şekillerde travma oluşturmak için kullanılan rodlar.	33
Şekil 4:	Cerrahi masa, inhalsyon anestezisi için vaporizatör, cerrahi aletler ve dental drill	34
Şekil 5:	Sıçanın inhalsyon anestezisi aldığı fanus içinde bekletilmesi.....	34
Şekil 6:	Sıçanın çivili başlıklarla tesbit edilmesi.....	34
Şekil 7:	Sıçanın kafa derisinin traş edilerek sterilize edilmesi	35
Şekil 8:	Kafa derisinin insize edilerek açılması.....	35
Şekil 9:	Sıçan kafatasında bregma ve lambdanın lokasyonu.....	35
Şekil 10:	Sıçanda dental drill ile kraniotomi defekti oluşturulması.	36
Şekil 11:	Kontrollü kontakt impakt (CCI) yöntemi ile 2.5 mm'lik uç vasıtasıyla 1,5 mm'lik derinlik ayarlanarak 1,5 m/s hız ile 85 ms süreyle travma oluşturuldu.....	36
Şekil 12:	Sakrifiye edilmesinden sonra diseke edilmeden önce ve edildikten sonra sıçan beyin materyalleri.	37
Şekil 13:	Akut gruplarda karşılaştırmalı HIF-1 α sonuç grafiği.....	45
Şekil 14:	Kronik gruplarda karşılaştırmalı HIF-1 α sonuç grafiği	46
Şekil 15:	Akut gruplarda karşılaştırmalı TNF- α sonuç grafiği.....	48
Şekil 16:	Kronik gruplarda karşılaştırmalı TNF- α sonuç grafiği	49
Şekil 17:	Akut gruplarda karşılaştırmalı TERT sonuç grafiği.....	51
Şekil 18:	Kronik gruplarda karşılaştırmalı TERT sonuç grafiği	52

**DENEYSEL KAFA TRAVMASI OLUŞTURULAN SIÇANLARDA
PENTOKSİFİLİN VE 2-METOKSİÖSTRADİOL'ÜN HİF-1 ALFA, TNF-ALFA,
APOPİTOZİS VE TELOMERAZ AKTİVİTESİ İLE İLİŞKİLİ GENLER
ÜZERİNE ETKİLERİ**

ÖZET

Amaç: Ağır kafa travması oluşturulan sıçanlarda gelişen ikincil beyin hasarını engellemesi üzerinde pentoksifilin ve 2-metoksiöstradiol etkinliğini HIF-1- α , TNF- α ve TERT mRNA ekspresyonları üzerinden araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 3 aylık 250-350 gr ağırlığında Sprague-Dawley erkek cinsi 98 adet sıçan kullanıldı. Her biri 14 adet sıçan içeren 7 adet deney grubu oluşturuldu. Sham grubu hariç tüm sıçanlara kafa travması oluşturuldu. İlaçları intraperitoneal (ip) yoldan ve kontrollü kortikal impakt modeliyle orta-ağır kafa travması oluşturulduktan 30 dk sonra uygulandı. Travma sonrası 3. ve 6. gruba 60 mg/kg pentoksifilin, 4. ve 7. gruba 5 mg/kg 2-metoksiöstradiol uygulandı. Travma sonrası ratlardan HIF 1- α ve TNF- α mRNA ekspresyonu ile apoptozis ve telomeraz gen aktivitesi ölçümü için kan alındı. Akut gruplar 24 saat sonra, kronik gruplar ise 30. gün sonra sakrifiye edilerek beyin dokularından ve kanından örneklemeleri alındı. Sonrasınca Real-Time PCR ile HIF-1 α , TNF- α ve telomeraz reverse transkriptaz (TERT) ekspresyon düzeyleri Real Time PCR ile hem kan hem de beyin dokusunda tetkik edildi.

Bulgular: 2-ME'ün akut dönemde HIF-1 α değerlerindeki bariz inhibisyonunun kronik dönemde olmadığı, TNF- α üzerindeki inhibisyonunun ise sadece kronik dönemde daha bariz olduğu ve TERT düzeylerindeki yükselmenin kronik dönemde olduğu görüldü. Pentoksifilinin ise; TNF- α düzeylerindeki inhibitör etkisinin akut ve kronik dönemde kan değerlerinde beyin parankim değerlerinden daha belirgin olduğu, HIF-1 α düzeylerini ise akut dönemde beyin parankiminde arttırdığını, kronik dönemde istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte azalttığını, TERT değerlerini kronik dönemde düşürürken akut dönemde yükselttiğini tespit ettik.

Sonuç: Bu çalışmada 2-ME'ün beyinde ve kanda HIF-1 α inhibisyonunun akut ve kronik dönemde diğer gruplardan daha fazla olması, beyinde TNF- α inhibisyonunun

akut ve kronik dönemde diğ er gr plardan daha fazla olması ve TERT düzeylerindeki yükselmenin kronik dönemde daha belirgin olması nedeniyle 2-ME' n kafa travması sonrası kullanımının faydalı olabileceğı d    n ld .

Pentoksifilinin ise TNF-  düzeylerindeki inhibitör etkisinin akut ve kronik dönemde kanda daha belirgin olmakla birlikte beyinde TNF-  inhibisyonunun 2-ME'e göre daha az olması ve HIF-1  düzeylerini akut dönemde beyin parankiminde artırması nedeniyle TBH'da etkinliğı yeterli değıldir. Ancak akut dönemde TERT düzeylerindeki artma da pentoksifilinin TBH'da koruyucu etkinliğini göstermektedir. Pentoksifilinin travma sonrası akut dönemde kullanımının önerilmesi için daha detaylı çalışmalar gereklidir.

Anahtar Kelimeler: HIF-1 , TNF- , TERT, 2-metoksiöstradiol, pentoksifilin, deneysel travmatik beyin hasarı

**THE EFFECT OF PENTOXIFYLLINE AND 2-METHOXYESTRADIOL AT
HIF-1 ALPHA, TNF-ALPHA, APOPTOSIS AND TELOMERASE ACTIVITY
RELATED GENES IN THE EXPERIMENTAL TRAUMATIC BRAIN
INJURY IN RATS**

ABSTRACT

Objective: Prevention of secondary brain injury via pentoxifylline and 2-methoxyestradiol in rats that created severe head trauma and investigate the effectiveness of HIF-1 α , TNF- α and TERT gene expression.

Materials and methods: In this study used 98 number 3 months, weighing 250-350 g male Sprague-Dawley species rats. Each 7 experimental group include 14 rats. All the rats except sham group created head trauma. First controlled cortical impact model through moderate-to-severe head trauma was created and drugs applied intraperitoneally (ip) and after 30 min was performed. After the trauma to 3rd and 6th group administered 60 mg/kg pentoxifylline and to 4th and 7th group administered 5 mg/kg 2-methoxyestradiol. Post-traumatic blood was taken for the measurement of HIF-1 α and TNF- α mRNA expression, telomerase activity. After 24 hours in groups of acute, chronic in groups of 30. days later, brain tissue and blood samples were taken by sacrifice. After real-time PCR with HIF-1 α , TNF- α and telomerase reverse transcriptase (TERT) expression levels detected in both blood and brain tissue by real time PCR.

Results: We have observed that the obvious inhibitory effect of 2-ME on HIF-1 α in the acute phase was not exist in the chronic phase and the inhibitory effect on TNF- α was obvious only in chronic phase and we have also observed that increased levels of TERT were exist in chronic phase. As for Pentoxifylline, in both of acute and chronic phase, its inhibitory effect on TNF- α level was higher in the blood samples than the brain tissue samples. On the other hand, Pentoxifylline increased the HIF -1 α level in the brain parenchyma in the acute phase but although it was not statistically significant, it decreased it in the chronic phase. We determined while it decreased the level of TERT in chronic phase, it increased in the acute phase.

Conclusion: In this study, in the acute phase 2-methoxyestradiol reduces the level of HIF-1 α , however, the impact was limited in the chronic period. Pentoxifylline; reduces the TNF- α but increases HIF-1 α and TERT levels in the acute phase.

Keywords: HIF-1 α , TNF- α , TERT, 2-methoxyestradiol, pentoxifylline, experimental traumatic brain injury.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çağımızın en önemli problemlerinden biri haline gelmiş olan kafa travmaları, öldürücü, sakat bırakıcı, uzun süre tedavi ve bakım gerektiren bir patolojidir. Travma sonrası normal fizyolojisi bozulan beyinde oluşan hipoksi ve iskemi sebebiyle oluşan ikincil hasar ile mevcut hasar derinleşmektedir (1, 2).

Travmatik beyin hasarlı (TBH) hastaların tedavisinde birçok tanı ve tedavi metodlarının kullanıma girmesine rağmen morbidite ve mortalite oranı halen yüksek seyretmektedir. Travmaya bağlı ölümlerin yarısından çoğunda kafa travması mevcuttur. Kafa travmalarında mortalite hızı, travmayı takip eden erken dönemde en yüksektir. Ölümcül seyreden kafa travmalarının yarısı hastaneye ulaştırılmadan ölümle sonuçlanmakta, travmaya bağlı olup hastanede gerçekleşen ölümlerin 2/3'si ilk 24 saat içerisinde ve bir hekim tarafından değerlendirilmesine rağmen meydana gelmektedir. Kafa travması sonrası kaybedilen hastaların otopsilerinde; yaklaşık %70'inde kafa içi basınç artışı bulguları saptanırken %60'ında intrakranial hematoma mevcuttur (3).

Travmatik serebral yaralanmalarda prognozu olumlu etkileyecek tek başına etkili bir tedavi ajanı henüz ortaya konulamamıştır. Ağır kafa travmalı hastalarda morbidite ve mortaliteyi etkileyen travmaya bağlı birincil etkilerinin yanısıra; kafa içi basınç (KİB) artışı, hipoksi, iskemi ve metabolik olaylar gibi ikincil etkiler de vardır. Bu sebeple kafa travmasının direkt etkisiyle meydana gelen ve birincil doku harabiyeti olarak adlandırılan olaylara ilave olarak; KİB'nin artması, posttravmatik endokrin ve biyokimyasal olaylar, herniasyon, beyin ödemi, beyin iskemisi, hipoksi ve hiperemi vs.

gibi ikincil olayları birbirinden ayırmak, tedaviyi planlamak açısından son derece önemlidir (4).

Beynin, diğer organlara göre oksidatif streslere karşı savunma mekanizması daha azdır. Bu nedenle beynin travmaya karşı antioksidan mekanizmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Travmaya maruz kalan beyin, oksidanlara karşı ikincil hasardan korunduğu oranda normal fizyolojisine dönebilir (5).

Travma ile oluşan iskemi sonrası nöronal hasarı önlemek ve kötü nörolojik sonuçları düzeltmek için, hipoksi ve beyin ödemi derinleştiren moleküllerin, genlerin üretimini veya dağılımını azaltmak gerekmektedir. Bunları inhibe eden ajanların, tedavi edici etkileri ile santral sinir sisteminde (SSS) travma veya iskemi sonrası oluşan kötü nörolojik tabloyu olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir (6).

Yeniden canlandırma sonrası beyin kan akımı ve oksijenasyon düzeltildiğinde fosfor metabolitleri ve hücre içi pH normal düzeyine dönmeye başlar. Ancak ilk hasarlanmadan 6-48 saat sonra hücre içi Ca^{+2} , eksitotoksisite, serbest oksijen radikalleri ve NO'nin (nitrik oksit) yol açtığı mitokondri fonksiyon bozukluğuna bağlı ikincil enerji yetmezliği olarak belirtilen ve beyin hasarını artıran dönem ortaya çıkmaktadır (7).

Bu dönemde dolaşımdaki ve dokulardaki inflamatuvar hücreler ve inflamatuvar mediatörler gelişen beyin hasarına katkıda bulunmaktadır. Hipoksik iskemik beyin hasarından altı saat sonra beyinde nötrofil, aktive makrofaj ve mikroglia birikimi ile TNF- α ve IL-1 β gen ekspresyonu ve sentezi artar. Ekstresek yolakta apopitoz sitokinlerce uyarılmış membran reseptörleri aracılığı ile başlatılır (7).

Kafa travması sonrası ikincil hasarın başlamasında hipoksi ve beyin ödemi önemli faktörlerdir. Kafa travması sonrası hipoksi göstergesi olarak Hipoksi ile İndüklenen Faktör'ün (HIF-1 α) ve ödem ile enflamasyon belirteci olarak da Tümör Nekroz Faktör'ün (TNF- α) kan ve beyin dokusunda arttığı bilinmektedir. Ortaya çıkan hipoksi ve enflamasyon hücrenin apopitozise gitmesine sebep olmaktadır. Apopitozisin sebebi olarak da hücrede telomeraz aktivitesindeki değişiklikler sorumlu olarak gösterilemektedir. Bu çalışma ile beyindeki hipoksi ve ödemin azaltılması, beynin ikincil

hasarlardan korunması amaçlanmaktadır. 2-metoksiöstradiol (2-ME) ve pentoksifilin kullanımının HIF-1 α ve TNF- α üzerinden hipoksi ve beyin ödemi azaltmaya katkısı nedeniyle hipoksi ve enflamasyonun önlenmesi ve buna bağlı olarak da apoptozisin engellenmesinde katkısı olabileceği düşünülmüştür (8-10)

Hipoksiye hücrel yanıt çok aşamalı bir süreç olup transkripsiyonel yanıtların çoğu HIF'ler tarafından düzenlenir. HIF-1 α 'nın tanımlanması, eritropoietinlerde (EPO) kronik hipoksinin çarpıcı etki mekanizmalarının araştırılmasına dayanır (11). Bu HIF gen ailesinin ana elemanları hipoksi ile indüklenen genlerin ifadenmesini aktive eden HIF-1 α geni ve diğeri HIF-1 α proteini ile heterodimer oluşturan aryl hidrokarbon reseptör nükleer transloktör (ARNT) proteininin sentezinden sorumlu HIF-1 β genidir (12-15).

HIF-1 α , hipoksi ile indüklenen genleri aktive ettiği için ana proteindir (15). HIF-1 β , oksijene yanıt oluşturmaz; fakat fonksiyonel HIF kompleksinin oluşumu için gereklidir. HIF α/β heterodimerleri hedef genin güçlendirici ya da promotorunda bir DNA bağlanma motifi olan hipoksi yanıt elementleri (HRE) üzerindeki hedef genlere bağlanır (16).

HIF-1 proteinleri hücre ve dokularda düşük oksijen basıncına adaptasyon, hücre sağ kalımı ve çoğalması, anjiyogenez, eritropoez, glikoz alınımlı ve demir metabolizması gibi süreçlere bağlı birçok genin hipoksiye transkripsiyonel aktivasyon cevaplarının anahtar düzenleyicisidir. HIF-1 α normoksik koşullar altında, oksijen bağımlı prolin hidroksilaz proteinleri (PHD) tarafından hidroksillenir. Hidroksillenen HIF-1 α alt üniteleri sonraki degradasyonlar için von Hippel-Lindau (VHL) proteininin hedefidir. Bunun dışında HIF-1 α 'nın normoksik modifikasyonları onun transkripsiyonel aktivasyonunu da etkileyebilir. HIF-1 α 'nın C-terminal transaktivasyon domeynine asparajin üzerindeki hidroksilasyon, HIF inhibe edici faktör (FIH) tarafından normokside katalizlenir (17). Bu hidroksilasyon ile HIF-1 α 'nın transkripsiyonel ko-aktivatörler ile etkileşimleri baskılanarak regüle edilir (18, 19).

HIF-1 α sitoplazmada lokalize olmakla birlikte bazı fraksiyonları için çekirdekte de bulunabilir. HIF-1 α transkripsiyonu oksijen konsantrasyonundan bağımsızdır ve HIF-1 α

stabilitesini etkilemez (20). Hipoksik koşullarda ne PHD'ler ne de HIF-1 α fonksiyoneldir. HIF-1 α proteazomal yıkımdan kaçarak sitozolde birikir ve stabil hale gelir. Ardından fosforillenerek nükleusa geçer ve HIF- β ile heterodimerik bir kompleks oluşturur. Bu kompleks hipoksiyle indüklenebilen genlerin promotor ya da güçlendirici DNA sekanslarına bağlanır. HRE'lere HIF bağlanması sonucu hedef genlerin transkripsiyonu başlar (21, 22). Hipoksiye ek olarak, TNF- α ve interlökin 1 β (IL-1 β) gibi proinflatuar sitokinler de HIF ifadesini tetikleyebilir (23).

2-ME, post-transkripsiyonel aşamada etki eden güçlü bir HIF-1 α inhibitörüdür. 2-ME'ün en önemli mekanizması neoanjiogenezin inhibisyonudur. 2-ME, HIF-1 α 'nın ekspresyonunun, nükleer akümüasyonun ve transkripsiyonel aktivitesinin inhibisyonu ile yapmaktadır. HIF-1 α güçlü bir anjiogenik ajan olan hipoksi ile salınımı uyarılan VEGF'nin üretilmesine aracılık etmektedir (24).

Pentoksifilin hücrel fosfodiesterazları (PDE) nonselektif olarak inhibe eden bir metilksantin türevidir. Fosfodiesteraz inhibitörü pentoksifilinin hipoksik iskemik beyin hasarı öncesi uygulandığında TNF- α düzeyini azaltarak koruyucu etkinlik gösterdiği belirtilmektedir. TNF- α 'nın vasküler hasarın oluşumuna katkıda bulunduğı gösterilmiştir (25).

Pentoksifilin antitrombotik, vazodilatör, antimitojenik ve antiinflatuar özellikleri olan bir ilaçtır. Fosfodiesterazlar siklik nükleotidlerin yıkımında rol alan enzim grubudur. Pentoksifilin çeşitli fosfodiesterazlar üzerinden etki ederek cAMP ve cGMP yıkımını engeller ve düzeylerini artırır (26).

Pentoksifilin hücre membran akışkanlığının sağlanması, immun modülasyon, fibrinolizisin uyarılması, antikoagülan etkiler ve fibroblast fizyolojisi üzerinde değişik etkiler gibi çeşitli farmakolojik özellikleri bulunan bir ilaçtır (27).

Bu çalışma ile; pentoksifilin ve östrojenin doğal metaboliti olan 2-ME inhibisyonu ile sıçan travma modellerinde travmaya bağlı serebral iskemi, hipoksi ve ikincil hasarın engellenmesi amaçlanmaktadır. Hipoksi ve iskemi sonucu ortaya çıkan HIF-1 α üzerinde birçok çalışma mevcut olup travma üzerine çalışmalar daha sınırlıdır. Hipoksik ve

iskemik olaylarda pentoksifilinin kullanımı mevcut iken, 2-ME'ün kullanımı mevcut değildir. Bu çalışmada bu ilaçları kullanarak, bu ilaçların kafa travması sonrasında gelişen ikincil hasarın önlenmesi üzerine olası pozitif etkilerini HIF-1- α , TNF- α ve TERT geni mRNA ekspresyonları üzerinden göstererek kliniğe katkı sağlamayı ve elde edilebilecek olası pozitif sonuçlar ile bu ilaçların klinikte kullanılmalarını amaçlamaktayız (28, 29).

2. GENEL BİLGİLER

2.1 KAFA TRAVMASI

2.1.1. Tanım

Travmatik beyin hasarı; kraniyum ve içeriklerine yönelik harici mekanik bir kuvvetin uygulanmasının sonucu olup geçici ya da kalıcı bozukluklara, fonksiyonel yetersizliklere veya psikolojik davranışlara neden olur (3).

Kafa travmaları; bütün dünyada sık karşılaşılan, adli, tıbbi ve cerrahi yönleri ile bugün için hala önemli sağlık, toplumsal ve ekonomik alanda sorundur. 21. yüzyılın her türlü ileri teknolojisi ve medeniyet koşullarına rağmen tüm dünyada meydana gelen yaralanmalar, tüm yaşlardaki ölüm nedenleri arasında üçüncü sırada yer almaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde Ulusal Bilim Akademisi, yaralanmaları “modern toplumun ihmal edilmiş hastalığı” olarak tanımlamaktadır (33, 34).

2.1.2. Epidemiyoloji

TBH'nın görülme sıklığını kesin olarak saptamak zordur, ancak her yıl 400/100.000 olarak bildirilmektedir. Doğumdan itibaren insanlar her yaş ve cinsten kafa travmalarına maruz kalabilirler. Doğum esnasında forseps kullanılması, beşikten veya kucaktan düşmeler, yaşın ilerlemesiyle ise sıklık sırasına göre trafik, iş, ev ve spor kazaları kafa travmalarının nedenlerini oluşturlar (3).

Travmaya bağlı ölümlerin yarısından çoğunda kafa travması mevcuttur. Kafa travmalarında mortalite hızı, travmayı takip eden erken dönemde en yüksektir. Kafa travması sonrası kaybedilen hastaların otopsilerinde; yaklaşık %70’inde kafa içi basınç artışı bulguları saptanırken %60’ında intrakranial hematoma mevcuttur (35).

Travmaya bağlı ölümlerin %50’si olay yerinde ilk birkaç dakikada beyin, beyin sapı, spinal kord, kalp ve büyük damar yaralanmalarına bağlı gelişmektedir. Ölümlerin %30’u hastaneye nakil ve acil servis safhasında subdural hematoma, epidural hematoma, hemo-pnömotoraks, dalak rüptürü, karaciğer rüptürü, pelvik kırıklar veya ciddi kanamalara yol açan diğer yaralanmalar nedeniyle ilk 3 saatte olmakta ve kurtarılabilecek hasta grubunu oluşturmaktadır. Bunun ise %20’si travmadan günler hatta haftalar sonra sepsis, multiorgan yetmezliği sonucu olmaktadır (36).

Ülkemizde ise tüm ölüm nedenleri içerisinde trafik kazaları üçüncü sırada yer almaktadır (40). Emniyet Genel Müdürlüğü verilerine göre ülkemizde 2000 yılında toplam motorlu araç sayısı 8.320.449 iken bu sayı 2013 yılında 17.939.447 olarak raporlanmıştır. Son 5 yıldaki ortalama araç artış oranı ise %5’in üzerinde kalmıştır. Ülkemizdeki sürücü sayısı ise 2013 verileriyle 25 milyonun üzerindedir (42).

Türkiye’de Emniyet Genel Müdürlüğü verilerine göre 2013 yılı toplam kaza sayısı 1.207.354 olup, olay yerinde ölen kişi sayısı 3.685 iken bu sayı sonradan ölenlerle birlikte 9.212’ye çıkmaktadır. Yaralı sayısı 274.829 olup bu rakamın %5’ini daimi sakat kalan grup oluşturmaktadır ki 13.741 kişidir. %15 oranında ise geçici sakatlık yaşan grubun oranıdır. Bu sonuçlardan ülkemizde her yıl önlenbilir nedenlerle yaklaşık binlerce kişinin yaşamını kaybettiği, yüzbinlerce kişinin yaralandığı, bunların bir kısmının eski işine dönemediği, büyük boyutta sosyoekonomik kaybın oluşturuğu anlaşılmaktadır. Yine aynı istatistik verilerine göre ölenlerin %25’ini 0-14 yaş grubu oluşturmaktadır (41, 42).

2.1.3 Sınıflama

Kafa travmasının evrensel olarak bilinen ve kabul edilen ortak bir sınıflaması yoktur. Glasgow koma skalası (GKS), kullanılan ilk travma skorlarından olup bozulmuş bilinç

durumu ve komanın süre ve derinliğinin değerlendirilebilmesi için Jennett ve Teasdale tarafından 1974 yılında tasarlanmıştır. Matematiksel sınıflamalar arasında en sık, evrensel olarak kabul edilen GKS kullanılmaktadır. GKS beyin harabiyetinin şiddetini pratik olarak en iyi gösterdiği kabul edilmektedir. GKS canlılık ve serebral korteksin fonksiyonlarını belirler (43). GKS 15 puan üzerinden hesaplanmakta olup en düşük değeri 3 puandır.

