



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI

**YOĞUN BAKIMDA TAKİP EDİLEN TRAVMATİK BEYİN
HASARLI HASTALARDA MİKRORNA BİYOGENEZİNDE
YER ALAN KOMPONENTLERİN EKSPRESYON
DÜZEYLERİNİN PROGNOZLA İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ayşe ÇABUKUSTA ACAR

Antalya, 2019



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI**

**YOĞUN BAKIMDA TAKİP EDİLEN TRAVMATİK BEYİN
HASARLI HASTALARDA MİKRORNA BİYOGENEZİNDE
YER ALAN KOMPONENTLERİN EKSPRESYON
DÜZEYLERİNİN PROGNOZLA İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ayşe ÇABUKUSTA ACAR

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Suat Hayri SANLI

“Kaynak gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

Antalya, 2019

Bu araştırma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TTU-2017-2499)

TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakóltesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı'ndaki eğitimim süresince ve tez çalışmamın her aşamasında bana yol gösteren, desteğini ve güvenini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Suat Hayri SANLI'ya, bilgi ve deneyimleriyle tez çalışmamla ilgili yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Burçak YOLDAŞ'a, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Necmiye HADİMİOĞLU şahsında tüm öğretim üyelerine tüm kalbimle teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca tüm sıkıntıları ve sevinçleri birlikte yaşadığım, beraber çalışmaktan gurur ve mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma, kliniğimizin çok değerli sekreteri, bizim için canla başla çalışıp her daim destekçimiz olan Elif ONAT DİK MEN'e çok teşekkür ederim.

Hayatımın anlamlı hale gelmesini sağlayan canım kızım Berfin Duru ACAR'a, eğitimimde ve yaşamımın her alanında bana sonsuz destek olan annem Emine BAYRAKTAR'a ve eşim Baver ACAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	v
Tablolar Dizini	vii
Şekiller Dizini	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Tarihçe	2
2.2. Epidemiyoloji	3
2.3. Travmatik Beyin Hasarı Sınıflaması	4
2.3.1. Klinik Şiddetine Göre Travmatik Beyin Hasarı Sınıflaması	4
2.3.2. Hafif Şiddette Travmatik Beyin Hasarı	5
2.3.3. Orta Şiddette Travmatik Beyin Hasarı	6
2.3.4. Ciddi Şiddette Travmatik Beyin Hasarı	6
2.4. Patofizyoloji	7
2.4.1. Primer Hasar	8
2.4.1.1. Epidural hematomlar (EDH)	8
2.4.1.2. Akut subdural hematomlar	8
2.4.1.3. Kontüzyonlar veya intraserebral hematomlar	9
2.4.2. Sekonder Hasar	9
2.4.3. Beyin Ödemi	10
2.4.4. İntrakraniyal Basınç (İKB) Artışına Bağlı Beyin Hasarı	11
2.5. Kafa Travmalarında Yaralanma Şekilleri	12
2.5.1. Kranial Kemik Kırıkları	12
2.5.2. Fokal Yaralanmalar	12
2.5.3. Diffüz Yaralanmalar	12
2.6. Kafa Travmalarında Yaralanma Mekanizmaları	13
2.7. Travmatik Beyin Hasarının Radyolojik Sınıflaması	13
2.8. Travmatik Beyin Hasarında Hücre Ölümü Mekanizmaları	14
2.8.1. Nekroz	14
2.8.2. Apoptoz	14

2.9. Yoğun Bakım Yönetimi	17
2.9.1. Kardiyovasküler ve Respiratuar Destek	17
2.9.2. Analjezi ve Sedasyon	18
2.9.3. Elektrolit ve Endokrin Bozukluklar	18
2.9.4. Genel Destekleyici Önlemler	19
2.9.5. İntrakranial ve Serebral Perfüzyon Basıncına Yönelik Yönetim	20
2.9.6. İntrakranial Hipertansiyon Yönetimi	20
2.9.7. Terapötik Hipotermi ve Normotermi	21
2.9.8. Nöroprotektif Tedaviler	22
2.10. Kafa Travmasında Prognoza Etki Eden Nedenler	26
2.11. MikroRNA	29
2.12. MikroRNA Biyogenezi	30
2.13. Kafa Travması ve MikroRNA	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Periferik Kan Örneklerinden RNA İzolasyonu ve Real-Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile Hedef Moleküllerin Gen Ekspresyon Profillerinin Çalışılması	35
3.2. DICER1 (Dicer), Drosha, DGCR8, XPO5 (Exportin5) ve AGO2 (Argonaute2) Spesifik Primerleri İle Real Time-PCR Gen Ekspresyonlarının Çalışılması	38
3.3. Periferik Kan Örneklerinden Protein İzolasyonu ve Western Blot Yöntemi ile Hedef Moleküllerin Protein Ekspresyon Profillerinin Çalışılması	44
3.4. Hoefer SE260 Dikey Jel Sistemi Kullanımı (Bis-Tris Jel ile Kullanımı)	45
4. BULGULAR	49
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	62
7. ÖZET	63
8. ABSTRACT	65
9. KAYNAKLAR	67
10. EKLER	79
Ek 1. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onayı	79

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADTK	Araç Dışı Trafik Kazası
AGO2	Argonaute2
AİTK	Araç İçi Trafik Kazası
ATP	Adenozin Trifosfat
BH	Beyin Hasarı
BİK	Beyin İçi Kanama
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
BÖ	Beyin Ödemi
BT	Bilgisayarlı Tomografi
CT	ThresholdCycle
DGCR8	DiGeorge Syndrome Critical Region 8
TRBP	Transaktivasyon-Sorumlu (TAR) RNA Bağlayıcı Protein
DMAH	Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DVT	Derin Ven Trombozu
EDH	Epidural Hematom
EDK	Epidural Kanama
EVD	Ekstraventriküler Drenaj
GAPDH	Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
GKS	Glaskow Koma Skalası
GOS	Glasgow Outcome Skoru
GTP	RanGTP
HSP	Isı Şok Proteinleri
IR	Işık Refleksi
İKB	İntrakraniyal Basınç
KİBAS	Kafa İçi Basınç Artışı
KT	Kafa Travması
miRNA	MikroRNA

mRNA	Messenger RNA
PCR	Polymerase chain reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
pre-miRNA	Prekürsör miRNA
pri-miRNA	Primer miRNA
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RNA	Ribo Nükleik Asit
RT-PCR	Reverse Transkriptaz-PCR
SAK	Subaraknoidal Kanama
SBP	Serebral Perfüzyon Basıncı
SDK	Subdural Kanama
siRNA	Short İnterfering RNA
SKA	Serebral Kan Akımı
SVD	Serebral Vasküler Direnç
TA	Tansiyon Arteriyel
TBH	Travmatik Beyin Hasarı
XPO5	Exportin5

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Glaskow Koma Skalası Skoru	4
2.2. Primer hasar özellikleri	8
2.3. Sekonder hasar nedenleri	9
2.4. Kafa travmasının tipleri	23
2.5. Güncellenmiş tedavi önerileri	23
2.6. Güncellenmiş monitorizasyon önerileri	25
2.7. Güncellenmiş eşik değerler	25
2.8. TBH'lı hastaların BOS ve kanlarından çalışılan miRNA profilleri	34
3.1. cDNA protokolü	37
3.2. Reverse Transkriptaz-PCR reaksiyon şartları	37
3.3. Spesifik gen bölgesi çoğaltmak için kullanılan primer dizileri	38
3.4. Real Time PCR protokolü	39
3.5. Sıcaklık protokolü	40
3.6. Karışım içeriği	45
4.1. Hasta ve Kontrol gruplarının sosyodemografik özellikleri	49
4.2. Hasta grubu TresholdCycle (CT) değerleri	50
4.3. Kontrol grubu TresholdCycle (CT) değerleri	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>		<u>Sayfa</u>
2.1.	Primer ve sekonder hasar patofizyolojisi	7
2.2.	miRNA biyogenezi	32
2.3.	Hafif ve ağır kafa travmasında artan ve azalan miRNA tipleri	33
3.1.	RNA izolasyon basamakları	36
3.2.	Bölgeye spesifik primerler için amplifikasyon eğrileri	39
3.3.	Standart amplifikasyon eğrilerinin analizi	41
3.4.	Standart doğru analizi	42
3.5.	Spesifik erime eğrisi analizi	43
3.6.	Ct (ThresholdCycle) analizi	44
4.1.	Hasta grubu ThresholdCycle (CT) ortalamalarının karşılaştırması	52
4.2.	Kontrol grubu ThresholdCycle (CT) ortalamalarının karşılaştırması	52
4.3.	Hasta ve Kontrol grubu travma günü ThresholdCycle (CT) ortalamalarının karşılaştırması	53
4.4.	Hasta ve Kontrol grubu travma sonrası 72. saat ThresholdCycle (CT) ortalamalarının karşılaştırması	53
4.5.	Erken dönemde yoğun bakımdan taburcu olan hastaların travma anı protein ekspresyon profilleri	54
4.6.	Erken dönemde yoğun bakımdan taburcu olan hastaların travma anı protein ekspresyon profilleri	54
4.7.	30. gün sonunda hafif TBH kategorisine giren hastaların travma anı protein ekspresyon profilleri	55
4.8.	30. gün sonunda hafif TBH kategorisine giren hastaların travma sonrası 72. saat protein ekspresyon profilleri	55
4.9.	GKS skorları kötüleşen hastaların travma anı protein ekspresyon profilleri	56
4.10.	GKS skorları kötüleşen hastaların travma sonrası 72. saat protein ekspresyon profilleri	56
5.1.	MiRNA biyogenezinin hipoksi aracılı regülasyonu	60

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Travmatik beyin hasarlı hastaların yoğun bakım ünitesi takibinde klinik, radyolojik ve elektrofizyolojik veriler prognozu değerlendirmede katkı sağlasa bile kesin bir prognostik belirteç günümüzde henüz bulunamamıştır. Mikromalar küçük, 19-28 nükleotidden oluşan, protein sentezini posttranskripsiyonel düzeyde regüle eden, endojen, kodlanmayan RNA molekülleridir. MikroRNA biyogenezi çekirdekte ve sitoplazmada olmak üzere iki basamakta gerçekleşir. Bu basamaklarda özelleşmiş moleküller görev yapmaktadır. Bunlardan en spesifik olanları RNaz III ailesinden olan Drosha enzimi ve kofaktörü Pasha (DGCR8), taşıma reseptörü olan Exportin5, yine RNaz III ailesine ait bir enzim olan Dicer endonükleazı, kararlı zincir seçilimini sağlayan Argonaute proteindir. MikroRNA sentezinde görev alan moleküllerin işlevlerini doğru yapamamaları halinde sentezi hedeflenen mikroRNA'nın da fonksiyonunun bozulduğu bilinmektedir.

Son yıllarda mikroRNA'lar çeşitli hastalıklarda biyobelirteç olarak araştırılmaktadır. Yapılan klinik ve deneysel çalışmalar, travmatik beyin hasarında düzeyleri ölçülen, prognostik ve diagnostik açıdan değerli birçok mikroRNA göstermiştir. Ancak travmatik beyin hasarlı hastalarda mikroRNA biyogenez komponentlerinin seviyeleriyle ilgili veriler kısıtlıdır.

Çalışmamızda Akdeniz Üniversitesi Anestezi Yoğun Bakım Üniteleri'ne kabul edilen ve travmatik beyin hasarı gelişen 21 hastanın travma sonrası ilk saatlerde ve 72. saatte alınan kan örneklerinden Dicer, Drosha, DGCR8, Exportin5 ve Argonaute2 seviyelerinin ölçülmesi ve kontrol grubu ile karşılaştırılması planlanmaktadır. Çalışmanın kontrol grubunu travma nedeni ile yoğun bakımda takip edilen fakat beyin hasarı tanısı olmayan 21 hasta oluşturacaktır. Erken (travma sonrası ilk saatler) ve geç (72. saat) dönemde ölçülen protein düzeylerinin farklı olup olmadığının saptanması ve bu değişimin prognoza etkisinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Travmatik beyin hasarlı hastalarda Dicer, Drosha, DGCR8, Exportin5 ve Argonaute2 ekspresyonlarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farklı bulunacağını ve bu komponentlerin travmatik beyin hasarlı hastaların prognoz takibinde bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

Travmatik beyin hasarı (TBH) eksternal bir kuvvet neticesinde beyinde meydana gelen patolojik değişiklikler olarak tanımlanmaktadır (1).

2.1. Tarihçe

Kafa travmaları ile ilgili ilk rapor MÖ. 2800 yıllarında yaşayan Mısırlı hekim İmhotep'e aittir ve kafa travmalarını tedavi edilir, edilebilir, edilemez olarak üç gruba ayırmıştır. Yüzyıllar sonra bugünde, bu gruplandırma geçerlidir, ancak tedavi edilemez kafa travmaları oranı çok daha aza inmiştir (2,3).

İnka İmparatorluğu mezarlarında bulunan kafataslarının incelenmesi trepanasyonların (basit cerrahi araçlar kullanarak kafatasına delik açmak) başlangıçta batıl nedenler daha sonra tedavi amaçlı kullanıldığını düşündürmektedir. Avusturya ve Fransa'da cilalı taş devrine ait mezarda bulunan kafataslarının %10'unda trepanasyon belirtileri görülmüştür. Avrupa'da tedavi amacı ile ilk trepanasyonlar Hipokrat (MÖ.460-355), Cornecius Celcus (MS. 1. yüzyıl), Galen (MS.131-201) gibi eski Roma doktorları tarafından kullanılmıştır. İbni Sina (Avicenna) MS. 9. yüzyılda trepanasyonu önermiştir. Abulcasis MS. 11. yüzyılda özellikle çökme kırıkları ve birleşik kırıklarını trepanasyonla tedavi etmiştir. Anadolu'da erken bronz çağında Kültepe yöresinde yaşamış Asurların trepanasyon yaptıkları arkeolojik çalışmalarda ortaya çıkarılmıştır (4).

Capri'li Jacop, 1518'de kafa travmaları üzerine ilk kitabını yazmıştır. Bu kitap sadece nöroşirurji konuları üzerine yazılmış ilk kitaptır. 16. yüzyılda Fransız Jean L. Petit kommazyon, kontüzyon ve kompresyon ayırımını yaparken, İngiliz Pervical Pott kranioserebral travmalarda, kap değil onun içinin önemli olduğunu yani kafatasının değil, beynin önemini vurgulamıştır. Tönnis ve Lcew Kafa Travması Patofizyolojisi'ni 19 yüzyılda yazmışlardır. Russell Symond, Cairns KT sonrası kafa içi basınç artışını (KİBAS) gözlemleyerek tedavi amacıyla dekompresyon fikrini ortaya atmışlardır. 20 yy'da Tuebber ve Luria'nın nörofizyolojik TBH'nın, Teasdale ve Jenet 1974'de Glaskow Koma Skalası (GKS) skorunu tanımladılar (3).

