

**T. C.  
GENEL KURMAY BAŐKANLIĐI  
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ HAYDARPAŞA EĞİTİM HASTANESİ  
BEYİN ve SİNİR CERRAHİSİ SERVİSİ**

**TRAVMATİK BEYİN YARALANMASINDA  
SODYUM HYALURONATIN GLİOZİS,  
ENFLAMASYON VE ÖDEM ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Dr.Tamer TEKİN  
J. Tbp. Yzb.**

**Tıpta Uzmanlık Tezi**

**İSTANBUL  
2007**

**T. C.**  
**GENEL KURMAY BAŐKANLIĐI**  
**GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ HAYDARPAŞA EĞİTİM HASTANESİ**  
**BEYİN ve SİNİR CERRAHİSİ SERVİSİ**

**TRAVMATİK BEYİN YARALANMASINDA**  
**SODYUM HYALURONATIN GLİOZİS,**  
**ENFLAMASYON VE ÖDEM ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Dr.Tamer TEKİN**  
**J. Tbp. Yzb.**

Gülhane Askeri Tıp Akademisi  
Haydarpaşa Eğitim Hastanesi'nin Beyin ve Sinir Cerrahisi Programı  
için ÖngördüĐü  
**UZMANLIK TEZİ**  
olarak hazırlanmıŐtır.

**TEZ DANIŞMANI**  
**Ahmet ÇOLAK**  
**Doç. Tbp. Kd. Alb.**

**İSTANBUL**  
**2007**

GATA Askeri Tıp Fakültesi Dekanlığına :  
" **Travmatik beyin yaralanmasında sodyum hyaluronatın gliozis, enflamasyon ve ödem üzerine etkileri** " konulu bu çalışma jürimiz tarafından GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Beyin Cerrahisi Servisi Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Doç. Tbp. Kd. Alb. Ahmet ÇOLAK

Üye : Prof. Tbp. Kd. Alb. Mehmet Nusret DEMİRCAN

Üye : Prof. Tbp. Kd Alb. Mehmet SARAÇOĞLU

Üye : Prof. Tbp. Kd. Alb. Kaan ERLER

Üye : Prof. Tbp. Kd. Alb. Engin GÖNÜL

ONAY:

J. Tbp. Yzb. Tamer TEKİN' in 15/ 10/ 2007 tarihinde savunduğu bu tez Akademi Kurulu' nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür ve kabul edilmiştir.

Mehmet Zeki BAYRAKTAR  
Prof. Tbp. Tümgeneral  
GATA K. Bil. Yrd.  
Askeri Tıp Fak. Dekanı ve  
Eğitim Hastanesi Baştabibi

## TEŞEKKÜR

*Asistanlık eğitimim süresince; gerek tıbbi, gerekse hayata dair, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, ilgisini, sabrını ve desteğini esirgemeyen başta klinik şefim Prof. Tbp. Kd. Alb. Mehmet Nusret DEMİRCAN olmak üzere, öğretim üyelerimizden Doç. Tbp. Kd. Alb. Ahmet ÇOLAK'a, Doç. Tbp. Kd. Alb. Murat KUTLAY' a, diğer uzmanlar, asistan arkadaşlarım, klinik hemşireleri, çalışanlarına sonsuz şükran duygularımı ve teşekkürlerimi sunarım.*

*Tez çalışmamın gerçekleştirilmesi sırasında emeği geçen ve bana yardımlarını esirgemeyen GATA HEH Biyokimya Kliniği öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Tbp. Bnb. Osman İPLİKÇİOĞLU' na, Yrd. Doç. Tbp. Kd. Yzb. Ömer ÖZCAN' a ve asistanlarına; Ankara GATA Patoloji A.B.D Tbp. Yzb. Armağan Güler' e; Ankara GATA Araştırma ve Geliştirme Laboratuvarı Cerrahi Bölümü Şefi Uzm. Vet. Alb. Tayfun İde'ye, şu anda orada görev yapan Uzm. Vet. Atğm. arkadaşlara ve tüm personeline teşekkürlerimi sunarım.*

*Asistanlık eğitimim ve tez sürecinde, her zaman olduğu gibi bana sonsuz desteğini veren, hayat arkadaşım sevgili eşime; beni yetiştiren aileme sonsuz teşekkürler.*

*J.Tbp.Yzb.Tamer TEKİN*

## ÖZET

### **Travmatik Beyin Yaralanmasında Sodyum Hyaluronatın Gliozis, Enflamasyon ve Ödem Üzerine Etkileri**

**Amaç:** Gliozisin santral sinir sistemi yaralanmalarında nöronal iyileşmeyi inhibe ettiği bugün net olarak anlaşılmıştır. Ancak azaltılması ya da önlenmesine yönelik bir çok çalışma yapılmış olmasına rağmen henüz başarılı tedavi stratejileri belirlenememiştir. Bu çalışma, travmatik beyin yaralanmasında sodyum hyaluronatın (NaHA) gliozis, enflamasyon, ödem üzerine etkilerini araştırmak ve gliozisi önlemek amacıyla yapılmıştır.

**Materyal Metod:** Çalışmada toplam 32 sıçan kullanıldı. Deneyde sıçanlar öncelikle süre olarak erken ve geç olarak ikiye ayrıldılar. Daha sonra bu iki grup kendi içerisinde NaHA ve kontrol grubu üzere ayrıldı. Her biri 8 sıçandan oluşan dört grup oluşturuldu. Tüm deneklere sağ koronal sütür önünde olmak üzere drillenerek kraniektomi yapıldı. Sağ frontal lobdan 3 mm<sup>3</sup> lük beyin dokusu eksize edildi. Oluşan loja NaHA, ya da % 0,9'luk serum fizyolojik uygulandı. Erken gruba 24. saatte, geç gruba ise 1 ay sonra ötanazi uygulandı. Her bir deneğin beyin dokusunda myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi, beyin su içeriği ve beyin elektrolit tayini, histopatolojik incelemeler yapıldı. **Bulgular:** NaHA grubunda kontrol grubuna göre erken ve geç dönemde düşük MPO aktivitesi belirlendi. NaHA grubunda kontrol grubuna göre geç dönemde astrosit sayısının daha az olduğu tespit edildi. NaHA grubunda kontrole göre gliozis kalınlığının daha az olduğu görüldü. **Sonuç:** NaHA travmatik beyin yaralanmalarından sonra ya da cerrahi girişim sonrası enflamasyonu ve gliozisi azaltıcı etkilerinden tedavi ajanı olarak faydalanılabilir bir biyomateryaldir. Ancak bu materyalle ilgili bu konuda daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler :** Sodyum hyaluronat, Gliozis, Travmatik Beyin Yaralanması

**Yazar Adı :** Dr. Tamer TEKİN

**Danışman :** Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK

## SUMMARY

### Effects of Sodium Hyaluronate on Gliosis, Inflammation and Edema in Traumatic Brain Injuries

**Aim:** Today it is proven that gliosis inhibits neuronal improvement in CNS. Although there are a lot of studies about how to decrease and inhibit gliosis, a successful treatment strategies could not be determined yet. This study was performed to assess the effects of sodium hyaluronate on gliosis inflammation and edema. **Materials and Methods:** 32 rats were used totally. They were divided into 2 groups in terms of time periods as early and late. Those were separated as NaHA and control group too. 4 groups were formed each containing 8 rats. All rats were craniectomied in front of coronal suture at right. 3 mm<sup>3</sup> brain tissue was excised from right frontal lobe. The rats were injected NaHA or %0.9 serum physiologic in brain cavity. Early group were euthanasied after 24 hours and late group were euthanasied after 1 months. MPO activity, brain water contents, brain ion contents and histopathology were investigated in every brain tissue. **Results:** Comparing control group, low MPO activity was observed for NaHA group in early and late period. It is determined that the number of astrocyts in NaHA group were fewer than in control group in late time period. Also, the thickness of gliosis in NaHA group was less than control group. **Conclusion:** NaHA is a beneficial biomaterial to use after traumatic brain injuries and operations because of the reducing effects on gliosis and inflammation. However, the more extended studies are needed about this biomaterial.

**Key Words :** Sodium Hyaluronate, Gliosis, Traumatic Brain Injuries

**Author :** Dr. Tamer TEKİN

**Counselor :** Dr. Ahmet Çolak

# İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ONAY SAYFASI .....	i
TEŞEKKÜR .....	ii
ÖZET .....	iii
İNGİLİZCE ÖZET .....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	vi
RESİMLER .....	vii
TABLolar.....	viii
1. GİRİŞ ve AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1.Beyin yaralanmasının fizyopatolojisi .....	4
2.1.1. Hücre sel cevap .....	4
2.1.2. Enflamatuvar cevap .....	6
2.1.3. İyon dengesi .....	7
2.2.Yaralanma sonrası glial skar ve nöronal iyileşme .....	8
2.2.1. Glial skar ve akson rejenerasyonu .....	8
2.2.2. Rejenerasyonu inhibe eden hücre tipleri .....	9
2.2.3. Santral sinir sistemi yaralanmasında inhibitör moleküller .....	11
3. MATERYAL METOD .....	15
3.1. MR görüntüleme .....	19
3.2. Histopatolojik inceleme .....	19
3.3. Biyokimyasal inceleme .....	20
3.3.1 ELİSA yöntemi ile myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ölçümü .....	20
3.3.2 Beyin iyon içeriği .....	20
3.3.3 Beyin su içeriğinin tayini .....	21
3.4. İstatistiksel analiz .....	23
4. BULGULAR .....	24
4.1. Myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi değişiklikleri .....	24
4.2. Beyin su içeriği değişiklikleri .....	24
4.3. Beyin elektrolit değişiklikleri .....	25
4.4. Histopatolojik değişiklikler .....	27
4.5. MRG bulguları .....	30
5. TARTIŞMA .....	32
6. SONUÇ .....	37
7. KAYNAKLAR .....	38

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>CS</b>	: Kondroitin sülfat
<b>CNS</b>	: Central nervous system
<b>ELAM</b>	: Endotelyal lökosit adezyon molekülü
<b>ELISA</b>	: Enzyme linked immunosorbent assay
<b>FGF</b>	: Fibroblast büyüme faktörü
<b>GFAP</b>	: Glial fibriler asidik protein
<b>HA</b>	: Hyaluronik asit
<b>ICAM</b>	: Hücreler arası adezyon molekülü
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>IN</b>	: Nogo bloker antikor
<b>GATA</b>	: Gülhane Askeri Tıp Akademisi
<b>KS-PG</b>	: Kondroitin sülfat proteoglikanları
<b>MAG</b>	: Myelin ilişkili glikoprotein
<b>MPO</b>	: Myeloperoksidaz
<b>MRG</b>	: Magnetik rezonans görüntüleme
<b>NaHA</b>	: Sodyum hyaluronat
<b>N-CAM</b>	: Nöral hücre adezyon molekülü
<b>NI</b>	: Nörit büyüme inhibitörü
<b>PDGF</b>	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
<b>SSS</b>	: Santral sinir sistemi
<b>TAG</b>	: Geçici aksonal glikoprotein
<b>TGF</b>	: Transforming büyüme faktörü
<b>TNF</b>	: Tümör nekrozis faktör

## RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
1. Çalışmada kullanılan denekler ve hayvan barınakları görülüyor.....	15
2. Genel anestezi uygulandıktan sonra deneği operasyon masasına sabitlendiği ön hazırlık aşaması görülmekte. ....	17
3. Operasyon masasında deneğin opere olacak bölgesi povidon iyotla temizlendikten sonra steril bir örtüyle örtülüp cerrahi aletlerin operasyon için hazırlandığı görülmekte.....	17
4. Orta hat cilt insizyonu yapıldıktan sonraki kraniumun drillenerek açılan burr hole deliği görülüyor. ....	18
5. Dekapitasyon sonrası çıkartılan deneğin beyini ve sağ frontal hemisferde oluşturulan lezyon bölgesi görülüyor.....	19
6. Lezyon bölgesinden biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler için alınan doku örnekleri görülüyor.....	20
7. Beyin dokularının hassas tartı ile ölçümü görülüyor.....	21
8. Alınan beyin dokularının hemisfer, bazal ganglion ve serebellumlarının ayrıldıktan sonraki görünüşleri .....	22
9. Alınan örneklerin dehidratasyon amacıyla otoklava bırakılmaları görülüyor. ....	22
10. Erken dönem NaHA grubu x10 büyütme (a), x40 büyütme(b) görülüyor. ....	28
11. Erken dönem kontrol grubu x10 büyütme (a), x40 büyütme(b) görülüyor .....	28
12. Geç dönem NaHA grubunda yoğun astrosit infiltrasyonu ile beraber hafif derecede gliozis görülüyor. x10 büyütme (a), x40 büyütme (b) .....	29
13. Geç dönem kontrol grubunda yoğun astrosit infiltrasyonu ile beraber ileri derecede artmış gliozis ve vaskülarizasyonda artma görülüyor. x10 büyütme (a), x40 büyütme (b).....	29
14. Koronal kesitli MR görüntülerinde (a) erken dönem NaHA grubundan, (b) erken dönem kontrol grubundan örnek kesitler.....	30
15. Koronal kesitli MR görüntülerinde (a) geç dönem NaHA grubundan, (b) geç dönem kontrol grubundan örnek kesitler.....	31

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
1. Aşağıdaki tabloda gruplara göre sıçan dağılımları gör÷lmektedir. (n= sıçan sayısı).....	16
2. MPO aktivitesi değişiklikleri.....	24
3. Beyindeki su oranı değişiklikleri .....	25
4. Erken dönem gruplarında beyindeki elektrolit değişiklikleri .....	26
5. Geç dönem gruplarında beyindeki elektrolit değişiklikleri.....	26
6. Gruplara göre astrosit, makrofaj, damar sayıları .....	27
7. Geç Dönem Gliosis Dokusu Kalınlıkları .....	27
8. Lezyon hacimlerinin mm <sup>3</sup> olarak değerlendirilmesi .....	31

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Travmatik beyin yaralanmaları çocuklarda ve erişkinlerde sık karşılaşılan durumlardan birisidir (1). Bu yaralanmaların bir kısmı nöronal rejenerasyon ve fonksiyonel iyileşme olmaması nedeni ile hayat boyu kalıcı sekeller oluşturmaktadırlar. Bununla birlikte hastane tedavi ve bakım masrafları, iş gücü kaybı ile maddi olarak ülke ekonomisine büyük bir yük getirmektedir. Bu sorunları aşmak için yüzyıl gibi uzun bir süredir araştırmacıların kontrollü deneysel hayvan modelleri oluşturarak yaptıkları çalışmalar, travmatik beyin yaralanmalarındaki hücresel ve moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına yardımcı olmuştur (2). Buradan elde edilen değerli bilgiler klinik uygulamalardaki hasta takibinde ve tedavi stratejilerinin belirlenmesinde bize yardımcı olmuştur.