2.1.4. Kafa Travmasında Fizyopatoloji

Özellikle son 20 yılda kafa travmalarının fizyopatolojisi hakkındaki bilgilerde artış, yoğun bakımdaki hasta bakım tekniklerindeki gelişmeler ve travmatik beyin hasarından sonra gelişen ikincil nöronal hasarın fizyolojisinin anlaşılması ile birlikte mortalite oranları azalmış, prognozda belirgin düzeltilmeler gözlenmiştir (45).

Travma sonucu SSS’de ilk olarak birincil beyin hasarı meydana gelmekte, birincil beyin hasarını takiben ortaya çıkan birçok karmaşık fizyopatolojik olaylara bağlı olarak ikincil beyin hasarı oluşmaktadır. Birincil hasarın kendisi serebral vasküler yapılarda yırtılma ve kopmalara da yol açmaktadır. İkincil hasarın temelini oluşturan hücresel olaylar döngüsü; birincil hasarla başlamakta ve ilk saatlerde enflamatuvar, eksitotoksik, oksidatif stres, metabolik, vasküler ve mitokondriyal mekanizmalarla aktive olmaktadır. İkincil beyin hasarı primer travmayı takiben saatler ya da günler içinde meydana gelir. Hemen daima bütünüyle iskemik tipte olup %80’in üzerinde fatal seyreder (46).

Kafa travmalarındaki tedavinin amacı gecikmiş, mekanik olmayan ikincil beyin yaralanmalarını önlemeye ya da en aza indirmeye yöneliktir. Çünkü direkt mekanik travmanın sonucu olan birincil yaralanma tedaviden etkilenmez (3).

Travmatik serebral yaralanmalarda prognozu olumlu etkileyecek tek başına etkili bir tedavi ajanı henüz ortaya konamamıştır. Kafa travmasının direkt etkisiyle meydana gelen ve birincil doku harabiyeti olarak adlandırılan olaylara ek olarak; KİB’ı artması, posttravmatik endokrin ve biyokimyasal olaylar, herniasyon, beyin ödemi, beyin iskemisi, hipoksi ve hiperemi vs. gibi ikincil olayları birbirinden ayırmak, tedaviyi planlamak açısından son derece önemlidir (4).

Birincil beyin yaralanmaları, travma anında ya travmanın direkt etkisi sonucu beyin parankiminde ya da akselerasyon ve deselerasyon kuvvetlerine bağlı uzun beyaz cevher traktuslarında meydana gelir. Beyin parankimasına olan direkt travma, beynin kemik protuberanslara çarpmasının veya beynin kemik fragmanlar ya da yabancı cisim tarafından penetrasyonu sonucu oluşur. Akselerasyon-deselerasyon kuvvetleri uzun beyaz cevher traktuslarında kopup ayrılmaya neden olarak aksonal bozulma ve ikincil hücre ölümüne yol açarlar (3).

İkincil beyin yaralanmaları başlangıç travmasını takip eden sistemik ve intrakranyal olaylardır. Primer travmaya bir yanıt olarak meydana çıkarlar ve nöronal harabiyet ile hücre ölümüne yol açarlar. Primer travma tarafından tetiklenen enflamatuvar olaylar bir dizi biomoleküler değişikliklerin bir sonucu olup mikrosirkülasyonun bozulmasına ve nöronal bütünlüğün ortadan kalkmasına yol açarlar. Dolayısıyla sistemik hipotansiyon, hipoksi, hiperkapni, şiddetli hipokapni, artan intrakranyal basınç, ateş, hiponatremi, anemi, diffüz intravasküler koagülopati gibi ikincil yaralanmalar beyin travması ya da multipl travmalar tarafından başlatılan bir seri fizyolojik değişikliklerin biyokimyasal sonuçlarıdır. İntrakranyal olaylar ise kanama (epidural, subdural, intraparakranyal), beyin ödemi, intrakranyal hipertansiyon, serebral vazospazm, intrakranyal enfeksiyon, epilepsidir (3).

İkincil beyin harabiyetinde major üç neden olarak hipoksi % 30 ($PaO_2 < 65$ mmHg), hipotansiyon % 13 (sistolik kan basıncı < 90 mmHg) ve anemi % 12 (hematokrit $< \% 30$) bulunmuştur (3).

Beynin, diğer organlara göre oksidatif streslere karşı savunma mekanizması daha azdır. Bu nedenle beynin travmaya karşı antioksidan mekanizmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Travmaya maruz kalan beyin, oksidanlara karşı ikincil hasardan korunduğu oranda normal fizyolojisine dönebilir (5).

Travma ile oluşan iskemi sonrası nöronal hasarı önlemek ve kötü nörolojik sonuçları düzeltmek için, hipoksi ve beyin ödemi derinleştiren moleküllerin üretimini veya dağılımını azaltmak gerekmektedir. Bunları inhibe eden ajanların tedavi edici etkilerinin travma veya iskemi sonrası oluşan kötü nörolojik tabloyu olumlu yönde etkilediği

bildirilmiştir. Geri dönüşümsüz doku hasarının gelişmesi için serebral kan akımının TBH'lı hastalarda 15 ml/100g/dak'nın altına düşmesi gerekmektedir (6, 47).

Kafa travması sonrası ikincil hasarın başlamasında hipoksi ve beyin ödemi önemli faktörlerdir. Kafa travması sonrası vücutta lokal ve sistemik inflamatuvar bir süreç başlamaktadır. Bu süreç immün düzenleyici hücrelerin aktive olması, proinflamatuvar sitokinlerin, araşidonik asit metabolitlerinin, kontakt faz proteinlerinin, hormonal mediatörlerin salınımı, koagülasyon sistemi ve akut faz proteinlerinin senteziyle karakterizedir (48, 49).

Beyin hasarını takiben nöronal hasarın yayılmasında rol oynadığı düşünülen birçok biyokimyasal madde bulunmaktadır. Bu maddelerin salınımı hücrelerin membran bütünlüğünü bozarak ve iyon değişikliklerine yol açarak hasar görmüş olan beyin daha da kötüleşmesine yol açan bir süreci başlatmaktadır. Bu maddeler glutamat ve aspartat gibi eksitator aminoasitler, sitokinler ve serbest radikallerdir (3, 50).

Yaralanmadan sonraki saatler içinde TNF, IL-1 β ve IL-6 gibi proinflamatuvar enzimlerin miktarı artar. Doku hasarının ilerlemesi direkt olarak nörotoksik mediyatörlerin salınımına veya indirekt olarak nitrik oksit (NO) ve sitokinlerin salınımına bağlıdır. Vazokonstriktörlerin biraz daha salınması (prostaglandinler ve lökotrienler), lökosit ve trombosit adezyonu ile mikrovasküler yapının obliterasyonu ve ödem oluşumu doku perfüzyonunu daha da azaltır ve ardından sekonder beyin hasarını şiddetlendirir (51).

Mekanik yer değiştirme sonucu morfolojik yaralanma (örn. Vasküler distorsiyon), otoregülasyonun bozulmasıyla gelişen hipotansiyon, NO veya kolinergik nörotransmitterlerin yetersizliği ve prostaglandinin indüklediği vazokonstriksiyonun artması da posttravmatik iskeminin mekanizmaların içinde yer alır (51, 52, 53)

Serebral travmada direkt doku harabiyeti ile serebral kan akımı ve metabolizma regülasyonu bozulmaktadır. Bu iskekiye benzer tablo, anaerobik glikolizise bağlı laktik asid birikimine, artan zar geçirgenliğine ve ardışık ödem oluşumuna yol açmaktadır. Anaerobik metabolizma hücresel enerji durumunu sağlamakta yetersiz kaldığından

adenosin trifosfat (ATP) depoları tükendir ve enerji bağımlı zar iyon pompalarında bozulma meydana gelir. İkinci aşamada ise glutamat, aspartat gibi eksitatuar nörotransmitterlerde aşırı salınım, voltaj bağımlı Ca^{++} ve Na^{+} kanalların aktivasyonu ile terminal zar depolarizasyonu gerçekleşmektedir. Ardışık Ca^{++} ve Na^{+} girişleri hücre içi katabolik sürece neden olmakta, sonuçta Ca^{++} ; lipid peroksidaz, proteaz ve fosfolipazları aktive etmekte ve buna bağlı olarak sırayla serbest yağ asitleri ve serbest radikallerin hücre içi düzeyleri artmaktadır. Caspas'ların, translokazların ve endonükleazların aktivasyonu biyolojik zarlarda ve nükleosomal deoksiribonükleotit'lerde fragmentasyon değişikliklerini başlatmaktadır. Tüm bu olaylar birlikte damar, hücre zarlarında, hücre yapılarında bozulmaya ve sonuçta da nekrotik veya programlanmış hücre ölümüne (Apopitozis) neden olmaktadır (3, 54).

2.1.5. Kafa Travmasında Enflamasyon

Kafa travması sonucu kan beyin bariyerinin bozulması ile SSS'ne geçen doğal öldürücü lenfositler, T lenfositler, polimorfonükleer lökositler (PMNL) gibi periferik kaynaklı hücreler gibi astrosit ve nöronlar da sitokin sekrete ederek inflamasyona ve beyin hasarına katkıda bulunmaktadır. İnflamasyon bölgesinde, aktive kapiller endotelial yüzeyde bulunan ICAM-1 (İntrasellüler Adezyon Molekülü), VCAM-1 (Vasküler Hücre Adezyon Molekülü), P-selektin ile lökosit yüzeyinde bulunan CD11/CD18, L-selektin adezyon molekülerinin etkileşmesiyle lökositlerin transmigrasyonu ve diapedezini sağlanmaktadır (54).

PMNL'ler adhezyon molekülleri aracılığıyla yayıldıkça hem defektif ve hem de sağlam endotelial hücre tabakalarına yapışmaktadır. Bu hücreler makrofajlar ve T-hücreleri ile birlikte yaralanmış dokuyu infiltre ederler. Bu enflamatuvar sürece yanıt olarak yaralı ve çevre doku elimine edilir. Bu başlangıç olaylar daha sonra vasküler endotelde değişiklikler ve kemotaksis yoluyla ekstraserebral inflamatuvar hücrelerin girişini kolaylaştıran birçok proinflamatuvar ve antinflamatuvar mediator salınımını uyarmaktadır. Mikroglia ve monositlerce salınan NO ve vasküler endotelial büyüme faktörü vasküler dilatasyona, kapiller kaçığa ve ekstrasellüler ödem oluşumuna yol açmaktadır (54, 57)

Travmayı takip eden saatler içerisinde inflamasyonu başlatan proinflamatuvar sitokinler sentezlenmektedir (58). TNF- α makrofajlar tarafından salınan nöronların sağ kalımında, onarımında, gelişiminde ve beyin dokusunda gelişen inflamasyonda belirgin rolü olan multifonksiyonel proinflamatuvar bir mediatördür. Makrofajlardan diğer mediatörlerin salınımını uyarmaktadır. KBB'nin permeabilitesini artırmakta, serebrovasküler endotele lökosit adezyonunu sağlamakta, prokoagülan süreçler yoluyla doku hasarı oluşturabilmektedir (58).

Tüm inflamatuvar periyod boyunca oluşan komponentler SSS hücrelerinin de inflamatuvar yetenekleri olduğunu; mikroglia, astrositler ve perivasküler hücrelerin de monosit/makrofajlar gibi sitokin ve inflamatuvar mediator salgıladığını göstermektedir. Yapılan son çalışmalarda nöronların immün sistemi aktive ederek inflamasyonu azaltıcı yönde özelliklerinin bulunduğu belirtilmektedir (57).

2.2. HİPOKSİ İLE İNDÜKLENEN FAKTÖR-1 α (HIF-1 α)

Oksijen, aktif hücresel işlevlerin çoğunluğu için enerji kaynağı olan ATP'nin üretildiği aerobik glukoz metabolizmasında son elektron alıcısıdır. Hücreler hipoksiyi fark eden ve hipoksi ile tetiklenen faktör aracılığı ile işleyen hızlı ve etkin bir moleküler yanıt sistemine sahiptir. Bu, transkripsiyonel regülatör oksijen desteğini artıran ve anaerobik ATP üretimini destekleyen birçok adaptif genin induksiyonuna aracılık eder (60).

HIF'in tanımlanması, eritropoietinlerde kronik hipoksinin çarpıcı etki mekanizmalarının araştırılmasına dayanır. Eritropoietin geninde yalnızca hipoksik koşullar boyunca kısıtlanan bir protein kompleksi keşfedildi. Bu protein kompleksine bağlanarak EPO geninin transkripsiyonunun artmasına ve sonuç olarak EPO üretiminde artışa neden olmuştur. Bu kompleks daha sonraları HIF-1 olarak isimlendirildi (11).

HIF-1, PAS (Per-Arnt-Sim) ailesinden HIF-1 α ve ARNT (Arl Hidrokarbon Nükleer Translokator-HIF-1 β) gibi iki heliks-loop-heliks proteinlerinden oluşmuş bir heterodimer komplekstir. Bunlardan HIF-1 α , hipoksi ile indüklenen genleri aktive ettiği için ana proteindir (15, 61).

HIF'in keşfinden sonra hakkında bildiklerimiz giderek artmıştır. Hipoksinin gen ekspresyonu yoluyla hücre biyolojisi ve memeli fizyolojisindeki önemi ve oksijen homeostazında oynadığı kritik rol araştırmacıları bu alanda çalışmaya cezbetmiştir.

2.2.1. HIF-1 Genleri, Proteinleri ve İşlevleri

HIF-1 proteinleri hücre ve dokularda düşük oksijen basıncına adaptasyon, hücre sağ kalımı, metabolizması ve çoğalması, anjiyogenez, vasküler tonus, eritropoez, glikoz alınımları ve demir metabolizması ve diğer fonksiyonları regüle eden proteinleri kodlayan birçok genin aktivasyon cevaplarının anahtar düzenleyicisidir. (60, 66).

Günümüzde gen bankasında, homoloji araştırmaları ve klonlama deneylerinde HIF-2 α (ayrıca endotelial PAS protein olarak da bilinir) ve HIF-3 gibi bu ailenin diğer üyeleri de bulunmuştur. HIF-2 α protein yapısı açısından büyük ölçüde HIF-1 α 'ya benzerlik gösterir. Ancak dokuya özgü ifadenmektedir. HIF-1 α her hücrede bulunabilirken, HIF-2 α fare karaciğerinde, tübüler sistemin gelişmesinde ve vasküler endotel hücrelerin yeniden yapılanmalarında görev alır ve bu dokularda yoğun şekilde görülürler. HIF-1 ve HIF-2 hipoksik ortamla indüklenerek HIF-1 β subünitesinden ayrılır ve pek çok transkripsiyonel aktivitelere aracı olur. HIF-1 α ve HIF-2 α oldukça benzer olmalarına ve HIF-1 β ile dimer oluşturarak hedef genlerin aynı DNA sekanslarına bağlanmalarına karşılık farklı doku ve hücresel yaygınlığa sahip olabilirler ve belkide farklı hedef genleri aktive edebilirler (12, 62).

HIF-1 alt ünitelerinin en az karakterize edileni HIF-3 α olup çok sayıda alternatif splayzing (alternatif kesip-ekleme) seçenekleri vermesi yönünden tek olanıdır. HIF-3 α 'nın splayzing seçeneklerinden biri olan inhibitör PAS domeyn proteininin (IPAS) HIF-1 α 'ya negatif bir regülatör gibi davrandığı ve bu nedenle HIF-3 α 'nın genellikle HIF sisteminin bir antagonisti olabileceği belirtilmiştir. HIF-3 α , HIF-1 α ile homolog olmasına rağmen, fizyolojideki rolü belli değildir. Ancak hipoksiye olan genetik cevabı negatif yönde etkileyerek görev yapar. HIF-3 α 'nın HIF-2 α üzerine inhibitör etkileri de bildirilmiştir (12, 62, 63, 64, 65).

Hücre ve organlar oksijen basıncındaki değişikliklere uyum sağlama ihtiyacındadırlar. HIF-1'in adaptasyonu ile regüle edilen farklı fonksiyonlu 100'den fazla gen tanımlanmıştır. HIF-1, hedef genlerin güçlendirici ve promotör bölgelerinde lokalize olmuş 50 baz çiftli HRE bölgesine bağlanarak, bu genlerin ekspresyonlarını aktive etmektedir (11).

Önemli hücresel fonksiyonların idamesinde oksijen transkripsiyonel bir sinyal görevi görür. Böylece de fizyolojik ve patolojik bir süreç başlatılmış olur. Hipoksiye cevap olarak organizmalar adaptasyon aşamasında çeşitli mekanizmalar geliştirirler. Genetik olarak transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel olaylarla bazı genler pozitif yönde aktive edilirken bazı genler de inaktif ya da negatif yönde etkilenir. Hipoksiye hücresel yanıt çok aşamalı bir süreçtir ve transkripsiyonel yanıtların çoğu HIF'ler tarafından düzenlenir. HIF-1'de uzun zamandır araştırılan ve hipoksi esnasında transkripsiyonu düzenleyen başlıca proteinlerden biridir (67).

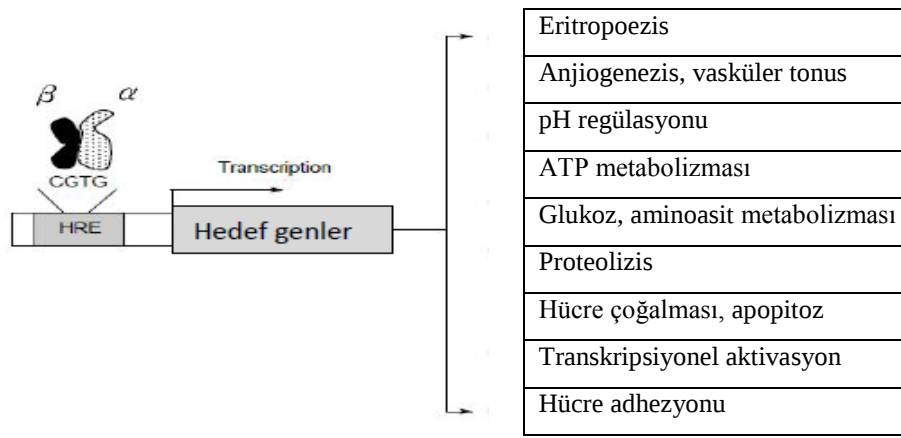
HIF-1 bir nükleer proteindir ve hücrenin O₂ homeostazında önemli bir role sahiptir. HIF-1, HIF-1 α ve HIF-1 β subünitelerinden oluşan bir heterodimerik komplekstir. HIF-1 β pek çok proteinde de bulunan ve hem hipoksi hem de normal O₂ saturasyonunda eksprese edilen yapısal parçadır. HIF-1 α ise ortamda bulunan O₂ miktarı ile regüle edilen ve HIF-1'in aktivitesini belirleyen regülatör subünittir (68).

Oksijen konsantrasyonundaki değişimlere bağlı olarak HIF-1 ile regüle edilen genlerin transkripsiyonunda düzenlemeler gerçekleşir. HIF-1 β 'nın sürekli eksprese edilmesinden farklı olarak HIF-1 α ekspresyonu azalan O₂ konsantrasyonuna bağlı olarak artar (69). Hipoksiye ek olarak, TNF- α ve IL-1 β gibi proinflatuar sitokinler de HIF ifadesini tetikleyebilir (23).

Hipoksiye hızlı bir şekilde cevap verebilmek için hücreler HIF-1 α proteinini düzenli ve devamlı olarak hipoksik olmayan koşullarda da sentez ve elimine ederler (70). HIF-1 α alt ünitesi normoksik koşullarda kararsızdır ve sonraki degradasyonlar için E3 ubiquitin ligaz kompleksinin bir parçası olan VHL proteininin hedefidir. Hipoksik koşullarda HIF-1 α proteazomal yıkımdan kaçır, sitozolda birikir, kararlı hale gelir, fosforillenir ve nükleusa geçerek HIF-1 β ile heterodimerik bir kompleks oluşturur. Bu kompleks

hipoksiyle indüklenabilen genlerin güçlendirici ya da promotörüne bir DNA bağlanma motifi olan hipoksi cevap elementleri ile bağlanır ve hedef genlerin transkripsiyonlarını başlatır (16, 21, 22, 71, 72).

HIF-1 α ekspresyonunun kaybına bağlı olarak endotel hücrelerinde proliferasyon, kemotaksis ve ekstrasellüler matriks penetrasyonu gibi anjiogenez aşamalarında farklılıklar olur (73).



Şekil 1: HIF-1 α , HIF-1 β heterodimerlerinin HRE'ye bağlanması ve aktive olan olaylar. (74, 75). (HIF: Hipoksi ile indüklenen faktör, HRE: Hipoksi yanıt elementleri)

Oksijen konsantrasyonuna duyarlı HIF-1 aktivitesini regüle etmede esas öneme hidroksilazlar sahip olmakla birlikte, HIF-1 aktivitesinin kontrolünde yardımcı diğer mekanizmalar da vardır. Hücrelerde sinyal iletiminde merkezi rol oynayan mitojen tarafından aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) yolağıdır. Bu regülasyonda MAPK ailesinin proteinleri olan serin/treonin kinazların rol aldığı gösterilmiştir. HIF-1'in fosforilasyonu HIF-1 β ile dimerleşmesine ve hedef genlerin promotör ya da güçlendirici DNA sekanslarına bağlanmasına böylece transkripsiyonel aktiviteye yol açar (13, 82, 83, 84).

2.2.2. HIF-1'in Hedef Genleri

Arteriyel endotel hücrelerinde, insan genlerinin %2'den fazlasının, direkt veya indirekt olarak HIF-1 tarafından regüle edildiği bildirilmiştir (9, 85, 86). Bu, transkripsiyonel regülatör oksijen desteğini artıran ve anaerobik ATP üretimini destekleyen birçok adaptif genin induksiyonuna aracılık eder. Bu genler, glukoz transporter- 1 (GLUT-1), glikolitik enzimler, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), NO sentetaz (NOS), adrenomedullin, karbonik anhidraz, β adrenerjik reseptörler ve eritropoietini kodlayan genleri içermekte olup HIF-1 tarafından aktive edilen genlerin bazıları listelenmiştir. Bunlar hücre büyümesi, angiogenez, hücre metabolizması ve yaşaması ile ilgilidir (60, 87, 88, 89)

HIF-1 düzeyi hipoksik koşullarla ilişkili olan akut tübüler nekroz, ateroskleroz, kanserler, kronik inflamasyon ve serebral iskemi gibi durumlardan etkilenir (92).

HIF-1'in transkripsiyonunu uyardığı VEGF anjiyogenezin ve vasküler geçirgenliğin anahtar düzenleyicisidir. VEGF, endotelial hücrelerin proliferasyonunu, migrasyonunu ve canlı kalmasını düzenler. Ayrıca, birçok antiapoptotik proteinin ekspresyonunu düzenler ve vasküler geçirgenliği artırır (93, 94). VEGF ayrıca, nöronlar da dahil olmak üzere, diğer hücrelerde bulunan reseptörlere de bağlanır. Son çalışmalarda direkt olarak nöral hücreleri etkileyebildiğini göstermiştir. VEGF nöronlarda apoptozu inhibe ederek nöroprotektif etki gösterir (60, 95, 96).