2.2. Epidemiyoloji

TBH günümüzde dünya çapında önemli bir sağlık sorunu ve sosyoekonomik problem haline gelmiştir. Genç erişkinlerde mortalite ve morbiditenin başlıca nedenleri arasında gelmektedir. Motorlu taşıtların kullanımının artması ise TBH insidansının artmasının önemli nedenlerindedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2003 yılında yaklaşık 1.565.000 TBH vakasından 1.224.000'i acil servis başvurusunda, 290.000'i hastane başvurusunda bulunmuş ve 51.000'i ölümlerle sonuçlanmıştır. Avrupa'da ise 330 milyon kişiden her yıl yaklaşık 7.775.000 yeni TBH vakası bildirilmektedir (5). 2020 yılında dünya çapında TBH'nın çoğu hastalığı geride bırakarak ölüm ve sakatlığın majör nedeni olacağı varsayılmaktadır (5). Türkiye'de ise yıllık 700-800.000 TBH vakası görülürken, bu hastaların 250.000'i hospitalize edilmektedir (6).

Kafa travmalarının insidansı sosyo-ekonomik seviye farklılıklarına, yaş, ırk ve cinsiyete göre değişim göstermektedir. Yapılan araştırmalarda 15-25 yaş grubunun risk yüzdesinin fazla olduğu görülürken, insidans 25-60 yaş grubunda düşme eğilimine girmekte, 60 yaşından sonra ise tekrar yükselmektedir. Kadın/erkek oranı 1/2-1/2.8 oranında değişmektedir. Gelişmekte olan toplumlarda kafa travması görülme oranı daha sıktır (7).

TBH'nın %42'sinden ve TBH sonucu ölümlerin %60-75'inden trafik kazaları sorumludur. Çocukluklarda TBH bisikletten veya yüksekten düşme şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Büyük bir bölümü ev çevresinde meydana gelen hafif şiddetteki yaralanmalar genellikle yüksekten düşmelere bağlıdır, çocuk ve yaşlılarda sıktır. Spor yaralanmaları ise genellikle gençlerde olmakta ve daha az ciddi komplikasyonlar gelişmektedir. Futbol, hokey, binicilik, dağcılık ve motor sporlarında ciddi kafa travması sıklığı artmaktadır (8).

TBH sonrasında yaş, pupiller reaktivite, motor fonksiyon ve bilgisayarlı tomografi gibi klinik parametrelerin bütünleştirilmesi ile klinik seyir öngörülebilmektedir. Ancak bu değişkenler yalnızca orta derecede sensitivite ve spesifite sağlamaktadır (9,10).

Travmatik beyin hasarının klinik klasifikasyonu genellikle bilinç düzeyini değerlendiren Glaskow Koma Skalası (GKS) skoru yapılmaktadır. GKS üç komponentin (göz, motor ve verbal skala) reaktivite skorunun toplamından (min:3

- max:15) oluşmaktadır (11). Motor komponent ağır hasarların ayrımını sağlarken göz ve sözel komponent orta ve hafif şiddetli hasarlarda belirleyici olmaktadır. GKS skorlamasına göre hafif TBH 14-15, orta TBH 9-13 ve ağır TBH ise 3-8 olarak tanımlanmaktadır. GKS ile klinik şiddetin değerlendirilmesini kısıtlayan faktörler ise hastane başvurusu öncesi sedasyon uygulaması ve paralizidir (5).

2.3. Travmatik Beyin Hasarı Sınıflaması

TBH'yi kategorize etmenin kliniğe göre, hasarlanma mekanizmasına göre, patofizyolojisine göre, patoanatomisine göre, prognoz ve tedavisine göre gibi birçok yolu tanımlanmıştır (12, 13, 14)

2.3.1. Klinik Şiddetine Göre Travmatik Beyin Hasarı Sınıflaması

En yaygın kullanılan sınıflama yöntemidir. Glasgow Koma Skoru (GKS) ile tanımlanır (Tablo 2.1). GKS göz, motor ve verbal yanıtla değerlendirilmiştir (15).

GKS 14-15 olanlar hafif, 9-13 arası olanlar orta, 8 ve aşağısı ise ciddi travmatik beyin hasarının varlığına işaret eder (13, 15, 16, 17).

GKS tekrarlanabilir, objektif, kolay uygulanabilir ve prognoz belirlemede prediktif değeri yüksek bir değerlendirme yöntemidir, ancak hipoksi ve toksikasyondan etkilenir, sedatize, entübe, periorbital travma nedeniyle gözünü açamayan, ekstremitelerini kırık nedeniyle hareket ettiremeyen hastaları değerlendirmede yetersizdir ve beyin sapı reflekslerinin değerlendirmesini göz ardı eder (13,15,18).

Tablo 2.1. Glaskow Koma Skalası Skoru (15)

Göz	Motor	Verbal
Spontan açık (4)	Emirlere uyuyor (6)	Oryante (5)
Sözel uyaranla açık (3)	Ağrıyı lokalize eder (5)	Konfüze (4)
Ağrı ile açık (2)	Ağrı ile çeker (4)	Uyumsuz kelimeler (3)
Göz açma hareketi yok (1)	Ağrıya fleksiyon yanıt (3)	Anlamsız sesler (2)
	Ağrıya ekstansör yanıt (2)	Yanıt yok (1)
	Yanıt yok (1)	

2.3.2. Hafif Şiddette Travmatik Beyin Hasarı

Travmatik beyin hasarı şiddeti GKS'ye göre sınıflandırılmıştır. Hafif travmatik beyin hasarı, kafa travması sonrası nörolojik fonksiyonlarda kısa süreli ve geçici bir duraklama ile sonuçlanan, bilinç kaybının da eşlik edebildiği beyin hasarıdır. Travmatik beyin hasarı olan hastaların çoğu bu grupta yer alır, GKS 14-15 olan hastaları kapsar. Bu grup içerisinde cerrahi müdahale gerektiren, hayatı tehdit eden lezyon saptanma oranı %1'den azdır, acil servislerde bu grubu tanımlayabilmek için hafif şiddette TBH için risk sınıflandırmasına gidilmiştir. Hafif şiddette TBH 'düşük risk', 'orta risk' ve 'yüksek risk' olarak alt gruplara ayrılmıştır. Düşük risk grubu GKS'si 15 olup, asemptomatik olan, eşlik eden başka bir yaralanması, kusması, bilinç değişikliği, hafıza ve oryantasyon kaybı, travma öncesi bilinen yüksek risk faktörü olmayan, pupillerin normal, baş ağrısının varsa hafif olduğu veya hiç olmadığı, anamnezin net alınabildiği, önemsiz mekanizma ile 24 saatten kısa süre önce oluşmuş hastaları kapsar. Bu grupta intrakraniyal hematoma görülme riski %0,1'den azdır. Orta risk grubu GKS'si 15 olup, kısa süreli bilinç kaybı, posttravmatik amnezi, kusma, baş ağrısı, intoksikasyon durumlarından bir veya daha çoğunu barındıran hastaları kapsar. Bu grupta %1.3 arasında cerrahi ihtiyacı olan intrakraniyal hematoma saptanması nedeniyle BT çekilmesi önerilmiştir. GKS'si 14-15 olan, fokal nörolojik defisiti bulunan, kafatası tabanı kırığı, pupiller asimetrisi, multipl travması, ciddi ağrılı çeldirici yaralanması bulunan, klavikulanın üzerindeki seviyelerde travma maruziyetinin bulguları, bilinç kaybı olan, posttravmatik konfüzyonu veya amnezisi, kusması olan, posttravmatik nöbet geçiren, anamnezi güvenilir olmayan, çocuk istismarı şüphesi olan, yakın dönemde ilaç veya madde alımı öyküsü olan, anamnezde kanama bozuklukları, antikoagülasyon kullanımı, bilinen nörolojik hastalığı, epilepsisi olan, 60 yaş üzerindeki hafif şiddette TBH olguları yüksek riskli olarak tanımlanmıştır. Bu grubun %10'unda cerrahi gerektiren intrakraniyal hematoma saptanmıştır (15,16).

2.3.3. Orta Şiddette Travmatik Beyin Hasarı

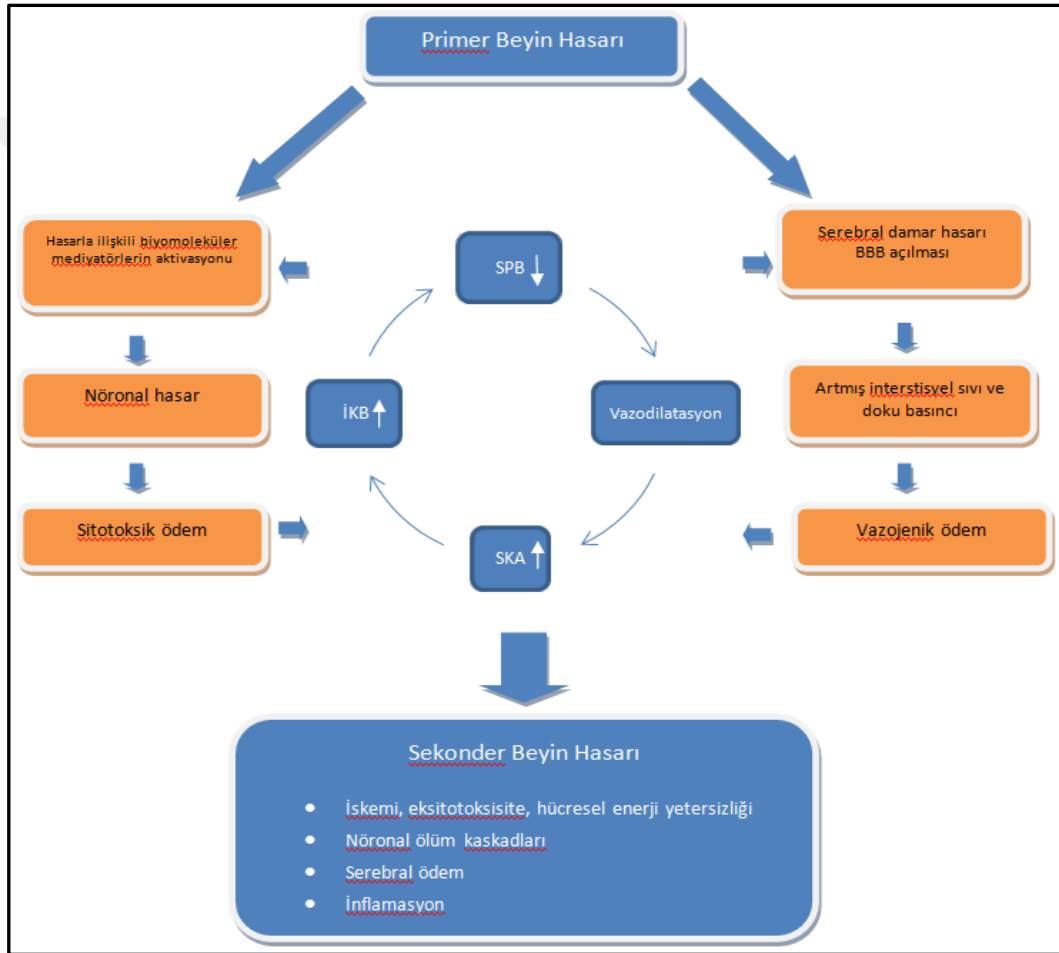
Kafa travmalı hastaların %10'unda orta şiddette TBH görüldüğü saptanmıştır. GKS 9 ile 13 arasındadır. İzole orta şiddetli TBH mortalitesi %20'den azdır, ancak %50 kadarı uzun dönem sakatlık yaşar. Orta şiddette TBH'nin %40 oranında BT bulgusu verdiği, %8'nin operasyon ihtiyacı olduğu saptanmıştır (15,16).

2.3.4. Ciddi Şiddette Travmatik Beyin Hasarı

Acile hayatta iken başvuran kafa travması vakalarının %10'u ciddi şiddette TBH'dir, GKS'si ≤ 8 olarak tanımlanmıştır. Mortalite yaklaşık olarak %35 oranında olup, vakaların %25'i cerrahi girişime ihtiyaç duymuştur. Tüm ciddi travmatik beyin hasarı saptanan hastalara BT çekilmesi ve operasyon yapılabilen merkeze transfer edilmesi önerilmiştir (15,16).

2.4. Patofizyoloji

Kafa travması vakalarındaki artışa rağmen bu hastalardaki mortalite oranının son 20 yılda ciddi bir düşüş göstermesi, kafa travması patofizyolojisinin son dönemde daha net olarak ortaya konabilmesine bağlanabilir (Şekil 2.1). Mortalitedeki bu düşüşü, morbidite oranlarında düşüşün izlemiyor olması da henüz kafa travması ve sonrasındaki süreç hakkında ortaya konulması gereken daha birçok ayrıntının varlığını göstermektedir.



BBB: Kan beyin bariyeri, SKA: Serebral kan akımı, SPB: Serebral perfüzyon basıncı, İKB: İntrakranial basınç

Şekil 2.1. Primer ve sekonder hasar patofizyolojisi (19)

2.4.1. Primer Hasar

Travma sonrası beyinde gelişen hasar primer ve sekonder hasar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Primer hasar travma anında oluşan ve mekanik kuvvet neticesinde gelişen doku deformasyonu olarak tanımlanmaktadır. Bu deformasyonlar direkt olarak damarlar, nöronlar ve prosesleri, glia, mikrogliaları fokal, multifokal ya da diffüz şekilde zarar verebilmektedir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Primer hasar özellikleri

1. Vasküler hasarlanma (fokal, multifokal, diffüz) İntraserebralhemoraji Diffüzvasküler hasar Subduralhemoraji Ekstraduralhemoraji (epiduralhemoraji) Subaraknoid kanama
2. Nöronal hasarlanma (fokal, multifokal veya diffüz)
3. Aksonal hasarlanma (fokal, multifokal veya diffüz)
4. Kontüzyon
5. Laserasyon

2.4.1.1. Epidural hematomlar (EDH)

Sıklıkla pterion noktasında temporal kemiğin en ince olduğu parçadan kırılması sonucunda %60 oranında orta meningeal arter kaynaklı, nadiren özellikle posterior fossada venöz kaynaklı kanamalardır. Epidural hematomun erken cerrahi işlemi sadece hayat kurtarmaz aynı zamanda derlenmenin hızlı olmasını sağlar (20). Ağır TBH ile başvuran hastaların %20'sinde mortalite ile sonuçlanan epidural hematomlar gözlenmiştir (21).

2.4.1.2. Akut subdural hematomlar

Travmatik ya da serebral atrofiye sekonder köprü venlerin hasarından veya kortikal arterlerden kaynaklanmaktadır. Ağır TBH olan hastaların %24'ünde, tüm travmatik beyin hasarının %10-20'sinde görülmele beraber %50'den %90'a varan oranda mortaliteye sahip olan fokal intrakraniyal lezyondur (21).

2.4.1.3. Kontüzyonlar veya intraserebral hematomlar

Ağır TBH olgularının %20-30'unda görülür, genellikle intraserebral vasküler yapıların yaralanmasına bağlı frontal ve temporal loblarda parankimin hasarlandığı, parankimin içine ya da etrafına olan yavaş, çok sayıda mikro boyutta kanamalardır. Travma esnasında piaaraknoid membranın kontüzyon alanı etrafında torsiyona uğraması ile oluşur, çoğu zaman subdural hematomla bir aradadırlar (21).