Travmatik beyin yaralanması, hücresel düzeyde nöronal ölüm; mikroglyal, astrositik aktivasyon; enflamatuar cevaba neden olmaktadır. Yaralanma sonrası gelişen en son süreç ise glial skar oluşumudur. Astrosit, mikroglyal, meningeal hücreler ve oligodendrosit prokürsörleri enflamatuar süreçte farklı zamanlarda, farklı görevler üstlenerek glial skar formasyonunun oluşmasına yardımcı olurlar (15).

Glial skar oluşumu nörolojik bilimlerin sürekli dikkatini çekmiş bir konudur. Şu ana kadar, glial skarla ilgili birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, açıklığa kavuşmayan birçok soru vardır. Henüz bu konuda tatmin edici bilgi edinilememiştir.

Hyaluronik asit (HA), ilk kez 1934 yılında gözün vitröz humor sıvısında bulunmuştur (40). 1964 yılında ise in vitro olarak sentezlenebilmiştir (40). Temelde, iki şeker ünitesi olan glukronik asit ve N-asetil glukozaminin 30.000' in üzerinde tekrarı ile polimerize olan bir makro moleküldür. Sodyum hyaluronat (NaHA) ise HA' e sodyumun eklenmesiyle üretilmiştir. HA ekstrasellüler matriks komponentinin en büyük kısmını oluşturur. Başlıca cilt, kartilaj, beyinde bulunmak üzere tüm dokularda bulunur. Jel olarak üretilir. Suda çözünebilir. Jelin viskozitesi zincir uzunluğuna bağlıdır (40). Doku hidrasyonu, proteoglikan organizasyonu, embriyonun gelişmesi, hücre farklı-

laşması, hücre hareketi gibi birçok konuda ve biyolojik olaylarda rol alır. Hücre adezyon ve motilitesi düzenlenmesinde, hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonuna aracılık eder (38,39,40,41). Enflamatuvar süreçte özellikle hücre adezyon, migrasyon ve invazyonunda CD44 molekülü ile sürekli bir etkileşim halindedir (41). Bu özelliği HA'in fiziksel ve kimyasal özellikleri ile bağlantılı olup, değişik membran reseptörleri ile etkileşime girmesine bağlıdır. Kendine özgü makromoleküler yapısı olan HA, su ve diğer ekstrasellüler matriksteki makro moleküller ile etkileşebilmektedir. Su dengesi, yağlama, viskozite, matriks düzenlemesi vb. gibi olaylar HA ile bağlantılıdır. Özellikle hem kartilaj hem de sinovyal sıvı içeren osteoartiküler eklemlerde HA'in önemli bir görevi vardır. HA solüsyonlarının, kendine özgü reolojik yapısı, vitröz humor ve sinovyal sıvının viskoelastik davranışlarından sorumludur (41). Fetal yaranın skarsız iyileşmesi üzerinde yapılan bir çalışmada, HA seviyelerinde yükselme tespit edilmiştir. Skarsız iyileşmede rol oynadığı düşünülmektedir (42).

Yukarıda bahsettiğimiz özelliklere sahip olmasından dolayı, günümüzde farklı birçok klinikte değişik amaçlarla kullanılmaktadır. Göz ameliyatlarında, cerrahi sırasında korneanın kurummasının önlenmesinde, fakoemülsikasyon sonrası, trabekülektomiye takiben ön kamara tedavisinde ve gözyaşı kuruluşunda kullanılır (43,44,45). Plastik cerrahide, yaygın olmakla birlikte meme cerrahisinde dolgu maddesi olarak kullanımı ile ilgili çalışmalar vardır (46). Dermatologlar ya da kozmetiklerle uğraşanlar cilt dolgu maddesi olarak, enjeksiyon yoluyla ya da losyon şeklinde gençleştirmek amaçlı kullanılmaktadırlar (47). Ortopedik cerrahide, osteoartritte intraartiküler enjeksiyonla kayganlaştırıcı ve antienflamatuvar özelliklerinden yararlanılmaktadır (48). Ayrıca son yıllarda yara iyileşmesinde hızlanma, postoperatif cerrahi skarların önlenmesinde nöroşirurji alanında ise laminektomi sonrası skarın önlenmesiyle ilgili çalışmalar vardır (49). Bu yönüyle araştırmacıların dikkatini çekmektedir.

Biz de çalışmamızda NaHA' ın bu özelliklerinden yola çıkarak travmatik beyin yaralanmasından sonra gliozis, inflamasyon, ödem üzerine etkilerini araştırdık.

Bu çalışmada, sıçan beyinde travmatik yaralanma oluşturularak sodyum hyaluronatın gliosis, inflamasyon ve ödem üzerine etkileri araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Beyin Yaralanmasının Fizyopatolojisi

#### 2.1.1 *Hücresel Cevap*

Santral sinir sistemi (SSS) yaralanması birkaç gün içerisinde yavaş yavaş gelişen hücresel ve moleküler olaylar dizisiyle başlar.

*Mikroglia/Makrofajlar:* Normal beyinde mikroglialar sessiz durumdadırlar. Fakat yaralanmayı takiben aktivasyon, hücre bölünmesi, yara bölgesine göç gibi çeşitli davranışlar gösterirler (16). Yaralanmadan kısa bir süre sonra da zamanla makrofaj gibi davranış gösteren mikroglia hücreleri akın ederler. Özellikle tüm spinal yaralanmalarda vasküler yaralanma olması nedeni ile bu bölgede kandan yoğun bir makrofaj geçişi olur. Mikroglia/makrofaj hücrelerinin haftalarca yaralanma bölgesinde çeşitli aşamalarda sayıca artışı sürekli devam eder (15).

*Oligodendrositler:* Dejenere olmuş akson varlığında dejenere olmuş myelin de vardır. SSS yaralanmasında myelin kılıfının direkt travmaya uğraması myelin artıklarının aniden ortaya çıkmasına yol açar. Bu artıklar mikroglialar tarafından yavaş yavaş ortadan kaldırılır. Bu birkaç hafta sürer. Oligodendrositlerin bir kısmı ölmesine rağmen; bir kısmı yaşar ve bu yüzden glial skarlar bazen oligodendrositleri, bazen de myelin debrislerini içerirler (15,17).

*Meningeal Hücreler:* Beyin ya da spinal korddaki meningeal yüzeyde herhangi bir penetran yaralanma hızlı bir şekilde meningeal hücrelerin göçüne yol açar. Bu hücreler SSS' ni çevreleyen glia sınırlarının yeniden yapılandırılmasında astrositlerle ilişkili olarak bir bölümünde rol oynar (18). Ayrıca SSS' de ana damarların çevresinde meningeal hücrelere benzer hücreler de vardır. SSS yaralanmasındaki rolleri açıkça belli değildir (15).

*Astrositler:* Gliosis, astrositlerin ördüğü sık bir ağ örtüsünden oluşur. Bu ağ örtüsü sıkı ve aralıklı bağlantılarla astrositlerce sınırlandırılır. Normal beyinde gri cevherde klasik bir morfolojiye sahip astrositler, kan damarlarıyla doğrudan temas halindedirler. Hücrelerinin bir bölümüyle, nöronal hücre göv-

delerinin çevresinde, onlarla sıkı bir ağ ilişkisi içerisindedirler. Yaralanmadan sonra meydana gelen ilk olay astrositleri de içeren hücre ölümüdür. Bu olay başlangıçta yıkıma uğrayan bölgenin mekanik olarak kendi kendini sınırlandırmasına yol açar. Fakat birkaç gün sonra lezyon genişlemeye başlar (20). Yaralanma bölgesinde ortaya çıkan yaygın astrositik reaksiyonla birlikte glial asidik fibriler proteinde (GFAP) artış görülür (19,20). Glial skar formasyonuna katılan hücreler lezyona olabildiğince yakındırlar. Özellikle de lezyon bölgesini ne miktarda hücrenin dolduracağı önemlidir. Çünkü lezyon bölgesine yakın astrositlerde, intermediate filamentler, vimentin ve nestin üretilir ve salgılanır. Ayrıca astrositler; trofik faktörler, sitokinler, proteazlar, proteaz inhibitörlerini, hücre yüzey, matriks ve diğer moleküllerini üreterek gibi pek çok biyokimyasal değişiklikleri meydana getirirler (15). Astrositik cevaptan etkilenen en erken olay meningeal hücrelerin yara bölgesine invazyonudur (19,21,22). Bu alan çevresindeki astrositlerde hipertrofi meydana gelir. Mükemmel bir süreç işler ve hücreler bölünürler. Sonuç olarak hiperfilamentöz astrositler ve onların geçirdikleri bir takım süreçler sıkılaştırılmış bir form haline gelmiş predominant astrositik dokuyu ortaya çıkarır (15).

*Multipotansiyel Progenitör Hücreler:* Çoğu önbeynin periventriküler bölgesinde yerleşmiştir. Fakat spinal kordun santral kanalının çevresinde olduğu gibi SSS' in diğer bölümlerinde de bulunurlar (15). Normal beyinde bu hücrelerin ana fonksiyonu yeni nöronlar ve glial hücreler üretmek için olfaktor loba göç etmektir (15). Bu hücreler nestin salgırlarlar. Hücre yüzeylerinde de polisialize N-CAM (nöral hücre adezyon molekülü) vardır. SSS yaralanmalarında nestin görülmesi, bu maddenin progenitörlerden kaynaklanabileceği olasılığını ortaya çıkarmıştır. Yaralanma bölgesine göç etmeye başlayan periventriküler hücrelerin nestin ve GFAP salgılamaya başlaması spinal kordda gözlenebilir. (23). Bunun SSS'in diğer alanlarında olup olmadığı henüz saptanamamıştır. Ancak lezyon çevresindeki astrositlerden de yaralanmayı takiben nestin üretilir. Bu yüzden beyin yaralanmalarında nestin pozitif hücrelerin iki kaynağı vardır (24).Fakat glial skarın gelişiminde progenitörlerin ne tür bir rol oynadığı ve özellikleri henüz tanımlanamamıştır (15).

### **2.1.2. Enflamatuar Cevap**

Enflamasyon yaralanmaya karşı verilen belli başlı savunma mekanizmalarından biridir (3). Beynin enflamatuar cevabı diğer dokuların verdiği reaksiyondan anlamlı bir şekilde farklıdır. Çoğu sistemik organda sıkça meydana gelen lökosit birikimi, beyinde ılımlı ve geç olarak meydana gelir. Buna karşın, beyinde mikroglia ve inflammatuar mediatörlerin salınımı dakikalar ve saatler içerisinde olur (4). Yaralanmayı takiben kan beyin bariyerinin permeabilitesinin bozulmasıyla mononükleer fagositler, T lenfositler, doğal öldürücüler, polimorfonükleer lökositlerin geçişi ve sitokin sekresyonu meydana gelir (8,9). Ek olarak, enflamatuar süreçte CD11/CD18, ICAM-1 (hücreler arası adezyon molekülü), ELAM-1 (endotelial lökosit adezyon molekülü) ve P-selektin gibi adezyon molekülleri de yer alır (10,11,12).

Glial hücrelerin aktive olmasıyla sitokin üretimi başlar. Beyin yaralanmalarında deneysel olarak TNF $\alpha$  (tümör nekrozis faktör  $\alpha$ ) ve IL-1 $\beta$  (interlökin-1 $\beta$ ) düzeyleri yüksek olarak tespit edilmiştir (5,6,7).

Son olarak, kompleman sisteminin önemini vurgulamak gerekir. Komplemanlar yaralanma sonrası hücrelerden kemokin ve sitokin sekresyonunu sağlarlar. Başlıca komplemanlar C3a, C4a, C9 BOS'da ve plazmada tespit edilmiştir (13,14).

### **2.1.3 Apoptozis**

Travmatik beyin yaralanmasından sonra nörolojik fonksiyon kayıplarına yol açan hücre ölümü görülür. Programlanmış olarak meydana gelen bu hücre ölümü apoptozis denilmektedir (26,27,28).

Nekroz esnasında hücre şişer, mitokondri genişler, organeller çözünür, plazma membranı yırtılır. Sitoplazma materyali hücre dışına geçerek enflamasyona neden olur. Apoptozis sırasında ise plazma membranı yırtılmaz, yüksek ATP (adenozin trifosfat) seviyeleri apoptozis için gerekli olur. Hücre içi ATP seviyesi hücrenin apoptozis veya nekroz ile öleceğine yön verir (23). Bu da mitokondrinin önemini apoptozisin erken fazında göstermektedir. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir (24). Apoptozis, hücre intihar şeklidir ve

hücre kendi kendisini aktif olarak yok eder. Bu olay nükleer büzülme ve DNA fragmentasyonu ile karakterizedir (24,25,26).

#### **2.1.4 İyon Dengesi**

Sinir hücresi membranında iyon trafiği başlıca üç tip transport sistemi ile gerçekleşmektedir:

1. Aktif transport sistemi: Direkt veya indirekt olarak enerjiye (ATP) bağımlıdır. (Örn: Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPaz pompası)
2. Pasif transport sistemi: Elektrokimyasal gradientlere bağlı olarak membran kanalları aracılığı ile gerçekleşir. Enerji bağımlı değildir.
3. İyon Kanalları (İyonoforlar): Reseptör protein yapısında kanallardır (29,30).

Hücreye enerji sağlandığı sürece aktif ve pasif transport sistemleri uyum içinde çalışarak, iyon dengesini sağlamaktadırlar (30).

Sinir hücresinde iyon dengesi üç aşamada bozulmaktadır. Temel enerji eksikliğinin henüz başlamadığı *ilk dönemde*; ekstrasellüler potasyum konsantrasyonu yavaş yavaş yükselmektedir. Aynı dönemde hidrojen iyonunun bir membran katyon kanalından kısmen hücre dışına çıkması, hücre içinde birikmeye başlayan laktik asidin noniyonik difüzyon ile kısmen hücreyi terk etmesi ve karbondioksit birikimine bağlı olarak hücre dışı pH'sı düşmektedir. Bu dönemde ekstrasellüler kalsiyum henüz azalmaya başlamamıştır. *İkinci dönemde* iyon pompalarının bozulmasına bağlı olarak potasyum hızla hücreyi terk ederken sodyum, klor ve kalsiyum iyonları hücre içine alınmaktadır. Symon, potasyum atılımındaki artış ile zaten azalmış hücre enerji düzeylerinin daha fazla iyon dengesini sağlayamayacak düzeylere indiğini ve bu noktanın aynı zamanda ekstrasellüler kalsiyum düzeylerinin aniden düştüğü zamana uyduğunu göstermiştir (30). Bu, ileri enerji eksikliğinin ve membran depolarizasyonunun görüldüğü dönemdir. Depolarizasyonda pompalar devre dışı kalmaya başladıkları için iyon akışı, iyonların konsantrasyon gradiyenti yönünde basit membran deliklerinden geçişleri ile sağlanmaktadır. İyon dengesinin bozulmasının *üçüncü aşamasında* iyon pompalarının bozulmasının yanısıra hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun yükselmesine bağlı olarak, membran geçirgenliğinin artması ile ortaya çıkan iyon kaçakları oluşmaktadır.(30).