Tablo 1. Hipoksi ile regüle edilen genler ve tetiklenen cevabın efektörleri (60)

Effektör	Mekanizma
Glukoz transporter-1	KBB'den glukoz transportu
Laktat dehidrogenaz-1	Pirüvatın laktata dönüşünü artırır
Pirüvat dehidrogenaz kinaz-1	Pirüvatın asetil koA'ya dönüşümündeki pirüvat dehidrogenaz aktivitesini azaltır
Karbonik anhidraz	pH regülasyonu
Adrenomedullin	Vazodilatasyon
B-adrenerjik reseptör	vazodilatasyon
Vasküler endotelial büyüme faktörü	Proliferasyon, migrasyon ve endotel hücrelerinin canlı kalması, vazodilatasyon, artmış permeabilite, apoptozisin inhibisyonu
Eritropoietin	Eritropoez, apoptoz inhibisyonu, angiogenez, nörotrfizim, inflamasyon inhibisyonu, KBB geçirgenlik azalması, hücrel ödem azalması
Endotelin-1	En güçlü vazokonstiktör (kalpte, nöral dokuda, koroid pleksusta)
TERT	Telomer uçlarının korunmasını sağlar.
NO sentetaz	NO sentezi
Leptin	Arcuat nuc ve hipotalamusa etki eden yağ dokudan salınan tokluk hormonu
HIF-1 α prolin hidroksilaz	HIF-1 α 'yı inaktive eder

Eritropoietin mRNA'sı insan beyinde esas olarak korteks ve hipokampusta eksprese olur. Nöronlar, astrositler, mikroglia ve beyin endotelial hücreleri EPO reseptörlerini eksprese eder. Bu reseptörler özellikle kapillerlerin etrafındaki astrosit ayak çıkıntılarında çok sayıda bulunmaktadır. EPO ekspresyonu hipoksi ile güçlü şekilde regüle edilirken, EPO reseptörlerinin ekspresyonu HIF-1 α 'ya sensitif değildir. Ancak proinflamatuvar sitokinler ve EPO'nun kendisi tarafından upregüle edilir (23, 97, 98, 99).

EPO'nun SSS'de, nöroproteksiyon, nörotrofizm, anjiyogenez, immunomodulasyon ve sinaptik plastisite de dahil olmak üzere parakrin etkileri olduğuna çok sayıda kanıt bulunmaktadır. Eritropoietinin hipoksi, iskemi, kafa travması ya da nöbetler gibi durumlarda nöronal canlılığını sürdürülmesinde önemli rolü olabilir. Astrositlerden hipoksi ile tetiklenen EPO salınımı nöronlarda glutamat salınımı ve apoptozisi inhibe edebilir. EPO'nun nöroprotektif etkilerine aracılık eden reseptörler eritropoezi sağlayanlardan farklı gibi görünmektedir. Eritropoietin ayrıca, astrositlerin proliferasyonunu, oligodendrositlerin farklılaşmasını, anjiyogenezi düzenler ve KBB'ni VEGF aracılı artmış geçirgenliğe karşı korur (23, 97, 98, 100).

2.3 TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR- α (TNF- α)

TNF- α , ilk kez 1975 yılında Carswell ve arkadaşları tarafından tanımlanmış olup endotoksinler ile indüklenen ve sarkomlarda hemorajik nekroza neden olan bir glikoprotein olarak tariflenen TNF- α 'nın zaman içinde birçok inflamatuvar, enfeksiyöz ve malign olayda rol oynadığı tespit edilmiştir. 1985 yılında ilk kez insan kaynaklı TNF- α klonlanmıştır ve daha sonra anti-TNF- α antikorlar ile solubl TNF reseptörleri üretilmiştir. Bununla birçok inflamatuvar hastalığın tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (101).

Sitokinler intrasellüler iletişimin medyatörleri olarak görev yapan doğal olarak üretilen bir grup proteinlerdir. Sitokinler enfeksiyon, inflamasyon, otoimmün, travmatik ve iskemik hasara karşı koruyucu cevapları sırasında homeostazisi korurken hücre fonksiyonlarını regüle ederler (102).

TNF- α , çok sayıda sitokin tarafında oluşturulan peptid mediyatör ailesinin bir üyesidir. Bu aileye ait diğer üyeler arasında lenfotoksin- α , Fas ligand ve CD40 ligand yer alır. TNF- α doğal ve kazanılmış immünite, hücre proliferasyonu ve apoptoziste rol oynayan ve önemli proinflamatuvar özelliklere sahip olan bir sitokindir. Bu sitokin başta makrofaj ve monositler olmak üzere, T hücreleri, düz kaslar, adipositler ve fibroblastlar tarafından üretilmektedir (101, 103).

TNF, proinflamatuvar sitokinler içinde en erken salgılanan ve konakçı cevabındaki en güçlü mediatördür. Nonglikolize bir transmembran proteinidir. İki çeşit TNF vardır. Aktif makrofajlardan salınan TNF- α ile aktif T hücrelerinden salınan TNF- β 'dir. Birçok inflamatuvar ve otoimmün hastalığın patogeneziyle ilişkili olduğu düşünülen immün düzenleyici yanıtları da içeren çok sayıda biyolojik etkiye sahip olan pleiotropik bir sitokindir. Biyolojik aktiviteleri birbirlerinden tamamen farklı olan bu iki tip TNF- α 'nın trimerik formları aktiftir (104).

TNF- α 'nın sinyal iletim yolları oldukça karmaşıktır ve halen tam olarak aydınlatılamamıştır. TNF- α sinyal iletimindeki en önemli faktörlerden biri transkripsiyon faktörü NF κ B aracılığı ile düzenlenmesidir. TNF- α -NF κ B yolağını kontrol eden 300 civarında moleküler bağlantı tespit edilmiştir (105).

Sitokinler hedef hücelere spesifik yüzey reseptörleri ile bağlanarak etkilerini başlatırlar. Bu reseptörler bağlarına çok yüksek afinite gösterirler. Çok küçük sitokin miktarları özel bir hücrel cevaba neden olan intrasellüler sinyal kaskadını başlatabilir. Proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IF- γ ve IL-6) SSS'de çok yönlü etkileri vardır (102).

TNF- α , proinflamatuvar ve programlı hücre ölümü yollarını TNFR1 aracılığı ile gerçekleştirirken, doku tamiri ve anjiyogenez fonksiyonunu TNFR2 aracılığı ile yapmaktadır (101).

2.3.1 TNF- α 'nın fizyolojik rolü:

Sağlıklı kişilerin serum ve dokularında TNF- α ekspresyonu tespit edilememektedir. Ancak organizma inflamatuvar ya da enfeksiyöz bir uyarı ile karşılaştığında TNF- α üretimi gerçekleşmektedir. TNF- α 'nın majör biyolojik rolü bakteriyel, viral ya da paraziter enfeksiyonlara karşı organizmayı savunmaktır. Adaptif immünitede TNF- α ve TNFR1 önemli rol oynar. Bunlar organizmanın patojene maksimum yanıt vermesini sağlar. TNFR1, T hücre aktivasyonunda bir kostimulatördür ve aktif T hücreleri tarafından eksprese edilir. TNF- α 'nın en önemli fonksiyonu ise doğal immün sistem tarafından gerçekleştirilen inflamatuvar reaksiyonu başlatmasıdır (105).

TNF- α embriyonik beyinde, spinal kord ve periferel sinirlerde fazlaca eksprese edilir. TNF- α sağlıklı erişkin fare ve sıçan beyinde de gözlenmiştir. SSS’de TNF- α üretimindeki artışlar; SSS parankiminde dejenerasyon ile birlikte olan hastalıklar, travmatik hasar, iskemi ve enfeksiyona bağlı hasardan sonra da görülebilir (110). TNF- α iskemik beyinde eksprese edilmiştir (111).

TNF- α invitro olarak myelin ve oligodendrosit hasarını uyarır, TNF- α mikroglial hücreleri aktive edebilir ve invivo olarak hücre ölümü ile sonuçlanan sıçan oligodendrositlerine karşı sitotoksik aktivitesi de vardır. Vasküler endotelial koagölasyon ve enflamasyon cevapları ile de aktif olarak ilişkilidir. Birçok endotelial hücre aktivitelerinin hücre yüzey moleküllerinin modölasyonu TNF tarafından düzenlenebileceği gösterilmiştir (112, 113, 114).

TNF- α , beyin hasarından sonra hızla artan pleotropik (çok yerde etkili olan) bir sitokindir. Eksojen TNF- α fokal iskemik lezyonu daha çok arttırır, bloke edici endojen TNF- α ise nöroprotektiftir. TNF- α ’nın spesifik etkileri anti-TNF- α ile antagonize edilerek gösterilmiştir. TNF- α toksisitesi nöronlara direkt etki yoluna, glutamat nöron sensivitesinin modölasyonuna ve oksijen radikallerine bağlı değildir. TNF- α ’nın toksisitesi nöron olmayan hücreler yolu ile oluşturulur. TNF- α ’nın akut artışı koruyucu değildir, hatta iskemik hasarı arttırır. Bu nedenle akut artmış TNF- α aktivitesinin bloke edilmesi nöroprotektiftir (115).

2.3.2 İnflamatuvar yanıtta TNF- α ’nın etkisi:

Her ne kadar TNF reseptörleri birçok hücre ve dokuda eksprese olsa da TNF- α ’nın birçok proinflamatuvar etkisi vasküler endotel ve endotel-lökosit etkileşimi üzerinden olmaktadır. TNF- α ; IL-8 ve IL-10 gibi çeşitli kemokinlerin sentezini ve endotel hücrelerinde E-selektin, ICAM-1 ve VCAM-1 gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonunu arttırır. Sonuç olarak TNF- α antijenden tamamen bağımsız olarak birçok farklı lökosit grubunu harekete geçirir. İnflamasyonun klasik triadının ortaya çıkmasından da TNF- α ile endotel hücre ilişkisi sorumludur. TNF- α siklooksijenaz 2 ekspresyonunu ve endotelden PGI₂ üretimini arttırır. Bunun sonucunda artmış lokal kan akımına bağlı olarak rubor ve kalor meydana gelir. Tumorse TNF- α aracılı artmış

vasküler permeabilite nedeniyle makromolekül ve sıvının damar duvarından transendotelial olarak dışarı çıkması nedeniyle olur. Bunlara ek olarak TNF- α trombomodulin gibi proteinleri azaltır ve intravasküler trombüs gelişimine neden olur (117, 118).

İskemik beyinde sitokin moleküllerinin sadece hasar verici yönde değil nöroprotektif etkileri de vardır. Bazı beyin hasarlarının patolojisinin altında yatan nöroglivasküler etkileşimde beyindeki sitokinler ve kemokinlerin önemli rolleri vardır. Bu nedenle SSS hastalıklarında etkin tedavi yöntemlerinin gelişmesinde sitokinler ve kemokinler önemli hedefler olabilirler (119, 120)

Konak yanıtının en erken ve en güçlü mediatörü olan TNF- α çoklu travmanın akut döneminde ilk 20 dakika içinde salınımı olmaktadır. En yüksek konsantrasyonlara bir iki saat içinde ulaşmakta ve 4-6 saat arasında anlamlı olarak azalmaktadır. Sonuç olarak; TNF- α travma sonrasındaki immunoinflamatuvar yanıtın merkezi bir düzenleyicisidir. Bu çalışmada travmanın erken döneminde hızlı bir şekilde artarak ikincil nöronal hasara neden olan TNF'nın düzeylerinin azaltılarak nöroprotektif etki elde edilmesi amaçlanmaktadır.

2.4 TELOMERAZ ENZİMİ

İnsanlarda telomerik DNA sekansı 6 nükleotidin tekrarından oluşmaktadır TTAGGG (5'→3'). Bu sekanslar kromozomların uçlarında binlerce kez tekrarlanmaktadır. Ökaryotik hücrelerde lineer DNA moleküllerinin çoğaltılması sırasında meydana gelen, kromozom uçlarında yer alan, guaninden zengin ve bunları erozyondan koruyan doğal bir yapıdır. Telomerlerin uzunlukları türden türe değişiklik gösterir. İlk defa Tetrahymena thermophila'da 1978 yılında tesbit edilmiştir. Telomerik DNA dizileri diğer DNA dizilerinden yapı ve işlev olarak farklıdır, ayrıca temel biyolojik bir işleve de sahiptir. (124).

Telomerler kromozomların uçlarını degradasyondan ve füzyondan koruyan DNA-protein yapılarıdır. Telomerler genomik bütünlüğün korunmasında önemli rol oynarlar. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda telomerlerin hücre yaşlanmasında görev yaptıkları

gösterilmiştir. Telomerlerin hücre için moleküler saat görevi yaptıkları düşünülmektedir. Telomerler olmadan genetik materyal her bir hücre bölünmesi sırasında bir miktar kaybedilir. Telomer uzunluğu kritik düzeyde kısaldığında da hücre bölünmesi durur, hücreler yaşlanır ve sonunda ölür. Replikatif yaşlanma ve bunun hücrel yaşlanma ile ilişkisini, kültüre alınmış insan fibroblastları ile çalışan Hayflick ve Moor-head tanımlamıştır (125, 126). Normal memeli somatik hücreleri, in vitro koşullarda belli sayıda bölünebilir. Bu maksimum bölünme sayısına "Hayflick Limiti" denir (127).

Bu telomer aşınmasını önlemek için, bölünen hücreler (embriyodaki yüksek seviyelerde ve doğumdan sonra seviyeleri azalan) telomeraz adı verilen telomer uzunluğunun muhafaza edilmesini sağlayan dolayısıyla hücre yaşlanması ve apoptozu önlemek için DNA sentezini katalize eden bir enzim sentezler. (128).

İnsanda, telomeraz özelleşmiş heterokromatin yapıda bir DNA polimerazı olup büyük ribonükleoprotein kompleksi, kromozomların uçlarına yeni telomer sekanslarını sentezlemektedirler. Telomer zinciri tamamlayıcı zincirden daha uzundur. Telomer elongasyonu mitozun M ve S fazı boyunca telomer tekrarlarının eklenmesiyle telomeraz telomerik DNA'yı uzatır ve telomer elongasyonu ile hücre siklusu regüle edilir (10).

Telomeraz enzimi iki korunmuş komponentten oluşur. Bu iki komponent telomer ekleme fonksiyonunu yerine getirirler. Core telomeraz protein (TR) ve Telomeraz revers transkriptaz domainini (TERT) içerir. TERT ve TR diğer proteinlerin regülasyonu ile enzim aktivitesini oluşturmaktadır. Şu ana kadar telomer bölgelerinin yaşlanma ile ilişkili olduğu gösterilmişti fakat telomer bölgelerindeki kılmanın yaşlanma ile ilgisinin yanında stres ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir (10). Bunun yanı sıra telomer kılması, hücrenin apoptozise geçmesini veya kromozomal kararsızlık oluşmasını da indükleyebilmektedir (32).

Telomeraz, telomerik DNA'nın bir zincirinden sentezlenen, ribonükleoprotein büyük bir enzim kompleksidir. Bu enzim germ hücreleri, hemopoietik hücreler ve özellikle yetişkin kök hücrelerinde yüksek aktiviteye sahiptirler. Yenidoğan insanların kord kanlarında yaklaşık 10 Kb civarındadır (130).

Telomerazın katalitik alt birimi olan telomeraz revers transkriptaz insanda hTERT adını almaktadır. hTERT, 127 kDa'luk büyük bir proteindir, 16 ekson ve 15 intron içermekte olup, yaklaşık 40 Kb'dır. Aktivasyonunda, tümör supresör genler, protoonkogenler ve çevresel faktörler etkilidir. TERT, yarı açık sağ ele benzetilmektedir. Dolayısıyla protein, başparmak, avuç içi, diğer parmaklar kısımlarından oluşur (131, 132).

Telomeraz enzimi ile her hücre bölünmesinde meydana gelen telomer kaybı telafi edilerek hücrenin yaşam süresi uzatılmaktadır (31). Sonuç olarak düşük telomeraz aktivitesi gösteren normal hücrelerde telomerik tekrarlar korunmakta, böylece hücreler kendini yenileyebilmektedir. Telomeraz aktivitesinin eksik olduğu somatik hücrelerde ise her hücre bölünmesinde telomerler kısalmaktadır. Telomeraz reverse transkriptazı insan somatik hücrelerine in vitro olarak sokulduğunda telomeraz aktivitesi yenilenmekte ve hücresel yaşam süresi dikkate değer biçimde artmaktadır.

2.5. PENTOKSİFİLİN

Pentoksifilin, 20 yıldan daha uzun süreden beri kullanılan, hücre membran akışkanlığının sağlanması, immün modülasyon, fibrinolizisin uyarılması, antikoagulan etkiler ve fibroblast fizyolojisi üzerinde değişik etkiler gibi çeşitli farmakolojik özellikleri bulunan, metil ksantin türevi ve fosfodiesteraz inhibitörü bir ilaçtır (27).

Pentoksifilin spesifik olmayan tip 4 fosfodiesteraz (PDE4) inhibitörü olup 5'nükleotidaz enziminin inhibisyonuyla dokuda ATP kaybını azaltarak ve iskemik süreç içerisinde enerji tüketimini minimumda tutarak hücre hasarını engellemektedir (135, 136).

PDE enzim inhibisyonu ile hücre içi c-AMP düzeyi artmakta ve artan c-AMP, ATP kullanarak hücre içi protein kinaz sistemini aktive edip membran proteinlerinin fosforilasyonuna neden olmaktadır. Bu fosforilasyon ile hücre membran stabilizasyonu sağlanır. Diğer yandan Na-K ATPaz'ın aktivitesinin de artışı hücre membran stabilizasyonuna katkıda bulunmaktadır (137).

Pentoksifilin'in proinflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe ettiği ve antiinflamatuvar özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Pentoksifilinin 5'nükleotidaz enzimi üzerine

etkisiyle hem ileri dönem hasarlayıcı metabolik zincirlerin gelişimi engellenir hem de reperfüzyon döneminde dokunun ihtiyacı olan enerji depoları korunabilir. Pentoksifilin sadece monositlerin ürettiği TNF- α 'yı değil, granülositlerin ürettiği TNF- α sekresyonunu da inhibe etmektedir. TNF- α iskemik beyinde eksprese edilmiştir. Travma sonrasında TNF- α beyinde hızlı şekilde arttığı tesbit edilmiş ve endojen TNF- α 'nın inhibe edilmesi ile iskemik ve travmatik beyin hasarında nöroprotektif etkileri gösterilmiştir (28, 111, 115).

Lökosit deformabilitesinde ve kemotaksisinde artış, endotel lökosit adezyonunda, nötrofil degranülasyonu ve süperoksidad salınımında azalma, monosit kaynaklı TNF üretiminde azalma, IL-1 ve TNF- α 'ya karşı azalmış lökosit cevabı, doğal öldürücü hücre aktivitesinde azalma ve T ve B lenfosit aktivasyonunda inhibisyon gibi etkileri bulunmaktadır (27).

Ayrıca pentoksifilin trombosit agregasyonunu engellediği, kan viskozitesini azalttığı, eritrositlerin fleksibilitesini artırdığı ve periferik dolaşımı düzelttiği kaydedilmiştir. Pentoksifilin eritrosit fizyolojisi üzerinde yaptığı değişikliklerin mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, eritrosit membranında ATP miktarını artırarak membran elastikiyetini düzelttiği, diğer taraftan yapılan elektron mikroskobik çalışmalarda, pentoksifilin alan kişilerin eritrositlerinin artmış elastikiyete sahip olduğu gösterilmiştir. Hipoksi, asidoz, hiperosmolarite ve üremi gibi durumlarda eritrosit ATP seviyesi azalmakta, hücre içi kalsiyum iyon konsantrasyonu artmakta ve sonuçta hücre membranı sertleşmektedir (139).

Sonuçta pentoksifilin hem mikrosirkülasyonda, hem de doku oksijenasyonunda perfüzyonu düzeltmektedir (140).

Pentoksifilin, oral veya parenteral yolla kullanılabilir ve her iki şekilde de tamamına yakını absorbe edilir. İlacın alımından 4-8 sonra aktif metabolitleri plazmada en üst düzeye (100 ng/ml) ulaşır. Yedi metaboliti olup (metabolit 1-7) iki ana metaboliti olan metabolit 1 ve metabolit 5, ilacın asıl aktif bölümleridir. İlacın tamamına yakını böbreklerle atılır (141).

Pentoksifilin plazma seviyeleri ile dozu arasında direkt ilişki vardır. Pentoksifilin ilk olarak oluşan metaboliti olan Metabolit I ile ilacın değişmeyen formu aynı anda kanda bulunur. Bu major metabolit potansiyel olarak ana ilaç gibi davranır, bu yüzden pentoksifilin etkinliği her iki ilacın plazma seviyelerine bağlıdır. Pentoksifilin ana metaboliti olan Metabolit I kanda saptanırken diğer 6 metabolit idrarda görülür. Pentoksifilin ve Metabolit I'nin demetilasyonu ile Metabolit VI ve VII oluşur. İn vitro çalışmalar pentoksifilin major metabolitlerinin hemoreolojik etki (kan ve elemanları) yaptığını göstermiştir. Bu infleksibl olan eritrositlerde fleksibilitenin ölçümü ile gösterilmiştir. Eritrositlerde ATP oranı artmış ve ATP/ADP oranı yükselmiştir. Bu da pentoksifilin ile başlayan sürecin metabolitlerin böbrekten atılımına kadar sürdüğünü göstermiştir. Değişime uğramamış pentoksifilin idrarda ancak eser miktarda çıkmakta; bu da hemen tümünün metabolize edildiğini göstermektedir (142).

Hemoreolojik ajan olan pentoksifilin, intermittan kladikasyon tedavisi için geliştirilmiş olup günümüzde pentoksifilin çok geniş kullanım alanı vardır. Tıkalı vasküler hastalıklarda; Periferik vasküler hastalıklar, serebral vasküler hastalıklar, diyabetik vasküler hastalıklar, orak hücreli anemi, polisitemia vera, iskemik kalp hastalığı, duyma bozuklukları, gözde dolaşım bozukluğu, kronik renal yetmezlik. Enfeksiyöz hastalıklarda; endotoksemi, septik dolaşım şoku, ARDS, HIV, bakteriyel menenjit, serebral malarya, kandidiyazis, kronik frunkolozis, immun yetersizlik, hiperkoagülabilité, onkolojik hastalıklarda, reynoud hastalığı, sistemik skleroz, astenospermi ve birçok hastalıkta kullanılmaktadır (139, 140, 145).

Sonuç olarak, başlangıçta sadece intermittant kladikasyonlu hastaların tedavisinde kullanılan bir ilaç olan pentoksifilin, son zamanlarda immün hücre fonksiyonları üzerinde, sitokin üretiminde ve hücre seviyesinde çeşitli fizyolojik etkilerinin keşfedilmesiyle, klinikte konvansiyonel tedaviye ilave olarak çeşitli hastalıkların rutin tedavisinde kullanılır hale gelmiştir. Serebrovasküler hastalığı olan bireylerde beyin kan akımını artırdığı bilinen pentoksifilin bu özelliği ile de nöron koruyucu etkinliğine katkıda bulunur (143, 144).

2.6. 2-METOKSİÖSTRADIOL (2-ME)

2- Metoksiöstradiol'ün bileşiği 2-methoxy-estra-1, 3, 5 (10)-triene-3, 17 β -diol olup sinonimleri 2-Hydroxyestradiol 2-methyl ether, 2-ME2, Panzem, NSC 659853'dür. Moleküler Yapısı $C_{19}H_{26}O_3$ ve kimyasal formülü ise:

2-ME, 17 β -östradiolün CYP450 ile hidroksilasyonundan sonra oluşan 2-hidroöstradiol'ün katekol-O-metil transferaz (COMT) tarafından metilasyonuyla oluşan doğal bir metabolitidir (152). COMT, karaciğer, eritrosit, beyin, böbrek ve meme dokularında bulunmaktadır (153). 2-hidroksi östradiol (2-HE)'ün sıçanlara uygulanmasıyla 7.9-24.9 dakikada 2-ME ortaya çıkmaktadır (157).