2.4.2. Sekonder Hasar

Sekonder hasar ise primer hasardan sonra hipoksi, hiperkapni, hipotansiyon, kafa içi basıncının artması ve hiperglisemi gibi faktörlerin zaman içinde oluşturduğu hasardır (Tablo 2.3). Kafa travmalarında tedavi sekonder hasarı önlemeye yönelik olup sekonder beyin hasarının önlenmesi morbidite ve mortaliteyi önemli ölçüde azaltmaktadır (22).

Tablo 2.3. Sekonder hasar nedenleri (22)

Sistemik	İntrakranial
Hipoksi	Kafa içi basınç artışı
Hipotansiyon	Hematom
Anemi	Konvülsiyon
Hipo/hiperkarbi	Enfeksiyon
Ateş	Vazospazm
Hipo/hiperglisemi	
Hiponatremi	

Kafa travmasının ilk dönemi travmanın oluşturduğu doğrudan doku hasarı, beyin kan akımı ve beyin metabolizmasında oluşan hasar ile karakterizedir. Bu dönemde anaerobik glikoliz nedeniyle laktik asit birikimi, membran geçirgenliğinde artış ve ödem oluşur. Anaerobik glikoliz yeterli enerji sağlayamayıp var olan ATP depoları da tükenince, ATP'ye bağımlı çalışan iyon pompaları hasar görür. Bu patofizyolojik kaskadın ikinci aşamasında glutamat, aspartat gibi eksitatör nörotransmitterlerin aşırı salınımı, N- metil-D aspartat, voltaj bağımlı sodyum ve kalsiyum kanallarının aktivasyonu terminal membran aktivasyonu oluşur. Sodyum ve kalsiyumun sürekli hücre içine akışı hücrelerin ölümüne neden olan intraselüler süreçleri başlatır. Hücre içi kalsiyum, lipid

peroksidaz, proteaz ve fosfolipazları aktive ederek intrasellüler serbest yağ asidi ve serbest radikallerin konsantrasyonunu artırır. Ayrıca hücre içi translokaz ve endonükleaz gibi maddelerin aktivasyonu hücre membranı ve DNA'ya hasar vererek nekroz ya da apoptozise neden olur (22).

2.4.3. Beyin Ödemi

Klinik tabloyu ağırlaştırıcı diğer bir faktör, travma sonrası akut dönemde görülen beyin ödemidir. Travma sonrasında, 24 saat içerisinde çekilen beyin tomografisinde dikkat çeker. Tomografideki bulgular ventriküllerde küçülme, 3. ventrikülün ve beyin sapı etrafındaki sisternlerin görülmemesidir. Bu tomografi bulguları, intrakraniyal basıncın arttığını gösterir. Travma sonrasında gelişen beyin ödeminde serebral kan akımının artışına bağlı ortaya çıkan beyin konjesyonu söz konusudur. Travma sonrası beyin ödemi vazojenik, sitotoksik, hidrostatik veya hiposmotik şekillerde görülebilir.

Vazojenik ödem en sık görülen beyin ödem şeklidir. Beyin kapiller endotelial hücrelerinin permeabilitesinin artması, yani kan beyin bariyerinin bozulması sonucu vasküler bölümden ekstraselüler sahaya doğru albumin gibi makromoleküllerin sızdığı ve bunu izleyen dönemde beyin parankiminin içine suyun girdiği ödem şeklidir. Beyaz cevherde su ve sodyum seviyesinin artmasına karşılık K seviyesinde düşmesi söz konusudur. Benzer değişiklikler serebral kortekste de olmakla birlikte, kortekste su artması ve K azalması daha düşük orandadır. Vazojenik ödemde astrositler hem gri hem de beyaz cevherde şişer.

Sitotoksik ödem hücre membranındaki sodyum ve potasyum pompalarının uygunsuz fonksiyon görmesi sonucu hücre metabolizma yetersizliğine bağlı gelişir. ATP'ye bağlı Na pompası yetmezliği nedeniyle Na hızla hücre içine toplanırken bunu izleyen dönemde osmotik dengeyi korumak için suyun hücreye girdiği, vazojenik ödemden farklı olarak kapiller permeabilitesinin bozulmadığı bir ödem şeklidir. Sitotoksik ödemde beyaz cevherdeki su ve iyon terki vazojenik ödem için belirtilen oranlara uygunluk gösterirken, kortekste sadece sodyum artışı saptanmıştır (23).

Osmotik ödem KBB sağlam olmasına karşın, uygunsuz osmotik gradient sonucu aşırı su birikmesine bağlı gelişir.

Hidrostatik ödem akut hipertansiyonda, artmış basıncın direkt olarak serebral kapillere iletilmesi sonucu kapiller vazodilatasyon gelişmesi ve proteinsiz transudanın ekstrasellüler sahaya geçişi ile gelişen bir ödem şeklidir. Hidrostatik ödemin başka örneği periventriküler ödem ile birlikte olan hipertansif hidrosefalustur. Bu durumda beyaz cevherdeki sıvı birikimi vazojenik ödemdekine benzerken, proteinden yoksundur (23).

2.4.4. İntrakraniyal Basınç (İKB) Artışına Bağlı Beyin Hasarı

Beyin hasarında (BH), özellikle TBH'da prognozu etkileyen faktörlerden biri de İKB'dir. Kafatası boşluğu sabit bir hacme sahiptir ve değiştirilemez, buna "Monro-Kellie Doktrini" denir (24). Kafa içi hacmini beyin dokusu (%80), beyin omurilik sıvısı (%10) ve serebral kan hacmi (%10) oluşturur. Bu kompartmanların birinde artma olduğunda diğer kompartmanlardan bir ya da birkaçında azalma olmaktadır. Beyin bu kompanzasyon yeterliliğini kaybettiğinde İKB artışı olur. İKB'nin normal değerleri erişkinlerde 20 mmHg olup, bu değerlerin üzeri artmış İKB olarak değerlendirilmektedir (25).

Kafa travmalarından sonra gelişen İKB artışı kafa travmasına bağlı mortalite ve morbiditenin önemli nedenlerinden biridir. TBH'lı hastaların yarısından fazlasında hospitalizasyonlarının bir döneminde İKB 20 mmHg ve üzerindeki değerlere yükselmektedir (26). İlk ölçülen İKB değeri 40 mmHg ve üzerinde olan hastalarda mortalite %69 olarak bildirilmiştir (27).

Beyin dokusunun fonksiyonlarını yerine getirmesi için oksijen ve glukoz gibi gerekli metabolitler serebral kan akımı (SKA) ile sağlanmaktadır. SKA birçok faktör tarafından kontrol edilmektedir. Otoregülasyon, serebral metabolizma, metabolik ve nöronal faktörler bunlardan birkaçıdır. Otoregülasyonda SKA'yı oluşturan komponentler serebral perfüzyon basıncı (SPB) ve serebral vasküler dirençtir (SVD). İKB serebral perfüzyon basıncının bir komponenti olup, SKA'ını belirlemede rol oynamaktadır.

SKA= SPB / SVD olarak formüle edilirken;

SPB= Ortalama Arteryel Basınç - (İKB + Serebral Venöz Basınç) olarak ölçülebilmektedir.

Bu durumda İKB artışı, SKA'yı azaltarak serebral dolaşımı bozmakta ve beyin hasarının artmasına neden olmaktadır (25,27). Bu nedenle TBH olan hastalarda İKB'yi azaltmayı amaçlayan tedaviler uygulanmaktadır.

2.5. Kafa Travmalarında Yaralanma Şekilleri

2.5.1. Kranial Kemik Kırıkları

Kraniyum elastikiyetinin deformasyonu sonucu oluşmaktadır. Kranial kemik, kafaya gelen darbeler sonucu kırılarak darbenin şiddetini absorbe eder böylece serebral dokunun hasarını azaltmada rol almaktadır. Kranial kemik kırıkları sık görülmelerine rağmen çoğu kez beraberinde ciddi beyin yaralanması bulunmamaktadır. Ayrıca ciddi beyin hasarı ile sonuçlanan yaralanmalarda kranial kemik kırığı eşlik etmeyebilir. Kranial kemik kırıkları 3 ana başlıkta sınıflandırılmaktadır;

- Lineer kırıklar,
- Çökme kırıkları,
- Kafa tabanı kırıkları.

2.5.2. Fokal Yaralanmalar

Kafa travması sonrası görülen lokalize harabiyetle karakterize makroskopik hasarı ifade etmektedir. Travma sonrası erken dönemde en önemli amaç, cerrahi olarak tedavisi mümkün olan bu lezyonları gecikmeden ortaya koyabilmektir. Fokal yaralanmalar 2 ana başlıkta sınıflandırılmaktadır;

- Kontüzyon,
- İntrakranial kanamalar.

2.5.3. Diffüz Yaralanmalar

Hem fonksiyonel hem yapısal karakterde olup, yaygın ve geniş beyin hasarını kapsamaktadır. Oluşum mekanizmasında, hızlı kafa hareketleri (akselerasyon ve deselerasyon) sonucu beynin büyük bir kısmında fonksiyon kaybı yer almaktadır. Diffüz yaralanmalar 2 ana başlıkta sınıflandırılmaktadır;

- Konküzyon,
- Diffüz aksonal yaralanma (5).

2.6. Kafa Travmalarında Yaralanma Mekanizmaları

1. Temas (kontak) ile gerçekleşen kafa travması,
2. Akselerasyon-deselerasyon ile gerçekleşen kafa travması.

Bu darbe mekanizmaları, beyinde üç çeşit fiziksel olaydan birinin veya birkaçının oluşmasına yol açmaktadır;

- a) Kompresyon (ezilme, çökme),
- b) Gerilme,
- c) Yırtılma, ayrılma.

Tablo 2.4. Kafa travmasının tipleri (5)

A) Temas Yaralanmaları	B) Akselerasyon Yaralanmaları
1. Kraniyumu deforme eden yaralanmalar a. Lokal : - Kemik kırıkları <ul style="list-style-type: none">• Lineer• Çökme• Epidural hematoma• Kup kontüzyon b. Uzak: Kubbe veya kaide kırıkları	1. Yüzey gerilmeleri <ul style="list-style-type: none">• Subdural hematoma• Kontur kup kontüzyon• Derin zorlanma• Konküzyon sendromları• Diffüz aksonal yaralanma
2. Şok dalgası yaralanmaları a. Kontur kup (counter coup) kontüzyon b. İntraserebral hematoma	

2.7. Travmatik Beyin Hasarının Radyolojik Sınıflaması (28,29)

- Kemik fraktürleri
- Epidural hematoma
- Subdural hematoma
- Subaraknoid kanama
- İntraparankimal hemoraji
- Serebral kontüzyon
- İnterventriküler hemoraji
- Fokal veya diffüzaksonal hasar

2.8. Travmatik Beyin Hasarında Hücre Ölümü Mekanizmaları

Nöronal hücre ölümü, travma gibi patolojik şartlarda disfonksiyone hücrelerin çıkarılmasının yanı sıra SSS'nin normal gelişimi için gereklidir. Ancak aşırı hücre kaybı akut ve kronik nörodejeneratif hastalıkların temelini oluşturmaktadır. TBH sonrası nekroz ve programlanmış hücre ölümü (apoptozis) olarak iki tür hücre ölümü meydana gelir. Apoptozis, TBH sonrası nöronal hücre ölümünde kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (30).

2.8.1. Nekroz

Ekstrem aminoasit nörotransmitterlerin aşırı salınımı ve metabolik yetersizlikle birlikte, şiddetli mekanik veya iskemik -hipoksik doku hasarına yanıt olarak oluşur. Takiben fosfolipazlar, proteazlar ve lipidperoksidazlar biyolojik zarı otoliz ederler. Geriye kalan hücre artıkları antijen olarak bilinip enflamatuar işlemlerle uzaklaştırılır, yerine skar dokusu bırakır (30).

2.8.2. Apoptoz

Normalde fizyolojik bir süreçtir. Embriyonik gelişim safhalarında çeşitli doku ve organların oluşumu sırasında o dokuyu veya organı oluşturacak hücrelerin moleküler temelleri olan bir uyarıyla yaşamsal faaliyetlerine son vermelerine, yani programlanmış hücre ölümüne verilen isimdir. Apoptozisde bir hücrenin erimesi kendi içerisinde oluşan bir durumdur (31).

Fosfatidilserinin translokasyonu, nükleer zarların lizisi, kromatin yoğunluğu ve DNA parçalanması ile seyreden olaylar ilerleyici zar bütünlüğünün bozulmasını tetikler. Nekroza benzer şekilde yoğunlaşmış intrasellüler materyaller (apoptotik cisimler) büzülen küçülen hücreden eksitotik mekanizmalarla uzaklaştırılırlar. TBH'da nekrotik ve apoptotik hücre ölümü kontuze alanlarda yaralanma sınır bölgesi ve subkortikal bölgelerde tespit edilmiştir (32,33).

TBH da apoptoza giden astrositik hücreler erken postravmatik dönemde, yeterli ATP yapımının sağlandığı fizyolojik membran potansiyelli ortamında morfolojik olarak sağlamdır. Primer travmayı takip eden saatler veya günler içerisinde apoptoz belirgin hale gelir. İnterlökin çevirici ailesinin spesifik

proteazını temsil eden kaspazların ardışık aktivasyonu ve etkisizleştirilmesi programlanmış hücre ölümünün en önemli mediatörleridir (34).

Kaspazlar apoptotik hücre ölümü esnasında önemli rol oynayan multigen ailesinden oluşan sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Kelime olarak "**Cysteine Aspartate Specific Prote ASES- CASPASE**"dan türetilmiştir. Hücre ölümü sırasında meydana gelen pek çok sellüler ve morfolojik değişimler, bu enzimlerin rol oynadığı birtakım süreçler neticesinde gelişir (35). Apoptozun işaretleri olan morfolojik değişiklikler (membran tomurcuklanması, kromatinde yoğunlaşma, nükleer parçalanma) spesifik substratları kaspaz bağımlı hücre bölünmesine gerektirir (30).

Kaspaz aracılı apoptozisin aktivasyonunda üç ayrı yolun varlığı bilinmektedir;

1. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis,
2. Hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile tetiklenen apoptozis,
3. Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis.

Apoptoz embriyonik gelişim, doku homeostazisi, ya da bağışıklık, savunma gibi hayatın temel süreçler içinde yer almaktadır. Kanser ve dejeneratif bozukluklara katkıda bulunurlar. Adenohipofizin ektodermden (Ratkhe Kesesi) farklılaşması tamamen bir apoptotik süreç sonucudur. Gelişimin erken evrelerinde adenohipofizdeki apoptotik faaliyetler aktif **Kaspas-3** ile gösterilmiştir (36). Apoptozis, beyin ve omurilik zedelenmesi modellerinde programlanmış hücre ölümü temel bir mekanizması olarak karakterize edilmiştir. Nekrozun aksine, apoptotik hücre ölümü yaygın gecikmeli vedaha uzun süreli olduğu TBH hastaların plazma ve BOS örneklerinde pro-apoptotikproteinlerle gösterilmiştir. Oligodentrositlerdeki gecikmiş apoptotik hasar immünohistokimyasal analizlerle de gösterilmiştir (37).