## **2.2. Yaralanma Sonrası Glial Skar ve Nöronal İyileşme**

SSS yaralanmasında genellikle reaktif gliosis ya da glial skar olarak tanımlanan bir cevap meydana gelir. Glial skar farklı hücrelerin farklı zamanlarda olaya katılması ve yaralanma bölgesine ulaşmasıyla yavaş yavaş gelişir. SSS yaralanmasında, yaralanma bölgesine ilk ulaşan hücreler kan akımından geçen makrofajlar ve çevre dokulardan göç eden mikroglialardır. Yaralanmadan sonra saatler içerisinde görülürler. 3-5 gün sonra çevre dokulardan gelen oligodendrosit prekürsörlerinde miktar olarak artma gözlenir. Eğer yaralanma meninksleri de penetre etmişse, SSS yüzeyini örtmek için göç başlar. Glial skarın son yapısı predominant astrositlerdir. Bu hücreler bölünürler ve yaralanmaya doğru yavaş yavaş göç ederler. En sonunda yaralanma bölgesindeki boş alanı doldururlar (15). Yaralanmanın kaynağı ne olursa olsun cevap kabaca aynıdır. Buna rağmen farklı tip patolojilerde (travmatik beyin yaralanması, infeksiyon, serebrovasküler olaylar, subaraknoid hemoraji vs.) bazı değişik ayrıntılar olabilir.

Sonuç olarak hücre ölümü ve yıkımı periyodundan sonraki ana tedavinin amacı nöroprotektif ve glioprotektif tedavidir. SSS yaralanması onarımında glial skar gelişiminin yerine akson rejenerasyonu ve ölen nöronların yerine yenilerinin konulması sağlamak, remyelinizasyonu indüklemek, kaçınılmaz olarak gerekli olacaktır. Glial skarın akson gelişimini ve myelinizasyonu önlediği kanıtlandıktan sonra, nasıl önlediği, hangi hücrelerin olaya katıldığı, bu oluşuma nelerin sebep olduğu, moleküler mekanizması, nasıl manipüle edilebileceğinin bilinmesinin önemi bu konuyla ilgili tüm nörolojik bilimlerin dikkatini çekmiş ve amacı haline gelmiştir (15).

### ***2.2.1 Glial Skar ve Akson Rejenerasyonu***

SSS' de akson rejenerasyonunda eksikliğin başlıca nedeni glial çevrenin doğal inhibisyonudur. Ancak buna karşın çoğu SSS aksonlarının rejenerasyon kabiliyetinin çok zayıf olduğu da hatırlanmalıdır (31,32). Bu yüzden az miktardaki bir inhibisyon bile rejenerasyonu önlemeye yeterlidir.

SSS akson yaralanmasında glial skar üretimi ve glial skar gelişimi aksonların rejenerasyonunu kaçınılmaz olarak engeller. (astroitler, oligodendrositler, oligodendrosit prekürsörleri, meningeal hücreler ve mikroglia) Beş hücre tipi de inhibitör özellikleriyle skarı oluştururlar. Muhtemelen mikroglia dışındaki hücrelerden herhangi biri aracılığıyla inhibisyon sağlanır. Ancak bu hücrelerin tamamı her zaman inhibitör değildir. Özellikle astroitlerin büyük bir bölümü esnektir ve farklı olaylar altında inhibitör ya da stimülatör olarak rol oynayıp, farklı yanıtlar verebilirler (15).

### **2.2.2 Rejenerasyonu İnhibe Eden Hücre Tipleri**

*Astroitler:* Beyin yaralanmasına karşı yanıt veren astroitler SSS parankim hacminin çoğunluğunu oluştururlar. Yaralanmaya yanıt olarak astroitik proliferasyon ve sürecin karmaşıklığı ve boyutunda artış olur. O yüzden herhangi bir SSS rejenerasyonu geniş bir astroitik çevrede meydana gelir. Glial skar, astroitlerin sıkı bir ağ örmesi ve ekstrasellüler matriks tarafından çevrelenerek birbirlerine yapışmalarıyla oluşur (15). Bu dokunun akson dejenerasyonunda son derece inhibitör olduğu yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda gösterilmiştir (15). Ancak, aksonların astroit sürecinde in vivo rejenerasyon olabildiğini gösteren çalışmalar da vardır (15). Bu fark olağandışı astroitlerin esnekliğinin SSS' de çevresel değişikliklere verdikleri inhibitör cevabın değişebileceğini gösterir. Ek olarak astroitlerin büyüme ve gelişimi için ya yaralanmamış SSS dokusu ya da serbest astroitik yüzeyin bir başka hücre tipi ile ara yüzey oluşturması gerekmektedir. Glial skar doku kültür modelinde astroitler periferik ve santral nöral tip hücrelerde akson rejenerasyonunu inhibe eder (15).

Yapılan çalışmalarda reaktif ve non-reaktif astroitlerin ürettikleri hücre yüzeyi ve ekstrasellüler matriks öge molekülleri arasındaki farklılıklar araştırılmaktadır (15). Bu moleküllerin çoğu nöron ve aksonlar üzerine etkilidir. Bu farklı tipteki moleküllerin glial skar inhibisyonundan sorumlu olabileceği açık ortadadır. Ancak şu sıralarda kondroitin sülfat proteoglikanlarının (KS-PG) en önemli inhibitör moleküller olduğu kanıtı ileri sürülmüştür (15).

İn vitro yapılan çalışmalarda astrositlerin akson rejenerasyonu inhibisyonu ve indüksiyonu yapabildiğinin kanıtlanması akılda karışıklıklara neden olmuştur (15).

*Oligodendrositler:* Son zamanlardaki yayınlarda oligodendrositlerin rejenerasyon inhibisyonunda önemli bir rol üstlendiğinden bahsedilmektedir (15). SSS' de myelinizan yollarda rejenerasyon meydana gelmez. Fakat bazı non-myelinizan yollar sınırlı rejenerasyon gücüne sahiptir (15). Erişkin sinir sistemindeki myelin de inhibitördür. Doğum sürecinde radyasyon verilerek abortus gerçekleştirilen hayvanlarda myelinizasyon öncesi oligodendrosit gelişiminde SSS yollarında bir miktar rejenerasyon görülmüştür (15). Oligodendrositlerin SSS rejenerasyonundaki inhibitör etkilerinin in vivo kanıtı IN-1(nogo bloker antikör) den gelmektedir (15). İn vitro olgun oligodendrositler ve in vivo myeline ait akson gelişimini inhibisyonu yapan en az üç molekül vardır. Bunlar NI250 (nörit büyüme inhibitörü), myelin bağımlı glikoprotein ve tenaskin-R' dır (15).

*Oligodendrosit prokürsörleri:* SSS FGF (fibroblast büyüme faktör) ve PDGF(trombosit kaynaklı büyüme faktörü) için reseptör üretimi ve bir hücre yüzey işaretçisi olan NG2 proteoglikanlarıyla işaretlenebilen küçük hücrelerin oluşturduğu bir ağ içerirler. Bu hücrelerin oligodendrositlerden morfolojik ve antijenik profil olarak farklı oldukları erişkin SSS' de gösterilmiştir (15). Fakat normal fonksiyonları tamamen anlayamamıştır. Ancak, bu hücrelerin SSS lezyonlarında yoğun bir şekilde görüldüğü de bir gerçektir. Olgun oligodendrositlerde NI250 ve myelinle ilişkili glikoprotein mediatörleri tespit edilmiştir (15). Bu hücreler akson gelişim inhibisyonu yapan versikan, DSD-1/fosfokan üretmektedirler (15).

*Mikroglia:* Mikroglia hücreleri SSS tarafından aktive edilirler. Yaralanma bölgesine göç eder ve bölünürler. Bu yüzden SSS yaralanmalarında 24 saat sonra büyük miktarlarda aktive olmuş mikroglia hücreleri görülür. Damar yaralanması meydana gelmişse, kandan geçen makrofajlar da olaya katılır (15). Bu hücreler toksik moleküller üretme yeteneğine sahiptirler. Aktive mikroglia, makrofajların çoğu özelliklerine sahiptir. Bu yüzden stimüle olduklarında serbest radikaller, nitrik oksit, araşidonik asit deriveleri ve diğer

toksik moleküller salınır (15). Son yıllarda yapılan bir çalışmada, makrofajlar tarafından üretilen toksik moleküllerin sekresyonunun mikroglialar tarafından engellendiğine dair bulgular saptanmıştır (15).

*Meningeal hücreler.* Beyin ve kord meningeal hücre tabakası tarafından çevrelenir. Benzer hücreler büyük kan damarları çevresinde de bulunmuştur. Bu hücreler astrositik glia formasyonun sınırlandırılmasında astrositlerle ilişki halindedir (15). Meningeal hücreler hızlı bir şekilde yaralanma bölgesine doğru göç ederler (15). Ayrıca göç eden meningeal hücreler astrositik reaksiyona benzer bir lokal skar dokusuna yol açarlar (15). Meningeal hücreler NG2 proteoglikanları üretebilirler (15). Fakat bu moleküle bağlı doğal inhibisyonu belirgin değildir. Ayrıca multifonksiyonel protein ve akson büyüme inhibitörü olan tenaskin de üretirler (15).

*Multipotansiyel progenitör hücreler.* Glial skarda görülen bazı nestin pozitif hücreler kök hücre kaynaklı olarak farzedilir. Nestin görülen hücrelerin, spinal kordda SSS yaralanma bölgesine doğru periventriküler bölgeden göç ettikleri tespit edildi (15). Ancak, yaralanma bölgesindeki astrositler de nestin salgırlar. Bu yüzden glial skarda ne kadar kök hücreden kaynaklanan hücrenin bulunduğu net olarak belli değildir (15). Akson rejenerasyonunda bu hücrelerin rolleri sadece spekülasyondan ibarettir.

### **2.2.3 SSS Yaralanmasında İnhibitör Moleküller**

*Myelin İlişkili Moleküller:* Yaralanmadan hemen sonra myelinizan bölgelerde MAG (myelin ilişkili glikoproteinler) ve NI250 inhibitör moleküllerini içeren myelin debrisleri ortaya çıkar. Bu debrisler SSS mikrogliya ve makrofaj hücreleri tarafından düşük fagositoz aktivitesiyle ortadan kaldırılır. Bu aktivite bir kaç ay sürebilir (15). Oligodendrositlerde hücre yüzeyinde ve matriks çevresinde tenaskin-R bulunur (15). Yaralanma sonrası NI250/nogo' da artış olur. NI250/nogo myelin yüzeyinde tanımlanır ve myelinde bulunur. SSS rejenerasyon bölgesinde SSS tamirinde anahtar bir rol oynayan IN-1 spesifik antikör blokeridir. Bu antikör çeşitli SSS yaralanmalarının tedavisinde, özellikle trofik faktörlerle kombine edildiğinde aksonal rejenerasyona ve parsiyel fonksiyonel iyileşmeye yol açar (15). Bu molekülünden son zamanlardaki yayınlarında bahsedilmektedir.

*Myelin ilişkili glikoproteinler (MAG)* : İn vitro olarak inhibitördür. Oligodendrositler üzerinde ve salınım formunda her iki şekilde de bulunur. Molekülün inhibitör tabiatı cAMP bağımlı mekanizma aracılığıyla nörotrofinler tarafından modüle edilebilir. Bu yüzden belirgin olarak SSS yaralanmalarında bulunur ve inhibitör özelliklere sahiptir (15).

*Tenaskin R*: *Tenaskin R* ekstrasellüler matrikste ve de özellikle beyaz cevherde bulunur. Oligodendrositler tarafından üretilir. SSS yaralanmasından sonra oranında artış görülür. İn vitro şartlarda tenaskin- R bazı akson tiplerini F3/11 spesifik hücre yüzey molekülü ile etkileşime girerek akson gelişiminde inhibisyon yapar. Tenaskin R' ın çeşitli proteoglikanlarla da etkileşimi mevcuttur (15).

*Kondroitin Sülfat Proteoglikanları*: Kondroitin sülfat proteoglikanları (KS-PG) SSS yaralanmasındaki ikinci majör inhibitör moleküldür. SSS yaralanmasında KS-PG salınımında artış olduğu görülür. Yaralanma bölgesinde in situ hibridizasyon ve immunokimyasal çalışmalarda bu kanıtlanmıştır. KS-PG' da gliosis bölgesinde artış saptanmış, korele olarak akson gelişiminin durduğu gözlenmiştir. Proteoglikan bariyer akson gelişimini engellemektedir. Ayrıca KS-PG akson gelişimini inhibe eden diğer inhibitör moleküllerle de etkileşim halindedir. SSS' de bulunan KS-PG molekülleri agrekan, versikan, nörokan ve brevikandır. Hepsi de yetişkin SSS' de bulunurlar. Bu inhibitörler içerisinde bir tek nörokan doğumda pik yapar ve daha sonra seviyesi yavaş yavaş düşer. Nörokan' ın tenaskin, TAG-1 (geçici aksonal glikoprotein)/aksonin-1, Ng-CAM/L1, N-CAM ile etkileşim halinde olduğu gösterilmiştir (15). Ng-CAM/L1 akson gelişiminin inhibisyonuna aracılık eder. Brevikan'ın serebellar granül nöronlarında akson gelişimi inhibisyonu yaptığı gösterilmiştir (15). Versikan nöral krest göçüne yardımcı olabilir (15). Ancak akson gelişiminde inhibisyon kanıtı yoktur (15). Diğer bir molekül DSD1/fosfokan 'dır. DSD1 'in sadece hipokampal nöronlarda, fosfokanın ise kontaktin N-CAM, Ng-CAM/L1, TAG-1/aksonin-1, and tenaskin ile etkileşerek akson gelişimi inhibisyonu yaptığı gözlenmiştir (15). NG2 molekülü de bir KS-PG' ıdır. Oligodendrositler ve oligodendrosit prokürsör hücrelerde bulunmasına karşın, spinal kord yaralanmalarında astrositler tarafından da salınır.

Sensoriyal, serebellar ve kortikal aksonlarda gelişim inhibisyonuna neden olabilir (15).