Önceleri 2-ME, 17 β -östradiol'ün inaktif metaboliti olarak kabul edilirken günümüzde anti-anjiogenik, anti-tümör, anti-proliferatif ve sitotoksik etkileri olan molekül olduğu hayvan modellerinde görülmüştür (154, 155).

2-ME gebeliğin üçüncü trimestrında en yüksek konsantrasyonda iken post menopozal değerleri düşüktür. Lokal olarak en yüksek konsantrasyonlar meme ve over dokularındadır (156).

2-ME insan vücudunda fizyolojik koşullarda çok düşük miktarlarda üretilmektedir. 2-ME'ün östrojen reseptörlerine afinitesi yoktur. Çoğunlukla farklı doku reseptörlerine bağlanırlar. Ancak östrojen reseptör bağımlı mekanizmalarla kardiyovasküler koruyucu etkileri mevcuttur. Erkek ve kadınlarda benzer şekilde etki ederler (153, 158). 2-ME'ün östrojenik aktivitesi olmadığı belirtilmesine karşın, 2-ME'ün MCF7 meme tümör hücre kültürlerinde östrojen reseptör bağımlı gen ekspresyonu ve mitozu aktive ettiği tesbit edilmiştir (61, 154).

2-ME, post-transkripsiyonel aşamada etki eden güçlü bir HIF-1 α inhibitörüdür (24). Bunu mikrotübüllerin depolimerizasyonu ve süperoksid radikallerinin üretiminin etkilenmesiyle yapmaktadır (169). 2-ME'ün en önemli mekanizması neoanjiogenezin inhibisyonudur. Bunu da mikrotübüllerin bozulması ve intrinsik ile ekstrinsik apoptotik yolların inhibisyonu ile yapmaktadır (159). HIF-1 α anjiogenez ile ilişkili bir transkriptör faktördür. 2-ME HIF-1 α 'nın ekspresyonunun, nükleer akümüülasyonun ve

transkripsiyonel aktivitesinin inhibisyonu ile yapmaktadır. Mekanizması postranskripsiyonel olup HIF-1 α protein sentezinin inhibisyonu ile sonuçlanır. HIF-1 α güçlü bir anjiogenik ajan olan hipoksi ile salınımı uyarılan VEGF'nin üretilmesine aracılık etmektedir (24). 2-ME aynı zamanda doza bağlı olarak VEGF'nin salınımını da inhibe etmektedir (153).

2-ME, HIF-1 α yolağıyla anjiogenez inhibitörü olarak kanser ilacı olarak hayli mesafe katetmiştir (159, 161, 162). 2-ME'nin solid tümörlerde ve prelinik inflamatuvar çalışmaları faz II aşamasındadır. Endotelial hücreler ve tümör hücreleri üzerine anti-proliferatif, sitotoksik ve pro-apoptotik etkiler mevcuttur (154). Anti-proliferatif etkisi, endotel, tümör, fibroblast, multiple myelom, düz kas, karaciğer stellat ve glomerüler mezengial hücrelerinde daha belirgindir (154).

Subaraknoid kanama (SAK) oluşturulan ratlarda HIF-1 α artışının apoptoz, KBB bozulması ve beyin ödemeine sebep olduğu ve bu etkilerin 2-ME ile hafifletildiği gösterilmiştir (163).

2-ME'ün in vitro hücre kültürü üzerindeki çalışmalarıyla hücre proliferasyonunun inhibisyonuna etkisi insanlarda ve deneysel hayvanlarda vasküler endotelial hücreler, düz kas hücreleri, fibroblastlar ve yağ doku hücreleri üzerinde gösterilmiştir (153).

Birçok çalışmada; 2-ME'ün akciğer, kolon, over, böbrek, prostat, orbital, serviks, endometrium, mide, özefagus, pankreas, meme kanserlerinde, vasküler tümörlerde, SSS tümörlerinde ve melanomda tümöral hücre büyümesi üzerine inhibitör etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir (153). Bunlar içerisinde 2-ME'e en duyarlı olan meme kanseridir.

Cilt fibroblast hücrelerinde yapılan in vitro çalışmada normal hücrelerin 2-ME'e cevabının artmış drug konsantrasyonlarına rağmen transforme olmuş hücrelere göre oldukça zordur. Aynı şekilde proliferasyon aşamasında olmayan, dinlenme halindeki tümör hücrelerinde 2-ME tarafından etkilenmesi oldukça güçtür.

Klinik çalışmalarda ise; 2-ME'ün prostat, over ve meme kanserinde etkisi faz I ve II çalışmalarıyla gösterilmiştir (56, 107, 108).

TBH sonrası akut fazda farelere uygulanan 2-ME2'ün potansiyel nöral koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Bunda sekonder beyin hasarını ve HIF-1 α ile nöropatolojik olarak ilişkili hedef genlerin regülasyonu değerlendirilmiştir (61).

3. MATERİYAL VE METOD

Bu çalışma Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Hayvan deneyleri ile ilgili ilkelere uygun olarak hazırlanan proje Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik kurulunun 13.11.2013 gün ve 11 sayılı toplantısında değerlendirilerek, çalışmanın sıçanlarda yapılmasının hayvan etiği açısından uygun olduğu aynı tarih ve 13/128 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

3.1. Deney Hayvanları

Birçok SSS travma modelinde; relatif olarak daha ucuz olması, kolay el edilebilmesi, genetik olarak manipüle edilebilmesi, fizyolojik parametrelerin ve nörofonksiyonel sonuçların takibinin mümkün olması nedeniyle fare ve sıçan kullanılması tercih edilmiştir (30).

Çalışmada, 231-419 gr ağırlıkta, 3 aylık toplam 98 adet Sprague-Dawley türü erkek sıçan kullanılmıştır. Hayvanlar Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilerek çalışma süresince uygun koşullarında bakımları yapılmıştır. Bakım ve hazırlık sürecinde her kafeste rastgele seçilen 5 sıçan $22 \pm ^\circ\text{C}$ oda ısısında 12'şer saat aydınlık / karanlık ortamda tutularak standart ticari pelet sıçan yemi verilmiş ve normal musluk suyuna serbestçe ulaşmaları sağlanmıştır. Çalışmaya başlamadan önce sıçanlar bir hafta süreyle bu ortamda izlenerek ortama uyum sağlamaları gözlemlendi.

3.2. Deney Grupları

Sıçanlar, basit ratsgele örnekleme yöntemiyle her deney grubunda 14 rat olmak üzere toplam 7 grup oluşturuldu.

Akut Grup İçin;

Grup 1 (n: 14): Travma oluşturulmayan ve tedavi uygulanmayan grup (Sham)

Grup 2 (n: 14): Kafa travması oluşturulan ancak tedavi verilmeyen grup

Grup 3 (n: 14): Kafa travması oluşturulup pentoksifilin verilen grup.

Grup 4 (n: 14): Kafa travması oluşturulup 2-metoksiötradiol verilen grup.

Kronik Grup İçin;

Grup 5 (n: 14): Kafa travması oluşturulan ancak tedavi verilmeyen grup

Grup 6 (n: 14): Kafa travması oluşturulup pentoksifilin verilen grup.

Grup 7 (n: 14): Kafa travması oluşturulup 2-metoksiestradiol verilen grup

3.3 Kafa Travması Modeli ve Travma Aleti

Kafa travmasında hayvan modelleri, insandaki kafa travmasının primer ve sekonder sebeplerini araştırmak ve insan beyni için mevcut sinir hasarını onarmaya yönelik çeşitli tedavi yöntemlerini geliştirmek için yapılmaktadır. Deneysel model seçimi araştırmanın amacına göre olmalıdır. Modellerin temel amacı nekrotik ve apoptotik nöronal hücre ölümünü ortaya koymak ve travmaya sekonder gelişen davranış değişikliği, fizyolojik, metabolik, kan ve doku değişiklikleri, kan beyin bariyeri geçirgenliği, enflamatuvar ve immunolojik cevaplar hakkında bilgi sahibi olmaktır (30).

SSS üzerine olan deneysel travma çalışmaları modelleri tekrarlanabilir ve sonuçları ölçülebilir protokolde olmalıdır. Travmatik beyin hasarı için günümüzde kullanılan travma araç modelleri; sıvı ile vurma, belirli yükseklikten ağırlık düşürülmesi ve pnömatik alet ile korikal çarpma olarak sıralanabilir. Günümüzde SSS hasarı oluşturulan araçlar elektronik, mekanik ve yazılımın ortak kullanıldığı sistemler içermektedirler (164, 165).

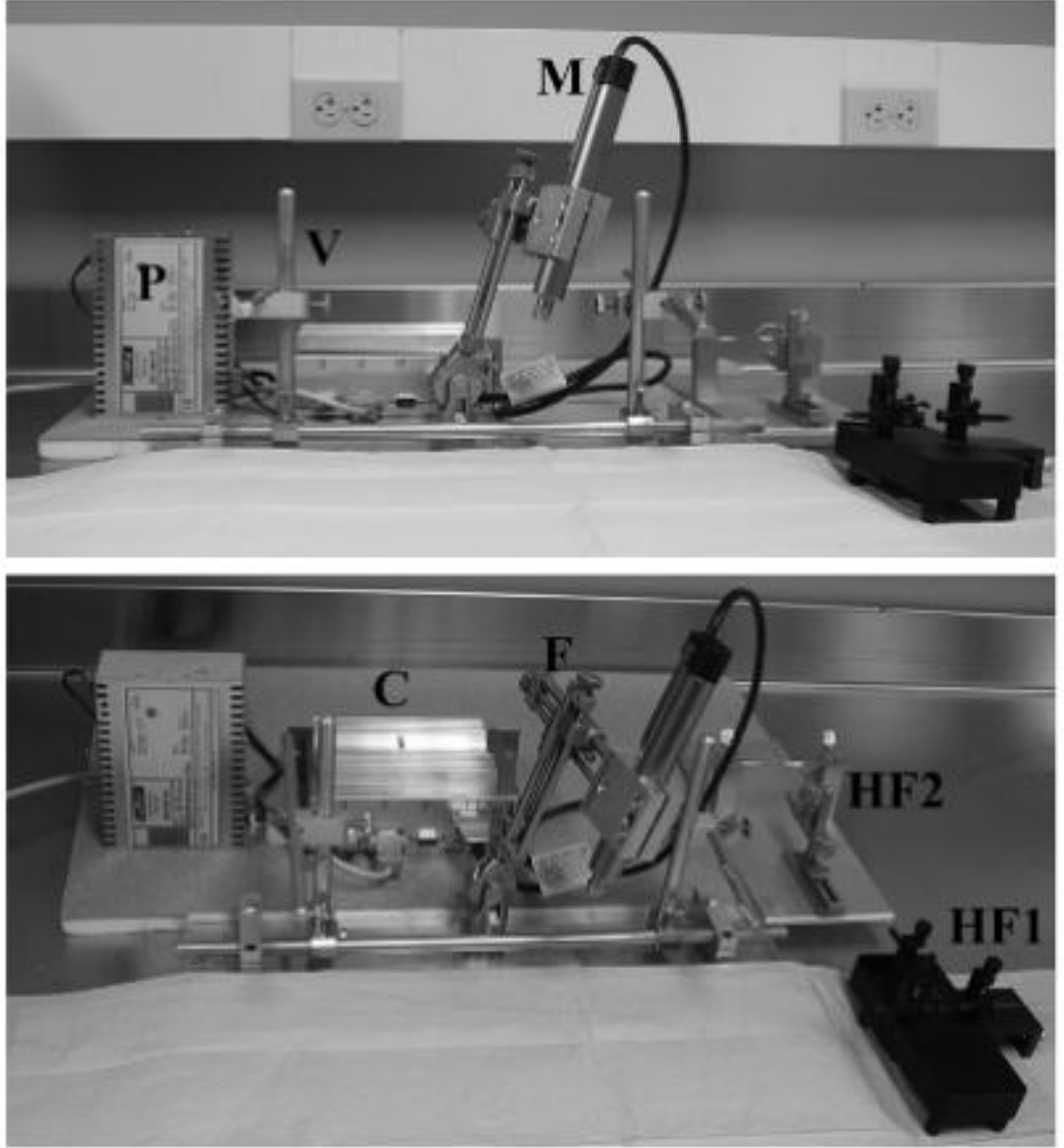
Marmarou'nun impakt akselerasyon modeli, diğer modellere göre uygulanması kolay, ucuz, kontrol edilebilir olması nedeniyle popülerdir. Hem apopitik hem de nekrotik hücre ölüm hasarı ortaya çıkarır. Histopatolojik olarak yaygın bilateral nöron, akson, dentrit ve mikrovasküler hasarı oluşturur. Özellikle korpus kallozum, internal kapsülde, optik traktusta, serebral ve serebellar pedinkülde ve beyin sapında diffüz aksonal yaralanma olur (167). Kontrollü kortikal çarpma modeli farelerde ve sıçanlarda bir yıl sonrası kadar devam ve beyin atrofisi ve serebral kan akımında azalma ile ilişkili olabilen bilişsel bozukluklar, fonksiyon kaybı, deformasyon derinliği gibi etki hızının yüksek derecede önemli olduğu araştırmalarda önemlidir (37).

Kontrollü kortikal çarpma modeli öncelikle fokal fasara yol açarak geniş kortikal kayıp, hipokampus ve talamik hasar, sitotoksik ve vazojenik beyin ödemi ve yüksek KİB oluşturmakta böylece insan ağır kafa travması modellerini taklit etmek için kullanılmaktadır (55). Ayrıca bu model ikincil süreçler, özellikle postravmatik epilepsi çalışmaları için uygundur (166).

Bu çalışmada Dr. Mehmet Bilgen tarafından oluşturulan kontrollü kortikal çarpma modeli kullanılmıştır. Bu yöntemde kraniyotomi oluşturularak bu alandan bilgisayarlı pnömotik sistemle istenilen hızda, derinlikte ve sürede kafa travması oluşturulmaktadır (30, 168).

Travma oluşturmak için kullandığımız modelde; bilgisayarda derinliği, süresi ve şiddeti ayarlanarak çizgisel doğrultuda hareket eden motor kontrollü çubuk aracılığıyla beyin üzerine kuvvet uygulanır. Bu travma aleti sinir dokusunda kontüzyon oluşturma prensibine dayanır.

Travmatik beyin hasarı oluşturulurken öncelikle sıçanın başı platform üzerine barlarla tesbit edilir. 2-3 mm genişlikteki yuvarlak uçlu rod ile kraniotomi oluşturulan alana travma uygulanır.



Şekil 2: Kontrollü kortikal çarpma uyguladığımız travma aleti. M: Motor, HF: Kafa çerçevesi, C: Elektronik kontrollör/driver, P: Güç kaynağı, V: Vertikal rod (30).

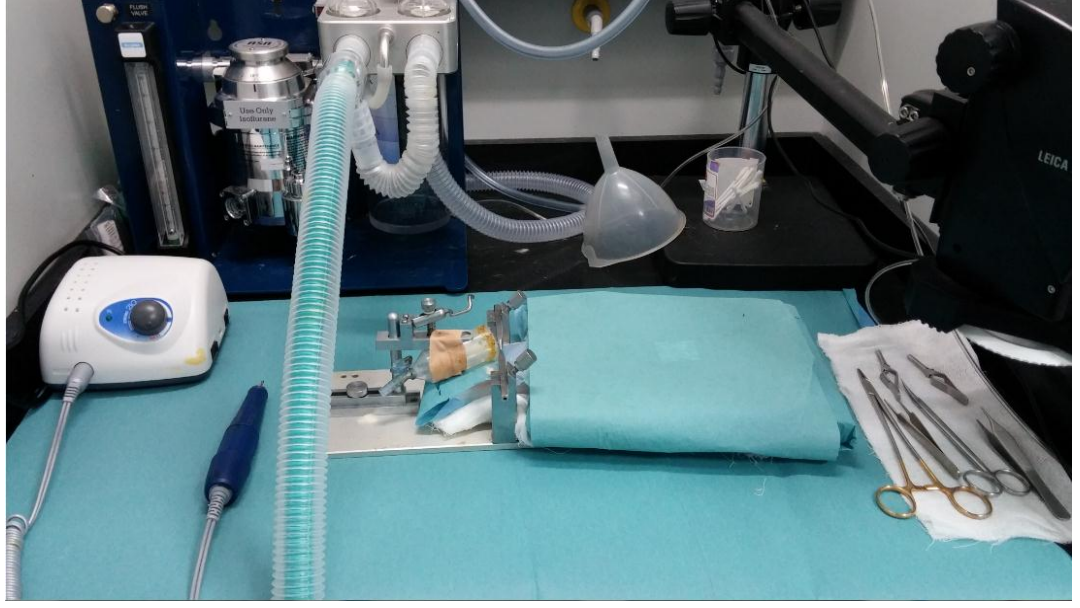


Şekil 3: Farklı boyut ve şekillerde travma oluşturmak için kullanılan rodler.

Çalışmada travma aleti ile 2,5 mm çaplı yuvarlak rod ile 1,5 m/s hız, 85 ms süre ve 1,5 mm derinlikte çarpma kuvveti uygulandı. Kontrollü kortikal çarpma için tanımlanan elektromanyetik travma aparatı, hasar için gerçek zamanlı feedback kontrol sistemiyle çalışarak darbenin derinlik, süre ve hızının ayarlanmasına olanak sağlandı.

3.4. Cerrahi Hazırlık ve Yöntem

Deneklere genel anestezi indüksiyonu için % 4 izofluran (Forane®, Abbott) ve idame için %2 izofluran spontan inhalasyon olarak %30 O₂ karışımı şeklinde uygulandı. Deney esnasından sıçanların spontan solunumu baskılanmadı. Anestezi derinliği çene ve iskelet kas tonusu ile izlendi. Anestezi sonrası prone pozisyonda standart çivili frame ile sabitlenen sıçanın kafa derisi tıraş edilerek ve %10 povidon-iyot ile saha temizliği yapılarak 10 mm' lik median lineer kesi ile cilt ve fasya kesilerek periost diseke edildi. Cilt ve galea bulldog klip ile laterallere tesbit edilerek yeterli görüş alanı sağlandı.



Şekil 4: Cerrahi masa, inhaalsyon anestezisi için vaporizatör, cerrahi aletler ve dental drill



Şekil 5: Sıçanın inhalsyon anestezisi aldığı fanus içinde bekletilmesi



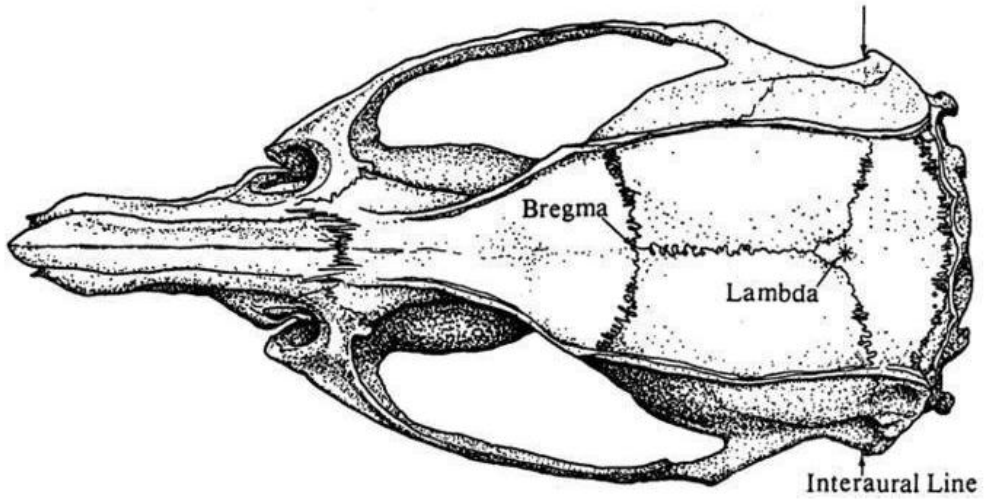
Şekil 6: Sıçanın çivili başlıklarla tesbit edilmesi



Şekil 7: Sıçanın kafa derisinin traş edilerek sterilize edilmesi

Şekil 8: Kafa derisinin insize edilerek açılması.

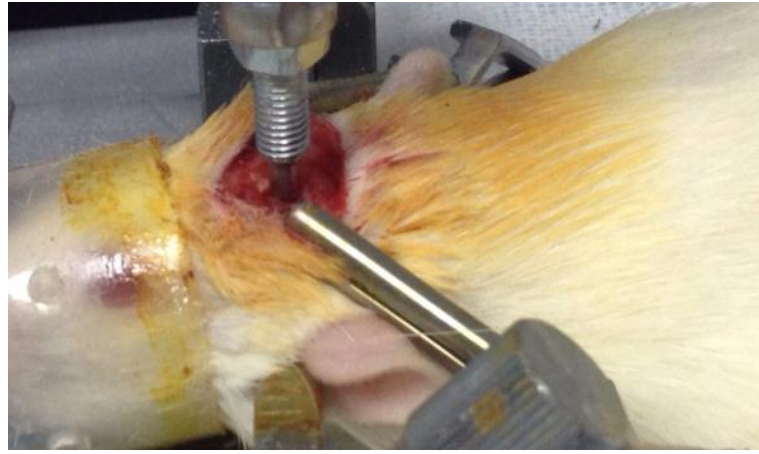
Ardından sol parasagittal bölgede sagittal sütürün 2 mm laterali ve bregmanın 2 mm posteriorundan dental drill ile 3 mm çaplı kranium turlanarak kraniyektomi defekti oluşturulur. Bu işlem esnasında alttaki duranın zedelenmemesine özen gösterildi.



Şekil 9: Sıçan kafatasında bregma ve lambdanın lokasyonu (106).



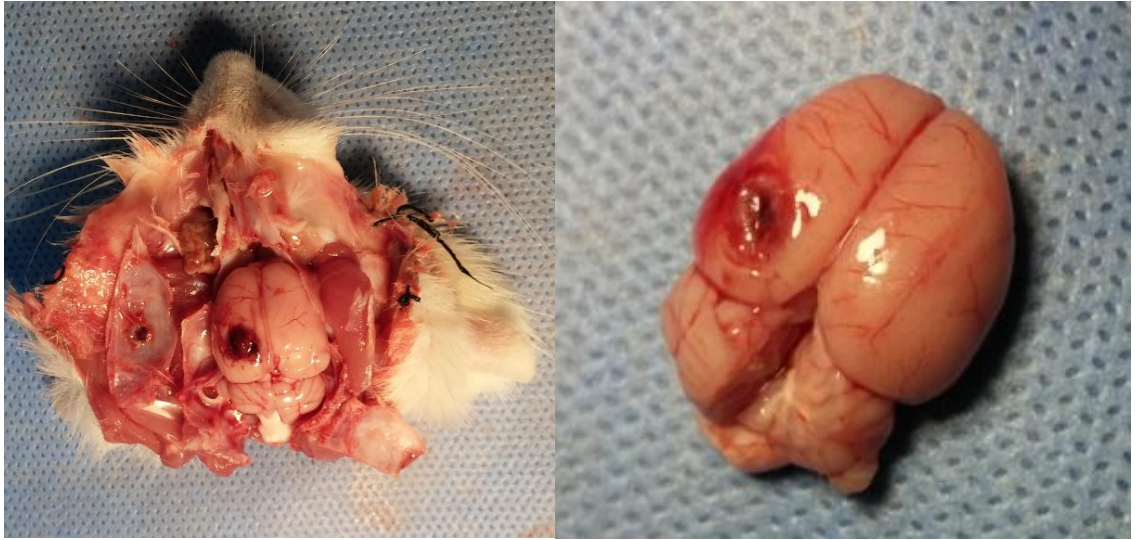
Şekil 10: Sıçanda dental drill ile kraniotomi defekti oluşturulması.