Ağır TBH sonrası BOS'nda pro-apoptotik (sFas, kaspaz-3) ve anti-apoptotik (bcl-2), proteinlerinin uzun bir süre aktive olduğu, özellikle Kaspaz-3 aktivasyonu derecesinin, yaralanmanın ciddiyetine bağlı olabileceği gösterilmiştir. Bu üç moleküldeki paralel artışlar, post-travmatik beyin ödemi, ikincil hücre yıkımı ve kronik hücre kaybı patofizyolojisinde apoptozda rolü gösterilmiş ve post-travmatik tedavi edici müdahaleler için yeni hedef olarak önerilmiştir (38).

Son zamanlarında TBH mağdurlarında yaşa bağlı nörodejeneratif hastalıkların sıklığında artış görülmüş; patogeneğinde eksitoksite, apoptozis, inflamatuvar olaylar, demiyelinizasyon, beyaz cevher patolojilerinin yanı sıra azalmış nörojenizasyon sorumlu tutulmuştur (37).

Isı şok proteinleri (HSP); adları “ısı” ile anılmakla birlikte sentezlenmeleri soğuk ve sıcak şoku, travma, hiperosmotik basınç, kimyasal maddeler, pestisitler, ağır metaller, oksijen azlığı veya yokluğu, besin azlığı veya yokluğu gibi stres faktörlerinde de artmaktadır. Bu yüzden HSP’ler “**stres proteinleri**” olarak da bilinmektedir. Belirtilen stres faktörlerinin etkisinin moleküler seviyede belirlenmesinde işaretleyici olarak genellikle bu proteinler kullanılır (39).

Merkezi sinir sistemindeki inflamasyon genellikle iskemi, travma, enfeksiyon ve diğer nöronal yaralanmalara eşlik eder. Artık bağışıklık sisteminin mikrogliya aktivasyonu, lökosit iyileştirme ve sitokin salgılanmasına bağlı nöronal hücre ölümünde majör bir rol oynadığı kabul edilmektedir.

Beyin hasarını takiben immün yanıtta HSP’lerin katılımı inflamatuvar durumu düzeltmek için bir girişim olarak görülebilir. HSP’ler, moleküler büyüklüğüne göre çeşitli aileleri kapsamaktadır. En çok çalışılanlardan biri Hsp-70’dir. **Hsp70**’nin çoğunlukla intrasellüler kompartmanda mevcut olduğu ve tekrar katlanan veya toplanan proteinler olarak işlev gören bir moleküler şaperon olarak etki gösterdiği düşünülmektedir (30,40).

Zhang ve ark. tavşan ağır kafa travması modelinde, travmadan 4 saat sonra lezyon çevresinde belirgin lezyondan uzakta daha az kontrol grubuna göre anlamlı Kaspaz-3 ve Hsp70 pozitif immünohistokimya boyamayı göstermişler; ağır travma sonrası erken aşamasının bir özelliği ve yaralanma zamanını tahmin etmek için uygulanabilir olduğunu bildirmişlerdir (41).

Wang ve ark. sıçan düffüz aksonal injury modelinde hipokampus HSP-70 mRNA’sının, RT-PCR amplifikasyonu daha sonra agaroz jel elektroforezi ile DAH sonrası 4. saatte saptanmış, 24 saatte maksimuma ulaşmış ve 48 saat sonra düşmüştür (42).

TBH sonrası salınan katekolaminler nörojenik pulmoner ödem ve myokard iskemisine neden olabilir. Ek olarak, katekolaminle indüklenmiş myosit disfonksiyonu ve inflamatuvar cevaplar nörojenik stunned myokard sendromuna

neden olabilir. Bu durum nörolojik aracılı ve EKG değişiklikleri, yükselmiş kardiyak troponin koroner iskemi olmaksızın ventriküler disfonksiyonla karakterize geri dönüşümlü bir kardiyak hasardır. Kardiyojenik pulmoner ödem ve non-hemorajik sistemik hipotansiyon sıklıkla TBH sonrası gelişmekte olup, yüksek mortaliteyle ilişkilidir. Hasara cevap olarak nöronlar ve glial hücreler proinflamatuvar sitokin üretir ve lokal ve sistemik inflamatuvar cevaba neden olur. Otonomik ve nöroendokrin yolların bozulması ise infektif komplikasyonlarla ilişkili olan immünsupresyona neden olabilirler (5).

Endokrin ve elektrolit anormallikleri, özellikle sodyum ve glukoz dengesinin bozulması, hipotalamik-pitüiter-adrenal aks disfonksiyonu ve buna sekonder adrenal yetmezlik TBH sonrasında sık görülür. İleri yaş, diffüz aksonal hasar, şiddetli serebral ödem, travmatik vazospazm ve kafa tabanı kırıkları risk faktörlerini oluşturmaktadır (5).

2.9. Yoğun Bakım Yönetimi

TBH'nin yoğun bakım yönetimi, hasarlanmış beyine yönelik müdahalelere ek olarak titiz genel yoğun bakım desteğini de içermektedir.

2.9.1. Kardiyovasküler ve Respiratuvar Destek

Hipotansiyon, geçici atakları da dâhil olmak üzere kötü nörolojik sonuçlarla ilişkilidir. Bu nedenle önlenmeli ya da geliştirse hızlıca tedavi edilmelidir. Övolemi izotonik kristalloidlerle sağlanmalıdır. Hipotonik solüsyonlar serebral ödemi kötüleştirebileceği için bu sıvıların uygulanmasından kaçınılmalıdır. Vazopressörlere, yeterli sıvı resüsitasyonu yapılmasına rağmen serebral perfüzyonu idame ettirmek için ihtiyaç duyulabilir ve genellikle norepinefrin kullanılır. İnvaziv olmayan kardiyak output monitorizasyonu sıvı durumunu optimize etmek için yararlı olabilir.

Pnömoni ve akut akciğer hasarı gibi pulmoner komplikasyonlar TBH sonrasında sıktır ve agresif olarak tedavi edilmelidir. Yüksek tidal volümle ventilasyon, beyin hasarı sonrası akut akciğer hasarı gelişimi açısından majör bir risk faktörüdür. Akciğer koruyucu ventilasyon stratejisi TBH hastaları için gereklidir. Pozitif ekspiryum sonu basıncının ılımlı seviyeleri (≤ 15 cmH₂O)

intrakraniyal basıncı anlamlı olarak yükseltmezler. Hiperkapni serebral vazodilatasyon ve intrakranial basınçta yükselmeye neden olur. Buna karşılık hipokapni ise serebral vazokonstriksiyon neticesinde serebral iskemiyle sonuçlanır. Bu nedenle normokapninin korunması önerilmekte ve rutin hiperventilasyon İKB kontrolünde artık kullanılmamaktadır.

2.9.2. Analjezi ve Sedasyon

Yeterli sedasyon İKB'yi kontrol altında tutmak, serebral metabolik ihtiyacı ve hasarlı beynin iskemiye olan toleransını azaltmak için ağır TBH hastalarının yönetiminde anahtar bir komponenttir. Propofol, İKB'yi efektif olarak azaltması ve hızlı titre edilebilen sedasyon seviyelerine imkan vermesi nedeni ile sıklıkla kullanılır. İnfüzyon hızı 4 mg/kg/saat'i aşmamalıdır. Midazolam total propofol dozunu azaltmak amacıyla tedaviye eklenebilir. Sedasyon kesintileri yüksek İKB'li hastalara uygun değildir. Analjezi genellikle parasetamol ve fentanil gibi opioid infüzyonlarıyla sağlanmaktadır. Nöromuskuler bloker ajanlar rutin olarak kullanılmamalıdır fakat refrakter intrakranial hipertansiyonlu hastalarda düşünülebilir.

2.9.3. Elektrolit ve Endokrin Bozukluklar

Sıvı ve elektrolit anormallikleri, özellikle sodyum dengesinin bozulması, tanı ve tedaviye sistematik bir yaklaşım kullanılarak yönetilmelidir (Tablo 2.2). Hiper ve hipoglisemi kötü sonuçlarla ilişkilidir ve bu nedenle önlenmelidir. Hem sıkı, hem de gevşek glisemik kontrol TBH sonrası zararlıdır. Orta derecede glukoz konsantrasyonları (7.0 - 10.0 mmol/litre) hedeflenmelidir.

Pitüiter yetmezlik taraması yüksek riskli hastalarda ve açıklanamayan hiponatremi veya hipoglisemi durumunda ya da uzun süreli yüksek doz vazopressör ihtiyacı olan hastalarda düşünülebilir. Hidrokortizon refraktör hipotansiyon için gerekli olabilir ve hiponatreminin sebat etmesi durumunda tedavi mineralokortikoidlerle desteklenebilir.

2.9.4. Genel Destekleyici Önlemler

Anemi: Restriktif transfüzyon stratejileri TBH'lı hastalarda, hasarlı beynin iskemiye olan duyarlılığı nedeniyle uygun olmayabilir. Ancak TBH sonrası transfüzyonu başlatmak için optimal hemoglobin seviyesi henüz tanımlanmamıştır.

Koagülopati: Koagülasyon bozuklukları üç TBH hastasından birinde gelişmekte ve hem hipokoagülasyon hem de hiperkoagülasyon durumu gözlenmektedir. Sebepler iyi tanımlanmamış fakat büyük miktarda doku faktörü salınması, değişmiş protein C homeostazı ve trombosit fonksiyon bozukluğu ile ilişkilendirilmiştir. İşlevsel analizler ve tromboelastometri, koagülasyon bozukluğunun derecesini ve en uygun tedaviyi belirlemek için rutin laboratuvar testlerinden daha faydalı olabilir.

Sempatik hiperaktivite: Beyin sapındaki inhibitör merkezlerin bozulması, siklik ajitasyon, distoni, ateş, taşikardi, hipertansiyon ve terlemeyle karakterize paroksizmal sempatik hiperaktiviteye neden olabilir. Tedavi; opioidler (özellikle morfin), beta adrenoreseptör antagonistleri ve santral etkili alfa 2 adrenoreseptör agonistlerini (klonidin, deksmedetomidin gibi) içermektedir. Haloperidolden kaçınılmalıdır.

Nöbetler: Erken posttravmatik nöbetler (7 gün içinde) TBH sonrası %20'den daha fazla hastada gözlenmektedir. Nöbet aktivitesinin agresif olarak tedavi edilmesi gerekmektedir. Ancak profilaktik antikonvülzan ilaçların nöbetlerin erken başlangıcının önlenmesinde efektif olduğuna veya bu ajanların geç posttravmatik nöbet insidansını azalttığına dair yüksek kalitede kanıt bulunmamaktadır. Fenitoin nöbet profilaksisinde sık kullanılmaktadır fakat fenitoinin olumsuz yan etkileri ve ilaç etkileşim profili nedeniyle levetirasetam ilk basamak ilaç olarak popüler hale gelmeye başlamıştır. Eğer profilaksi uygulanıyorsa, antikonvülzanlar nöbeti olmayan hastalarda 7 günden daha uzun süre kullanılmamalıdır.

Diğer destekleyici önlemler: TBH hastaları stres ülseri riski altındadır ve sıklıkla bozulmuş gastrointestinal motiliteye sahiptir. Erken enteral beslenme önerilmekte ve laksatif kullanımı İKB artışına neden olabilecek olan konstipasyonun önlenmesi açısından önem arz etmektedir. Yatak başının 30° - 45°

elevasyonu İKB'ı ve ventilatör ilişkili pnömoni riskini azaltır. Derin ven tromboz riski TBH sonrası yüksektir. Yoğun bakım ünitesine girişten itibaren fiziksel profilaksi yöntemlerine ek olarak, 24 saatlik klinik ve radyolojik stabilitenin ardından farmakolojik tromboprofilaksi tavsiye edilmektedir.

2.9.5. İntrakranial ve Serebral Perfüzyon Basıncına Yönelik Yönetim

Hematom, serebral ödem ve hidrosefali intrakraniyal hipertansiyona neden olabilir. Yönetim İKB'ın önceden belirlenmiş bir eşik değer ($< 20-25$ mmHg) altında idame ettirilmesine odaklanmıştır. Ancak artık primer olarak İKB kontrolünden çok, beyin perfüzyonunun ve beyin korumasının sürdürülmesi için çok yönlü bir yaklaşıma vurgu yapılmıştır. Serebral perfüzyon basıncı (SPB) orta arter basıncı ve İKB arasındaki farktır. SPB'nin doğru ölçümü için arteriyel basınç transdüseri İKB ölçümü için referans olan seviye ile aynı olmalıdır (tragus seviyesi). Kalp seviyesinde kan basıncı ölçümü, yatak başı yükseltildiğinde hatalı olarak yüksek hesaplanmış bir SPB ile sonuçlanır.

SPB 60 ile 70 mmHg arasında hedeflenmesi önerilmektedir. Sistemik kan basıncını arttırmak için sıvı ve vazopressör uygulamasına bağlı gelişen akut akciğer hasarı ile ilgili komplikasyon riski nedeniyle 70 mmHg'den daha yüksek CPP'ye ulaşma rutin girişimlerinden kaçınılmalıdır. Serebrovasküler reaktivite TBH sonrası bozulabilir.

2.9.6. İntrakranial Hipertansiyon Yönetimi

20 mmHg'yı aşan İKB kötü sonuçlarla ilişkilidir. Ancak İKB monitorizasyonu rehberliğinde tedavi yönetimini destekleyen kesin kanıtlar mevcut değildir.

2016'da yayınlanan Brain Trauma Foundation kılavuzları; tüm kurtarılması muhtemel ve anormal BT bulgusu olan ağır TBH tanılı hastalarda ya da normal BT bulgusu varlığında yaşın 40'ın üstünde olması, motor duruş veya hipotansiyon (SKB < 90 mmHg) bulgularından en az iki tanesinin varlığı halinde İKB monitorizasyonunu önermektedir.

İKB düşürme stratejileri genellikle en güvenli ve ilk basamak tedavilerle başlamak üzere adım adım uygulanır (Tablo 2.5).

Hiperosmolar tedavi: Yıllardan beri hiperosmolar tedavi intrakraniyal hipertansiyon tedavisinde önemli bir yer kaplamaktadır. Mannitol (0.25-1 g/kg) yükselmiş İKB'nin akut tedavisinde önerilmektedir. Mannitolün yan etkileri hipotansiyon ve tekrarlayan uygulamalar sonrasında fazla artmış serum osmolaritesini içermektedir. Monitorize İKB artışlarında mannitol en sık kullanılan ajan olmasına rağmen İKB monitorizasyonu olmayan ve transtentoryal herniasyon ve progresif nörolojik bozulma bulguları olan hastalarda kullanımı kısıtlandırılmalıdır. Hipertonik salin, direkt olarak osmotik diürezi indüklemeyen serum osmolaritesini arttırmaktadır. Ayrıca mannitole karşılaştırıldığında potansiyel hemodinamik, vazoregulator ve immünolojik avantajlara sahiptir. Ancak hiperosmolar salinin optimal osmolar yükleme ve uygulama modu (bolus veya sürekli infüzyon) hakkında kesin bir tanımlama mevcut değildir. Mannitol ve hipertonik salini karşılaştıran çeşitli çalışmalar yapılmış fakat hangisinin daha efektif olduğu kesinleştirilememiştir.