*DSD-1/fosfokan:* Yapılan çeşitli deneysel çalışmalarda SSS yaralanmasında DSD-1 ya da fosfokanın seviyelerinde yükselme görülmüştür (15). Fosfokan hücre yüzey molekülleriyle etkileşime girerek akson gelişiminde inhibisyona yol açar. Salınım SSS yaralanmalarında artan transforming growth faktör b (TGF-b) ile birlikte seviyelerinde artış görülür (15).

*Nörokan:* Tenaskin, TAG-1/aksonin-1, Ng-CAM/L1, N-CAM molekülleriyle etkileşime girerek akson gelişiminde inhibisyon yapar. SSS'de normalde en sık bulunduğu yer beyaz cevherdir. Çoğunluğu astrositlerden üretilir (15).

*Versikan:* SSS' de beyaz cevherde bulunur. İn vitro çalışmalarda oligodendrosit hücreler tarafından üretildiği gösterilmiştir. Yaralanmalarda seviyelerinde artış olur (15). Akson rejenerasyonunda inhibisyona yol açtığı gözlenmemiştir (15).

*Brevikan:* Embriyoya benzer olarak yetişkin beyninde seviyelerinde artış görülen bir proteoglikandır. SSS' de yaygın olarak bulunur. Astrositler tarafından üretilir. Serebellar granüler nöronlara yapışır ve akson gelişimini inhibe eder (15).

*NG2:* SSS yaralanmasından yaklaşık 4 gün sonra bu immünoreaktif hücrelerde büyük miktarlarda artış olur. Bu hücreler oligodendrosit prokürsörleri olabilir. Buna ek olarak spinal kord yaralanmalarında astrositlerde NG2 salınımı görülür (34,35). NG2 sensoriyal ve serebellar aksonların her ikisinin de gelişimini inhibe eder (15).

*Biglikan ve dekorin:* Her ikisinde de SSS yaralanmasında özellikle de gliyal hücrelerde artış olur (15). Dekorin akson gelişiminde etkilidir ve inhibitör değildir (15).

*CS56 (kondroitin sülfat 56) antijeni:* SSS yaralanmalarında KS-PG ile immünoreaksiyona girerek seviyelerinde artış olur (15).

#### *Gliyal Skardaki Diğer Moleküller:*

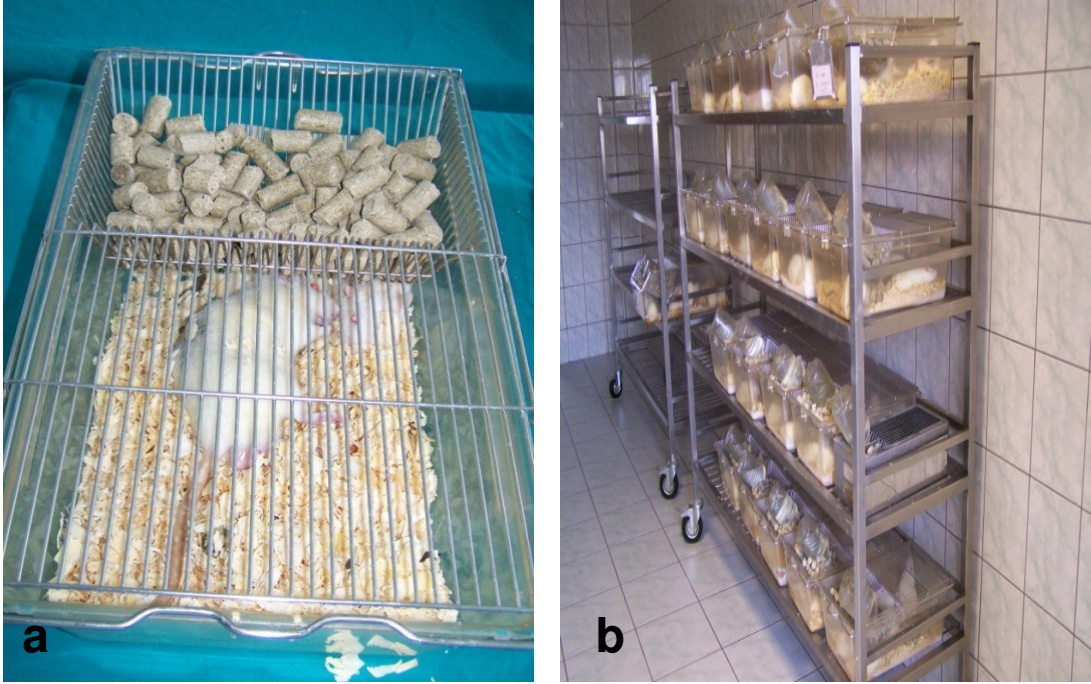
*Tenaskin:* SSS yaralanmalarında yükselen kompleks bir moleküldür. Astrosit ve meningeal hücrelerle ilişkilidir. Bu kompleks özelliklerinden dolayı bazı aksonlarda yüksek derecede inhibisyona sahiptir (15).

*CD44*: Astrositler üzerinde bulunan bir glikoproteindir. Akson gelişim inhibisyonu yaptığı gösterilmesine karşın yaralanma sırasında seviyelerinde artış olup olmadığı bilinmemektedir (15,36,37).

### 3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Ankara GATA Etik Kurulu'ndan 02.Mart.2007 tarihli ve 07/14 sayılı deneysel çalışma için onay belgesiyle Ankara GATA Araştırma ve Geliştirme Hayvan Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada 32 adet ağırlıkları 350-400 gr. arasında değişen erkek Wistar Albino sıçan kullanıldı (Resim 1.1).



**Resim 1 (a, b).** Çalışmada kullanılan denekler ve hayvan barınakları görülüyor.

Sıçanlar randomize sekizerli dört eşit gruba ayrıldılar (Tablo 1).

- 1.Grup: Erken Dönem Kontrol Grubu
- 2.Grup: Erken Dönem NaHA Grubu
- 3.Grup: Geç Dönem Kontrol Grubu
- 4.Grup: Geç Dönem NaHA Grubu

**Tablo 1.** Aşağıdaki tabloda gruplara göre sıçan dağılımları görülmektedir. (n= sıçan sayısı)

	Na HA grubu	Kontrol Grubu
<b>1.Erken Dönem</b>	n=8	n=8
<b>2.Geç Dönem</b>	n=8	n=8
<b>Toplam n= 32</b>	<b>n=16</b>	<b>n=16</b>

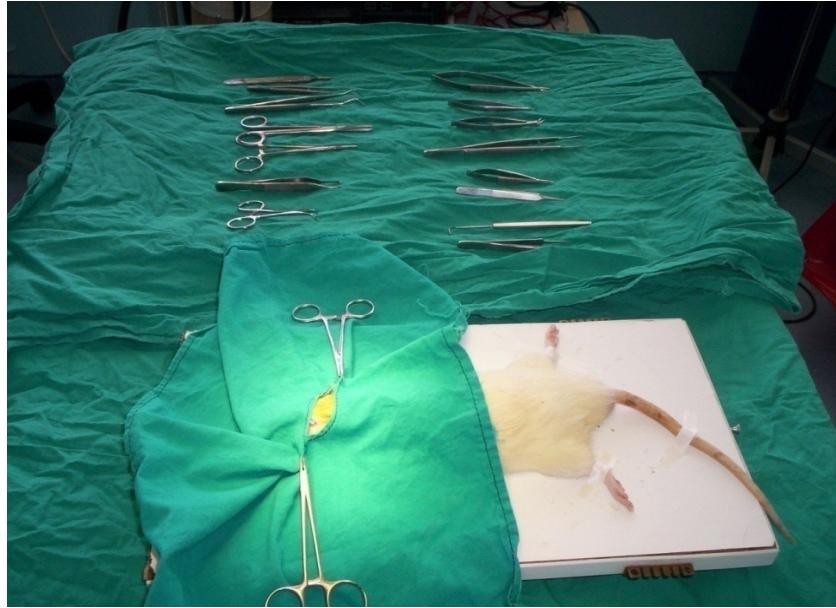
Operasyondan bir gün önce sıçanların kranial bölgeleri traş edildi. Cerrahide kullanılacak aletler bir gece önce buharlı otoklavda 134 C<sup>o</sup> 'de sterilize edildi. Prone pozisyonda fikse edilen her sıçan intramüsküler olarak verilen 60 mg/kg ketamine hidroklorür (Ketalar, Parke-Davis. Eczacıbaşı, İstanbul) ve 9 mg/kg Xylazine (Rompun, Bayer. İstanbul) ile genel anestezi altında cerrahiye alındı (Resim 2). Cerrahi başlangıcında insizyonun yapılacağı saha povidon iodin ile temizlendi ve steril örtü ile örtüldü (Resim 3). 2.0 cm.lik kranial orta hat sagittal cilt insizyonu yapıldı. Periosteum sıyrıldıktan sonra sağda koronal sütürün önünde ve orta hattın 1 cm. lateralinde frontal kemikte elektrikli drill (14000 devirli) ile 5 mm. çapında kraniektomi yapıldı (Resim 4). 3 mm. çaplı disposable biyopsi punch ( Plasti-med, Germany ) ile sağ frontal bölgedeki beyin korteksinden 3 mm<sup>3</sup> lük beyin dokusu eksize edildi (Resim 5). Kanama kotonoid pediler ve serum fizyolojik ile kontrol edildikten sonra operasyon lojunun herbirine 0,3 cc. olacak şekilde,

1. ve 3. gruptakilere (Kontrol Grupları) (n=8) %0,9 'luk serum fizyolojik
2. ve 4. gruptakilere (NaHA Grupları) (n=8) NaHA (Acri. BioVisc plus 1,2 ml., % 1,8 sodyum hyaluronat, Acri. Tec, Almanya) uygulandı.

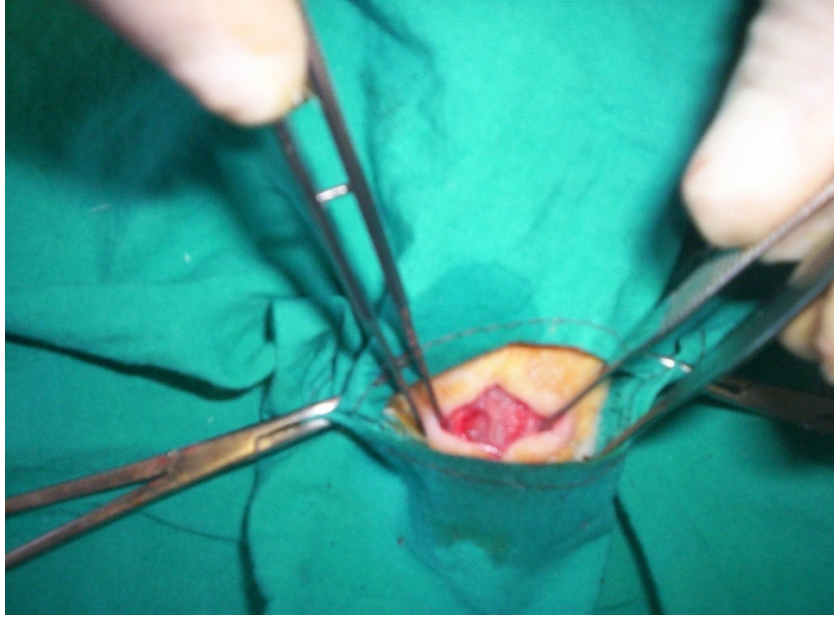
Dura kapatılmadan cilt 4/0 absorbable sütür (Sentesorb, polyglycolic acid braided violet, Boz, Türkiye) ile anatomisine uygun bir şekilde kapatıldı. Sıçanlar normal oda şartlarında spontan olarak uyandılar. Uygun ortam ısısının sağlandığı ısıtılmış bölümde her biri kafeslerine konarak standart fare yemi ile su ve yiyecek kısıtlaması yapılmadan beslendiler.



**Resim 2.** Genel anestezi uygulandıktan sonra deneğin operasyon masasına sabitlendiği ön hazırlık aşaması görülmekte.



**Resim 3.** Operasyon masasında deneğin opere olacak bölgesi povidon iyotla temizlendikten sonra steril bir örtüyle örtülüp cerrahi aletlerin operasyon için hazırlandığı görülmekte.



**Resim 4.** Orta hat cilt insizyonu yapıldıktan sonraki kraniumun drillenerek açılan burr hole deliği görülüyor.

**1.ve 2. Grup: Erken Dönem (Kontrol grubu n=8, NaHA grubu n=8)**

Operasyondan 24 saat sonra intramüsküler sedasyonla kranial MR tetkiki yapıldı. Ardından sıçanlar genel anesteziye alınıp, dekapitasyonla ötanazi yapıldı. Sıçanların beyinleri çıkartılıp akut dönem sonuçlarını değerlendirmek amacıyla histopatolojik örnekler %10 formalin ile fikse edilerek kasetlere konuldu. Biyokimyasal örnekler daha sonra çalışılmak üzere  $-80C^0$  derin dondurucuda saklandı (Resim 5 ve 6). Beyin su içeriği tayini yapıldı.

**3. ve 4. Grup: Geç Dönem (Kontrol grubu n=8, NaHA grubu n=8)**

Operasyondan bir ay sonra deneklere yine aynı şekilde genel anesteziye alınıp, dekapitasyonla ötanazi uygulandı. Sıçanların beyinleri çıkartılıp geç dönem sonuçlarını değerlendirmek amacıyla histopatolojik örnekler %10 formalin ile fikse edilerek kasetlere konuldu. Biyokimyasal örnekler daha sonra çalışılmak üzere  $-80C^0$  derin dondurucuda saklandı (Resim 5 ve 6). Beyin su içeriği tayini yapıldı.



**Resim 5.** Dekapitasyon sonrası çıkartılan deneğin beyini ve sağ frontal hemisferde oluşturulan lezyon bölgesi görülüyor.

### **3.1 MR Görüntüleme**

Erken ve geç dönemdeki tüm sıçanlara Ankara GATA Radyoloji Servisinde operasyon sonrası MR görüntülemesi yapıldı. Görüntüleme sonrasında lezyon bölgesinin mm<sup>3</sup> olarak hacmi hesaplandı. Tüm veriler istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

### **3.2 Histopatolojik İnceleme**

Bu çalışmalar Ankara GATA Patoloji A.B.D tarafından yürütülmüştür. Alınan doku örnekleri % 10'luk formaldehit çözeltisi içine konduktan sonra kasetlendi ve doku takip cihazına yerleştirildi. Bu aşamadan sonra fiksasyon için formolden geçirildi ve dereceli alkol ile dehidrate edildi. Ksilen aşamasından sonra parafinden geçirildi. Parafin bloklar haline getirilen doku örnekleri dondurulduktan sonra mikrotom ile 5 mikrometre kalınlığında kesildi ve etüvde 60 derecede 3 kez ksilen ile deparafinize edildi. Dereceli alkolde rehidrate edilen doku örnekleri su ile yıkandı ve Hemotoksilen-Eosin ile boyandı. Işık mikroskopu altında X10 ve X40 büyütmede incelenen doku örneklerinin

morfometrik analizi yapıldı. Tüm grupların X10 ve X40 büyütmede digital fotoğrafları çekildi ve bilgisayar ortamına aktarıldı.