Şekil 11: Kontrollü kontakt impakt (CCI) yöntemi ile 2.5 mm'lik uç vasıtasıyla 1,5 mm'lik derinlik ayarlanarak 1,5 m/s hız ile 85 ms süreyle travma oluşturuldu.

Sonrasında skalp 3/0 ipek ile suture edilerek yara tekrar %10 povidon-iyot ile temizlendi. Travma öncesinde gruplardan HIF-1 α ve TNF- α mRNA ekspresyonunun belirlenebilmesi için intrakardiyak 0,5 ml kan örnekleri alınarak EDTA'lı tüplerde korundu ve 2 saat içinde RNA izolasyonu için çalışmaya alındı. 3. ve 4. gruba 60 mg/kg pentoksifilin (Vasoplan 100 mg/5 ml, Mustafa Nevzat İlaç), 6. ve 7. gruba da

5 mg/kg 2-metoksiöstradiol (2-Methoxyestradiol, M6383 Sigma Aldrich) 0,1 cc %70'lik alkol içinde çözüldükten sonra travma sonrası 30 dakika içinde periton içine uygulandı. Akut gruplar travma sonrası 24 saat, kronik gruplar ise 1 ay sonra 1 ml kan alındıktan sonra ketamin anestezisi altında intrakardiyak kanı boşaltılıp dekapitasyonla sakrifiye edildi ve beyin dokuları zedelenmeden çıkartıldı. Kan örnekleri ve travma oluşturulan sağ hemisferler sıvı nitrojen içinde hızlı bir şekilde fiksasyona tabi tutuldu ve -80°C'de Real-Time PCR ile HIF-1 α , TNF- α ve TERT ekspresyon düzeyleri çalışılmak üzere çalışmaya kadar saklandı. Böylece beyin dokusu miktarı sabit tutulmaya çalışıldı. Bu metod kullanılarak numunelerin standardizasyonu gerçekleştirildiği gibi, her bir sıçanda eşit miktarda numune üzerinde çalışılmış oldu. Doku örnekleri analiz için ortam hazırlandıktan sonra -80°C'den çıkarıldı,



Şekil 12: Sakrifiye edilmesinden sonra diseke edilmeden önce ve edildikten sonra sıçan beyin materyalleri.

3.5. RNA İzolasyonu

3.5.1. Beyin Dokusundan RNA İzolasyonu

1. Total halde sıvı azot ile dondurulan sıçan beyininin sağ ön lobu ayırt edilip 1ml trizol (Roche) içeren eppendorf tüpe (Roche) alındı.
2. Enjektör yardımıyla doku parçalanarak alındı.
3. Oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.
4. 200 µl kloroform eklendi ve 15 sn votrexlendi.
5. Oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi.
6. 12000 g'de 15 dk +4 °C santrifüj edildi.
7. Aköz faz yeni tüpe ependorf alındı.
8. 500 µl izopropanol eklendi. (Trizol miktarına bağlı)
9. Birkaç kez alt üst edildi.
10. Oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.
11. 12000 g'de 10 dk +4°C santrifüj edildi.
12. Süpernatant kısım atıldı.
13. 1 ml % 75 etanol eklenip, vortexlendi.
14. 7500 g'de 5 dk +4°C santrifüj edildi.
15. Süpernatant kısım atıldı.
16. Pellet etrafındaki etanol pipetle alınıp temizlendi.

17. 5-10 dk oda ısısında kurutuldu.
18. 60 µl NFW ile pellet resüspanse edildi.
19. +4°C buzdolabında 10-15 dk bekletildi.
20. Biospec Nano (Shimadzu) ile ölçümü yapıldı.

3.5.2. Kandan RNA İzolasyonu

Sıçanlardan travma öncesi ve travma sonrası alınan kan örneklerine aşağıdaki işlemler uygulanmıştır.

1. 500 µl kana 500 µl trizol (Roche) eklenip vortekslendi ve buza alındı.
2. 200 µl kloroform eklenip vorteklenir ve tekrar buza alındı.
3. 12000 rpm'de 30dk santrifüj edilir. Aköz faz yeni tüpe alındı.
4. 1:1 oranında izopropanol eklenir alt-üst edilip yaklaşık 3 saat -20°C'de bekletildi.
5. 14000 rpm 30 dk +4°C ya da oda ısısında santrifüj edildi.
6. Süpernatant atıldı. Pellet çok az ya da görünmüyor olabilir.
7. %70'lik ethanol tüpe full dolduruldu. (Yıkama başladı)
8. 14000 rpm 5 dk santrifüj edildi.
9. Süpernatant atılır. 500 µl dH₂O eklenip vortekslenir ve 25 µl 5M NaCl eklendi.
10. 1 ml absolute ethanol eklenip alt-üst edilir. -20°C'de overnight bekletildi.
11. 14000 rpm 30 dk santrifüj edildi. Süpernatant dökülüp tüpün ağzı ters çevrilerek kurutuldu.

12. %70'lik ethanol tüpe full doldurulur. 14000 rpm 5 dk santrifüj edildi. Supernatant atılır ethanol uzaklaşsın diye beklendi (damla olsa bile tüpte mineral kirliliği vermez).

13. 50 µl Nuclease free water ile resüspanse edilir.

14. Biospec Nano (Shimadzu) ile ölçümü yapıldı.

3.5.3. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA örneklerinden Roche High Fidelity cDNA Synthesis Kit kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı.

Random Primer	1 µl
Oliga Primer	1 µl
dH ₂ O	4,4 µl
RNA	5 µl

6,4 µl mix dağıtıldı. 5 µl RNA dağıtıldı.

65 °C'de 10 dk inkübe edildi.

Reaction Buffer	4 µl
Protector RNase İnhibitör	0,5 µl
Deoxynucleotide Mix	2 µl
DTT	1 µl
Reverse Transcriptase	1,1 µl
Toplam Mix	8,6 µl

8,6 µl mix dağıtıldı.

PCR Programı

29 °C	10 dk
48 °C	60 dk
85 °C	5 dk

Sentezlenen cDNA -20°C’de saklandı.

3.5.4. Ekspresyon Çalışması

LightCycler 480 II (Roche) Real-Time PCR cihazı kullanılmıştır.

1. cDNA örnekleri 1/5 oranında Nuclease Free Water ile seyreltilti.
2. Aşağıdaki miktarlarda reaksiyon plate (Roche) üzerine dağıtıldı.

2X Probe Master Mix	10 µl
Primer/Probe	1 µl
Nuclease Free Water	4 µl
cDNA	5 µl

3. LightCycler 480 II (Roche) Real-Time PCR cihazında aşağıdaki programa koyuldu.

95° C	10 dk	} 45 Döngü
95° C	10 saniye	
60° C	30 saniye	
72 ° C	1dk	
40° C	30 saniye	

4. Her bir örnek çift çalışıldı.
5. Housekeeping gen olarak beta-actin kullanıldı.
6. Ekspresyonu araştırılan genlere ait bilgiler aşağıdaki gibidir.

Gen Adı	NCBI link	Assay ID
Actb	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/81822	500152
Tnf	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/24835	502875
Hif1a	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29560	502875
Tert	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/301965	506186

7. Veriler delta delta ct metodu kullanılarak normalize edilmiştir.

3.6. İstatistiksel Analiz

Power analizi: Kontrol grubunda %90 oranında ortaya çıkabileceğini düşünülen hipoksi, beyin ödemi ve hücre apopitozu değişkenlerinin kullanılacak olan etken maddelerle %40'a düşürülmesi amaçlanmıştır. Bu beklentiler doğrultusunda istatistiksel güç ($1-\beta$) 0.80, α tip I hata olasılığı ise 0.05 olarak alındığında grup başına minimum 14 rat alınması gerektiği hesaplandı.

Hipotez testleri: Verilerin normal dağılıma uygunluğu histogram ve q-q grafikleri Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Varyans homojenliği Levene testi ile test edildi. Gruplar arası karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi ve Kruskal-Wallis H testi ile, ölçümler arası karşılaştırmalar Friedman testi ile değerlendirildi. Çoklu karşılaştırmalar Duncan-Bonferroni ve Dunn's testleri ile değerlendirildi. Veriler ortanca (25. ve 75. yüzdeler) veya ortalama ve standart sapma olarak ifade edildi. Verilerin analiz R 3.2.0 (www.r-project.org) yazılımı ile değerlendirildi. $p<0.05$ düzeyi anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya 98 adet 231-419 gr ağırlık aralığındaki Spraque-Dawley türü erkek sıçanlar dahil edildi. n=14 olacak şekilde 7 gruba ayrıldı. Her bir sıçandan travma öncesi ve sonrası 0,5'er cc kan alınarak sıçanlar sakrifiye edildikten sonra da kontüze sağ hemisfer alınarak örnekler incelendi.

4.1 Ağırlık

Tablo 2: Akut grup ağırlık tablosu

Değişken	Akut Gruplar				
	SHEM (n=14)	Kontrol (n=14)	Pentoksifilin (n=14)	2-ME (n=14)	<i>p</i>
Ağırlık (gr)	340.93±49.66 ^a	274.21±25.54 ^b	271.00±21.01 ^b	288.71±24.53 ^b	<0.001

Kafa travması oluşturulup akut dönemde sakrifiye edilen sıçanlarda; kontrol grubu için ortalama ağırlık 274.21 gr, pentoksifilin verilen grupta ortalama 271.00 gr, 2-ME verilen grupta ortalama 288.71 gr iken sham grubunda ortalama 340.93 gr olarak ölçülmüştür.

Tablo 3. Kronik grup ağırlık tablosu

Değişken	Kronik Gruplar				
	SHEM (n=14)	Kontrol (n=14)	Pentoksifilin (n=14)	2ME2 (n=14)	p
Ağırlık (gr)	340.93±49.66 ^a	256.64±11.99 ^b	295.29±20.85 ^c	301.21±28.64 ^c	<0.001

Kafa travması oluşturulup kronik dönemde sakrifiye edilen sıçanlarda; kontrol grubu için ortalama ağırlık 256.64 gr, pentoksifilin verilen grupta ortalama 295.29 gr, 2-ME verilen grupta ortalama 301.21 gr iken sham grubunda ortalama 340.93 gr olarak ölçülmüştür.

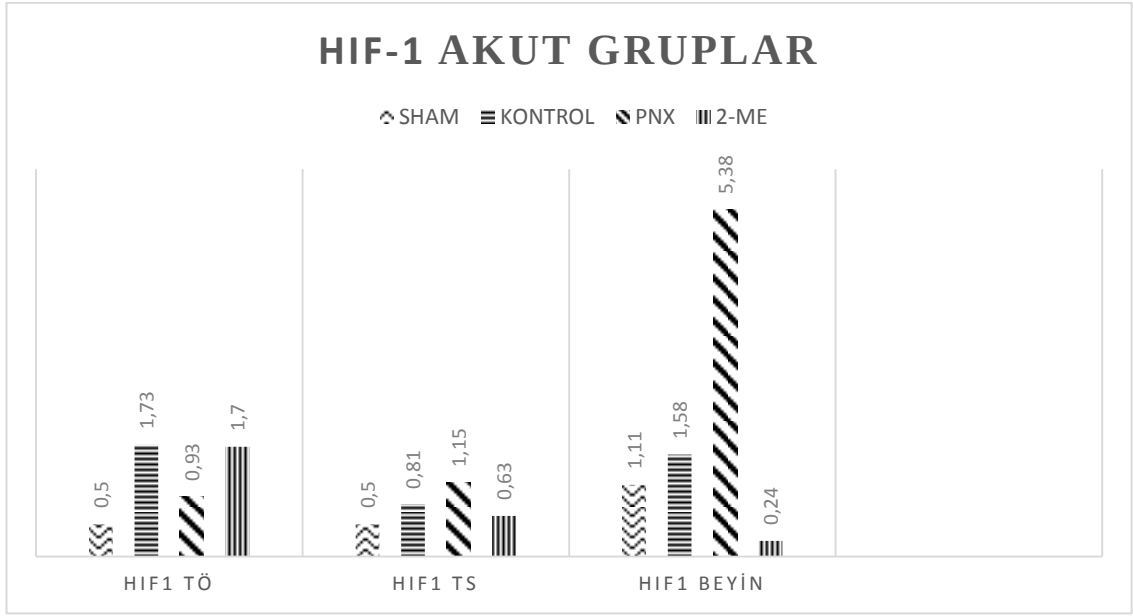
4.2 HIF-1α Grupları

4.2.1 Akut Gruplar

Tablo 4. Akut dönemde çalışılan HIF-1α ile ilgili istatistik sonuçlar.

Değişken	Akut Gruplar				
	SHEM (n=14)	Kontrol (n=14)	Pentoksifilin (n=14)	2-ME (n=14)	p
HIF-1α					
Travma öncesi kan	0.50 (0.41-0.77) ^{a,X}	1.73 (1.27-4.34) ^{ab}	0.93 (0.63-2.04) ^{ab,X}	1.70 (1.21-2.34) ^{b,X}	<0.001
Travma sonrası kan	0.50 (0.41-0.77) ^X	0.81 (0.58-2.36)	1.15 (0.57-1.44) ^X	0.63 (0.45-0.84) ^Y	0.050
Beyin parankimi	1.11 (0.98-1.90) ^{a,Y}	1.58 (1.27-2.21) ^a	5.38 (3.52-8.03) ^{b,Y}	0.24 (0.23-0.33) ^{c,Z}	<0.001
p	<0.001	0.424	0.002	<0.001	-

Veriler aritmetik ortalama±standart sapma veya ortanca (1. ve 3. kartiller) olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan farklı küçük harfler (a, b, c) gruplar arası farklılığı, aynı küçük harfler (a, b, c) gruplar arası benzerliği ifade etmektedir. Aynı sütunda yer alan farklı büyük harfler (X, Y, Z) ölçümler arası farklılığı, aynı büyük harfler (X, Y, Z) ölçümler arası benzerliği ifade etmektedir.



Şekil 13: Akut gruplarda karşılaştırmalı HIF-1 α sonuç grafiği

Kafa travması oluşturulup akut dönemde sakrifiye edilen sıçanlarda;

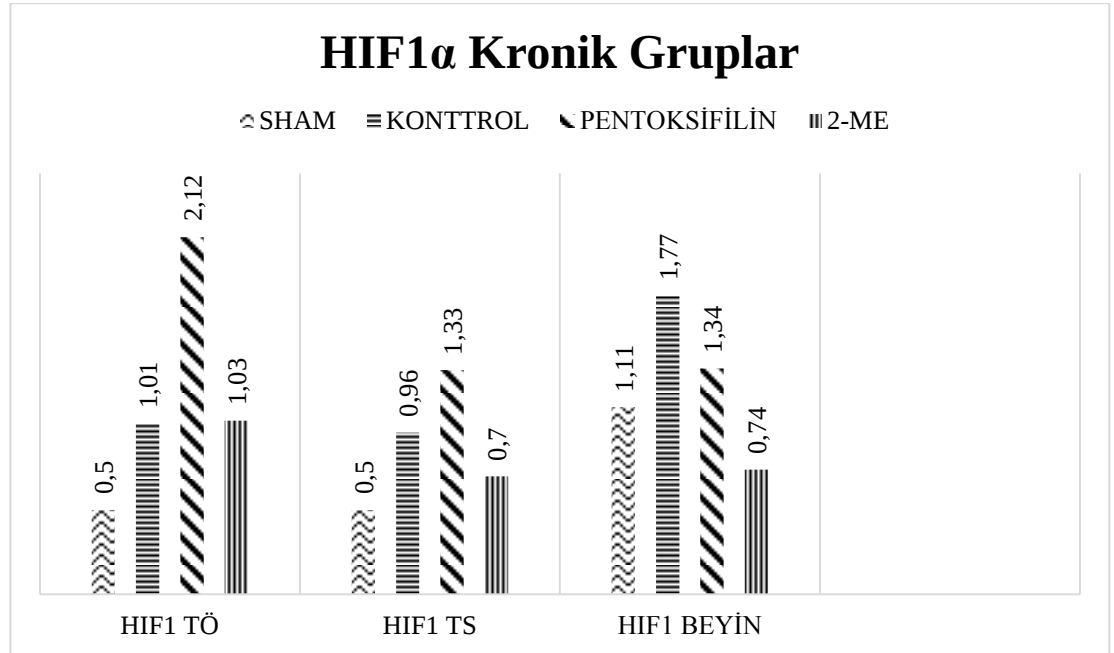
1. Kontrol grubunda HIF-1 α değerlerinde kanda ve beyin parankiminde istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p : 0.424).
2. Pentoksifilin verilen grupta HIF-1 α değerlerindeki yükselme istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p : 0.002). HIF-1 α değerlerinin travma sonrasında arttığı ve beyin parankiminde ise bu artışın sham ile kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görülmüştür.
3. 2-ME verilen grupta HIF-1 α değerlerinin 2-ME ile azaldığı ve bu azalmanın beyin parankiminde sham ve kontrol grubuna göre daha fazla olduğu tesbit edilmiştir (p : <0.001).

4.2.2. Kronik Gruplar

Tablo 5. Kronik dönemde çalışılan HIF-1 α ile ilgili istatistik sonuçlar.

Değişken	Kronik Gruplar				
	SHEM (n=14)	Kontrol (n=14)	Pentoksifilin (n=14)	2-ME (n=14)	p
HIF-1α					
Travma öncesi kan	0.50 (0.41-0.77) ^{a,X}	1.01 (0.77-1.47) ^{b,X}	2.12 (1.11-3.06) ^c	1.03 (0.60-1.36) ^b	<0.001
Travma sonrası kan	0.50 (0.41-0.77) ^{a,X}	0.96 (0.72-1.23) ^{ab,X}	1.33 (0.88-1.69) ^b	0.70 (0.52-0.86) ^{ab}	<0.001
Beyin parankimi	1.11 (0.98-1.90) ^{ab,Y}	1.77 (1.24-2.54) ^{a,Y}	1.34 (0.81-2.89) ^{ab}	0.74 (0.48-1.81) ^b	0.023
p	<0.001	0.018	0.135	0.584	-

Veriler aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma veya ortanca (1. ve 3. kartiller) olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan farklı küçük harfler (a, b, c) gruplar arası farklılığı, aynı küçük harfler (a, b, c) gruplar arası benzerliği ifade etmektedir. Aynı sütunda yer alan farklı büyük harfler (X, Y, Z) ölçümler arası farklılığı, aynı büyük harfler (X, Y, Z) ölçümler arası benzerliği ifade etmektedir.



Şekil 14: Kronik gruplarda karşılaştırmalı HIF-1 α sonuç grafiği

Kafa travması oluşturulup kronik dönemde sakrifiye edilen sıçanlarda;

1. Kontrol grubunda HIF-1 α değerleri kanda ve beyinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p : 0.018). Kanda HIF-1 α ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik bulunmazken beyinden alınan örneklerde yüksek değerler elde edilmiştir.
2. Pentoksifilin verilen grupta HIF-1 α değerlerinde kanda ve beyinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p : 0.135). Beyinde HIF-1 α ekspresyonunun kontrol grubuna göre azaldığı, sham grubuna göre ise arttığı görülmüştür.
3. 2-ME verilen grupta HIF-1 α değerlerinde kan ve beyin HIF-1 α değerlerinde sayısal olarak azalma olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildir (p : 0.584). Beyin parankiminde HIF-1 α ekspresyonunun kontrol ve pentoksifilin verilen gruplara göre daha fazla azaldığı, sham grubuna göre de azaldığı görülmüştür.

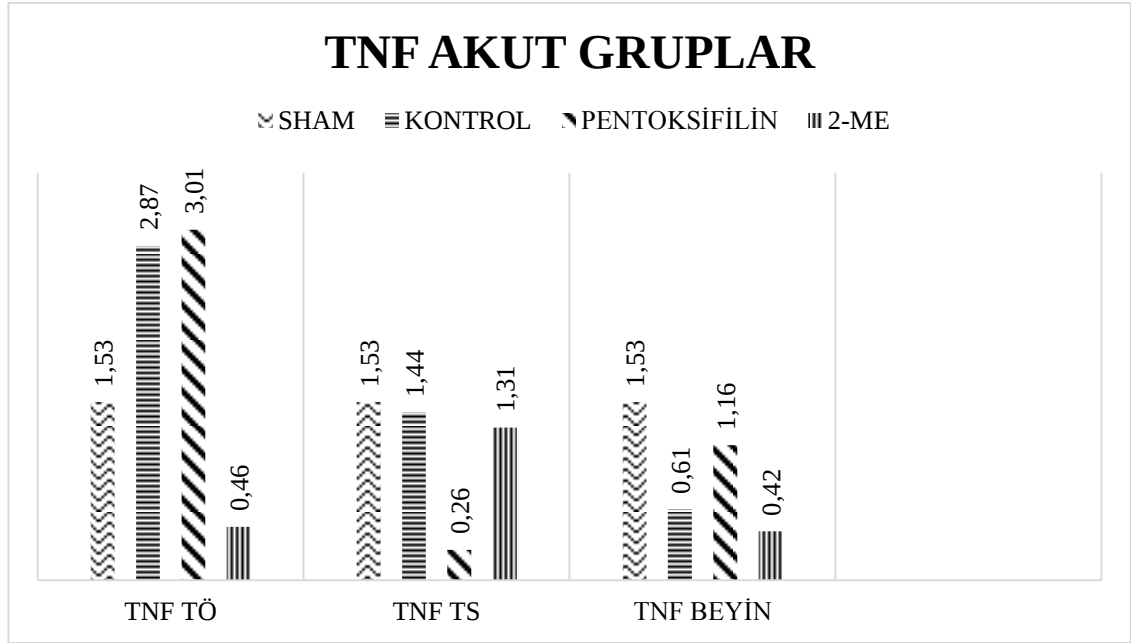
4.3 TNF- α

4.3.1. Akut Gruplar

Tablo 6. Akut dönemde çalışılan TNF- α ile ilgili istatistik sonuçlar.

Değişken	Akut Gruplar				
	SHEM (n=14)	Kontrol (n=14)	Pentoksifilin (n=14)	2-ME (n=14)	p
TNF-α					
Travma öncesi kan	1.53 (0.99-2.10) ^a	2.87 (1.72-4.02) ^{a,X}	3.13 (1.49-43.69) ^{b,X}	0.46 (0.08-1.09) ^{b,X}	<0.001
Travma sonrası kan	1.53 (0.99-2.10)	1.44 (0.36-2.10) ^Y	0.26 (0.11-0.41) ^Y	1.31 (0.52-1.89) ^Y	0.208
Beyin parankimi	1.01 (0.73-2.33) ^a	0.61 (0.40-1.55) ^{a,Z}	1.16 (0.58-2.13) ^{b,X}	0.42 (0.28-0.70) ^{a,X}	<0.001
p	0.500	0.024	<0.001	0.024	-

Veriler aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma veya ortanca (1. ve 3. kartiller) olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan farklı küçük harfler (a, b, c) gruplar arası farklılığı, aynı küçük harfler (a, b, c) gruplar arası benzerliği ifade etmektedir. Aynı sütunda yer alan farklı büyük harfler (X, Y, Z) ölçümler arası farklılığı, aynı büyük harfler (X, Y, Z) ölçümler arası benzerliği ifade etmektedir.