Cerrahi müdahale: Genişleyen intrakraniyal hematomlar, kitle etkisini ve İKB'ı azaltmak için boşaltılabilir ve sekonder hasarı sınırlayabilir. Kemik flebini yerleştirmemek, ileri dönemde beyin şişmesinin etkilerini minimize etmek için bir seçenek olarak düşünülebilir. Bir ventriküler kateter aracılığıyla beyin omurilik sıvısının drenajı, hasar sonrası ilk 12 saatte GKS skoru 6'nın altında olan hastalarda düşünülmelidir. Sekonder dekompressif kraniyektomi; refrakter İKB yüksekliği tedavisinde kafatasının büyük bir alanının çıkarılması ve duranın açılmasıdır.

2.9.7. Terapötik Hipotermi ve Normotermi

Terapötik hipotermi, prelinik çalışmalarda en etkili nöroprotektan olarak bulunmuştur ancak klinik çalışmalarda sonuçlar üzerinde aynı etki gösterilememiştir.

Ateş, TBH sonrası sık görülmekte ve genel olarak kötü klinik sonuçlarla ilişkilendirilmektedir. Ateş düşürülmesi sonucunda beyin metabolizmasının iyileştiğine dair kanıtlar mevcut olup TBH sonrası potansiyel nöroprotektif etkisi nedeni ile normotermi sağlanması öneriler arasındadır.

2.9.8. Nöroprotektif Tedaviler

Preklinik ve erken klinik çalışmalarda umut vadeden tedaviler gösterilmiş olmakla birlikte bu tedavilerin yararları prospektif klinik çalışmalarda kanıtlanmamıştır. Preklinik deneylerde progesteronun inflamasyonu azalttığı, antiapoptotik olduğu ve hücre proliferasyonunu indüklediği gözlenmiş ancak orta ve ağır TBH'lı hastalarla yapılan faz 3 klinik çalışmalarda sağkalımı ya da nörolojik sonuçları iyileştirdiği gösterilememiştir. Eritropoetin; endotelial hücrelere, nöronlara ve glial hücrelere faydalı olabilecek non-hemopoetik mekanizmalara sahiptir. Preklinik çalışmalarda gösterilen nöroprotektif etkisi randomize kontrollü çalışmalarda gösterilememiştir (19).

TBH'da güncel monitorizasyon önerileri ve vital bulguların eşik değerleri Tablo 2.6 ve Tablo 2.7'de gösterilmiştir.

Tablo 2.5. Güncellenmiş tedavi önerileri (43)

Dekompresif kraniektomi	Level 2a
	GKS (genişletilmiş) skoru ile takip edilen sonuçlar açısından bakılırsa; diffüz hasarlı olan (kitleli yok) ciddi TBH hastalarında travmadan 6 ay sonra 1 saatlik periyotta 15 dakikadan uzun süre İKB 20 cmHg ve üzerinde olan hastalarda ilk aşama tedavilerinin ardından bifrontal DCC önerilmemektedir. Ancak bu uygulamanın İKB azalttığı ve YBÜ yatış süresini kısalttığı görülmüştür
	Ciddi TBH olan hastalarda geniş frontotemporal DCC'nin (12x15 cm or 15 cm çaptan az olmayan) daha küçük frontotemporal DCC'ye oranla mortaliteyi daha çok azalttığı ve nörolojik iyileşmede daha etkili olduğu görülmüştür
	Tüm bu veriler RESCUEicp çalışmasından toplanmıştır. Güncellemelere https://braintrauma.org/coma/guidelines adresinden ulaşılabilir
Profilaktik hipotermi	Level 2b
	Yaygın hasarı olan hastalarda kısa dönem (ilk 2.5 saat) ve uzun dönem (hasardan 48 saat sonra) hipotermi önerilmemektedir
Hiperosmolar tedavi	Önceki kılavuzdaki (3.) veriler mevcut standartlara uygun delillere göre desteklenmemektedir
	Transtentoryal herniasyon bulgusu olan ancak İKB monitorizasyonu henüz yapılmamış hastalarda veya ekstrakranial sebeplere bağlı olmayan progresif nörolojik bozulması olan hastalarda mannitol kullanımı sınırlandırılmalıdır
Serebrospinal sıvı drenajı	Level 3
	Ekstraventriküler drenaj (EVD) sisteminden sürekli Bos drenajı yapılarak sistem sıfırlanması aralıklı drenaj yapılmasından daha etkilidir
	GKS < 6 olan hastalarda hasardan sonraki ilk 12 saat boyunca İKB düşürmek için Bos drenajı uygulanabilir
Ventilasyon terapileri	Level 2 b
	Uzun süreli profilaktik hiperventilasyon uygulayarak PaCO ₂ < 25 mmHg tutmak önerilmemektedir
Anestezik, analjezik ve sedatifler	Level 2b
	İKB artışı olanlarda görülen EEG'deki burst supresyonlarına karşı profilaksilerde barbitürat kullanımı önerilmemektedir
	Artmış İKB kontrolü için yüksek doz barbitürat kullanılabilir ancak hastanın hemodinamik stabilitesi göz önünde bulundurulmalıdır
	İKB kontrolünde propofol de kullanılabilir ancak mortalitede ya da ilk altı aylık sonuçlarda gelişme göstermez. Ayrıca önemli morbiditelere neden olabilir

Tablo 2.5 (Devam). Güncellenmiş tedavi önerileri (43)

Steroid	Level 1 Önerilmez. Ciddi TBH olan hastalarda yüksek doz metilprednizolon kullanımı mortaliteyi arttırır ve kontrendikedir.
Beslenme	Level 2a Hasardan sonraki 5 ile 7 gün arasında bazal metabolik replasmanı sağlamak için beslemek mortaliteyi azaltır
	Level 2b Transgastrik jejunal bypass ile ventilatör ilişkili pnömoni riski azaltılır
Enfeksiyon profilaksisi	Level 2a Erken trakeotomi açılması mekanik ventilasyon ihtiyacını azaltmaktadır ancak yararı zararından daha çok olan bir uygulamadır. Mortaliteyi ve nozokomiyal pnömoniyi azalttığına dair kanıt yoktur Ventilatör ilişkili pnömoniyi azaltmak amacıyla oral batikon kullanımı önerilmemektedir. Bu uygulama akut respiratuar distress sendromuna neden olabilir
	Level 3 EVD için antibiyotikli kataterlerin kullanılması kateter ilişkili enfeksiyonları önleyebilir
Derin ven trombozu (DVT) profilaksisi	Level 3 DMAH veya unfraksiyone heparin, mekanik profilaksilerle kombine olarak kullanılabilir. Ancak intrakranial kanamanın artma riski vardır Beyin hasarı stabil olan hastalarda intrakranial kanama riskine göre ağır basan bir yarar varsa varis çoraplarına ek olarak farmakolojik profilaksi düşünülebilir DVT profilaksisinde kullanılacak olan ajanın dozu veya zamanlaması ile ilgili önerileri destekleyecek yeterli veri bulunmamaktadır
Stroke profilaksisi	Level 2A Geç posttravmatik stroke'u önlemek için fenitoinin ve valproatın profilaksik kullanımı önerilmez Tedavinin yararı zararından fazla olacağı düşünülürse fenitoinin kullanımı erken posttravmatik stroke (<7 gün) oranını azaltmak için kullanımı önerilir ancak erken dönem posttravmatik stroke'un kötü sonuçlarla ilgisi yoktur

Tablo 2.6. Güncellenmiş monitorizasyon önerileri (43)

İKB monitorizasyonu	Level 2B
	Hastanede ve yaralanma sonrası ilk haftalık süreçte mortaliteyi azaltmak için ağır TBH'lı hastaların yönetilmesinde İKB monitorizasyonundan elde edilen bilgilerin kullanılması önerilir
	Resüsitasyon sonrası GKS 3-8 arası olan, anormal BT bulguları olan ve kurtarılabilir bütün hastalarda İKB monitorizasyonu olmalıdır. Anormal BT bulguları hematoma, kontüzyo, ödem, herni ve bası altında bazal sisternaları içermektedir
SPB monitorizasyonu	Level 2B
	Kılavuzlara dayalı tavsiyelerde 2 haftalık mortaliteyi azaltmak için ağır TBH olan hastalarda SPB monitorizasyonu kullanımı önerilmektedir
İleri serebral monitorizasyon	Level 3
	Juguler bulb monitorizasyonu ile elde edilen arter ve ven arası oksijen basınç farkını kaynak olarak yapılan tedavi kararlarının travma sonrası 3-6 aylık mortaliteyi azalttığı ve sonuçları geliştirdiği düşünülmektedir

Tablo 2.7. Güncellenmiş eşik değerler (43)

Kan basıncı eşik değeri	Level 3
	50-69 yaş arasındaki hastalarda SKB > 100 mmHg tutmak, 15-49 yaş ve >70 yaş olanlarda SKB 110 mmHg ve üzerinde tutmak mortaliteyi azaltmak ve sonuçları iyileştirmek için önerilir
İKB eşik değeri	Level 2B
	İKB değeri 22 mmHg'dan yüksek olanlarda tedavi endikedir. Bu değerin üzerinde mortalite artmaktadır
	Level 3
	İKB değeri, klinik bulgular ve beyin BT bulguları kombinasyonu ile tedavi şekline karar verilebilir
SPB eşik değeri	Level 2B
	SPB hedefi 60-70 mmHg arasındadır. Minimum değer (60 veya 70 mmHg) net değildir ve hastanın otheregülasyon durumuna bağlıdır
	Level 3
	SPB 70 mmHg'dan büyük tutmak için aşırı sıvı ve vazopressör yüklemesinden kaçınılmalıdır. Solunum yetmezliği riski vardır
İleri serebral görüntüleme	Level 3
	Juguler venöz saturasyonun %50'den düşük olmasından mortaliteyi azaltmak ve sonuçları iyileştirmek adına kaçınmak gerekir

2.10. Kafa Travmasında Prognoza Etki Eden Nedenler

TBH'da prognoz tahmini hala klinikte karşılaşılan sorunlardan biridir. Şu ana kadar birçok nedenin sonucu etkilediği ortaya konulmuştur. Yaş, cinsiyet, yaralanma nedeni, zaman, radyolojik ve bilgisayarlı tomografi bulguları, kan basıncı, kafaiçi basınç, kan gazları, solunum hızı ve hacmi, pupil boyutu ve ışık yanıtı, beyin kan akımı, beyin oksijen metabolizması, beyin şifti, uyarılmış potansiyel gecikmesi, amplitüdü, GKS skoru, okülosefalik yanıt, okülovestibüler yanıt, ekstremitte kuvveti gibi veriler bu amaçla sıklıkla çalışılmaktadır (44).

Yaş

Kafa yaralanmalarında, yaralanmanın ciddiyeti dışında belki de sonuç üzerinde tek başına en önemli etken olarak bildirilmektedir. Mevcut kanıtlar artan yaş ile TBH sonrası kötüleşen sonuç arasında sürekli bir ilişki olduğunu göstermektedir. Yaş ölüm eğrisi 60'lı hatta bazı çalışmalarda 40'lı yaşlardan sonra ölümün anlamlı olarak arttığını göstermektedir (44,45,46,48).

Cinsiyet

Yapılan tüm çalışmalarda, kafa yaralanması erkeklerde daha sık görülmesine rağmen, cinsiyet farklılığının sonuç açısından önemli bir farklılık yaratmadığı bildirilmektedir (10,47,49).

İrk

Bazı ülkelerden bildirilen çalışmalarda ırk farklılığı değerlendirilmekte ve ırklar arasında sonuç üzerinde farklılıklar olduğu bildirilmektedir (47,50).

Yaralanma Nedeni

Kafa yaralanmasının nedeni ve meydana geliş şekli de sonucu tahmin etmede ipucu vermektedir; örneğin düşmelerde trafik kazalarına kıyasla daha çok kanama görülmekte ve penetran kafa yaralanmalarında sonuç künt yaralanmalara kıyasla daha kötü olmaktadır (44). Birçok çalışmada yaralanma nedeni ile kafa yaralanmalı olguların sonuç durumu arasında güçlü ilişki olduğu gözlenirken (10,50,51,52), yaralanma nedenlerinin sonuç üzerinde fark oluşturmadığını bildiren çalışmalar da mevcuttur (49,50).

Entübasyon Gereksinimi ve Kan Basıncı Değerleri

Acil hava yolu temini gerektiren BH'lı olgularda ölüm oranının yüksek olduğu bildirilmektedir. Kafa yaralanması sonrası erken dönemde ortaya çıkan oksijenlenme azlığı ve düşük tansiyon arteryel (TA) değerlerinin kötü sonuçlar ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir (53-57).

Butcher ve ark. (53) tarafından yapılan bir çalışmada, BH'lı olgularda, sistolik kan basıncının 90–120 mmHg arasında olduğu olgularda bu değerlerden daha düşük veya yüksek olarak gözlemlendiği diğer olgulara kıyasla prognozun daha iyi olduğu saptanmıştır.

Oksijen yetmezliği ve kan basıncı düşüklüğünün birlikte görüldüğü BH'lı olgularda bunlardan yalnızca birinin görüldüğü olgulara kıyasla sonucun daha kötü olduğu bildirilmektedir (54).

Nörolojik Muayene Bulguları

Kafa yaralanmalı olguların acil servise girişteki nörolojik muayene bulguları sonuç tahmini açısından çok önemli bilgiler vermektedir. Yapılan çalışmalarda tek ya da çift taraflı ışık refleksi (IR) kaybı kötü sonuç ile ilişkili bulunmuştur (48,49,55,57,58,59).

Glasgow Koma Skalası

Kafa yaralanmalı olguların bilinç düzeyini değerlendirmede kullanımı yaygın kabul gören Teasdale ve Jennett tarafından geliştirilen GKS, geliştiricileri tarafından derinlemesine test edilmiş olup, gözlemciler arası hata en az olacak şekilde parametreleri belirlenmiştir (11). Göz açma (4 puan), motor yanıt (6 puan) ve sözel (5 puan) olmak üzere üç bölümde toplam 15 üzerinden puanlanan GKS, entübe olgularda sözel yanıt veya periorbital ödemli olgularda göz açma gibi yanıtların değerlendirilmesindeki güçlüğü rağmen, tümüyle veya en önemli belirtecin motor yanıt olarak belirlenmesi ile sonuç tahmini üzerinde etkin bir araç olduğu vurgulanmaktadır (48,52,55,56,59-63).

Radyolojik Bulgular

Kafa yaralanması sonrasında kafatası ve içeriğindeki yapılarda oluşan doku yaralanmalarının olguların sonucu üzerindeki etkilere ait çalışmalarda özellikle kafa içi yaralanmaların önemi vurgulanmaktadır (10,48,56,58,60-64).

Marshall ve ark.'nın (65) 1991 yılında kafa yaralanmalı olgulardaki BT bulgularını sınıflaması ile bu sınıflama sonuç tahmininde yaygın olarak kullanılmıştır (60,64). Bazı çalışmalarda ise her bir BT bulgusunun ayrı ayrı sonuç üzerine etkisi araştırılmıştır (10,55,56,62). Bu çalışmalarda hem Marshall sınıflamasının, hem de yalnız başına ele alınan yaralanmaya bağlı subaraknoidal kanama (SAK) ve orta hat yapılarında itilme oluşturan lezyonların epidural kanama (EDK), akut subdural kanama (SDK), beyin içi kanamalar (BİK) ve beyin ödeminin (BÖ) sonuç üzerindeki etkileri gösterilmiştir.