**Resim 6.** Lezyon bölgesinden biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler için alınan doku örnekleri görülüyor.

### **3.3 Biyokimyasal İnceleme**

**3.3.1 ELİSA yöntemi ile myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ölçümü:** Hastanemiz biyokimya laboratuvarında dokulardaki nötrofil infiltrasyonunun bir göstergesi olan MPO aktivitesi ölçümü için dokulardan alınan örnekler 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM tris, 1mM glisin, 1µg/ml löpeptid ve 28 µg/ml aprotinin (pH 7.4) olarak hazırlandıktan sonra lizis solüsyonuyla 10 mg. 'a 200 µl. lizis tamponuyla doku homojenize edildikten sonra 1500 g devirde 15 dakika süre ile 4°C'de santrifüje edildi. Spektrofotometrik ölçüm yapıldı. ELİSA test kiti (Mouse MPO Elisa test Kit, HK210, Hollanda) ile bir ünite enzim aktivitesi, 37°C 'de 460 nm absorbansta (1.0 ml/dk) meydana gelen değişiklik olarak değerlendirildi.

**3.3.2 Beyin iyon içeriği:** Dehidrate örnekler beyin iyon içeriklerinin (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>) tespiti için 1 hafta süreyle 1 N nitrik asidin 1 ml. içerisinde iyon salınımı için bekletildi. Bu solüsyonun Na<sup>+</sup> ve K<sup>+</sup> seviyeleri flame fotometre ile

Cl<sup>-</sup> seviyeleri ise dijital kloridometre ile ölçüldü. İyon içerikleri dehidrate bey- nin her bir gramındaki mikrokuvalantlar olarak ifade edildi. (  $\mu\text{Eq/kg.kuru}$  ağırlık )

**3.3.3 Beyin su içeriğinin tayini :** Alınan doku örnekleri elektronik analitik tartıda yaş ağırlıkları (mg.olarak) tartıldı (Resim 7). Örnekler 95 C<sup>o</sup> ' de otoklavda 24 saat boyunca bekletildi (Resim 8 ve 9). Ardından dehidrate örneklerin kuru ağırlıkları ölçüldü. Beyin su içerikleri yaş ağırlık – kuru ağırlık / yaş ağırlık X 100 formülüne göre hesaplandı (33).



**Resim 7.** Beyin dokularının hassas tartı ile ölçümü görülüyor.



**Resim 8.** Alınan beyin dokularının hemisfer, bazal ganglion ve serebellumlarının ayrıldıktan sonraki görünümleri.



**Resim 9.** Alınan örneklerin dehidratasyon amacıyla otoklava bırakılmaları görülüyor.

### **3.4 İstatistiksel Analiz**

Tüm gruplarda SPSS 15.0 programı kullanılarak normal dağılıma uyan çoklu grupların karşılaştırılması, Levene testi ile varyansların dağılımının homojenliği kontrol edildikten sonra post-hoc Bonferroni testleri ile karşılaştırıldı. İkili grupların karşılaştırılmasında Independent Sample T testi kullanıldı.  $P < 0,05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Myeloperoksidaz (MPO) Aktivitesi Değişiklikleri

Tüm gruplar, MPO aktivitesi değişikliklerinin ELİSA yöntemiyle ölçümü yapılarak karşılaştırıldılar (Tablo 2.)

1. Grup: MPO aktivitesi kontrol grubunda  $204,46 \pm 33,41$  ng/ml., 2.grup: NaHA grubunda  $143,05 \pm 15,99$  ng/ml. tespit edildi. Erken dönemde NaHA grubunda kontrol grubuna göre MPO aktivitesinde anlamlı bir düşüş saptandı. ( $p < 0,0001$ ) (Tablo 2.)

3. Grup: kontrol grubunda  $295,87 \pm 21,03$  ng/ml., 4. grup NaHA grubunda  $277,82 \pm 11,03$  ng/ml. tespit edildi. Geç dönemde NaHA grubunda kontrol grubuna göre MPO aktivitesinde anlamlı bir düşüş saptandı. ( $p < 0,0001$ ) (Tablo 2.)

**Tablo 2.** MPO aktivitesi değişiklikleri

	Kontrol	NaHA
<b>Erken Dönem</b>	$204,46 \pm 33,41$	$143,05 \pm 15,99$
<b>Geç Dönem</b>	$295,87 \pm 21,03$	$277,82 \pm 11,03$

Değerler ortalama  $\pm$  standart deviasyon olarak ifade edilmiştir. (MPO aktivitesi ölçüm sonuçlarının birimi ng/ml. dir).  $P < 0,05$  altındaki değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir.

### 4.2 Beyin Su İçeriği Değişiklikleri

Beyin su içeriği tayininde, lezyon tarafı ipsilateral, karşı taraf ise kontralateral olarak adlandırıldı. Hemisfer, bazal ganglion ve serebellumun su içerikleri karşılaştırıldı (Tablo 3).

İpsilateral hemisferde bütün gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. ( $p > 0,05$ ) Kontralateral hemisferde erken dönemde anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p > 0,05$ ). Geç dönemde NaHA  $75,22 \pm 1,66$  gr./gr. kuru ağırlık, kontrol grubunda  $79,01 \pm 2,08$  gr./gr. kuru ağırlık olarak tespit edildi. Anlamlı olarak beyin su içeriği NaHA grubunda düşüktür. ( $p = 0,021$ ) (Tablo 3).

İpsilateral bazal ganglionda bütün gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. (  $p > 0,05$ ) (Tablo 3).

Kontralateral bazal ganglionda bütün gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. (  $p > 0,05$ ) Serebellumunda bütün gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. (  $p > 0,05$ ) (Tablo 3).

**Tablo 3.** Beyindeki su oranı değişiklikleri

<b>Erken Dönem</b>	<b><u>Kontrol</u></b>	<b><u>Na HA</u></b>
İpsl .Korteks	77,69 ± 1,14	77,72 ± 1,48
Kontl.Korteks	78,26 ± 2,36	78,17 ± 2,15
İpsl. BG	77,86 ± 0,90	77,13 ± 2,28
Kontl. BG	78,87 ± 2,51	78,31 ± 2,05
Serebellum	77,68 ± 1,41	78,81 ± 1,45
<hr/>		
<b>Geç Dönem</b>		
İpsl. Korteks	76,70 ± 2,96	78,79 ± 2,48
Kontl. Korteks	79,01 ± 2,08	75,22 ± 1,66
İpsl. BG	78,01 ± 2,61	70,86 ± 23,48
Kontl. BG	75,78 ± 3,74	78,60 ± 3,20
Serebellum	77,60 ± 1,44	74,43 ± 0,80
<hr/>		

Değerler ortalama ± standart deviasyon olarak ifade edilmiştir. Beyin su içeriği sonuçlarının birimi gr./gr. kuru ağırlıktır.  $P < 0,05$  altındaki değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir.

#### **4.3 Beyin Elektrolit Değişiklikleri**

İpsilateral ve kontralateral hemisferlerin elektrolit değerleri karşılaştırıldı. İpsilateral ve kontralateral hemisferde dört grup arasında elektrolit sonuçları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 4). ( $P > 0,05$ )

**Tablo 4.** Erken dönem gruplarında beyindeki elektrolit değişiklikleri

	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>
<b>Na HA</b>			
İpsl. Korteks	155,03 ± 31,07	182,37 ± 59,10	82,26 ± 26,98
Kontl. Korteks	135,26 ± 28,19	158,07 ± 43,37	71,83 ± 18,79
<b>Kontrol</b>			
İpsl. Korteks	162,16 ± 46,23	201,19 ± 86,27	89,63 ± 33,24
Kontl. Korteks	152,01 ± 44,58	201,01 ± 45,78	80,03 ± 20,24

Değerler ortalama ± standart deviasyon olarak ifade edilmiştir. Beyin su içeriği sonuçlarının birimi mEq iyon /kg kuru ağırlıktır. P <0,05 altındaki değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir.

**Tablo 5.** Geç dönem gruplarında beyindeki elektrolit değişiklikleri

	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>
<b>Na HA</b>			
İpsl .Korteks	296,45 ± 27,80	427,71 ± 22,91	157,19 ± 21,75
Kontl.Korteks	300,79 ± 33,05	405,70 ± 23,76	152,48 ± 9,77
<b>Kontrol</b>			
İpsl .Korteks	263,59 ± 67,70	340,30 ± 71,22	167,96 ± 19,72
Kontl.Korteks	264,79 ± 31,38	389,28 ± 12,93	160,15 ± 15,55

Değerler ortalama ± standart deviasyon olarak ifade edilmiştir. Beyin su içeriği sonuçlarının birimi mEq iyon /kg kuru ağırlıktır. P < 0,05 altındaki değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir.

#### 4.4 Histopatolojik Değişiklikler

Işık mikroskobu ile hematoksil-eozin ile boyama yapılan preparatlar lezyon bölgesi merkez alınarak incelendi. İncelemede X10 ve X40 X60X 100 objektif kullanıldı (Resim 10, 11,12, 13). Sayım işlemi, kesitler üzerinde X40 oküler merceğinde 15 farklı birim alan içine düşen hücrelerin sayılması ile gerçekleştirildi. Bunların ortalaması alınarak birim alandaki astrosit, makrofaj ortalama hücre sayıları ve vaskülarizasyon oranları bulundu (Tablo 6) (Resim 10,11,12,13).

Lezyon bölgesinden laterale doğru oluşan gliosis bölgesinin kalınlığının mm. olarak ölçümü yapıldı (Tablo 7).

**Tablo 6.** Gruplara göre astrosit, makrofaj, damar sayıları

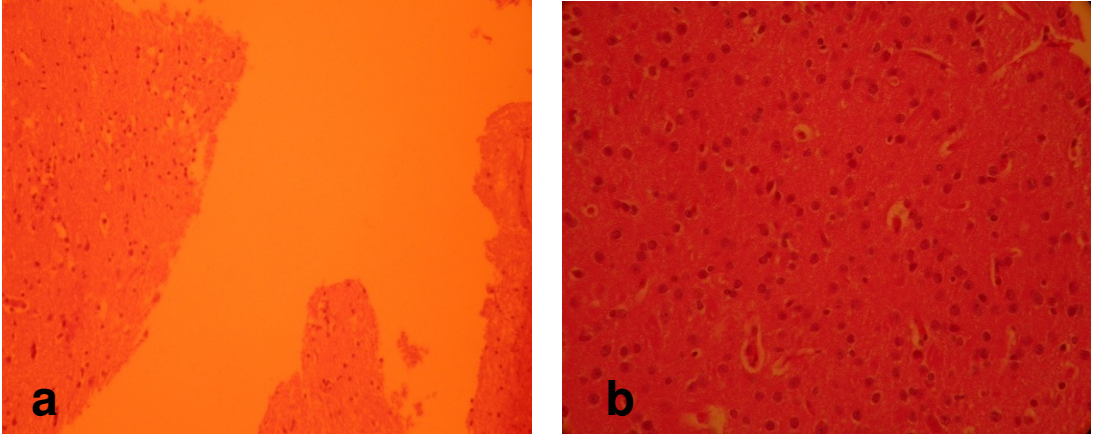
	<b>Astrosit</b>	<b>Makrofaj</b>	<b>Damar</b>
<b>1. Grup</b>	43,857 ± 5,81	20,714 ± 8,80	9,857 ± 3,93
<b>2. Grup</b>	40,375 ± 3,85	18,125 ± 14,46	7,125 ± 2,64
<b>3. Grup</b>	103,28 ± 15,47	8,714 ± 4,19	22,857 ± 4,45
<b>4. Grup</b>	39,285 ± 4,88	9,571 ± 3,86	21 ± 3,55

Yukarıda verilen değerler X40 büyütmede mikroskopta sayım sonrası adet olarak verilmiştir. Değerler ortalama ± standart deviasyon olarak ifade edilmiştir. P <0,05 altındaki değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir.

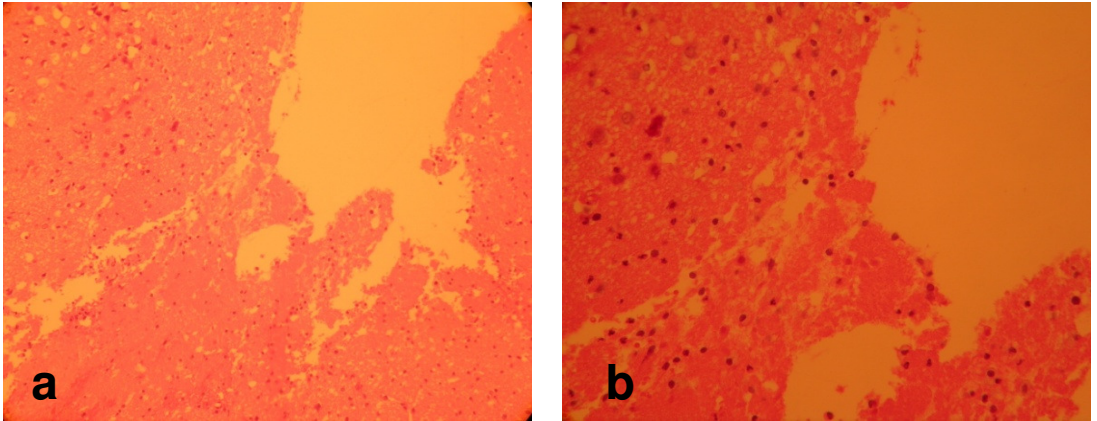
**Tablo 7.** Geç Dönem Gliosis Dokusu Kalınlıkları

<b>Kontrol</b>	1,9 ± ,64
<b>NaHA</b>	0,214 ± 0,10

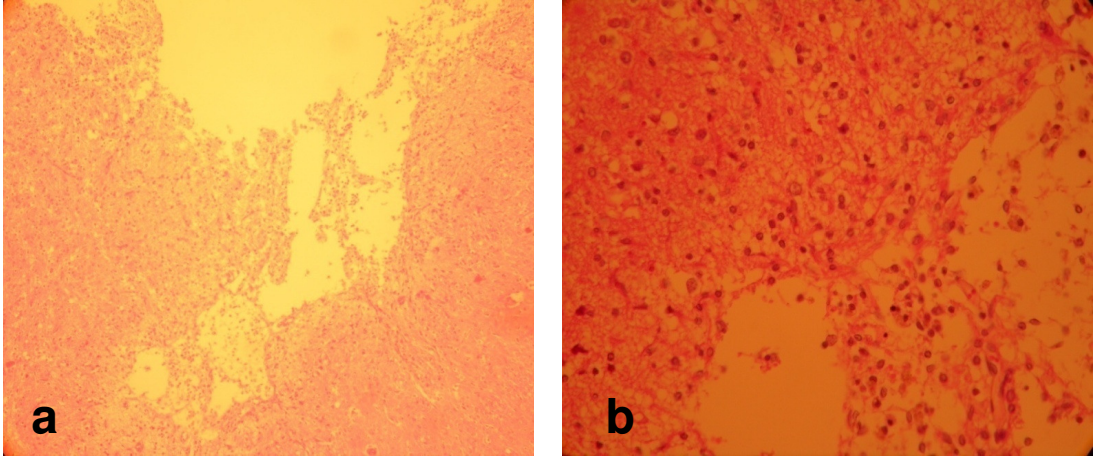
Yukarıda verilen değerler mm. olarak verilmiştir. Değerler ortalama ± standart deviasyon olarak ifade edilmiştir. P <0,05 altındaki değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir.