Şekil 15: Akut gruplarda karşılaştırmalı TNF- α sonuç grafiği

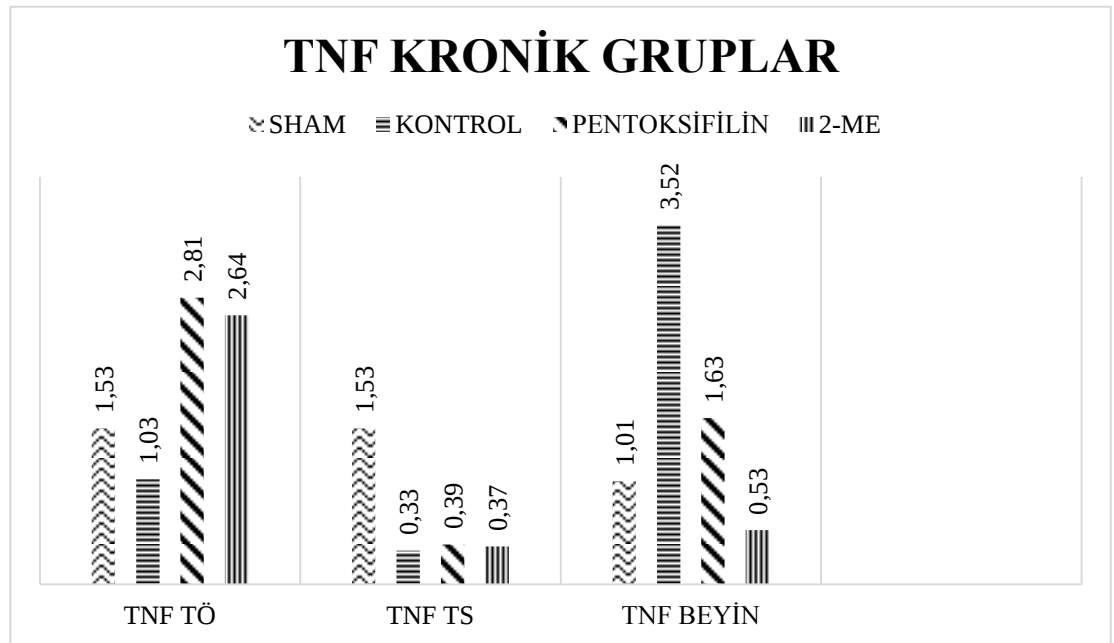
1. Kontrol grubunda TNF- α değerleri kan ve beyin değerlerindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p : 0.024). Travma sonrası ve beyin değerleri istatistiksel olarak düşük saptanmıştır.
2. Pentoksifilin verilen grupta TNF- α değerlerindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). Travma sonrası kan değerlerinin anlamlı olarak düştüğü görüldü. Beyin dokusunda değerlerin sham grubuna göre azaldığı ancak kontrol grubuna göre de arttığı görüldü.
3. 2-ME verilen grupta TNF- α değerleri anlamlı bulunmuştur (p : 0.024). Beyin TNF- α değerlerinin sham, kontrol ve 2-ME gruplarına göre anlamlı derecede azaldığı görüldü. Ancak kanda 2-ME'ün TNF- α değerlerini artırdığı gözlemlendi.

4.3.2. Kronik Gruplar

Tablo 7. Kronik dönemde çalışılan TNF- α ile ilgili istatistik sonuçlar.

Değişken	Kronik Gruplar				
	SHEM (n=14)	Kontrol (n=14)	Pentoksifilin (n=14)	2-ME (n=14)	p
TNF- α					
Travma öncesi kan	1.53 (0.99-2.10) ^{ab}	1.03 (0.53-1.59) ^{a,X}	2.81 (1.55-3.38) ^{b,X}	2.64 (1.23-3.70) ^{ab}	0.017
Travma sonrası kan	1.53 (0.99-2.10) ^a	0.33 (0.16-1.00) ^{b,Y}	0.39 (0.17-1.14) ^{b,Y}	0.37 (0.26-0.77) ^b	0.001
Beyin parankimi	1.01 (0.73-2.33) ^{ab}	3.52 (1.61-5.96) ^{a,Z}	1.63 (1.04-3.57) ^{ab,X}	0.53 (0.16-2.09) ^b	0.030
p	0.500	<0.001	0.004	0.058	-

Veriler aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma veya ortanca (1. ve 3. kartiller) olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan farklı küçük harfler (a, b, c) gruplar arası farklılığı, aynı küçük harfler (a, b, c) gruplar arası benzerliği ifade etmektedir. Aynı sütunda yer alan farklı büyük harfler (X, Y, Z) ölçümler arası farklılığı, aynı büyük harfler (X, Y, Z) ölçümler arası benzerliği ifade etmektedir.



Şekil 16: Kronik gruplarda karşılaştırmalı TNF- α sonuç grafiği

Kafa travması oluşturulup kronik dönemde sakrifiye edilen sıçanlarda;

1. Kontrol grubunda TNF- α değerlerindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$). Kanda TNF- α değerlerinde düşme, beyin TNF- α değerlerinde ise diğer gruplara göre artma gözlenmiştir.

2. Pentoksifilin verilen grupta TNF- α değerlerindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p: 0.004$). Kan değerlerinde düşme, beyin parankim TNF- α değerlerinde ise kontrol grubuna göre düşme olmuştur.

3. 2-ME verilen grupta TNF- α değerlerinin kanda ve beyin parankiminde 2-ME ile düştüğü görülmüştür ($p: 0.058$). Beyin TNF- α değerlerindeki düşmenin diğer gruplara göre daha fazla olduğu görülmüştür.

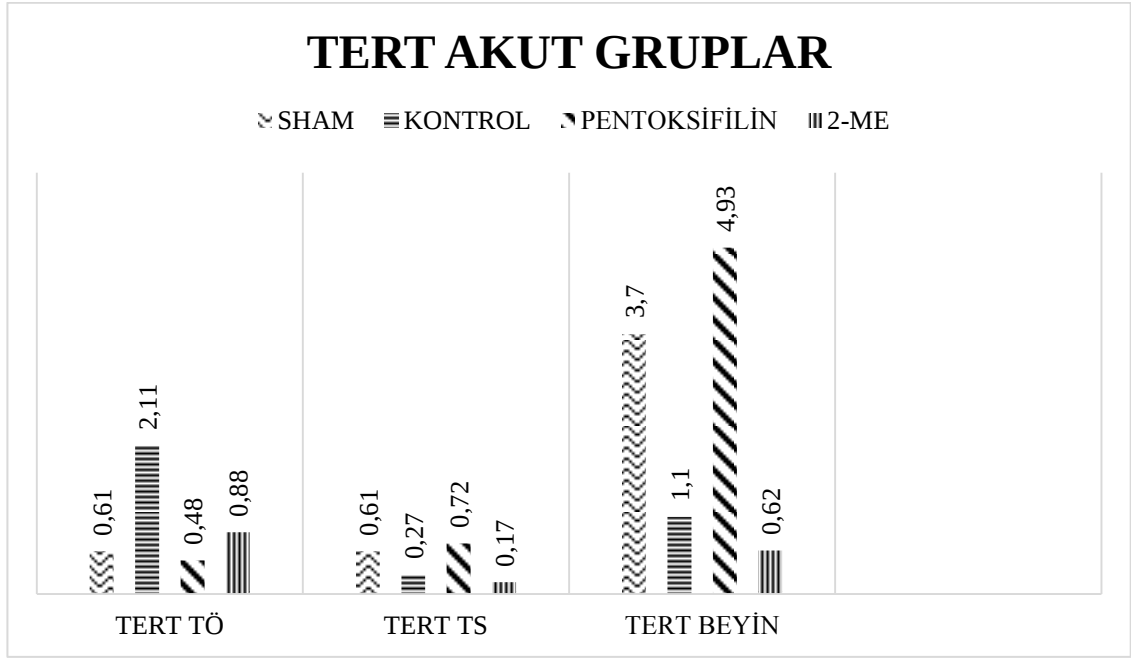
4.4. Tert Enzimi

4.4.1. Akut Gruplar

Tablo 8: Akut dönemde çalışılan TERT ile ilgili istatistik sonuçlar.

Değişken	Akut Gruplar				
	SHEM (n=14)	Kontrol (n=14)	Pentoksifilin (n=14)	2-ME (n=14)	p
TERT					
Travma öncesi kan	0.61 (0.54-1.00) ^{a,X}	2.11 (1.19-3.67) ^{b,X}	0.48 (0.22-0.60) ^{ab,X}	0.88 (0.26-1.77) ^{ab}	0.015
Travma sonrası kan	0.61 (0.54-1.00) ^X	0.27 (0.00-0.63) ^Y	0.72 (0.00-1.16) ^X	0.17 (0.01-0.66)	0.088
Beyin parankimi	3.70 (1.99-5.03) ^{a,Y}	1.10 (0.69-1.56) ^{b,X}	4.93 (1.98-10.01) ^{a,Y}	0.62 (0.45-0.90) ^b	<0.001
P	<0.001	<0.001	0.018	0.395	-

Veriler aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma veya ortanca (1. ve 3. kartiller) olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan farklı küçük harfler (a, b, c) gruplar arası farklılığı, aynı küçük harfler (a, b, c) gruplar arası benzerliği ifade etmektedir. Aynı sütunda yer alan farklı büyük harfler (X, Y, Z) ölçümler arası farklılığı, aynı büyük harfler (X, Y, Z) ölçümler arası benzerliği ifade etmektedir.



Şekil 17: Akut gruplarda karşılaştırmalı TERT sonuç grafiği

Kafa travması oluşturulup akut dönemde kurban edilen sıçanlarda;

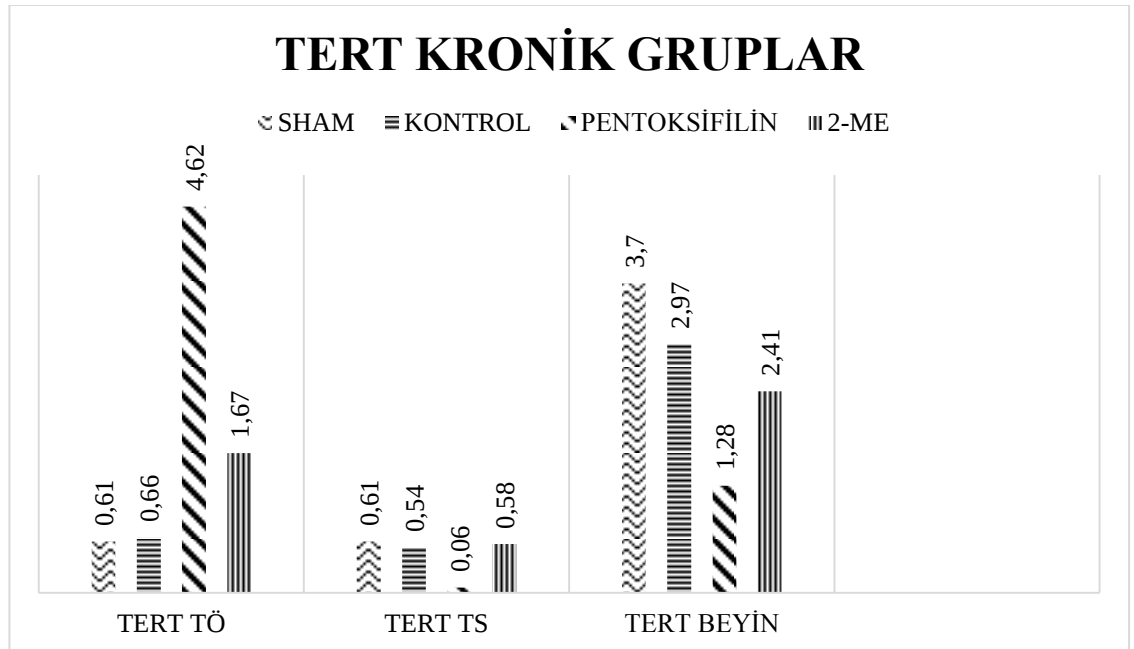
1. Kontrol grubunda TERT enzim değerlerindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p: <0.001$). Travma sonrası TERT değerlerinde azalma mevcut iken, bu değerlerdeki düşme beyinden alınan örneklerde daha az ölçülmüştür.
2. Pentoksifilin verilen grupta TERT değerlerindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p: 0.018$). Pentoksifilinin TERT değerlerinde arttırdığı görülmüştür. Beyin dokusunda TERT düzeylerinin diğer gruplara göre daha fazla artma olmuştur.
3. 2-ME verilen grupta TERT değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p: 0.395$). Beyin dokusunda TERT düzeyleri diğer gruplara göre daha düşük ölçülmüştür.

4.4.2. Kronik Gruplar

Tablo 9: Kronik dönemde çalışılan TERT ile ilgili istatistik sonuçlar.

Değişken	Kronik Gruplar				
	SHEM (n=14)	Kontrol (n=14)	Pentoksifilin (n=14)	2-ME (n=14)	p
TERT					
Travma öncesi kan	0.61 (0.54-1.00) ^{a,X}	0.66 (0.10-1.67) ^{a,X}	4.62 (1.99-5.21) ^{b,X}	1.67 (1.56-3.21) ^{ab,XY}	<0.001
Travma sonrası kan	0.61 (0.54-1.00) ^X	0.54 (0.13-1.27) ^X	0.06(0.40-1.02) ^Y	0.58 (0.24-1.00) ^X	0.927
Beyin parankimi	3.70 (1.99-5.03) ^{a,Y}	2.97 (2.26-5.52) ^{a,Y}	1.28 (0.57-2.64) ^{b,Y}	2.41 (1.26-7.89) ^{ab,Y}	0.026
P	<0.001	<0.001	0.002	0.003	-

Veriler aritmetik ortalama±standart sapma veya ortanca (1. ve 3. kartiller) olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan farklı küçük harfler (a, b, c) gruplar arası farklılığı, aynı küçük harfler (a, b, c) gruplar arası benzerliği ifade etmektedir. Aynı sütunda yer alan farklı büyük harfler (X, Y, Z) ölçümler arası farklılığı, aynı büyük harfler (X, Y, Z) ölçümler arası benzerliği ifade etmektedir.



Şekil 18: Kronik gruplarda karşılaştırmalı TERT sonuç grafiği

Kafa travması oluşturulup kronik dönemde sakrifiye edilen sıçanlarda;

1. Kontrol grubunda TERT değerlerindeki değişiklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştır ($p: <0.001$).
2. Pentoksifilin verilen grupta TERT değerlerinde kanda ve beyinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştır ($p: 0.002$). TERT düzeylerinin kanda azaldığı görölmüştür. Beyinde ise diğer gruplara göre daha düşük değerler elde edilmiştir.
3. 2-ME verilen grupta TERT değerlerinde ki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p: 0.003$). TERT değerlerinin 2-ME ile kanda azalma olmuştur. Beyin dokusunda ise sham ve shame göre düşük ama pentoksiline göre yüksek değerler elde edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Kafa travmaları; bütün dünyada sık karşılaşılan, adli, tıbbi ve cerrahi yönleri ile bugün için hala önemli sağlık, toplumsal ve ekonomik alanda sorundur. Travmatik beyin hasarı tüm dünyada genç nüfusta ölüm ve sakatlığın önde gelen sebebidir (33).

Travma sonucu santral sinir sisteminde ilk olarak birincil beyin hasarı meydana gelmekte, birincil beyin hasarını takiben ortaya çıkan birçok karmaşık fizyopatolojik olaylara bağlı olarak ikincil beyin hasarı oluşmaktadır. Birincil hasarın kendisi serebral vasküler yapılarda yırtılma ve kopmalara da yol açmaktadır. İkincil hasarın temelini oluşturan hücresel olaylar döngüsü; birincil hasarla başlamakta ve ilk saatlerde enflamatuar, eksitotoksik, oksidatif stres, metabolik, vasküler ve mitokondriyal mekanizmalarla aktive olmaktadır. Sekonder beyin hasarı primer travmayı takiben saatler ya da günler içinde meydana gelir. (46).

Özellikle son 20 yılda kafa travmalarının fizyopatolojisi hakkındaki bilgilerde artış, yoğun bakımdaki hasta bakım tekniklerindeki gelişmeler ve travmatik beyin hasarından sonra gelişen ikincil nöronal hasarın fizyolojisinin anlaşılması ile birlikte mortalite oranları azalmış, prognozda belirgin düzelmeler gözlenmiştir (45).

Santral sinir sistemi, inflammatuar cevabın düzenlenmesinde önemli role sahiptir. Hem dolaşımdan hem de nöral yollardan gelen immunolojik sinyallere cevap vermektedir. Travmatik beyin hasarında inflammatuar sürecin başlaması, organize olması; pro-antiinflammatuar sitokinler, kemokinler, adezyon molekülleri, kompleman faktörleri,

reaktif oksijen radikallerini içeren kompleks ve multifaktoriyel bir süreçtir. Hasar sonrası erken dönemde gelişen inflamasyon; kan elemanlarının ekstrasvazasyonu, hücre içi oluşan inflamasyon komponentleri, reaktif oksijen/nitrojen ürünleri tarafından uyarılmakta ve santral sinir sisteminde doku hemostazının bozulmasına, mikroglia ve astrositlerin aktivasyonu ile inflamasyonun başlamasına neden olmaktadır (57).

Beynin, diğer organlara göre oksidatif streslere karşı savunma mekanizması daha azdır. Bu nedenle beynin travmaya karşı antioksidan mekanizmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Travmaya maruz kalan beyin, oksidanlara karşı ikincil hasardan korunduğu oranda normal fizyolojisine dönebilir (5).

Travmatik serebral yaralanmalarda prognozu olumlu etkileyecek tek başına etkili bir tedavi ajanı günümüzde henüz ortaya konamamıştır. Kafa travmasının direkt etkisiyle meydana gelen ve birincil doku harabiyeti olarak adlandırılan olaylara ek olarak; KİB'ı artması, posttravmatik endokrin ve biyokimyasal olaylar, herniyasyon, beyin ödemi, beyin iskemisi, hipoksi ve hiperemi vs. gibi ikincil olayları birbirinden ayırmak, tedaviyi planlamak açısından son derece önemlidir (4).

Travma ile oluşan iskemi sonrası nöronal hasarı önlemek ve kötü nörolojik sonuçları düzeltmek için, hipoksi ve beyin ödemi derinleştiren moleküllerin üretimini veya dağılımını azaltmak gerekmektedir. Bunları inhibe eden ajanların, tedavi edici etkileri ile SSS travma veya iskemi sonrası oluşan kötü nörolojik tabloyu olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir. (6, 47).

Yaralanmadan sonraki saatler içinde TNF, IL-1 β ve IL-6 gibi proinflamatuvar enzimlerin miktarı artar. Doku hasarının ilerlemesi direkt olarak nörotoksik mediyatörlerin salınımına veya indirekt olarak nitrik oksit ve sitokinlerin salınımına bağlıdır. Vazokonstriktörlerin biraz daha salınması, lökosit ve trombosit adezyonu ile mikrovasküler yapının obliterasyonu ve ödem oluşumu doku perfüzyonunu daha da azaltır ve ardından sekonder beyin hasarını şiddetlendirir (51).

Travma sonrasında TNF- α beyinde hızlı şekilde artmaktadır. Erişkin sıçanlara ekzojen TNF- α verilmesi fokal iskemik beyin hasarlanmasını şiddetlendirirken, endojen TNF-

α 'nın TNF bağlayıcı protein veya TNF antagonistleri ile bloke edilmesinin iskemik ve travmatik beyin hasarında nöroprotektif etkileri gösterilmiştir (109, 115, 116)

Uygunsuz ya da artmış TNF- α üretimi organizmaya zarar verebilmektedir. Kanser, kronik infeksiyon ve kronik inflamasyon durumlarında ortaya çıkan anoreksi, kilo kaybı ve protein yıkımı gibi durumlardan TNF- α sorumludur. Ayrıca endotoksinler nedeniyle ortaya çıkan şok, vital organ disfonksiyonu, inatçı stres hormonu salınımı ve buna bağlı ölümlerde de sorumlu mediyatör TNF- α 'dır (104).

Proinflamatuvar sitokinler, IL-1 ve TNF- α çeşitli dokularda farklı biyolojik etkinliklere sahiptirler. Bu sitokinlerin SSS hastalıklarında inflamatuvar reaksiyonlarla ilişkili olduklarını gösteren çalışmalar mevcuttur. IL-1, TNF- α ve bunların mRNA'larının SSS hasarından sonra arttıkları gösterilmesine rağmen, bu sitokinlerin hasardaki rolleri henüz tam anlaşılamamıştır. Hasarın erken dönemlerinde gözlemlendiği gibi bu sitokinlerin aşırı ekspresyonu hasarlı doku için zararlı olabilir. Hasarın erken evresi sırasında gözlenen sitokinlerdeki düşük düzey lezyonlu dokunun onarımını arttırabilir (102).

IL-1 ve TNF- α gibi sitokinler sağlıklı hayvan SSS'de düşük oranda eksprese olurlar. Bu ekspresyon çeşitli tip lezyonlardan sonra önemli derecelerde artar. Bu sitokinlerin SSS lezyonlarındaki rolleri halen tartışmalıdır. Belirlenen duruma bağlı olarak bu sitokinler, nörotropik ya da nörotoksik olabilirler. Bu sitokinlerin aşırı üretimi hasarlanmış SSS'ini olumsuz yönde, düşük seviyeleri ise olumlu yönde etkileyebilir. Bu sitokinlerin etkisinin bloke edilmesi ile yapılan çalışmalar, SSS hasarını azaltıcı etki yaptıklarını destekler. Aksine mutant hayvanlarda yapılan çalışmalar bu sitokinlerin SSS hasarında nöroprotektif ajanlar olduklarını göstermiştir (102).

Arteriyel endotel hücrelerinde, insan genlerinin %2'den fazlasının, direkt veya indirekt olarak HIF-1 tarafından regüle edildiği bildirilmiştir (9, 85, 86). Bu, transkripsiyonel regülatör oksijen desteğini artıran ve anaerobik ATP üretimini destekleyen birçok adaptif genin induksiyonuna aracılık eder. Bu genler, glukoz transporter- 1 (GLUT-1), glikolitik enzimler, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), NO sentetaz (NOS), adrenomedullin, karbonik anhidraz, β adrenerjik reseptörler ve eritropoietini kodlayan

genleri içermekte olup HIF-1 tarafından aktive edilen genlerin bazıları listelenmiştir. Bunlar hücre büyümesi, angiogenez, hücre metabolizması ve yaşaması ile ilgilidir (60, 87, 88, 89)

HIF-1'in kompleks bir rol oynayarak, hipoksik koşullarda apoptozisi indüklediği bildirilmiştir (90). Aynı araştırma grubu tarafından düşük oksijen basıncında HIF-1 α delesyonlu kök hücre genetik çalışmalarında, delesyonlu olanlardaki apoptozisin normallerden daha az olduğu gösterilmiştir. HIF-1 α ve HIF-1 β ekspresyonlarının, apoptozis ile ve kaspaz-3, Fas-hücre yüzey reseptörleri, Fas ligandı gibi apoptoz uyarıcı faktörlerle anlamlı derecede korele olduğu gösterilmiştir (90, 91)

Telomerler kromozomların uçlarını degradasyondan ve füzyondan koruyan DNA-protein yapılarıdır. Telomerler genomik bütünlüğün korunmasında önemli rol oynarlar. Telomerler olmadan genetik materyal her bir hücre bölünmesi sırasında bir miktar kaybedilir (125, 126). İnsanda, telomeraz kromozomların uçlarına yeni telomer sekanslarını sentezlemektedir. Şu ana kadar telomer bölgelerinin yaşlanma ile ilişkili olduğu gösterilmişti fakat telomer bölgelerindeki kısalmanın yaşlanma ile ilgisinin yanında stres ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir (10). Bunun yanı sıra telomer kısalması, hücrenin apoptozise geçmesini veya kromozomal kararsızlık oluşmasını da indükleyebilmektedir. Telomeraz aktivitesinin eksik olduğu somatik hücrelerde ise her hücre bölünmesinde telomerler kısalmaktadır (32).