Özgeçmiş

Kafa yaralanması öncesi hastanın mevcut olan sistemik hastalıkları, ventriküloperitoneal şant gibi kafa içi cihazlar, geçirilmiş inme ve benzeri yaralanma öncesi hasarlar sonucu önemli derecede etkilemektedir. Bu gibi durumları olan görece hafif yaralanmalı olgularda beklenenden daha kötü sonuçlar ortaya çıkmaktadır (44).

Eşlik Eden Yaralanmalar

Kafa yaralanmalarına sıklıkla diğer vücut bölümlerine ait yaralanmalar eşlik etmektedir. Karasu ve ark.'ı (66) kafa yaralanmalı olgularda %34 oranında ek vücut bölgesi yaralanması görüldüğünü belirtirken, Ökten ve ark.'ı (58) bu oranı %44,8 olarak bildirilmektedir. Yapılan uluslararası bir çalışmada kafa dışı ağır yaralanma bulgusu varlığının sonuç üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (10).

Ameliyat

Kafa yaralanmalı olguların yaklaşık %10'unda cerrahi girişim gerekmektedir (66,67). Cerrahi girişimin tek başına ele alındığında sonuç üzerine etkili olmadığı yönünde bildiri mevcut olup (60), özellikle kitle etkisine yönelik cerrahi girişim yapılan olgular ayrı değerlendirildiğinde ameliyatın sonuç üzerinde etkin olduğu da bildirilmektedir (10,68).

İnfeksiyon

Kafa yaralanmalı olgularda hastane infeksiyonlarının ölüm sıklığını, enfekte olmayan olgulara göre 5 kat artırdığı bildirilmektedir (69,70).

2.11. MikroRNA

MikroRNA (miRNA) yaklaşık 22 (genelde 20-24 nükleotid) nükleotid uzunluğunda tek iplikçikli RNA molekülü türüdür ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynar. İyi tanımlanmış iki tane küçük RNA tipi bulunmaktadır; miRNA'lar ve short interfering RNA (siRNA)'lar. İlk keşfedilen küçük RNA miRNA'dır (71). mRNA parçalanması veya translasyon inhibisyonu ile gen ekspresyonunu düzenleyen, küçük kodlamayan RNA'ların bir sınıfı olan miRNA'ların keşfiyle normal gelişim süreci ve hastalıklardaki rollerinin araştırılması, onları yeni bir biyobelirteç sınıfı yapmaktadır. miRNA'lar genom üzerinde protein kodlayan intron veya ekzon bölgeleri ve protein kodlamayan bölgelerdeki RNA genlerinden transkripsiyonu sağlanan, fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen, fonksiyonel RNA molekülleridir. İnsan genomunda miRNA'ları kodlayan yüksek seviyede korunmuş yüzlerce gen bölgesi keşfedilmiştir. Şu an itibariyle, insan genomunda 1000'in üzerinde miRNA tanımlanmıştır (71,72). İlk mikroRNA, Lee ve çalışma arkadaşları tarafından 1993 yılında Victor Ambros laboratuvarında yuvarlak solucan olan *Caenorhabditis elegans*'ta lin-4 olarak adlandırdıkları genin hiçbir protein kodlamamasına karşın 22 nükleotid uzunluğunda küçük bir RNA transkribe etmesiyle rapor edilmiştir (73,74). Ancak bulunan bu genetik materyal için miRNA terimi ilk defa 2001 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır (74,75).

miRNA'lar birbirini izleyen üç basamaklı işlem sonucunda meydana gelir. İlk basamakta miRNA genlerinden primer miRNA (pri-miRNA)'ların transkripsiyonu gerçekleşir. İkinci basamakta pri-miRNA'lar prekürsör miRNA (pre-miRNA)'lara nükleus içinde dönüştürülür. Üçüncü ve son basamakta olgun miRNA'ların sitoplazma içinde oluşumu gerçekleşir (73-76).

miRNA'lar, primer transkript (pri-miRNA) olarak RNA polimeraz II enzimi tarafından genomik DNA'dan sentezlenir. Pri-miRNA (500-3000 baz), "cap" ve "poli A" kuyruğuna sahip sap-ilmik yapısındadır. miRNA'lar fonksiyonlarını

kendi nükleotid dizilerini, komplimenter hedef genleri tanıma özelliği sayesinde gerçekleştirirler. Ayrıca, miRNA'ların her birinin birden fazla mRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebildiği ve mRNA'ların her birinin de birden fazla miRNA tarafından hedeflenebildiği bilinmektedir (73,77,78).

miRNA'ların hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi birçok biyolojik süreçte etkili anahtar moleküller oldukları bugün artık açık bir şekilde bilinmektedir. miRNA'lar, hedefledikleri mRNA'nın moleküler düzeydeki özelliklerine göre onkogenik veya tümör süpresör özellik kazanabilirler.

miRNA terimi ilk kullanıldığı günden beri normal ve malign hematopoezdeki rolünü anlamak için büyük çapta çalışmalar yapılmış ve sonucunda önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda bu küçük moleküllerin hematopoezde farklılaşma, çoğalma ve apoptoz (programlı hücre ölümü) gibi çok önemli hüresel olaylarda kritik öneme sahip olduğu gösterilmiştir (79,80).

miRNA'ların kanserden inflamasyona kadar çoğu hastalıkla ilişkili olduğu bildirilmiştir. miRNA'lar periferik kanda RNAaz aktivitesinden korunduğu için fizyolojik ve patolojik süreçte iyi bir biyobelirteç olarak kullanılabilirler bildirilmiştir (81,82).

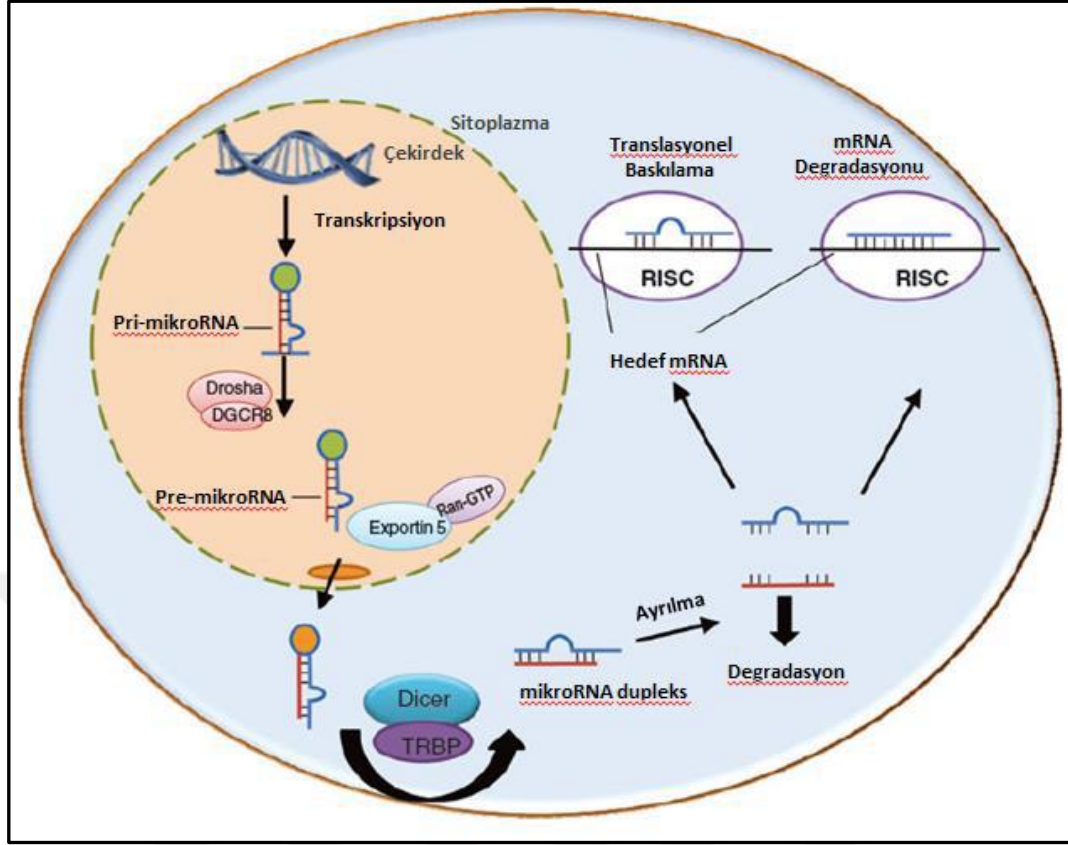
2.12. MikroRNA Biyogenezi

miRNA biyogenezi çekirdekte ve sitoplazmada olmak üzere iki basamakta gerçekleşir (Şekil 2.2). Bu basamaklarda özelleşmiş moleküller görev yapmaktadır. miRNA'ların transkripsiyonları genomik DNA üzerinden, genellikle RNA polimeraz II tarafından gerçekleştirilir. Primer transkript olan 5'cap ve poli A kuyruklarına sahip pri-miRNA, RNaz III ailesinden Drosha enzimi ve kofaktörü Pasha (DGCR8)'dan oluşan mikroprosesör kompleks tarafından kesilerek 60-70 nükleotitlik stem-loop içeren öncü miRNA elde edilir (pre-miRNA). DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8) çift iplikli RNA bağlayıcı bir proteindir. Bazı miRNA'ların Drosha-DGCR8 basamağını atlayarak, çok kısa intronlardan splicing ile oluştuğu bilinmektedir. Pre-miRNA çekirdek membranında bulunan Exportin5 (XPO5) aracılığıyla enerji bağımlı olarak

çekirdekten sitoplazmaya taşınır. Bu aşamada GTP (RanGTP) kullanılmaktadır (83).

Sitoplazmaya geçen pre-miRNA, Dicer-TRBP [transaktivasyon-sorumlu (TAR) RNA bağlayıcı protein] ile katalizlenir ve yine RNaz III ailesinden bir enzim olan Dicer1 (Dicer) tarafından yaklaşık 22 nükleotitlik bir dupleks oluşturacak şekilde kesilir. Oluşan bu dupleks molekül hem olgun miRNA'yı, hem de antisens miRNA'yı içermektedir. Kılavuz miRNA olarak adlandırılan bir zincir RISC (RNA-induced silencing complex)'e yüklenir ve miRISC veya miRNPs (miRibonükleoprotein) olarak adlandırılır. RISC, 5' ucu daha kararlı olan zincir seçilimini sağlayan katalitik komponent olan Argonaute2 (Ago2) proteinini de içermektedir. Anti-kılavuz veya antisens miRNA ipliği ise serbest kaldıktan sonra sindirilir. miRNA RISC'i, baz eşleşmesi sayesinde tanıdığı, hedefi olan mRNA'nın 3' UTR bölgesine yönlendirir. miRNA ve mRNA arasındaki bu tanıma olayı miRNA'nın 5' ucundaki 6-8 nükleotitlik seed bölgesi ile kurulan mükemmel eşleşme sayesinde gerçekleşir. miRNA-mRNA etkileşimi sonrasında hedef mRNA'nın protein ekspresyonu transkripsiyonel baskılama, mRNA degradasyonu veya uncapping ve deadenilasyon ile hızlandırılan mRNA decay'i sonucu gerçekleşebilir (83).

miRNA ve mRNA arasında mükemmel veya mükemmele yakın bir dizi komplementasyonu olması durumunda RISC kompleksinde bulunan Ago2 proteini hedef mRNA'nın degradasyonunu sağlar. Mükemmel bir eşleşme olmadığı durumlarda ise yine Ago'nun etkisi ile ribozom mRNA'ya bağlanamaz ve hedef molekülün transkripsiyonu baskılanmış olur. miRNA'nın maturasyonu sırasında görev yapan bu moleküller etkin miRNA aktivasyonu için hatasız iş görmek zorundadır (83).

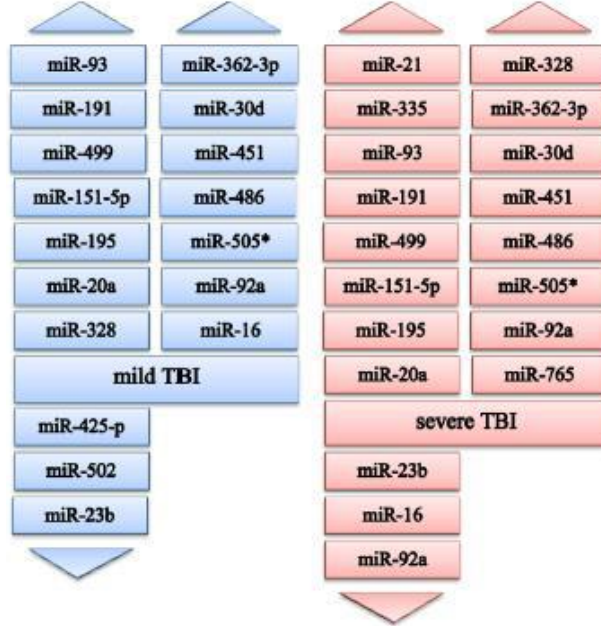


Şekil 2.2. miRNAbiyogenez (84)

2.13. Kafa Travması ve MikroRNA

İnsanlarda TBY'nın şiddet ve prognoz açısından sınıflandırılması ilk olarak, GKS kullanılarak yapılmıştır. GKS'ye göre; GKS: 14-15; Hafif, GKS: 9-13; Orta, GKS: 3-8; Ağır olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Hafif kafa travması, 30 dakikadan kısa süren bilinç kaybı ve 24 saatten kısa süren amneziyle karakterizedir. Tüm kafa travmalarının %75-90'lık kısmını hafif kafa travması kapsamaktadır (85). Kafa travmalarının büyük kısmını kapsamasına rağmen tanısal amaçlı görüntüleme yöntemlerinin kullanımı son derece sınırlıdır. Bu nedenle hafif kafa travmalarının tanısında anlamlı olabilecek spesifik biyomarker arama çalışmaları yapılmaktadır. Bu amaçla çalışılan biyokimyasal parametrelerden biri de miRNA'dır. miRNA yüksek seviyede korunan DNA bölgelerinden kodlanan fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen, yaklaşık 20-24 nükleotid uzunluğunda, küçük RNA molekülleridir. Bu protein kodlamayan RNA molekülleri kendi nükleotid dizilerinin tamamlayıcısı olan hedef

mRNA'lara bağlanıp transkripsiyonel baskılama veya mRNA yıkımı ile transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunun düzenlenmesini gerçekleştirir. miRNA'lar bu yolağı kullanarak hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve hücre ölümü gibi hemostatik süreçlerde önemli roller oynamaktadır. Son yıllarda kafa travmasında da anlamlı olabilecek miRNA tiplerine yönelik çokça çalışma yapılmaktadır. Ancak bu çalışmaların büyük kısmını hayvan çalışmaları oluşturmaktadır. Bu konuda yapılan insan çalışmaları sınırlı düzeydedir. Kafa travması ve miRNA düzeyi arasındaki ilişkiyi araştırmaya yönelik yapılan kısıtlı sayıda insan çalışması mevcuttur (86). Yapılan tüm çalışmalar az sayıda insan çalışmasını kapsamaktadır. Kafa travması sonrası şiddet ve prognoz açısından anlam ifade edebilecek miRNA tiplerine yönelik yapılan insan çalışmasında miRNA-425-p, -21, -93, -191 -499,-328, -362-3p, -451, -486a tiplerinin kafa travmasında artan düzeyleri kafa travmasının şiddetini ve prognozunu belirlemede kullanılabileceği yönünde değerlendirilmiş ve bu konuda yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermiştir (Şekil 2.3) (86).