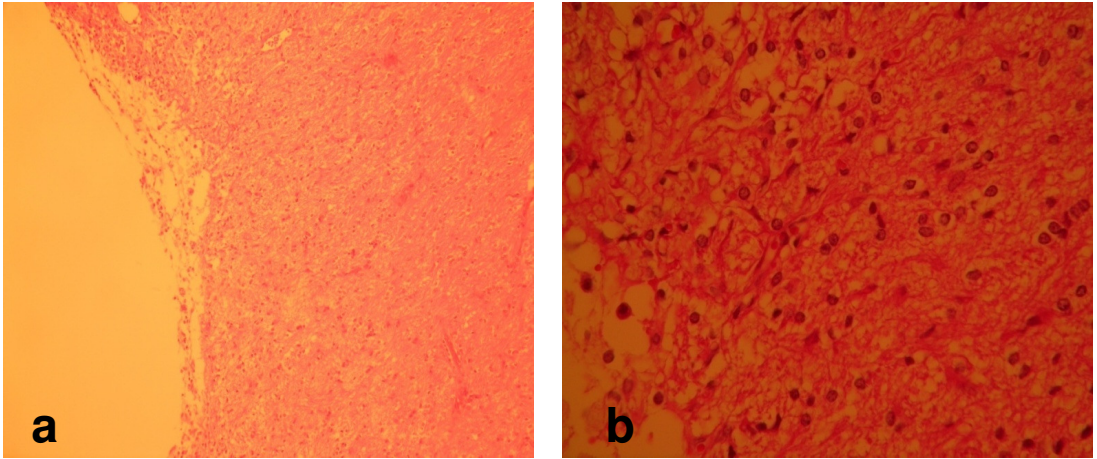
**Resim 10.** Erken dönem NaHA grubu X10 büyütme (a), X40 büyütme (b) görülüyor.



**Resim 11.** Erken dönem kontrol grubu X10 büyütme (a), X40 büyütme (b) görülüyor.



**Resim 12.** Geç Dönem NaHA grubunda yoğun astrosit infiltrasyonu ile beraber hafif derecede gliozis görülüyor. X10 büyütme (a), X40 büyütme (b)



**Resim 13.** Geç dönem kontrol grubunda yoğun astrosit infiltrasyonu ile beraber ileri derecede artmış gliozis ve vaskülarizasyonda artma görülüyor. X10 büyütme (a), X40 büyütme (b)

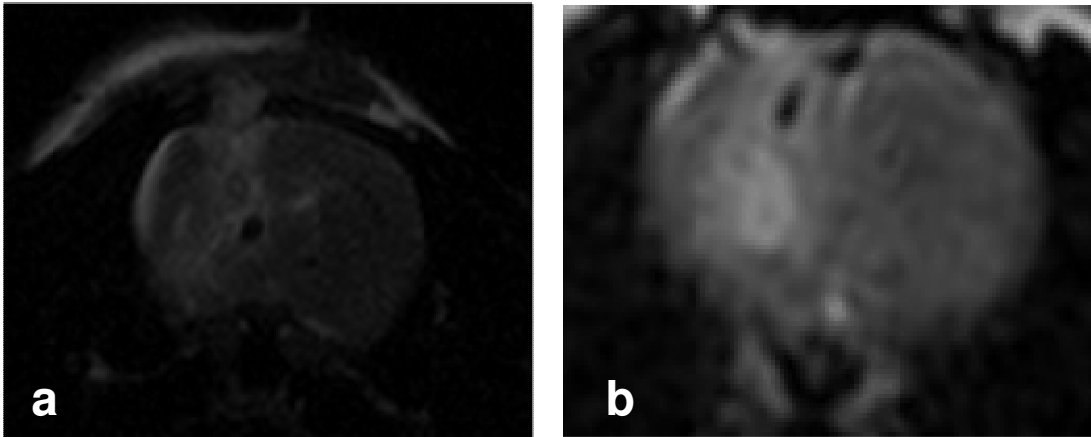
Hücre sayıları incelendiğinde geç kontrol grubunun astrosit sayısında geç NaHA grubuna göre anlamlı derecede yükseklik vardı. ( $p < 0,0001$ ) (Resim 12,13). Erken dönemde ise aralarında anlamlı bir fark saptanmadı ( $p > 0,05$ ) (Tablo 6).

Makrofaj sayılarında dört grup arasında anlamlı bir fark saptanmadı. ( $p>0,05$ ) Ancak geç dönemdeki gruplarda erken gruplara göre makrofaj sayısında anlamlı bir düşüş bulundu (Tablo 6). ( $p<0,0001$ )

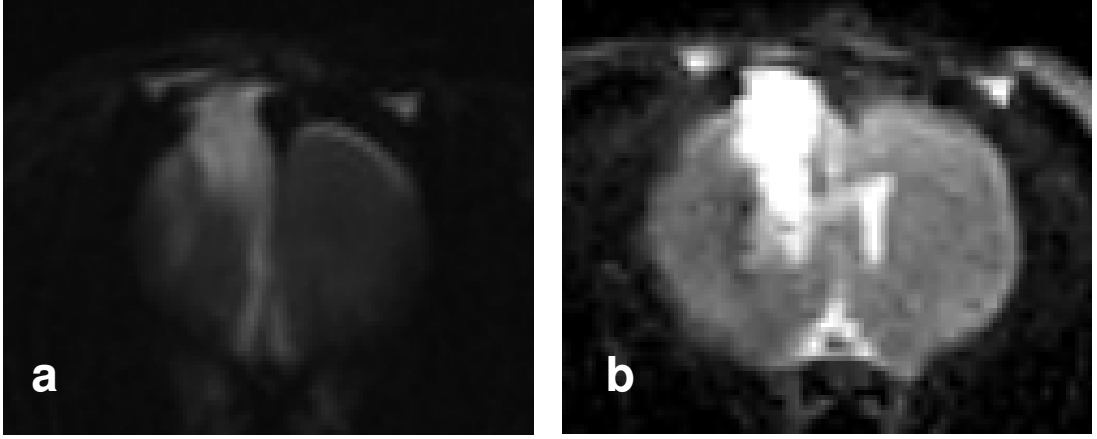
Vaskülarizasyon açısından da kontrol ve NaHA grupları arasında anlamlı bir fark saptanmadı. ( $p>0,05$ ) Fakat geç gruplarda erken gruplara göre anlamlı bir vaskülarizasyonda artış saptanmıştır (Tablo 6). ( $p<0,0001$ )

Gliozis dokusu kalınlıkları incelendiğinde geç kontrolün gliozis kalınlığının geç NaHA grubuna göre daha kalın bir gliozis yapısına sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 7). ( $p<0,0001$ ) (12,13)

#### **4.5 MRG Bulguları**



**Resim 14.** Koronal kesitli MR görüntülerinde (a) Erken dönem NaHA grubundan, (b) Erken dönem kontrol grubundan örnek kesitler.



**Resim 15.** Koronal kesitli MR görüntülerinde (a) geç dönem NaHA grubundan, (b) geç dönem kontrol grubundan örnek kesitler.

**Tablo 8.** Lezyon hacimlerinin mm<sup>3</sup> olarak değerlendirilmesi

	<b>Kontrol</b>	<b>NaHA</b>
<b>Erken Dönem</b>	22,34 ± 4,227	18,631 ± 3,98
<b>Geç Dönem</b>	31,06 ± 10,212	12,75 ± 1,911

Yukarıda verilen değerler mm<sup>3</sup> olarak verilmiştir. Değerler ortalama ± standart deviasyon olarak ifade edilmiştir. P <0,05 altındaki değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Erken dönem NaHA ve kontrol grubu arasında lezyon hacminde anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 8). ( p > 0,05) (Resim 14)

Geç dönemde NaHA grubunda, kontrol grubuna göre lezyon hacminde anlamlı derecede bir küçülme saptandı (Tablo 8). (p < 0,001)(Resim 15)

## 5. TARTIŞMA

Travmatik beyin yaralanmaları ile yapılan deneysel çalışmalarda kriyo yaralama, bıçakla yaralama, ve doku çıkartılması gibi çeşitli yaralanma modeli oluşturulmuştur (51,52,53). Bu çalışmada, insandaki beyin yaralanmalarına en yakın ve en iyi model olduğunu düşündüğümüz doku çıkarılması modeli uyguladık. Sodyum hyaluronatın(NaHA) beyin üzerindeki akut dönem etkilerini görmek için erken dönem, gliosis üzerine etkilerini görmek amacıyla geç dönem olarak çalışmamızda iki grup oluşturduk.

Travmatik beyin yaralanmasında çok çeşitli mekanizmalar ve süreçler rol oynamaktadır. Bu konuda çok bilgi olmasına rağmen süreçler ve tedavi hakkında çalışmalar devam etmektedir (15,54). Travmatik beyin yaralanmasından sonra bir kaç saat içerisinde inflamatuvar süreç başlamaktadır (55,56). Bunu takiben sitokinlerin salınımı ve glial hücrelerin (astrozitler, oligodendrositler, onların prekürsörleri ve mikroglialar) aktivasyonu meydana gelir (15,54). Astrozitler yaralanma bölgesine göç ederler. Kronik dönemde süreç astrozitlerin glial fibriler asidik protein salgılaması ve gliosis oluşumuyla sonlanır (15,54). Gliosis ise belirgin bir şekilde nöronal rejenerasyonun inhibe olmasına neden olur (15,54). Glial skarın oluşum mekanizmalarının tam olarak açıklığa kavuşturulmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu mekanizmaların keşfedilmesi, glial skarı azaltabilecek ya da tamamen ortadan kaldıracı tedavi yöntemlerinin ortaya koyulmasına yardımcı olacaktır.

Gliosis oluşum mekanizmaları ve önlenmesine yönelik son yıllarda birçok deneysel araştırma yapılmıştır. Moon ve arkadaşları, ethidium bromür enjeksiyonu sonucu glial skarda azalma sağlamışlardır (57). Kalderon ve Foks, yüksek doz X-ışını (>10 Gy) ile radyasyonla gliosisde gerilemeye neden olarak, fonksiyonel motor iyileşme sağlamışlardır (58). Yeni transgenik fare yaklaşımı ile GFAP üreten gen bölümü bölgesine herpes timidin kinaz yerleştirilerek astrozitler spesifik olarak öldürülmüş ve travmatik beyin yaralanmasında gliosis oluşumunun önüne geçilmiştir (59). Bazı araştırmacılar, gliosis yol açan moleküllerin salınımını önlemeye çalışmışlardır. Logan ve arkadaşları, TGF-  $\beta$ 1 (transforming büyüme faktörü- $\beta$ 1) güçlü astroitik reak-

siyona neden olan bu moleküle karşı antikor geliştirmişlerdir. Ancak, astroglial skarda azalmaya neden olurken, nöronal yaşama süresinde de gerilemeye neden olmuştur (60). Li ve arkadaşları, yaralanma sonrası topikal glukokortikoid kullanmış ve glioziste gerilemeye neden olmuşlardır (61). Balasingam ve arkadaşları, interlökin-10' un antiinflamatuvar etkilerinden yararlanarak gliozisde azalmaya neden olmuşlar (62). Brewer ve arkadaşları, interlökin-10' u sistemik olarak enjekte etmişler ve iyi sonuçlar almışlardır (63).

Ekstrasellüler matriks sentezini önleyen inhibitör moleküller ilk defa Fichard ve arkadaşları  $\beta$ -ksilozid ve sodyum klorat ile proteoglikan sentezini inhibe etmeyi başarmışlardır (64). Smith-Thomas ve arkadaşları ise, astrosit hücre kültürlerinde bu inhibitörlerin kullanımı sayesinde dorsal root ganglionunda gelişime neden olmuştur. Fakat geniş toksik etkileri nedeniyle in vivo kullanıma uygun değildir (65). Stichel ve arkadaşları, demir şelatörü 2,2'- dipiridinle kollajen triple heliksinin oluşumunu önlemesi nedeniyle, fimbriya forniks lezyonuna enjekte ederek yaralanma bölgesinde Kollajen IV oluşumunda azalmaya neden olmuşlardır. Bununla birlikte akson lezyonlarında rejenerasyon gözlemişlerdir (66).

Stichel ve arkadaşları, fimbriya forniks lezyonlarına kollajen IV' ü bloke eden poliklonal antikorlar enjekte ederek forniks aksonlarında rejenerasyon sağlamışlardır (66). Fichard ve arkadaşları, in vitro olarak kondroitin sülfat - 56 antikorlarıyla kondroitin sülfat proteoglikanlarını bloke ettiler ve dorsal root ganglionunda büyüme gözlemlenildi (64). Fakat in vivo kullanımında henüz nöral gelişime ait herhangi bir bildiri yoktur.

Araştırmacılar, genetik ekstrasellüler matriks molekül mutasyonlarının, ekstrasellüler matriksin gelişimi ve rejenerasyonunda önemli bir rolü olduğunu keşfetmişlerdir (67). Astrositlerin glikoprotein ailesinden tenaskin-C, oligodendrositlerin ve bazı nöronların ise tenaskin-R salgıladıkları tespit edilmiştir (68). Gen manipulasyonları denenerek yapılan bir kaç genetik çalışma olmasına karşın gen terapisi için henüz yeterli neticeler alınamamıştır (67).

Zhou zhu ve arkadaşları, in vitro astrosit hücre kültürlerinde hücre siklus inhibisyonu yapan olomousin ile gliozisde azalmaya neden olmuştur

(69). Yine Simone Di Giovanni ve arkadaşları, in vivo deneysel bir çalışmada flavopiridolün hücre siklus inhibisyonuyla gliozis ve nöral hücre ölümünü azalttığını göstermişlerdir (51).