Pentoksifilin spesifik olmayan tip 4 fosfodiesteraz (PDE4) inhibitörü olup 5'nükleotidaz enziminin inhibisyonu ile dokuda ATP kaybını azaltarak ve iskemik süreç içerisinde enerji tüketimini minimumda tutarak hücre hasarını engellemektedir (135, 136). PDE enzim inhibisyonu ile hücre içi c-AMP düzeyi artmakta ve artan c-AMP, ATP kullanarak hücre içi protein kinaz sistemini aktive edip membran proteinlerinin fosforilasyonuna neden olmaktadır. Bu fosforilasyon ile hücre membran stabilizasyonu sağlanır. Diğer yandan Na-K ATPaz'ın aktivitesinin de artışı hücre membran stabilizasyonuna katkıda bulunmaktadır (137).

Pentoksifilin proinflamatuvar sitokinlerin (IL-6, TGF- β) üretimini inhibe ederek antienflamatuvar etki eder. Bu yolla periferik organ hasarında koruyuculuk etkisi vardır (135, 136). Köpeklerde ise beyin koruyucu etkisi gösterilmiştir (138).

Daha önce pentoksifilin akciğer, kalp, barsak, karaciğer, böbrek, spinal kord ve beyinde iskemi-reperfüzyon hasarını azalttığına yönelik rat, fare, tavşan ve köpek gibi çeşitli hayvan türlerinde yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (146, 147, 148, 149, 150, 151).

Yenidoğan sıçanlarda yapılan çalışmada hipoksik iskemik beyin hasarı öncesi pentoksifilin uygulamasının serebral infarkt alanını azalttığı, hipoksi sonrası pentoksifilin uygulamasının kortikal hasarı azaltırken striyatal ve hipokampal hasara etkili olmadığı gösterilmiştir (144).

Helmy ve ark.'nın 2009 yılında yaptıkları çalışmada TNF- α 'nın beyin ile ilgili farklı birçok patolojide pro-inflamator mediatör olarak görev aldığı (171), Goodman'ın çalışmasında TBH sonrası insan kan ve BOS örneklerinde TNF- α 'nın arttığı (172), Knoblach'ın 1999 yılındaki çalışmasında ise sıçanlarda deneysel TBH sonrası ise nöronal apoptozis için TNF- α 'nın promotor rol oynadığı belirtilmiştir (173).

İnsanlar üzerinde yapılan bir çalışmada ise pentoksifilin özellikle iskemik dokularda olmak üzere serebral kan akımını arttırdığı bildirilmiştir (178). Pentoksifilin hasarlı beyin bölgelerinde nöroprotektif etkilerinin olması nedeni ile TBH'nın tedavisinde iyi bir alternatif olacağını düşündük. Bu çalışmada pentoksifilin diğer gruplar ile karşılaştırıldığında akut ($p < 0.001$) ve kronik ($p: 0.004$) dönemde TNF- α değerlerini özellikle kanda daha belirgin olmak üzere inhibe ettiğini, ancak bu inhibisyonun beyin parankim örneklerinde az olduğunu gözlemledik. Pentoksifilin HIF-1 α düzeyleri üzerinde ise akut fazda arttırıcı etki gösterdiğini, bununla birlikte TERT üzerinde beyin parankim dokusunda akut dönemde daha belirgin bir artış olduğunu gözlemledik.

Literatürde TBH'da pentoksifilin HIF-1 α 'ya etkisi konusunda herhangi bir çalışma yoktur. Bununla birlikte 2009 yılında Zhou ve ark.'nın tübulointestinal fibrozis üzerinde pentoksifilin etkilerine baktıkları çalışmada; pentoksifilin HIF-1 α 'ya herhangi bir

etkisinin olmadığı belirtilmiştir (179). Bu çalışmada da akut dönemde pentoksifilinin HIF-1 α düzeyleri üzerinde herhangi bir inhibitör etkisi olmadığı hatta beyin parankiminde HIF-1 α düzeylerini arttırdığı gözlemlendi. Pentoksifilinin kronik dönemde HIF-1 α ile ilgili sonuçları ise istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber HIF-1 α düzeylerini düşürdüğünü tesbit edildi (0.135).

Pentoksifilinin iskemi tedavisinde (60 mg/kg) infark alanını düşürdüğünden ve nöroprotektif etkilerinden dolayı kullanılmaktadır (38). Literatürde pentoksifilinin TBH'da HIF-1 α ve TERT düzeylerine etkileri ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada pentoksifilinin TNF- α düzeyleri üzerindeki inhibe etkisi doğrulanırken beyin parankiminde bu inhibisyonun daha az olduğu tesbit edildi. Aynı zamanda akut dönemde TERT düzeylerindeki artma da pentoksifilinin TBH'da koruyucu etkisini doğrulamaktadır. Bununla birlikte özellikle akut dönemde beyin parankiminde artan HIF-1 α ekspresyon düzeyleri de nöroprotektif etkileri konusunda yeni soruları ve çalışma gerekliliğini de beraberinde getirmektedir.

2-ME, post-transkripsiyonel aşamada etki eden güçlü bir HIF-1 α inhibitörüdür (24). Bunu mikrotübüllerin depolimerizasyonu ve süperoksid radikallerinin üretiminin etkilenmesiyle yapmaktadır (169). 2-ME'ün en önemli mekanizması neoanjiogenezin inhibisyonudur. Mekanizması postranskripsiyonel olup HIF-1 α protein sentezinin inhibisyonu ile sonuçlanır (24).

2-ME'ün östrojen reseptörlerine afinitesi olmadığı bildirilmesine karşın Sutherland ve ark.'nın 2007 yılında yaptığı çalışmada 2-ME'ün MCF7 meme tümör hücre kültürlerinde östrojen reseptör bağımlı gen ekspresyonu ve mitozu aktive ettiği tesbit edilmiştir. Ancak Bruce-Keller ve ark.'nın 2007 yılında yaptığı diğer bir çalışmada kontrollü kortikal impakt yoluyla TBH oluşturulan farelerde 2-ME'ün nöroprotektif etkilerinin östrojen reseptör yolu aktivasyonu ile olmadığı, çünkü; östrojen verilen grupta beyin hasarında herhangi bir iyileşme elde edilmediği yoluyla bildirilmiştir.

Schaible ve ark.'nın 2014 yılında fareler üzerinde yaptıkları çalışmada 2-ME uygulanması ile akut dönemde (travmadan 30 dk. sonra) lezyon hacminin azaldığı gösterilmiştir.

Schaible ve ark.'nın 2014 yılında ki aynı çalışmasında TBH oluşturulan farelerde 2-ME'ün HIF-1 α gen ekspresyonu üzerinde derin etkilerinin olmadığı, ancak etkin olarak HIF-1 α proteinini azalttığı ve farklı HIF-1 α hedef genlerinin vivo olarak artmasını oransal olarak azalttığı tesbit edilmiştir. Bu çalışmada HIF-1 α 'nın travmanın 6. saatinden 48. saatine kadar arttığını göstermektedir (61).

SAK oluşturulan ratlarda HIF-1 α artışının apopitoz, KBB bozulması ve beyin ödemeine sebep olduğu ve bu etkilerin 2-ME ile hafifletildiği gösterilmiştir (163).

Sashindranath ve ark.'nın 2012 yılında yaptıkları çalışmada travmadan 24 saat sonra; TNF- α ve Serpine 1 (PAI-1) gen ekspresyonundaki artışın HIF-1 α aracılığıyla 2-ME ile azaltıldığını göstermiştir. İnflamasyon, koagülasyon, fibrinolizis ve KBB'nin geçirgenliğindeki artış gibi çeşitli ikincil hasarlanmalarda patofizyolojik olaylardaki potansiyel olumsuz etkilerinden dolayı TBH'da TNF- α uygun olmayan biyomarker olarak düşünülmüştür. Kafa travmasında artan PAI-1'in de nörovasküler hasarlanmada promotor rolü olduğu tesbit edilmiştir (170). PAI-1'in artmasının Johansson, Lip ve Tuttolomondo gibi farklı çalışmalarda iskemi için de risk oluşturduğu belirtilmiştir.

Fokal kortikal çarpma ile oluşturulan deneysel kafa travmasında Corletto ve ark.'nın 2009 yılındaki çalışmasında; HIF, VEGF, VEGFR ekspresyonunun, kontüze alanda ve perilezyonal bölgedeki astrositlerde arttığı gözlemlenmiştir. İnfiltrat olan makrofaj ve nötrofiller travmanın 4. gününde en yüksek düzeyde görülmüştür (174).

2-ME'ün HIF-1 α düzeylerine etkisi daha önce Schaible ve ark. tarafından akut dönemde bakılmış olmasına karşın kronik dönemde 2-ME'ün etkileri konusunda literatürde çalışma mevcut değildir. Schaible ve ark.'nın çalışmasında akut dönemde HIF-1 α 'nın düzeylerinde azalma olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada 2-ME'ün akut dönemde beyin parankimi ve kan örneklerindeki HIF-1 α değerlerinde ileri düzeyde azalma olduğu gözlemlendi ($p<0.001$). Kronik dönemde ise HIF-1 α düzeylerinde azalma olmakla birlikte bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p: 0.584$).

2-ME'ün TNF- α düzeyleri üzerinde akut dönemde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmedi (p : 0.024). Ancak beyin parankimindeki HIF-1 α ekspresyonundaki azalmanın sham, kronik ve pentoksifilin verilen gruba göre çok daha olduğu görüldü. Kronik dönemde kanda daha belirgin olmak üzere TNF- α değerlerini süprese ettiği ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (p : 0.058). Ancak akut fazda beyin dokusundaki TNF- α inhibisyonun diğer gruplardan daha fazla olduğu tesbit edildi. TERT seviyesindeki artışın ise akut fazda minimal olduğu görüldü.

Kang ve ark.'nın 2004 yılında yaptıkları çalışmada *invivo* olarak TERT ekspresyonundaki artışın hipoksik iskemik beyin hasarında koruyucu olduğu belirtilmiştir. TERT postmitotik ve gelişen matür sinir sisteminde nöronal sağ kalımın modülasyonunda dinamik rol oynamaktadır. TERT, erişkin beyin dokusunda uyarılabilen olup NMDA reseptör aracılı eksitotoksik nekrozu önleyerek nöronları iskemik beyin hasarından korumaktadır (39). TERT ve TBH konusunda literatürde çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada akut dönemde 2-ME'ün TERT üzerine etkisi istatistiksel olarak anlamlı değilken kronik dönemde özellikle beyin dokusunda TERT düzeyleri yüksek bulunmuştur (p : 0.003). Pentoksifilinin ise akut dönemde TERT düzeylerini özellikle beyinde arttırdığı (p : 0.018) ve kronik dönemde beyin parankiminde TERT değerlerini düşürdüğü görülmüştür (p :0.002).

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada yeni bir tedavi ajanı olarak çalışılan HIF-1 α inhibitörü 2-ME ile TNF- α inhibitörü pentoksifilinin TBH oluşturulan ratlarda beyin parankimi ve kan örneklerindeki HIF-1 α , TNF- α ve TERT değerleri karşılaştırılmalı olarak çalışılmıştır. Neoanjiogenik yönüyle onkolojik çalışmaları fazla olan 2-ME'ün antiinlamatuar etkilerinden dolayı TBH'nın ikincil hasarında kullanılabilirliğini öğrenmek amacıyla çalışmamızda kullandık. 2-ME'ün akut dönemde HIF-1 α değerlerindeki bariz inhibisyonunun kronik dönemde daha az olduğunu, ancak beyindeki HIF-1 α inhibisyonunun akut ve kronik dönemde diğer gruplardan daha fazla olduğunu,gördük. 2-ME'ün TNF- α üzerindeki inhibisyonunun akut dönemde kanda olmadığını ancak kronik dönemde belirgin olduğunu, beyin parankiminde TNF- α inhibisyonunun akut ve kronik dönemde diğer gruplardan daha fazla olduğunu, TERT düzeylerindeki yükselmenin ise kronik dönemde olduğunu gördük. Bu nedenle 2-ME'ün kafa travması sonrası kullanımının faydalı olabileceğini düşündük. Pentoksifilinin ise; TNF- α düzeylerindeki inhibitör etkisinin akut ve kronik dönemde kanda daha belirgin olduğunu, beyinde ise bu inhibisyonun 2-ME'e göre daha az olduğunu tesbit ettik. Pentoksifilinin HIF-1 α düzeylerini ise akut dönemde beyin parankiminde arttırdığını, kronik dönemde ise azaltmakla birlikte bu azalmanın 2-ME'e kıyasla daha az olduğunu, TERT değerlerini kronik dönemde düşürürken akut dönemde belirgin olarak yükselttiğini tesbit ettik. Bu nedenle pentoksifilinin TBH'da etkinliği yeterli değildir. Ancak akut dönemde TERT düzeylerindeki artma da pentoksifilinin TBH'da koruyucu

etkinliğini göstermektedir. Pentoksifilin travma sonrası akut dönemde kullanımının önerilmesi için daha detaylı çalışmalar gereklidir.

Sonuç olarak; pentoksifilin apoptoz, KBB ve beyin ödeminde artışa neden olan HIF-1 α ekspresyonunu beyin parankiminde yükseltirken TNF- α 'yı düşürmekte ve TERT üzerine olumlu katkılar sağlamaktadır. Bu nedenle travma sonrası tedavi edici ajanların tek bir mekanizma üzerine etkili olmadığı birbiri ile ilişkili veya ilişkisiz birçok mekanizma üzerine etkili olduğu ve hedeflenen tedavide bu etki mekanizmaları arasındaki dengelerin etkili olduğu görülmüştür. Pentoksifilin halen iskemik strok sonrası kullanılabilen bir ajandır. Ancak travma sonrası akut dönemde kullanımının önerilmesi için daha detaylı çalışmalar gereklidir.

2- ME ile ilgili Wu ve arkadaşlarının 2013 yılındaki SAK sonrası HIF-1 α üzerine etkinliğini gösteren çalışma ile bizim çalışmamızda benzer sonuçlar elde edilmiş, HIF-1 α üzerine etkisi gösterilmiştir. Ancak TNF- α üzerine 2-ME'ün yeterli etkinliği akut dönemde gösterilememekle birlikte kronik dönemde beyin parankim dokusunda gösterilmiştir. Aynı şekilde TERT düzeylerindeki yükselme kronik dönemde anlamlı bulunmuştur. 2-ME'ün kafa travması sonrası kullanımının faydalı olabileceği düşünüldü.

Travma sonrası beyin parankiminde oluşan hasara ilişkin birçok bilinmezin de olduğu malumdur. Bu çalışmada kullandığımız tedavi edici ajanlarında birbirine zıt farklı mekanizmalar üzerinden etkinliğini gördük. Bu çalışma bize göstermiştir ki; travma sonrası ortaya çıkan olayların daha iyi anlaşılması ve tedavinin planlanabilmesi için hücre içi mekanizmaların ve mediatörlerin etkileşiminin daha iyi anlaşılması gerekir. Bu konuda daha fazla moleküler ve genetik çalışmaya ihtiyaç vardır. Çalışmamızın bu konuda ileriki çalışmalar için bir basamak olmasını umuyoruz.

KAYNAKLAR

1. Jennet B. Epidemiology of head injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996; 60:362-369.
2. Jennet B. Historical perspective on head injury. In: Narayan RK, Wilberger JE, Povlishock JT (eds.) *Neurotrauma*. USA, The Mc Graw Hill Co., Inc. 1996; 3-11.
3. Ergüngör F. Kafa travmalarında patofizyoloji. In: Kofralı E, Zileli M, Ziyal İ, Ünlü A (eds). *Temel Nöroşirurji*. 1. cilt. Ankara: Buluş Tasarım ve Matbaacılık Hizmetleri, 2010;553-580.
4. Jenneth B, Galbraith S. Head injuries: Pathology and natural history of head injury. An introduction to neurosurgery (4 th ed). William Heinemann, London 1983, 214 – 233.
5. Özben T: Pathophysiology of cerebral ischemia. Mechanisms involved inneuronal damage. In: Free Radicals, Oxidative stress, and Antioxidants (Eds.Özben T). Plenum Press, New York, 1998, p.163-187.
6. Hall ED, Braughjer JM. Central nervous system and stroke. II. Physiological and pharmacological evidence for involvement of oxygen radicals and lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1989; 6:303-313.
7. Grace, PA.; Ischemia-reperfusion injury, *Br J Surg*. 1994; 81: 637-647.
8. Yeo EJ, Chun YS, Park JW. New Anticancer Strategies Targeting HIF-1. *Biochem.Pharmacol* 2004; 68: 1061-1069.
9. Semenza GL. Expression of Hypoxia-Inducible Factor1 : Mechanisms and Consequences. *Biochem Pharmacol*. 2000;59:47-53.
10. Armanios M, Blackburn EH. The telomere syndromes. *Nat Rev Genet*. 2012 Oct;13(10):693-704.

11. Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 5680–84.
12. Kelsey JL. Breast cancer epidemiology: Summary and future direction. *Epidemiol Rev*. 1993;15:256-63.
13. Ke Q, Costa M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*. 2006;70:1469-80.
14. Park S, Dadak AM, Haase V, Fontana L, Giaccia AJ, Johnson R. SHypoxia-induced gene expression occurs solely through the action of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α): role of cytoplasmic trapping of HIF-2 α . *Mol Cell Biol*. 2003;23:4959-71.
15. Yamada N, Horikawa Y, Oda N, Lizuka K, Shihara N, Kishi S, Takeda J. Genetic Variation in the Hypoxia Inducible -1 α Gene Is Associated with Type 2 Diabet in Japanese. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2005; 90: 41-47.
16. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. 1992;12:5447–54.
17. Jessica Cassavaugh and Karen M. Lounsbury. Hypoxia-Mediated Biological Control. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2011;112:735–44.
18. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick R. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev*. 2002;16:1466–1471.
19. Hewitson KS, McNeill LA, Riordan MV, Tian YM, Bullock AN, Welford RW, Elkins JM, Oldham NJ, Bhattacharya S, Gleadle JM et al. Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *J Biol Chem*. 2002;277:26351–26355.
20. Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, Huang WQ, Wotzlaw C, Hellwig-Burgel T, Jelkmann W. Intracellular localisation

- of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci.* 2003; 116: 1319–26.
21. Lee J, Bae S, Jeong J, Kim S, Kim K. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med.* 2004; 36:1-12.
 22. Maynard MA, Ohh M. Molecular targets from VHL studies into the oxygen-sensing pathway. *Curr Cancer Drug Targets.* 2005; 5: 345-56.
 23. Rabie T, Marti HH. Brain protection by erythropoietin: a manifold task. *Physiology.* 2008;23:263-74.
 24. Mabjeesh NJ, Escuin D, LaVallee TM, Pribluda VS, Swartz GM, Johnson MS, et al. 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell* 2003;3:363–75
 25. Vakili A, Mojarrad S, Akhovan MM, Rashidy-Pour A. Pentoxifylline attenuates TNF- α protein levels and brain edema following temporary focal cerebral ischemia in rats. *Brain Researcg.* 2011; 1377: 119-125.
 26. Essayan DM: Cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 108(5):671-80.
 27. Paradowski, PT., Zeman, K. Pentoxifylline. *Postepy Hig Med Dosw.* 1995; 49: 201- 20.
 28. Yeh S, Ou L, Gean P, Hung J, Chang W. Selective Inhibition of Early –but not late- Expressed HIF-1 α Is neuroprotective in Rats after Focal Ischemic Brain Damage. *Brain Pathology.* 2011: 249-262
 29. Zhou D, Matchett G, Jadhav V, Dach N, Zhang J. The effect of 2-methoxyestradiol, a HIF-1 α inhibitör, in global cerebral ischemia in rats. *Neurol Res.* 2008 April; 30(3): 268-271.
 30. Bilgen M., A new device for experimental modeling of central nervous system injuries. *Neurorehabil Neural Repair.* 2005; 19 (3): 219-226.
 31. Bayramoğlu A. Mesane kanserli hastaların idrar örneklerinde telomeraz enzim aktivitesi. *FU Sağ Bil Tıp Derg.* 2006; 20(6): 423-426.

32. Frias C, Garcia-Aranda C, De Juan C, Moran A, Ortega P, Gomez A, Hernando F, Lopez-Asenjo JA, Torres AJ, Benito M, Iniesta P. Telomere shortening is associated with poor prognosis and telomerase activity correlates with DNA repair impairment in nonsmall cell lung cancer. *Lung Cancer* 2008; 60: 416-425.
33. Battistella FD, Benfield JR. Blunt and penetrating injuries of the chest wall, pleura and lungs. In. Shield Tw. General thoracic surgery. 5nd Ed.Philadelphia: Williams and Wilkins. 2000; 815-863.
34. Öktem İS, Kamaşak K, Doğu Y. Kafa Travmaları. Sözüer E, İkizceli İ(ed), Travma El Kitabı, birinci baskı, Adana: Özyurt matbaacılık. 2011; 451-491.
35. Jennet B, Lindsay KW. Kafa travması sıklığı, nedenleri ve sonuçları. Özcan OE, Turgut M, Açıkgöz M (çev.) Temel Nörosirürji'den, 5. Baskı. Ankara, Günes Kitabevi., 1995; 229-240.
36. Mullins RJ, Stone J, Hedges JR, et al. Influence of a Statewide Trauma System and the CRAMS Scale for Accurately Triaging Patients to Trauma Centers. *Ann Emerg Med* 1985;14:1061-1064.
37. Dixon CE, Kochanek PM, Yan HQ, Schiding JK, Griffith RG, Baum E, Marion DW, DeKosky ST. One-year study of spatial memory performance, brain morphology, and cholinergic markers after moderate controlled cortical impact in rats. *J Neurotrauma*. 1999; 16: 109-22.
38. Vakiki A, Khorasani MZ. Post-ischemic treatment of pentoxifylline reduces cortical not striatal infarct volume in transient model of focal cerebral ischemia in rat. *Brain Research*. 2007; 1144: 186-191.
39. Kang HJ, Choi YS, Hong SB, Kim KW, Woo RS, Won SJ, et al. Ectopic expression of the catalytic subunit of telomerase protects against brain injury resulting from ischemia and NMDA-induced neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience*. 2004; 24: 1280-1287.
40. Emniyet Genel Müdürlüğü Trafik Hizmetleri Başkanlığı. 2008 Raporu. Basımevi Şube Müdürlüğü. Ankara. 2008; 13-14.

41. Ulaştırma İstatistikleri Takımı, Türkiye İstatistik Kurumu, 2006 Yılı Trafik Kaza İstatistikleri (Karayolu), Ankara. 2008; 11-13.
42. <http://www.trafik.org.tr>. Türkiye Geneli Kaza İstatistikleri. Erişim tarihi:04.05.2015.
43. Stein SC, Classification of head injury. In: Narayan RK, Wilberger JE, Povlishock JT. eds. Neurotrauma. Mc Graw Hill: New York; p.31–41, 1996
44. Teasdale G, Jennet B. Assessment of coma and impaired consciousness: A practical scale. *Lancet* 1974; 2: 81-84.
45. Marik PE, Varon J, Trask T. Management of head trauma. *Chest* 2002;122: 699-711.
46. Graham DI, Adams JH, Doyle D, Teasdale GM, Lawrence AE, McLellan DR. Ischaemic brain damage is still common in fatal non-missile head injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 52: 346–350, 1989
47. Cunningham AS, Salvador R, Coles JP, Chatfield DA, Bradley PG, Johnston AJ, Steiner LA, Fryer TD, Aigbirhio FI, Smielewski P, Williams GB, Carpenter TA, Gillard JH, Pickard JD, Menon DK. Physiological thresholds for irreversible tissue damage in contusional regions following traumatic brain injury. *Brain*. 2005; 128: 1931–1942.
48. Mimoz O, Benoist JF, Edouard AR, Assicot M, Bohuon C, Samii K. Procalcitonin and C-reactive protein during the early posttraumatic systemic inflammatory response syndrome. *Intens Care Med* 1998; 24:185-8.
49. Bauman H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today*. 1994;15:74-80.
50. Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC. Production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta by human cerebral microvascular endothelium after percussive trauma. *J Trauma* 1997; 42: 1101-7.
51. Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth*. 2007; 99 (1): 4–9.