Şekil 2.3. Hafif ve ağır kafa travmasında artan ve azalan miRNA tipleri (86)

Çalışmalarda miRNA düzeylerine travma sonrası çeşitli dönemlerde plazma, BOS ve serumdan bakılmış olup, çeşitli miRNA türlerinin arttığı ya da azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 2.8) (87).

Tablo 2.8. TBH'lı hastaların BOS ve kanlarından çalışılan miRNA profilleri (87)

Sample of TBI patients	Related miRNAs	Injury severity	Time points after TBI	Up- or downregulated	References
Plasma	miR-765	mild and severe	within 24	up	(Redell et al., 2010)
	miR-16, miR-92a	mild	within 24h	up	
		severe	within 24h	down	
	miR-142-3p, miR-423-3p	mild, moderate and severe	arrival	down	(Mitra et al. 2017)
BOS	miR-9	Severe	NA	down	(Patz et al., 2013)
	miR-451	Severe	NA	up	
	miR-328, miR-362-3p, miR-451, miR-486	severe	within 48h	up	(Bhomia et al., 2016)
Serum	miR-1255B, miR-151-5p, miR-194, miR-195, miR 199a-3p, miR-20a, miR-27a, miR-27b, miR-30d, miR-328, miR-362-3p, miR-381, miR-486, miR-505*, miR 625*, miR-638, miR-92a, miR-451	mild and moderate	within 12h	up	(Bhomia et al., 2016)
	miR-1291, miR-130b, miR-151-5p, miR-195, miR-19a, miR-20a, miR-296, miR-29c, miR-30d, miR-328, miR-339-3p, miR-362-3p, miR-486, miR-505*, miR-579, miR-601, miR-660, miR-9*, miR-92a, miR-451	Severe	within 48h	up	
	miR-425-5p, miR-502	mild	0-1h, 4-12h	down	(Di Pietro et al. 2017)
	miR-21	severe	4-12h, 48-72h	up	
	miR-335	severe	0-1h, 4-12h, 48-72h	up	

Çalışmamızda, travmatik beyin hasarlı hastaların, periferik kan örneklerinde miRNA işlenmesinde görevli komponentlerden Dicer, Drosha, DGCR8, Exportin5 ve Argonaute2'nin mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinin ölçülmesi ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu seviyelerin farklı bulunmasının tanısal değer taşıyabileceğini göstermek hedeflenmiştir. Ayrıca bu komponentlerin hasar sonrasında klinik seyrin öngörülebilmesi açısından yeni aday biyobelirteçler olabileceğini göstermek amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon birimi tarafından desteklenmiştir. Ayrıca, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 01.03.2017 tarih ve 139 sayılı kararı ile "bilimsel ve etik açısından sakınca olmadığı" onayı alınmıştır (Ek 1).

Çalışmamızda Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Anestezi Yoğun Bakım'ına kabul edilen, travma nedeniyle beyin hasarına uğramış, GKS skoru 8 ve altı olan (ağır travmatik beyin hasarı), 18 yaş ve üstü 21 hasta incelenmiştir. Travma sonrası hastalarda epidural hematoma, subdural hematoma, intraserebral hematoma, mikrohemorajiler, kontüzyo, diffüz veya fokal aksonal hasar, laserasyon veya subaraknoid kanama saptanması ile hastalar travmatik beyin hasarlı kabul edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastaların ilk dönem örnekleri hastane başvurusu sonrası 4-6. saatte periferik kanlarından alınmıştır.

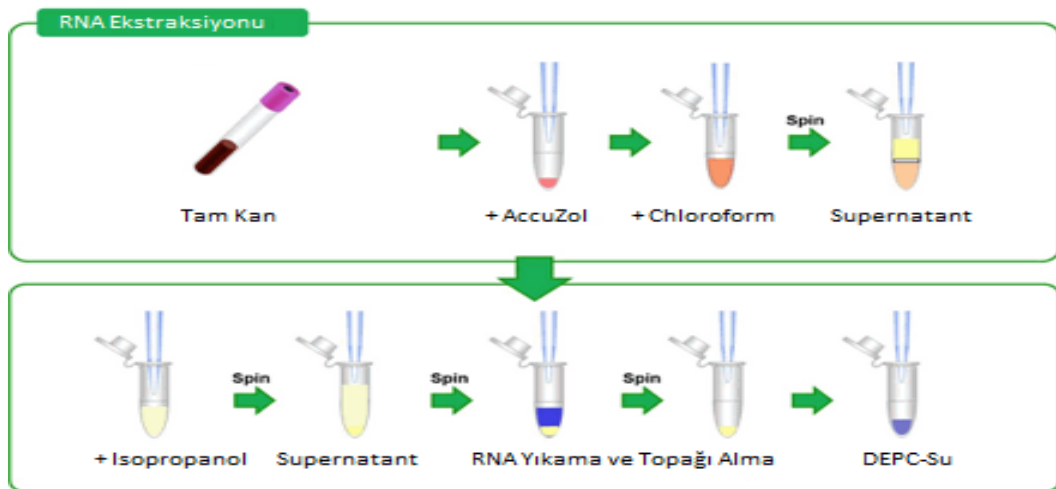
İlk örneklerin alınmasından sonraki 72. saatte ikinci kan örnekleri alınmıştır. Geç dönem kan örneklerinin posttravmatik 72. saatte alınmasının nedeni, yapılan hayvan çalışmalarında kan-beyin bariyerinin protein geçirgenliğinin bifazik olarak travmadan 4-6 saat ve 2-3 gün sonra arttığı gösterilmiş olmasıdır (88,89).

Çalışmanın kontrol grubunu, travmaya maruz kalmış, fakat klinik veya radyolojik beyin hasarı, amnezi, senkop veya nörolojik muayenesinde defisiti olmayan 18 yaş ve üstü 21 hasta oluşturmuştur. Kontrol grubundan da vaka grubuyla aynı zamanlarda periferik kan örnekleri alınmıştır. Alkol, madde veya ilaç bağımlılığı olan, bilinen nörolojik veya psikiyatrik hastalık öyküsü olan, daha önceden intrakranial operasyon öyküsü ve neoplazik hastalıklara sahip olan hastalar ve travma nedeniyle opere edilen hastalar çalışmadan dışlanmıştır.

3.1. Periferik Kan Örneklerinden RNA İzolasyonu ve Real-Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile Hedef Moleküllerin Gen Ekspresyon Profillerinin Çalışılması

RNA örnekleri BIONEER Marka Accuzol Total RNA Ekstraksiyon kiti kullanılarak aşağıda sıralı verilen protokol kullanılarak elde edildi (Şekil 3.1).

1. 250 µl EDTA'lı tam kan örneği tüpe alındı. 750 µl Accuzol ilave edildi. Elle karıştırıldı.
2. Bu karışıma 200 µl kloroform eklenip, 15 saniye vorteks yapıldı, 10 dakika buz kalıbına kondu.
3. 4°C -15 dakika-12.000 rpm'de santrifüj edilip, süpernetant kısmı (üstte kalan sıvı, plazma+lökosit) yeni 1.5'luk tüpe aktarıldı, tortu olmamasına dikkat edildi.
4. Süpernetant'a 500 µl izopropanol eklenip elle karıştırıldı. 10 dakika buz kalıbına kondu.
5. 4°C-10 dakika-12.000 rpm santrifüj edildi. Üstteki süpernetant kısmı döküldü. Kurutma kağıdı ile üstteki sıvı kurutuldu.
6. Yıkama işlemi için %70-80'lik etanol 1000 µl eklendi. Elle karıştırıldı.
7. 4°C -7 dakika-12.000 rpm santrifüj edildi. RNA pelletler dipte kalır, üstteki kısım dökülme katıldı.
8. Pelletlere 50 µl RNaz Free Water eklenip, pelletler bu sıvıda çözündü. Miktar ve kalite tayini 2 µl RNA örneği ile konsantrasyon değerleri ölçülerek yapılan 260 ve 280 nm'deki absorbans değerleri ile A_{260}/A_{280} formülüyle hesaplanan RNA örnekleri kullanılacağı zamana kadar -70, -80°C'de muhafaza edildi.



Şekil 3.1. RNA izolasyon basamakları

Tüm örneklerin RNA izolasyonlarının tamamlanmasının ardından -70, -80°C’de muhafaza edilen RNA’lar Thermo Fisher High-Capacity cDNA Reverse Transcription kiti ile aşağıda verilen protokol uyarınca cDna’ya çevrildi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. cDNA protokolü

İçerik	Hacim
10X RT Buffer	2 µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8 µl
10X RT Random Primer	2 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 µl
Nuclease-Free H ₂ O	4.2 µl
Toplam	10 µl

Örnek sayısına göre toplam hacim belirlendi ve 2X RT master mix hazırlandı. Vaka ve kontrol grubu örnekleri için 10 ul RNA ve 10 ul 2X RT master mix kullanılarak reaksiyon hazırlandı ve bu reaksiyon tüpleri aşağıda verilen şartlarda RT-PCR (Reverse Transkriptaz-PCR) reaksiyonuna konuldu (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Reverse Transkriptaz-PCR reaksiyon şartları

Termal Protokol	Basamak 1	Basamak 2	Basamak 3	Basamak 4
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Zaman	10 dakika	120 dakika	5 dakika	∞

RT-PCR sonucu elde edilen cDNA örneklerinin saflık ve miktar tayinleri Denovix Marka QFX Model Florometre, dsDNABroadRangeAssay kit ile ölçüldü. Elde edilen cDNA’ların saflık derecesinin uygunluğu ve konsantrasyonların yeterliliği tespit edildi. Konsantrasyonlar örneklerin yoğunluğuna göre eşitlendi.

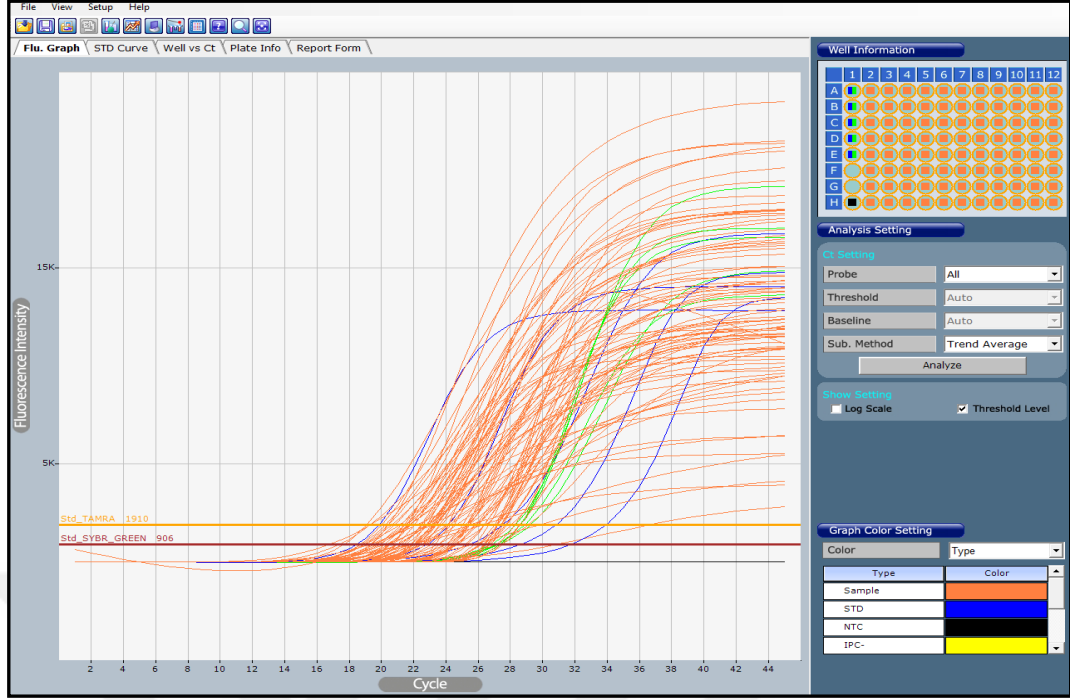
3.2. DICER1 (Dicer), Drosha, DGCR8, XPO5 (Exportin5) ve AGO2 (Argonaute2) Spesifik Primerleri İle Real Time-PCR Gen Ekspresyonlarının Çalışılması

Gen ekspresyon çalışmasında en önemli basamaklardan biri olan spesifik primerlerin dizi dizaynı literatürden alınan referans ile kullanmış olduğumuz Q-PCR cihazının özelliklerine uygun olarak yapıldı (Tablo 3.3). Referans olarak da insan GAPDH kullanıldı. Primer setlerinin, %20-80 oranında Guanin (G) – Sitozin (C) içermesine, özellikle G ile benzer çalışan nükleotitlerden ve probun 5' ucuna G bazı gelmemesine, seçilen dizide G'den çok C bazı olmasına, melting temperature (Tm) sıcaklığının 65-85 C° arasında olmasına dikkat edildi (90,91,92).

Tablo 3.3. Spesifik gen bölgesi çoğaltmak için kullanılan primer dizileri

Primer Setleri	Sekanslar
DGRC8	F: GCAAGATGCACCCACAAAGA R: TTGAGGACACGCTGCATGTAC
AGO2	F: TCGCACTATCACGTCCTCTG R: ATGGCTTCCTTCAGCACTGT
DICER1	F: TACCCCGTTCCCCTGTGCGA R:TCGGAGGCCTCTTCTTGCTGCT
DROSHA	F: TTCCCTCCCTTGGCCCAGCTT R:CTATAAAAGGCTCTCGGGCCGC
XPO5	F: CACAACGAGAGGTGATGAG R:AAGGTGAGAAGACGGAACAGAG

Buna göre Q-PCR deneylerimizde GreenStar qPCR Pre-Miks ve primer setleri kullanıldı. Primerin gen bölgelerini arttırıp azaltması SYBER GREEN boyasının serbest halde DNA üzerine bağlanmasıyla oluşan sinyalin, FAM filtresi kullanılarak floresan miktarının ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Uygun PCR koşullarında primerin hedef bölge üzerine bağlanması ve uzamasının ardından yeni zincir oluşmaya başlar. DNA zincir sentezi uzadıkça ve her bir döngüde ürün miktarı arttıkça floresan ışımaya da ona bağlı olarak artmaya devam eder. Kullanılan primer dizileri uygun ve uyumlu olduğu sürece ilgili gen bölgesi çoğalır, tek bir baz değişikliği bile gen bölgesinin tamamının çoğalmasını engelleyeceği ve sonraki dizinin bölgeyi çoğaltmasına izin vermeyeceği için; aynı diziyeye sahip olmayan gen bölgelerinde farklı amplifikasyon eğrileri elde edilir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Bölgeye spesifik primerler için amplifikasyon eğrileri

Bir önceki basamakta elde edilen cDNA lar uygun konsantrasyonlara seyretilerek ticari kit protokolüne göre (BIONEER K-6253 Accupower 2X GreenStar Master Mix) fRealTime PCR çalışması yapıldı.