Noriko Hayashi ve arkadaşları, in vivo heparin oligosakkaritlerini kullanarak gliozisde azalma bildirmişlerdir (52). Lei Zhang ve arkadaşları, in vitro deneysel hayvan çalışmasında beyinde nitrik oksitle kriyo yaralanma modelinde intraperitoneal olarak kafeik asit kullanarak gliozisde azalma saptamışlardır (70). Yi Li ve arkadaşları, orta serebral arter oklüzyonu modeli oluşturulan sıçanlarda intravenöz kemik iliği hücre transplantasyonu ile glioziste azalma ve kontrol grubuna göre nörolojik iyileşmede başarı elde etmişlerdir (71).

Hyaluronik asit (HA), invitro çalışmalarda Prostaglandin E sentezini indükleyen, IL-1 $\alpha$ (interlökin) ve bunun yanında bradikinini, araşidonik asit serbestleşmesini engellediği bildirilmiştir. Ayrıca inflamatuvar hücrelerin yapışmasını, proliferasyonunu, migrasyonunu, kemotaksisini ve fagositozunu önlediği de gösterilmiştir (41,76). Ryan ve arkadaşları, karşılaştırmalı olarak kondroitin sülfat glikoproteinlerinin nöral yapılar üzerindeki inhibitör etkilerini araştırırken, hyaluronik asit jelde dorsal root ganglionlarında büyüme gözlemiştir (50). Bu bulgu glukozaminoglikan ailesinin bir üyesi olan hyaluronik asitin, nöral yapılar üzerinde inhibitör etki yerine nöral gelişime uygun bir ortam oluşturduğunu göstermektedir. Ciddi beyin yaralanması geçiren hastalarda akut enflamatuvar cevap, erken proinflamatuvar sitokin üretimi; serebral kan damarlarında nitrik oksit sentazda ve hücre adezyon moleküllerinde artış; yaralanma bölgesinde yaklaşık 4-24 saat içerisinde lökosit infiltrasyonu meydana gelmektedir (81). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda travmatik beyin yaralanması sonrasında, nötrofil infiltrasyonunun kan-beyin bariyeri harabiyeti ve ödem gelişiminde korelasyon gösterdiği gösterilmiştir (81). Sodyum hyaluronatın antienflamatuvar etkinliği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (72-80) Bu amaçla ortopedi kliniklerinde osteoartrit tedavisinde lokal olarak kullanılmaktadır (41,48). Çalışmamızda Hyaluronik asitin bu özelliğini, travmatik beyin yaralanmasında kullanarak enflamatuvar süreci yavaşlatmak ve gliozis oluşumunu önlemeye çalıştık. Beyin yaralanmasında nötrofil

infiltrasyonunun azalmasının yaralanma bölgesindeki sekonder yaralanmayı önleme ve yara bölgesinde genişleme açısından kritik bir önemi vardır (56,82). Ayrıca bu inflamatuvar sürecin gliozisin bir parçası olması nedeni ile gliozisi de dolaylı olarak azaltmasını bekledik. MPO aktivitesi, beyin nötrofil infiltrasyonunun tespitinde bir gösterge olarak kullanılmaktadır (81). Enflamatuvar sürecin gözlemi amacıyla ELİSA(enzyme-linked immunosorbent assay) ile MPO aktivitesi ölçümü yaptık. Çalışmamızda erken ve geç dönemde kontrol grubuna göre daha düşük MPO aktivitesi tespit ettik ( $p < 0,0001$ ). Bu sonuç sodyum hyaluronatın etkin bir antienflamatuvar etkinliğinin olduğunu ortaya koymuştur.

Sodyum hyaluronat visköz yapısı ile beraber iyi derecede su tutucu bir makromolekül olma özelliğindedir (41). Bu özelliği sayesinde travmatik beyin yaralanması sonrası ödem etkisini azaltmasını beklerdik. Fakat beyin su içeriği tayini ile erken ve geç dönem sodyum hyaluronat ve kontrol gruplarından, sadece geç dönemde kontralateral hemisferde sodyum hyaluronatın kontrole göre beyin su içeriğinde anlamlı bir düşüş saptadık ( $p = 0,021$ ). Bu sonucu kısmen su tutucu özelliğine bağliyabiliriz. Bunun haricinde anlamlı bir fark saptamadık. Ancak kontrol ve sodyum hyaluronat arasında ortalama  $\pm$  standart deviasyon değerlerini karşılaştırdığımızda değerler arasında önemli bir fark yoktu. Ayrıca MRG incelemesinde, erken ve geç dönemi karşılaştırdığımızda ileri derecede ödem etkisi bulgusu olmaması, beyinde kullanılabilir uygun bir biyomateryal olarak olduğunu göstermektedir. MR bulgularımız da, erken ve geç dönemde sodyum hyaluronatın kontrole göre lezyon hacminde  $\text{mm}^3$  olarak daha düşük bulunması, beyinde kullanılabilir uygun bir biyomateryal olarak kullanılabileceğini desteklemektedir.

Son zamanlarda beyin yaralanmalarında ve travmalarında iyon homeostazisinin üzerinde önemle durulmaktadır (83). Bu yüzden çalışmamızda sodyum hyaluronatın travmatik beyin yaralanmasında iyonlar üzerindeki etkilerini de değerlendirdik. Kawamata ve arkadaşları, beyin kontüzyonundan sonra beyin ödeminde artışa karşın beyin iyon konsantrasyonlarında değişiklik saptamamışlardır (84). Stiefel ve arkadaşları, sıçanlarda iskemi yaratarak travmatik beyin yaralanmasını taklit etmişler ve beyin iyonla-

rında anlamlı bir düşüş gözlemiştir (85). Tshal ve arkadaşları, subdural ve epidural hematoma sonrası beyin  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Cl}^-$  iyonlarında artış,  $\text{K}^+$  iyonunda azalma ve bunlara paralel olarak ödemde artış görüldüğünü bildirmiştir (86). Kevin ve arkadaşları, genelde  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Cl}^-$  iyonlarındaki değişikliklerin ödeme neden olduğunu,  $\text{K}^+$  iyonundaki değişimlerin ise tam ters etki yaptığını bildirmişlerdir (87). Astrositlerin iyonlar üzerindeki homeostazisi, kan beyin bariyerinin devamlılığı üzerindeki etkileri de mevcuttur. Astrositlerin, iyon homeostazisindeki rolü uzun zamandır bilinmektedir. Özellikle ekstrasellüler  $\text{K}^+$  un devamlılığı ve korunmasında görev almaktadır (83). Ancak yine de glial hücrelerin iyon homeostazisindeki rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Travma sonucu hem kan beyin bariyeri zarar görmekte, astrositlerde ise şişme ve ölüm görülmektedir. Ayrıca  $\text{K}^+$  ve  $\text{Na}^+$  dengelerinde tersine değişimlerin ortaya çıkması sitotoksik ve vazojenik ödeme neden olurlar (83). Çalışmamızda erken ve geç dönemde  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ve  $\text{Cl}^-$  iyonları karşılaştırıldı. Erken ve geç dönemde kontrol, NaHA arasında anlamlı bir fark saptanmadı ( $p > 0,05$ ). Fakat geç dönemde erken döneme göre hem NaHA grubunda, hem de kontrol grubunda  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ve  $\text{Cl}^-$  iyonlarında anlamlı bir artış saptanmıştır ( $p < 0,001$ ). Bu bulgulara göre NaHA' ın beyin iyon homeostazisinde herhangi bir bozulmaya neden olmadığı anlaşılmaktadır. Başka bir deyişle, ödeme neden olabilecek bir neden bulunmamıştır.

Çalışma süresince hiçbir denekte enfeksiyon veya enflamasyon gelişmemiştir. Bu da sodyum hyaluronatın yabancı cisim reaksiyonuna yol açmadığını ve enfeksiyona zemin hazırlayan bir madde olmadığını göstermiştir.

Travmatik beyin yaralanmasında, ilk olarak kan beyin bariyerinin bozulmasını takiben makrofaj ve mikroglia göçü olmaktadır (15). Daha sonra astrositler ve oligodendrositlerin göçü meydana gelir (15). Bilindiği gibi astrositlerin GFAP üretimi ile gliozisi meydana getirmektedir (15). Histopatolojik incelemelerimizde, erken dönemde hücre sayılarında anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Geç dönemde ise sodyum hyaluronat grubunun astrosit sayısında, kontrole göre daha düşük olduğu görüldü ( $p < 0,01$ ). Makrofaj sayısında ise anlamlı bir değişiklik saptanmadı ( $p > 0,05$ ). Gliozis ölçümünde ise geç dönemde kontrol grubunda gliozis kalınlığında sodyum

hyaluronata göre artış görüldü ( $p < 0,001$ ). Bu sonuçlar sodyum hyaluronatın hücreyel göçü yavaşlattığını ve gliozisde azalmaya neden olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızdaki bulgular şunu göstermiştir ki, travmatik beyin yaralanmasında sodyum hyaluronatın kontrol grubuna göre gliozisde azalmaya, inflamatuvar süreçte yavaşlamaya ve glial hücre sayısında düşüşe neden olmuştur.

Sodyum hyaluronat; gelecekte travmatik beyin yaralanmalarında, postoperatif gliozisin önlenmesi ya da azaltılması amacıyla alternatif olarak kullanılabilir. Çalışmamız bu amaca yönelik ilk kez yapılmıştır ve sonuçlar olumludur. Klinik uygulamaya yönelik yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

## **6. SONUÇ**

Sodyum hyaluronat, beyin cerrahisinde travmatik beyin yaralanmalarında beyin dokusu üzerine uygulanarak antienflamatuvar ve gliozisi önleyici etkisinden yararlanmak potansiyelinde bir madde olarak kullanılacak bir biyomateryal olarak değerlendirilebilir. Klinik uygulamaya yönelik yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Levin H.S., Cognitive function outcomes after traumatic brain injury, *Curr Opin Neurol.*, 11:643– 646, 1998.
2. H.Richard Winn., New York: Youmans Neurological Surgery Vol. 2, Central nervous system injury pub: Pennsylvania elsevier science pub, fifth edition: 202, 2003.
3. Suffredini A.F., Fantuzzi G., Badolato R., Oppenheim J.J.& O'Grady, N.P., New insights into the biology of the acute phase response, *J. Clin. Immunol.*, 19: 203–214, 1999.
4. Sian-Marie Lucas, Nancy J. Rosemary M. Gibson, The role of inflammation in CNS injury and disease, *British J. Pharmacology* 147: 232-240, 2006.
5. Balasingam V., Tejada-Berges T., Wright E., Bouckova R., Yong VW., Reactive astrogliosis in the neonatal mouse brain and its modulation by cytokines., *J Neurosci.*,14:846–56, 1994.
6. Selmaj KW., Farooq M., Norton WT., Raine CS., Brosnan CF., Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumour necrosis factor., *J Immunol.*, 144:129–35, 1990.
7. Tchelingierian J-L., Quinonero J., Booss J., Jacque C., Localisation of TNFa and IL-1a immunoreactivities in striatal neurons after surgical injury to hippocampus., *Neuron*, 10:213–24, 1993.
8. Tsuchihashi Y., Kitamura T., Fujita S., Immunofluorescence studies of the monocytes in the injured rat brain, *Acta Neuropathol* ,53:213–9, 1981.
9. Giulian D., Chen J., Ingeman JE., George JK., Nojonen M., The role of mononuclear phagocytes in wound healing after traumatic injury to the adult mammalian brain, *J Neurosci* 9:4416–29, 1989.
10. Pober J.S., Cotran R.S., Cytokines and endothelial cell biology, *Physiol Rev.*, 70:427-51,1990.
11. Zhang R.L., Chopp M., Chen H., Garcia J.H., Temporal profile of ischemic tissue damage, neutrophil response, and vascular plugging

- following permanent and transient (2H) middle cerebral artery occlusion in the rat, *J Neurol Sci.*, 125:3–10, 1994.
12. Barone F.C., Hillegass L.M., Tzimas M.N., Schmidt D.B., Foley J.J., White R.F., et al., Time-related changes in myeloperoxidase activity and leukotriene B4 receptor binding reflect leukocyte influx in cerebral focal stroke, *Mol Chem Neuropathol.*, 24:13–30, 1995.
  13. Kasuya H., Shimizu T., Activated complement components C3a and C4a in cerebrospinal fluid and plasma following subarachnoid hemorrhage, *J Neurosurg.*, 71:741–6, 1989.
  14. Lindsberg P.J., Ohman J., Lehto T., Karjalainen-Lindsberg M.L., Paetau A., Wuorimaa T., et al., Complement activation in the central nervous system following blood–brain barrier damage in man, *Ann Neurol.*, 40:587–96, 1996.
  15. James W. Fawcett and Richard A. Asher, The glial scar and central nervous system repair, review article *brain research bulletin*, Vol. 49, No. 6, pp. 377–391, 1999.
  16. Kreutzberg G. W., Microglia: A sensor for pathological events in the CNS, *Trends Neurosci.*, 19:312–318, 1996.
  17. Perry V. H., Gordon S., Macrophages and the nervous system., *Int.Rev. Cytol.*, 125:203–244, 1991.
  18. Krueger S., Sievers J., Hansen C., Sadler M., Berry M., Three morphologically distinct types of interface develop between adult host and fetal brain transplants: Implications for scar formation in the adult central nervous system, *J. Comp. Neurol.*, 249:103–116, 1986.
  19. Abnet K., Fawcett, J. W., Dunnett S. B., Interactions between meningeal cells and astrocytes in vivo and in vitro, *Dev. Brain Res.*, 53:187–196, 1991.
  20. Dusart I., Schwab M. E. , Secondary cell-death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord, *Eur. J. Neurosci.*, 6:712-724, 1994.
  21. Mathewson A. J., Berry, M., Observations on the astrocyte response to a cerebral stab wound in adult rats, *Brain. Res.*, 327:61– 69, 1985.