52. Armstead WM. Differential activation of ERK, p38, and JNK MAPK by nociceptin/orphanin FQ in the potentiation of prostaglandin cerebrovasoconstriction after brain injury. *Eur J Pharmacol.* 2006; 529: 129–135.
53. DeWitt DS, Prough D. Traumatic cerebral vascular injury: the effects of concussive brain injury on the cerebral vasculature. *J Neurotrauma.* 2003; 20: 795–825.
54. Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC. The role of cytokines in the neuropathology of stroke and neurotrauma. *Neuroimmunomodulation.* 1998; 5: 143-159.
55. Marklund N, Hillered L. Animal modelling of traumatic brain injury in preclinical drug development: where do we go from here?. *Br J Pharmacol.* 2011; 164:1207-29.
56. Li L, Bu S, Bäckström T, Landström M, Ulmsten U, Fu X. Induction of apoptosis and G2/M arrest by 2-methoxyestradiol in human cervical cancer HeLaS3 cells. *Anticancer Res.* 2004; 24: 873-80.
57. Cederberg D, Siesjo P. What has inflammation to do with traumatic brain injury. *Childs Nerv Syst* 2010;26:221-226.
58. Arand M, Melzner H, Kinzl L, Bruckner UB. Early inflammatory mediator response following isolated traumatic brain injury and other major trauma in humans. *Langenbeck's Arch Surg* 2001;386:241-248.
59. Yu R, Gao L, Jiang S, Guan P, Mao B. Association of HIF-1 α expression and cell apoptosis after traumatic brain injury in the rat, *Chin. J. Traumatol*; 2001: 218–221.
60. Benarroch EE., Hypoxia-induced mediators and neurologic disease. *Neurology.* 2009; 73: 560-5
61. Schaible EV, Windschügl J, Bobkiewicz W, Kaburov Y, Dangel L et al. 2-Methoxyestradiol confers neuroprotection and inhibits a maladaptive HIF-1 α response after traumatic brain injury in mice. *J. Neurochemy.* 2014; 129 (6): 940-954

62. Raval RR, Lau KW, Tran MG, Sowter HM, Mandriota SJ, Li JL et al. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 5675-86.
63. Dupont WD, Parl FF, Hartmann WH, Brinton LA, Winfield AC, Worrel JA, et al. Breast Cancer Risk Associated with Proliferative Breast Disease and Atypical Hyperplasia. *Cancer*. 1993; 71: 1258-65.
64. Makino Y, Kanopka A, Wilson WJ, Tanaka H, Poellinger L. Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia inducible factor-3 α locus. *J Biol Chem*. 2002; 277: 32405-32408.
65. Maynard MA, Evans AJ, Shi W, Kim WY, Liu FF, Ohh M. Dominant-negative HIF-3 α 4 suppresses VHL-null renal cell carcinoma progression. *Cell Cycle*. 2007 Nov 15; 6 (22): 2810-6
66. Cassavaugh J ve Lounsbury K.M.. Hypoxia-Mediated Biological Control. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2011; 112: 735–44.
67. Rocha S. Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. *Trends Biochem Sci* 2007; 32(8): 389-97.
68. Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol* 2003;23:9361-74.
69. Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol* 1996; 271: 1172-80.
70. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 1997; 272: 22642-7.
71. Ruas JL, Poellinger L, Pereira T. Role of CBP in regulating HIF- 1-mediated activation of transcription. *J Cell Sci*. 2005; 118: 301-11.

72. Page EL, Robitaille GA, Pouyssegur J, Richard DE. Induction of hypoxia-inducible factor-1 α by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem.* 2002; 277: 48 403-9.
73. Tang N, Wang L, Esko J, Giordano FJ, Huang Y, Gerber HP et al. Loss of HIF-1 α in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2004;6:485-95.
74. Chun YS., Kim MS., Park JW., Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF-1 α . *J Korean Med Sci.* 2002; 17(5): 581-8
75. Quintero M, Mackenzie N, Brennan PA. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in cancer. *EJSO* 2004; 30: 465-8.
76. Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers EC, Semanza GL, Pinedo HM. Levels of Hypoxia-Inducible Factor-1 α During Breast Carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93: 309-14.
77. Semanza GL. HIF-1 and Tumor Progression :Pathophysiology and Therapeutics. *Trends Mol Med.* 2002; 8: 62-67.
78. Semenza GL. Targeting HIF-1 for Cancer Therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3: 721-32.
79. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev.* 2000; 14: 34-44.
80. Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev.* 2001; 15: 2675-2686.
81. Bardos JJ, Ashcroft M. Hypoxia-Inducible factor-1 and Oncogenic Signalling. *BioEssay.* 2004; 2: 262-69.
82. Salnikow K, Blagosklonny MV, Ryan H, Johnson R, Costa M. Carcinogenic nickel induces genes involved with hypoxic stress. *Cancer Res.* 2000; 60: 38-41.206.

83. Salnikow K, Donald SP, Bruick RK, Zhitkovich A, Phang JM, Kasprzak KS. Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress. *J Biol Chem.* 2004; 279: 40337-40344.
84. Li J, Davidson G, Huang Y, Jiang BH, Shi X, Costa M, Huang C. Nickel compounds act through phosphatidylinositol-3-kinase/Akt-dependent, pS6k)-independent pathway to induce hypoxia inducible factor transactivation and Cap43 expression in mouse epidermal Cl41 cells. *Cancer Res.* 2004; 64: 94-101.
85. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Polychronidis A, Simopoulos C, Gatter KC, Harris AL, Sivridis E. Endogenous markers of hypoxia/anaerobic metabolism and anemia in primary colorectal cancer. *Cancer Sci.* 2006; 97 (7): 582-588.
86. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JG, Semenza GL. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood.* 2005; 105: 659-669.
87. Greer S. N., Metcalf J. L., Wang Y. and Ohh M. The updated biology of hypoxia-inducible factor. *EMBO J.* 2012; 31: 2448–2460.
88. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell.* 2012; 48, 399–408.
89. Kiichi H, Semenza GL. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 59:15-26.
90. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, et al. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature.* 1998; 394: 485–490.
91. Volm M, Koomagi R. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. *Anticancer Res.* 2000; 20: 1527-33.
92. Chen M. and Manley J. L. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009; 10, 741–754.

93. Kaelin WG, Jr. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O₂ sensing and cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:865– 873.
94. Testa U, Pannitteri G, Condorelli GL. Vascular endothelial growth factors in cardiovascular medicine. *J Cardiovasc Med.* 2008; 9:1190 –1221.
95. Bogaert E, Van Damme P, Poesen K, et al. VEGF protects motor neurons against excitotoxicity by upregulation of GluR2. *Neurobiol Aging Epub.* 2010; 31 (12): 2185-91
96. Tolosa L, Mir M, Olmos G, Llado J. Vascular endothelial growth factor protects motoneurons from serum deprivation-induced cell death through phosphatidylinositol 3-kinase-mediated p38 mitogen-activated protein kinase inhibition. *Neuroscience.* 2009; 158: 1348–1355
97. Brines M, Cerami A. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 484–494.
98. Marti HH. Erythropoietin and the hypoxic brain. *J Exp Biol* 2004; 207: 3233–42.
99. Weidemann A, Johnson RS. Nonrenal regulation of EPO synthesis. *Kidney Int.* 2009;75: 682– 688.
100. Adamcio B, Sargin D, Stradomska A, et al. Erythropoietin enhances hippocampal long-term potentiation and memory. *BMC Biol.* 2008;6:37.
101. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol.* 2008; 214 (2): 149-60
102. Wang CX, Shuaib A. Involvement of inflammatory cytokines in central nervous system injury. *Progress in Neurobiology.* 2002; 67 (2): 161-172
103. Shohami, E., Ginis, I., & Hallenbeck, J. M. Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine & growth factor reviews.* 1999; 10 (2): 119-130.
104. Popa C, Netea MG, van Riel PL, van der Meer JW, Stalenhoef AF. The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res.* 2007; 48 (4): 751-62.
105. Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G, Crougton K, et al. A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol.* 2004; 6 (2): 97-105.

106. George P., Charles W. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, New York, 1998; p. 11.
107. Dahut WL, Lakhani NJ, Gulley JL, Arlen PM, Kohn EC, Kotz H et al. Phase I clinical trial of oral 2-methoxyestradiol, an antiangiogenic and apoptotic agent, in patients with solid tumors. *Cancer Biol Ther.* 2006; 5: 22-7.
108. James J, Murry DJ, Treston AM, Storniolo AM, Sledge GW, Sidor C, Miller KD. Phase I safety, pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of 2-methoxyestradiol alone or in combination with docetaxel in patients with locally recurrent or metastatic breast cancer. *Invest New Drugs.* 2007; 25: 41-8.
109. Simmons RD, Willenborg DO. Direct injection of cytokines into the spinal cord causes autoimmune encephalomyelitis-like inflammation. *J. Neurol. Sci.* 1990; 100: 37-42
110. Gendron RL, Nestel FP, Lapp WS, Baines MG. Expression of tumor necrosis factor- α in the developing nervous system. *Int. J. Neurosci.* 1991; 60: 129-136
111. Navashiro H, Martin D, Hallenbeck JM. Inhibition of tumor necrosis factor and amelioration of brain infarction in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997; 17: 229-232.
112. Schobitz B, De Kloet ER, Holsboer F. Gene expression of interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor in the brain. *Prog. Neurobiol.* 1994; 44: 397-432
113. Ellison MD, Merchant RE. Appearance of cytokine-associated central nervous system myelin damage coincides temporally with serum tumor necrosis factor induction after recombinant interleukin-2 infusion in rats. *J. Neuroimmunol.* 1991; 33: 245-251
114. Gamble JR, Smith WB, Vadas MA. TNF modulation endothelial and neutrophil adhesion. In: Beutler, B. (Ed.), Tumor Necrosis Factor. New York: Raven; 1992. p. 65-86

115. Barone FC, Arvin B White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, et al. Tumor necrosis factor- α . A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* 1997;28:1233-1244
116. Young GY, Gong C, Qin Z, Ye W, Mao Y, Betz AL. Inhibition of TNF- α attenuates infarct volume and ICAM-1 expression in ischemic mouse brain. *Neuroreport* . 1998; 9: 2131-2134
117. Lundberg IE. The role of cytokines, chemokines, and adhesion molecules in the pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Rheumatol Rep*. 2000; 2 (3): 216-24.
118. Esmon CT. Role of coagulation inhibitors in inflammation. *Thromb Haemost*. 2001; 86 (1): 51-6.
119. Zaremba J, Losy J. Cytokines in clinical and experimental ischemic stroke. *Neurol Neurochir Pol*. 2004; 38: 557-62
120. Minami M, Katayama T, Satoh M. Brain cytokines and Chemokines: Roles in ischemic injury and pain *J Pharmacol Sci* 2006; 100:461-470
121. Werner C. and Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br. J. Anaesth*. 2007; 99: 4-9.
122. Adams JH. Head injury. In: Adams JH, Duchen LW eds. *Greenfields Neuropathology* 5 th ed. London: Edward Arnold 1992; 106-52
123. Ikeda Y, Long DM. The molecular basis of brain injury and brain edema. The role of oxygen free radicals. *Neurosurgery*. 1990; 27: 1-11
124. Greider CW. Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem*. 1996; 65: 337-65.
125. Hayflick L. Aging under Glass. *Mutation Research* 1991; 256: 69-80
126. Harley C.B. Telomere Loss: Mitotick Clock or Genetic Time Bomb? *Mutation Research* 1991; 256: 271-282.
127. Reddel R.R. The Role of Senescence and Immortalization in Carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21: 477-484
128. Calado RT, Yound NS. Telomere diseases. *N Engl. J Med*. 2009;361;2353-65.

129. Yılmaz Miroğlu Y, Dıraman E, Eren Z, Telomer ve Telomeraz; *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*. 2011; 4: 41-48.
130. Prescott J.C.,Blackburn E.H. Telomerase; Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *Curr Opin Genetics and Development* 1999;9:368-373.
131. Griffith DJ, Corneau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Mossus H, Mammalian Telomeres end in A Large Duplex Loop, *Cell*. 1999; 97:503-514
132. Zvereva MI, Shcherbakova DM and Dontsova OA, Telomerase: Structure, Functions, and Activity Regulation, *Biochemistry (Moscow)*, 2010, Vol. 75, No. 13, 1563-1583.
133. Windmeier C, Gressner AM. Pharmacological aspects of pentoxifylline with emphasis on its inhibitory actions on hepatic fibrogenesis (review). *Gen Pharmac.* 1997; 29: 181-96.
134. Haque K, Mohan P. Pentoxifylline for neonatal sepsis. *Cohrane Database Syst Rev*. 2003; 2: 1-13.
135. Boldt Joachim, Brosch C, Piper SN, Suttner S, Lehmann A, Werling C: Influence of prophylactic use of pentoxifylline on postoperative organ function in elderly cardiac surgery patients. *Crit Care Med*. 2001; Vol. 29, No. 5.
136. Üstünsoy H, Sivrikoz C, Nurözler F, et al: The protective role of pentoxifylline in the peripheral system during extracorporeal circulation. *Turkish J Thorach and Cardiovasc Surg* 2000; 8: 687-9.
137. Udassin R,Vromen A,Seror D, Haksel Y. Pentoksifilin attenuates ischemia/reperfusion injury to the small intestine in the rat. *Pediatr Surg Int*.1996; 11:329-333
138. Durgut K, Hoşgör K, Görmüş N, Özergin U, Solak H: The cerebroprotective effects of pentoxifylline and aprotinin during cardiopulmonary bypass in dogs. *Perfusion* 2004; 19: 101-106.
139. Thiel, M., Bardenheuer, HJ., Drug therapy of sepsis. An indication for pentoxifylline, *Anaest*.1994; 43: 249-56.

140. Eugene-Jolchine, I., Milpied, N., Prevention studies with pentoxifylline: New clinical Project, *J Cardiovas Pharm.* 1995; 25: 143-6.
141. Gilman AG, Goodman LS, Rall WT, Murad F. The methylxanthines. *The Pharmacological basis of therapeutics*. Seventh edthion. 1990:598-601.
142. Ely, H., Pentoxifylline therapy in dermatology: A review of localized hyperviscosity and its effects on the skin, *Dermatol Clin.* 1988; 6: 585-608
143. Bath PMW, Bath-Hextall FJ. Pentoxifylline, propentofylline and pentifylline for acute ischaemic stroke (review). *Cochrane Database Syst Rev.* 2004; 3: 1-14.
144. Eun BL, Liu XH, Barks JD. Pentoxifylline attenuates hypoxic-ischemic brain injury in immature rats. *Pediatr Res.* 2000; 47: 73-87.
145. Sulkowski S, Ejsmont-Pietrow G, Musiatowicz B et al. Role of pentoksifilin in prevention and treatment of adult respiratory distress syndrome. *Pneumonol Alergol Pols.* 1993; 61:574-8.
146. Ebrahimi F, Hajrasouliha AR, Tavakoli S, Sadeghipour H, Ghasmi M, Rofouei BR, Ahmadi SH, Dehpour AR. Pentoxifylline improves reoxygenation-induced contractile recovery through a nitric oxide-dependent mechanism in rat papillary muscles. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006; 47: 571-7.
147. Banfi C, Sironi L, De Simoni G, Gelosa P, Barcella S, Perego C, Gianazza E, Guerrini U, Tremoli E, Mussoni L. Pentoxifylline prevents spontaneous brain ischemia in stroke-prone rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 310: 890-5.
148. Şirin BH, Yılık L, Coşkun E, Ortaç R, Şirin H. Pentoxifylline reduces injury of the brain in transient ischaemia. *Acta Cardiol.* 1998; 53: 89-95.
149. Savaş S, Delibaş N, Savaş Ç, Sütçü R, Cindaş A. Pentoxifylline reduces biochemical markers of ischemia-reperfusion induced spinal cord injury in rabbits. *Spinal Cord.* 2000; 40: 224-9.
150. Simone AJH, Gerry TM. Pentoxifylline reduces fibrin deposition and prolongs survival in neonatal hyperoxic lung injury. *J Appl Physiol.* 2004; 97: 2014-9.
151. Travadi J, Patole S. Pentoxifylline reduces the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Pediatr Res.* 2006; 60: 185-9.

152. Zhu, B.T. Conney, A.H., Is 2-methoxyestradiol an endogenous estrogen metabolite that inhibits mammary carcinogenesis? *Cancer Res.* 1998; 58, 2269–2277.
153. Mueck A.O, Seeger H., 2-Methoxyestradiol-Biology and mechanism of action. *J. Steroids.* 2010; 75: 625-631.
154. Sutherland T.E., Anderson R.L., Hughes R.A., et al, 2-Methoxyestradiol-a unique blend of activities generating a new class of anti-tumor/anti-inflammatory agents. *Drug Discovery Today.* 2007; 12: No 13/14.
155. Susan L. Mooberry, Mechanism of action of 2-methoxyestradiol: new developments. *Drug Resistance Updates* 6; 2003; 355–361
156. Tevaarwek A.J., Holen K.D., Alberti D.B., et al. Phase I Trial of 2-Methoxyestradiol NanoCrystal Dispersion in Advanced Solid Malignancies. *Clin Cancer Res.* 2009; 15 (4): 1460-1465.
157. Zacharia L.C., Piché C.A., Fielding R.M., et al. 2-Hydroxyestradiol Is a Prodrug of 2-Methoxyestradiol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004; 309 (3): 1093-1097.
158. Lippert TH, Seeger H, Mueck AO. Metabolism of endogenous estrogens. In: Oettel M, Schillinger E, editors. Estrogens and antiestrogens—handbook of experimental pharmacology. Berlin: Springer Verlag; 1999. p. 243–71.
159. Mooberry SL. New insights into 2-methoxyestradiol, a promising antiangiogenic and antitumor agent. *Curr Opin in Oncol* 2003;15:425–30.
160. Kim NY, Pae HO, Kim YC, Choi CK, Rim JS, Lee HS, Kim YM, Chung HT: Pentoxifylline potentiates nitric oxide production in interleukin-1 β -stimulated vascular smooth muscle cells through cyclic AMP-dependent protein kinase A pathway. *Gen Pharmacol.* 2002; 35 (4): 205–211.
161. Mooberry, S.L. Mechanism of action of 2-methoxyestradiol: New developments. *Drug Resistance Updates.* 2003; 6: 355-361.
162. Becker, C.M., Rohwer, N., Funakoshi, T., et al. 2-methoxyestradiol inhibits hypoxia-inducible factor-1 α and suppresses growth of lesions in a Mouse model of endometriosis. *Am. J. Pathol.* 2008; 172 (2): 534-544.

163. Wu C., Hu Q., Chen J., et al. Inhibiting HIF-1 α by 2ME2 ameliorates early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013; 437: 469–474
164. Ip EY, Giza CC, Griesbach GS, Hovda DA. Effects of enriched environment and fluid percussion injury on dendritic arborization within the cerebral cortex of the developing rat. *J Neurotrauma* 2002; 19: 573-85.
165. Chen S, Pickard JD, Harris NG. Time course of cellular pathology after controlled cortical impact injury. *Exp Neurol*. 2003; 182: 87-102.
166. Albert-Weissenberger C, Sirén AL. Experimental traumatic brain injury. *Exp Transl Stroke Med*. 2010; 13: 16
167. Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg*. 1994; 80(2): 291–300.
168. Thal C.S., Wyschkon S., Pieter D., Engelhard K., Werner C. Selection of endogenous control genes for normalization of gene expression analysis after experimental brain trauma in mice. *J. Neurotrauma*. 2008; 25: 785-794
169. Ricker JL, Chen Z, Yang XP, Pribluda VS, Swartz GM, Van Waes C. 2-methoxyestradiol inhibits hypoxia-inducible factor 1 α , tumor growth, and angiogenesis and augments paclitaxel efficacy in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004; 10:8665-73
170. Sashindranath M, Sales E, Daglas M, Freeman R, Samson AL, Cops EJ. The tissue-type plasminogen activator-plasminogen activator inhibitor 1 complex promotes neurovascular injury in brain trauma: evidence from mice and humans. *Brain*. 2012;135: 3251-64
171. Helmy A, De Simoni MG, Guilfoyle MR, Carpenter KL, Hutchinson PJ. Cytokines and innate inflammation in the pathogenesis of human traumatic brain injury. *Prog Neurobiol*. 2011 Nov;95(3):352-72
172. Goodman J, Robertson C.S, Grossman R.G, Narayan R.K. Elevation of tumor necrosis factor in head injury. *J. Neuroimmunol*. 1990; 30: 213-217.

173. Knoblach S.M, Fan L, Faden A.I. Early neuronal expression of tumor necrosis factor- α after experimental brain injury contributes to neurological impairment. *J. Neuroimmunol.* 1999; 95: 115-125.
174. Corletto, F., Beech, J., Skepper, J., Menon, D. Characterization of expression of hypoxia inducible factor 1 α in a rat model of traumatic brain injury. *J. Neurotrauma.* 2009; 26: A39.
175. Marbacher S, Fandino J, Kitchen ND: Standard intracranial in vivo animal models of delayed cerebral vasospasm. *Br J Neurosurg.* 2010; 24: 415-434.
176. Evans SM, Pinto Pereira LM, Addae JJ: Neuroprotection by caffeine and pentoxifylline during experimental cerebral ischaemia. *West Indian Med J.* 1999; 48: 23-25.
177. Bruno Rde B, Marques TF, Batista TM, Lima JC, de Arruda KG, Lima PF, Santos Nda S, Cunha GM, Vitor HV, Viana GS: Pentoxifylline treatment improves neurological and neurochemical deficits in rats subjected to transient brain ischemia. *Brain Res.* 2009; 1260: 55-64.
178. Hartmann A, Tsuda Y: A controlled study on the effect of pentoxifylline and an ergot alkaloid derivative on regional cerebral blood flow in patients with chronic cerebrovascular disease. *Angiology.* 1988; 39:449-57.
179. Zhou Q, Zheng F, Hou F. Inhibition of tubulointerstitial fibrosis by pentoxifylline is associated with improvement of vascular endothelial growth factor expression. *Acta Pharmacol.* 2009; 30: 98–106.

TUTANAK

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahi Anabilim Dalı araştırma görev görevlisi Dr. Abdalbaki YÜCEER'in 06/07/2015 tarihinde yapılan "Deneysel Kafa Travması Oluşturulan Sıçanlarda Pentoksifilin ve 2-Metoksiestradiol'ün HIF-1 α , TNF- α , Apoptozis ve Telomeraz Aktivitesi ile İlişkili Genler Üzerine Etkilerinin Araştırılması" Tıpta Uzmanlık Tezi Değerlendirme Sınavında başarılı olmuştur. İş bu tutanak tarafımızca imza altına alınmıştır.

Başkan

Prof. Dr. İ. Suat ÖKTEM

Üye

Prof. Dr. Ali KURTSOY

Üye

Yrd. Doç. Dr. Mustafa ÖĞDEN