22. Reier P. J., Houle, J. D., The glial scar: Its bearing on axonal elongation and transplantation approaches to CNS repair, *Adv. Neurol.*, 47:87–138, 1988.
23. Johansson C.B., Momma, S., Clarke, D. L., Risling, M., Lendahl, U., Frisén, J., Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system, *Cell*, 96:25–34, 1999.
24. Holmin S., Almqvist, P., Lendahl, U., Mathiesen, T., Adult nestin expressing subependymal cells differentiate to astrocytes in response to brain injury, *Eur. J. Neurosci.*, 9:65–75, 1997.
23. Antar V., Bir genel kaspaz inhibitörü olan qvd-oph'nin nöroprotektif etkilerinin deneysel spinal kord travması modelinde incelenmesi., *Taksim Eđit. Arař.Hast. Nörořirürji Yayınlanmamış Uzmanlık Tezi* , 2005.
24. Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson SA., Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation, *J Cell Biol.*, 119: 493-501, 1992.
25. Lu J., Ashwell K., Ken W.S., Waite P., Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis, *Spine*, 25: 1859-1866, 2000.
26. Cohen JJ, Apoptosis: The physiological pathway of cell death, *Hosp Pract.*, 15: 35-43, 1993.
27. Spencer S., Cataldo NA., Jaffe RB., Apoptosis in the human female reproductive tract, *Obstetrical and Gynecological Survey*, 5:314-323, 1996.
28. Anthony K.F. Liou , Robert S. Clark, To die or not to die for neurons in ischemia, traumatic brain injury and epilepsy: a review on the stress-activated signaling pathways and apoptotic pathways, *Progress in Neurobiology*, 69 : 103–142, 2003.
29. Lehninger AL., Nelson DL., Cox MM., Principles of biochemistry, New York,worth publishers inc., 2:268-97,1993
30. Siesjö B.K., Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia part I: Pathophysiology., *J Neurosurg.*, 77:169-84, 1992.
31. Fawcett J. W., Axon growth and regeneration: Intrinsic neuronal effects,

- Trends Neurosci., 15:5– 8, 1992.
32. Tetzlaff W., Kobayashi N. R., Giehl K. M. G., Tsui B. J., Cassar S. L., Bedard A. M., Response of rubrospinal and corticospinal neurons to injury and neurotrophins, Prog.Brain Res., 103:271–286, 1994.
  33. Toshali R. Patel, Gerald P. Schielke, Julian T. Hoff, Richard F. Keep, Comparison of cerebral blood flow and injury following intracerebral and subdural hematoma in the rat, Brain Research, 829:125–133, 1999.
  34. Grill R. J., Stallcup W. B., Tuszynski M. H., Temporal upregulation and spatial distribution of putative inhibitory and growth permissive substrate molecules in the injured adult rat spinal cord, Soc. Neurosci. Abstr., 24:1054, 1998.
  35. Levine J. M., Increased expression of the ng2 chondroitin-sulfate proteoglycan after brain injury, J. Neurosci., 14:4716–4730, 1994.
  36. Asher R., Bignami A., Hyaluronate binding and CD44 expression in human glioblastoma cells and astrocytes, Exp. Cell Res., 203:80 –90, 1992.
  37. Sretavan D. W., Feng L., Pure´ E., Reichardt L. F., Embryonic neurons of the developing optic chiasm express L1 and CD44, cell surface molecules with opposing effects on retinal axon growth, Neuron, 12:957–975, 1994.
  38. Weigel P.H., Frost S.J., LeBoeuf R.D., McGary C.T., The specific interaction between fibrin(ogen) and hyaluronan: possible consequences in haemostasis, inflammation and wound healing, Ciba Found Symp., 143:248-61, 1989.
  39. Schiller S., Synthesis of hyaluronic acid by a soluble enzyme system from mammalian tissue, Biochem Biophys Res Commun., 15:250-5, 1964.
  40. Richard D. Price , M.G. Berry, Harshad A. Navsaria., Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence, Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery, 60:1110-1119,2007.
  41. Çağatay U., Diz osteoartritinde artroskopik debridman ve viskosüplemantasyonun yeri, Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2.

- Ortopedi ve Travmatoloji Bölümü Yayınlanmamış Uzmanlık Tezi , 2005
42. Longaker M.T., Chiu E.S., Adzick N.S., Stern M., Harrison M.R., Stern R., Studies in fetal wound healing. V. A prolonged presence of hyaluronic acid characterizes fetal wound fluid, *Ann Surg.*, 213:292-6, 1991.
  43. Sihota R., Saxena R., Agarwal H.C., Intravitreal sodium hyaluronate and secondary glaucoma after complicated phacoemulsification., *J Cataract Refract Surg.*, 29:1226-7, 2003.
  44. Hoffman R.S., Fine I.H., Packer M., Stabilization of flat anterior chamber after trabeculectomy with Healon5, *J Cataract Refract Surg.*, 28:712-4, 2002.
  45. Condon P.I., McEwen C.G., Wright M., Mackintosh G., Prescott R.J., McDonald C., Double blind, randomised, placebo controlled, crossover, multicentre study to determine the efficacy of a 0.1% (w/v) sodium hyaluronate solution (Fermavisc) in the treatment of dry eye syndrome, *Br J Ophthalmol.*, 83:1121-4, 1999.
  46. Lin K., Bartlett S.P., Matsuo K., LiVolsi V.A., Parry C., Hass B., et al., Hyaluronic acid- filled mammary implants: an experimental study, *Plast Reconstr Surg.*, 94:306-15, 1994.
  47. Carruthers J, Carruthers A., A prospective, randomized, parallel group study analyzing the effect of BTX-A (Botox) and nonanimal sourced hyaluronic acid (NASHA, Restylane) in combination compared with NASHA (Restylane) alone in severe glabellar rhytides in adult female subjects: treatment of severe glabellar rhytides with a hyaluronic acid derivative compared with the derivative and BTX-A. *Dermatol Surg.*, 29:802-9, 2003.
  48. Lohmander L.S., Dalen N., Englund G., Hämäläinen M., Jensen E.M., Karlsson K., et al., Intra-articular hyaluronan injections in the treatment of osteoarthritis of the knee: a randomised, double blind, placebo controlled multicentre trial., *hyaluronan multicentre trial group, Ann Rheum Dis.*, 55:424-31, 1996;.
  49. Kato T., Haro H., Komori H., Shinomiya K., et al., Evaluation of

- hyaluronic acid sheet for the prevention of postlaminectomy adhesions ,  
The Spine Journal 5 :479–488, 2005.
50. Gilbert R.J., McKeon R.J., Darr A., Calabro A., Hascall V.C.,  
Bellamkonda R.V., CS-4,6 is differentially upregulated in glial scar and is  
a potent inhibitor of neurite extension. *Mol. Cell. Neurosci.* 29 (2005) 545  
– 558
  51. Di Giovanni S., Movsesyan V., Ahmed F., Cernak I., Schinelli S., Stoica  
B., Faden Al., Cell cycle inhibition provides neuroprotection and reduces  
glial proliferation and scar formation after traumatic brain injury, *PNAS  
Neuroscience*. June 7, 102, 23:8333-8338, 2005.
  52. Hayashi N, Miyata S, Kariya Y, Takano R, Hara S, Kamei K., Attenuation  
of glial scar formation in the injured rat brain by heparin oligosaccharides,  
*Neuroscience Research*, 49: 19–27, 2004.
  53. Steven G. Kernie, Trent M. Erwin, and Luis F. Parada ., Brain  
Remodeling Due to Neuronal and Astrocytic Proliferation After Controlled  
Cortical Injury in Mice, *Journal of Neuroscience Research*, 66:317–326,  
2001.
  54. Fitch M.T., Silver J., CNS Injury, glial scars, inflammation: Inhibitory  
extracellular matrices and regeneration failure, *Experimental Neurology*,  
2007 May 31
  55. Lucas S.M., Rothwell N.J., Gibson R.M., The role of inflammation in  
CNS injury and disease, *Br J Pharmacol.*, 147:232-40, 2006
  56. Frank C. Barone and Kenneth S. Kilgore, Role of inflammation and  
cellular stress in brain injury and central nervous system diseases,  
*Clinical Neuroscience Research*, 6:329-356, 2006.
  57. Moon LD, Brecknell JE, Franklin RJ, Dunnett SB, Fawcett JW., Robust  
regeneration of CNS axons through a track depleted of CNS glia, *Exp.  
Neurol.*, 161:49-66, 2000
  58. Kalderon N., Fuks Z., Structural recovery in lesioned adult mammalian  
spinal cord by x-ray therapy in lesioned adult spinal cord, *PNAS.USA*  
93:11185-11190, 1996.
  59. Bush T.G., Puvanachandra N., Horner C.H., Polito A., Ostendorf T.,

- Svendsen C.N., et al., Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice, *Neuron*, 23: 297-308, 1999.
60. Logan A., Green J., Hunter A., Jackson R., Berry M., Inhibition of glial scarring in the injured rat brain by a recombinant human monoclonal antibody to transforming growth factor-beta2, *Eur J Neurosci.*, 11:2367–2374, 1999.
  61. Li M., Shibata A., Li C., Braun P.E., McKerracher L., Roder J., Kater S.B. David ,Myelin-associated glycoprotein inhibits neurite/axon growth and causes growth cone collapse, *J Neurosci Res.*, 46:404–414, 1996.
  62. Balasingam V, Yong V.W., Attenuation of astroglial reactivity by interleukin-10, *J Neurosci.*, 16:2945–2955, 1996.
  63. Brewer K.L., Bethea J.R., Yeziarski R.P., Neuroprotective effects of interleukin-10 following excitotoxic spinal cord injury, *Exp Neurol* ,159: 484–493, 1999.
  64. Fichard A., Verna J.M., Olivares J., Saxod R., Involvement of a chondroitin sulfate proteoglycan in the avoidance of chick epidermis by dorsal root ganglia fibers: a study using beta-D-xyloside., *Dev Biol.*, 148:1–9, 1991.
  65. Smith-Thomas L.C., Stevens J., Fok-Seang J., Faissner A., Rogers J.H., Fawcett J.W., Increased axon regeneration in astrocytes grown in the presence of proteoglycan synthesis inhibitors, *J Cell Sci* ,108:1307–1315, 1995.
  66. Stichel C.C., Hermanns S., Luhmann H.J., Lausberg F., Niermann H., D’Urso D., Servos G., Hartwig H.G., Muller H.W., Inhibition of collagen IV deposition promotes regeneration of injured CNS axons, *Eur J Neurosci*, 11: 632– 646, 1999.
  67. J. McGraw, G.W. Hiebert, and J.D. Steeves., Mini-Review Modulating Astroglia After Neurotrauma, *Journal of Neuroscience Research*, 63: 109–115, 2001.
  68. Faissner A., The tenascin gene family in axon growth and guidance, *Cell Tissue Res* ,290:331–341, 1997.

69. Zhu Z., Zhang Q., Yu Z, Zhang L, Tian D, Zhu S et al., Inhibiting cell cycle progression reduces reactive astrogliosis initiated by scratch injury in vitro and by cerebral ischemia in vivo, *Glia*, 55:546-558, 2006.
70. Zhang L., Zhang W.P., Chen K.D., Qian X.D., Fang S.H., Wei E.Q., Caffeic acid attenuates neuronal damage, astrogliosis and glial scar formation in mouse brain with cryoinjury, *Life Sciences*, 80: 530–537, 2007.
71. Li Y., Chen J., Zhang C.L., Wang L., Lu D., Katakowski M., et al., Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells, *Glia* ,49:407-417, 2005.
72. Forrester J.V., Wilkinson P.C., Inhibition of leukocyte locomotion by hyaluronic acid. *J Cell Sci*, 48:315-331, 1981.
73. Presti D., Scott J.E., Hyaluronan-mediated protective effect against cell damage caused by enzymatically produced hydroxyl (OH.), radicals is dependent on hyaluronan molecular mass, *Cell Biochem Funct*, 12:281-288, 1994.
74. Tobetto K., Nakai K., Akatsuka M., Yasui T., Ando T., Hirano S., Inhibitory effects of hyaluronan on neutrophil-mediated cartilage degradation, *Connect Tissue Res.*,29:181-190,1993.
75. Nawrat P., Surazynski A., Karna E., Palka J.A., The effect of hyaluronic acid on interleukin-1-induced deregulation of collagen metabolism in cultured human skin fibroblasts, *Pharmacol Res* ,51:473-477, 2005.
76. Sasaki A., Sasaki K., Konttinen Y.T., Santavirta S., Takahara M., Takei H., et al., Hyaluronate inhibits the interleukin-1 $\beta$ -induced expression of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 in human synovial cells, *Tohoku J Exp Med* , 204:99, 2004.
77. Ialenti A., Di Rosa M., Hyaluronic acid modulates acute and chronic inflammation, *Agents Actions* ,43:44-47, 1994.
78. Wobig M., Bach G., Beks P., Dickhut A., Runzheimer J., Schwieger G., et al., The role of elastoviscosity in the efficacy of viscosupplementation for osteoarthritis of the knee: a comparison of hylan G-F 20 and a lower-molecular-weight hyaluronan, *Clin Ther.*, 21:1549-1562, 1999.

79. Roth A., Mollenhauer J., Wagner A., Fuhrmann R., Straub A., Venbrocks R.A., et al., Intra-articular injections of high-molecular-weight hyaluronic acid have biphasic effects on joint inflammation and destruction in rat antigen-induced arthritis, *Arthritis Res Ther.* , 7:677-686, 2005.
80. Gotoh S., Onaya J., Abe M., Miyazaki K., Hamai A., Horie K., et al., Effects of the molecular weight of hyaluronic acid and its action mechanisms on experimental joint pain in rats, *Ann Rheum Dis* , 52:817-822, 1993.
81. Whalen M.J., Carlos T.M., Wisniewski S.R., Clark R.S., Mellick J.A., Marion D.W., et al., Effect of neutropenia and granulocyte colony stimulating factor-induced neutrophilia on blood-brain barrier permeability and brain edema after traumatic brain injury in rats, *Crit. Care Med.*, 28:3710-7, 2000.
82. Fitch M.T., Doller C., Combs C.K., Landreth G.E., Silver J., Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: In vivo and in vitro analysis of inflammation-induced secondary injury after CNS Trauma, *Journal of Neurosci.*,19: 8182-8198, 1999
83. Vizuete M.L., Venero J.L., Vargas C., Ilundáin A.A., Echevarría M., Machado A., et al., Differential Upregulation of Aquaporin- 4 mRNA Expression in Reactive Astrocytes after Brain Injury: Potential Role in Brain Edema, *Neurobiology of Disease*, 6: 245–258, 1999.
84. Kawamata T., Mori T., Sato S., Katayama Y., Tissue hyperosmolality and brain edema in cerebral contusion, *Neurosurg Focus.*,22:5, 2007.
85. Stiefel M.F., Tomita Y., Marmarou A., Secondary ischemia impairing the restoration of ion homeostasis following traumatic brain injury, *J Neurosurg*, 103:707-14, 2005.
86. Toshali R. Patel a., Gerald P. Schielke., Comparison of cerebral blood flow and injury following intracerebral and subdural hematoma in the rat, *Brain Research* , 829:125–133, 1999.
87. Kevin R. Lee, A. Lorris Betz, Intracerebral infusion of thrombin as a cause of brain edema, *J. Neurosurg*, 83: 1045-1050, 1995.