Ticari olarak kullanıma hazır bu mikslar, PCR koşulları için gerekli tüm materyali içerisinde bulundurmakta ve kullanıcı sadece primer ve örnek cDNA'sını ekleyerek kullanmaktadır ve çalışmamızda aşağıdaki protokoller uygulanmıştır (Tablo 3.4 ve Tablo 3.5).

Tablo 3.4. Real Time PCR protokolü

İçerik	Volüm	Konsantrasyon
2X Master Mix	12 µl	
Örnek	3 µl	100 ng/µl
Primerler	2 µl (F+R)	1 pmole/µl her biri için
Distile Su	3 µl	
Toplam	20 µl	

Tablo 3.5. Sıcaklık protokolü

Adımlar	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Pre-Denaturation	95°C	5 dk	
Denaturation	95°C	15 sn	40 cycle
Annealing	60°C	30 sn	
Extension	72°C	1 dk	
Final Extension	24°C	1 dk	

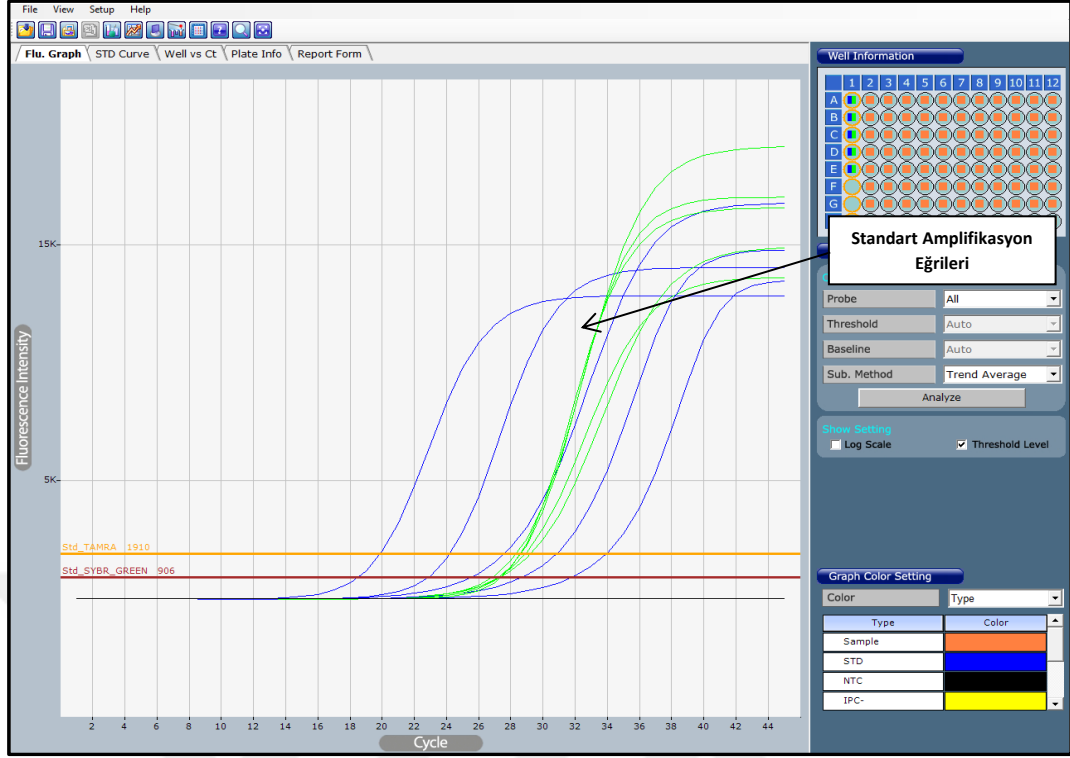
Tablo 3.4 ve Tablo 3.5: Syber Green Master Mix ile hazırlanan reaksiyon hacmi bileşenleri ve uygulanan PCR şartları

Hazırlanan mikslar, optik şeffaf filme kaplı 0,2 ml'lik PCR tüpleri içerisinde (BIONEER Marka ExiSpin Model Vortex-Mixer cihazı ile homojenliği sağlandıktan sonra) BIONEER Marka ExiCycler96 Model Q-PCR cihazına yerleştirildi. Deneylerin amplifikasyon koşulları, (SyberGreen Master Mix için gerekli sıcaklık, süre ve döngü sayıları) zaten BIONEER (Cihazları, Master Mix'leri ve Primer-Prob'ların üreticisi) tarafından optimize edildiği için çalışmalardan olumlu sonuçlar alındı.

Optimizasyonun kontrolü ve teyidi için BIONEER Marka ExiCycler96 Model Q-PCR cihazında kullandığımız spesifik primerlere özel çalışma analizleri yapıldı.

Standart Eğrileri

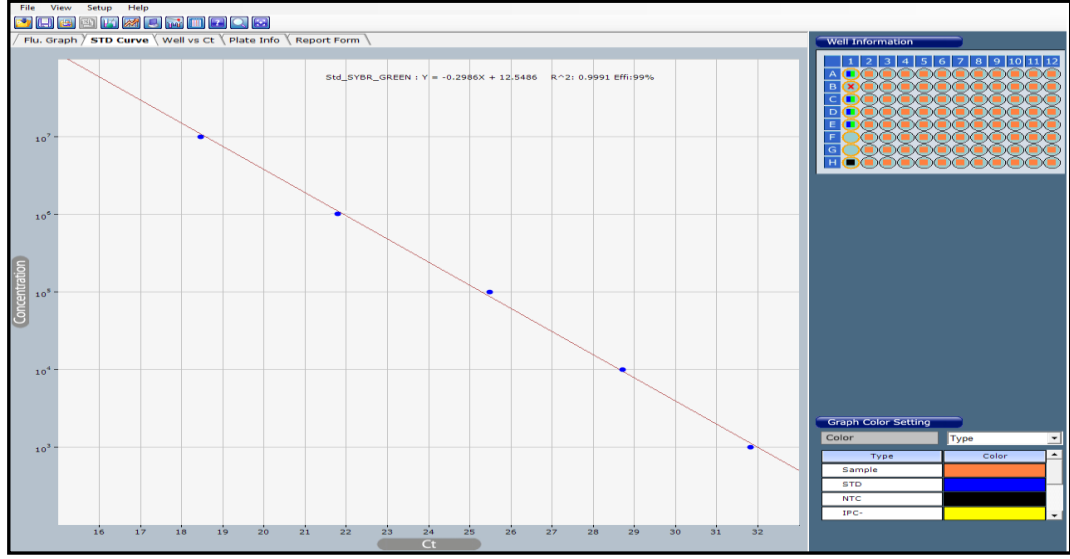
Standart olarak kullanılan örneklerin eğimi, PCR amplifikasyonunu tahmin etmek için yaygın olarak kullanılır. Çalışmamızda Standart eğri yöntemini kullanarak mutlak miktar belirleme, bilinen bir miktara dayalı bilinmeyenler ölçüp, önce standart bir eğri oluşturduk; daha sonra bilinmeyenleri standart eğriyle karşılaştırdık (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Standart amplifikasyon eğrilerinin analizi

Standart Doğrusu

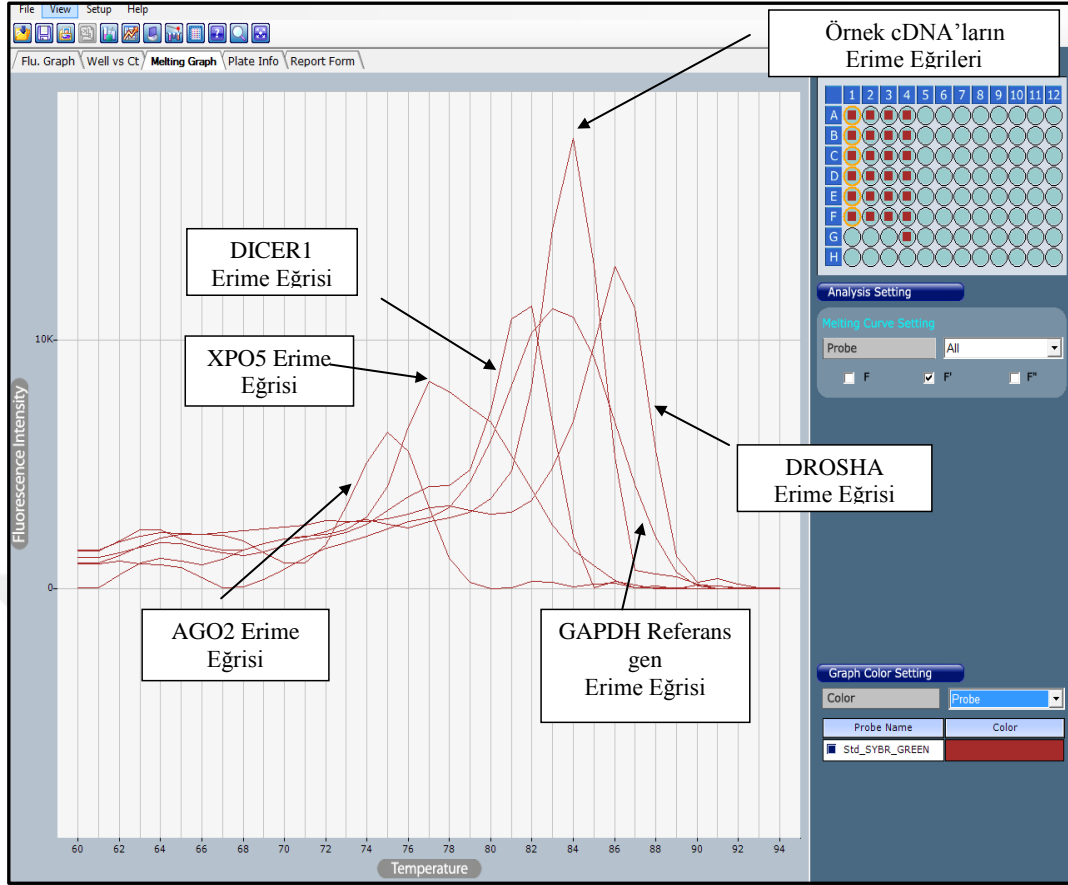
Standart doğru oluşturmak, PCR için en az miktarda doğrulama gerektirir. Standart doğrunun verimliliği %100'e ne kadar yakın ise güvenilirliğinden o kadar emin olunur. Standart, hedef sekansın nispeten yüksek konsantrasyonuna sahip olmalıdır, böylece birçok dilüsyon basamağında bir dilüsyon serisi oluşturabilir. Böylelikle standart seyreltilir ve kaliteli standart örnekleri elde edilir. Biz de qPCR çalışmasında örnekleri kullanarak bir standart doğru oluşturduk (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Standart doğru analizi

Melting Curve-Primer Kontrolü

Erime eğrisi analizinin amacı, primerlerimizin belirli bir PCR ürünü verdiğini ve spesifik olmayan bir amplifikasyon olmadığını kontrol etmektir. Birden fazla eğri, spesifik olmayan amplifikasyon (dimerleşme olduğunu) gösterir. Primerlerin doğru çalıştığından emin olmak için melting curve (erime eğrisi) basamağını PCR'a ekledik ve primerlerin kontrolü sağladık (Şekil 3.5).

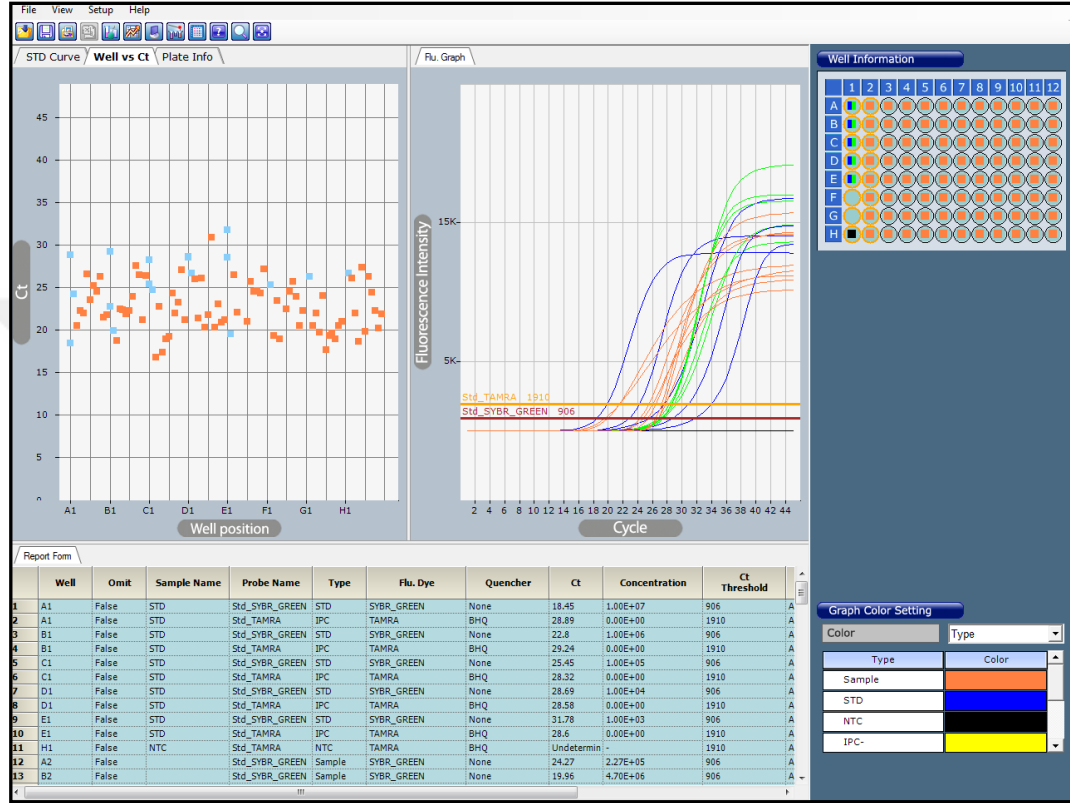


Şekil 3.5. Spesifik erime eğrisi analizi

SYBR Green yöntemiyle yapılan Q-PCR'ın başlangıcında ortamda tek zincirli cDNA molekülü, primerler ve reaksiyon tampon çözeltisi içinde SYBR Green boyası bulunmaktadır. Bağlı olmayan serbest cDNA molekülü tek zincirli olduğu için çok az bir floresan ışımaya yapmaktadır. Primerler bağlanıp uzama başladığında ise SYBR Green, çift zincirli cDNA'nın arasına girerek floresan yayılımı başlatmaktadır. Başlangıçtaki döngülerde zayıf olan floresan sinyal; oluşan ekspresyona bağlı olarak belirli sayıda çoğaltım sonrasında ilerleyen döngülerde hızla artmaya başlamaktadır. Bu artış miktarı Q-PCR cihazının 2D-CCD kamerasının algılayabildiği miktara ulaştığında Ct (Eşik Değeri) olarak algılanmakta ve analiz yazılımı bu değerleri kullanarak sonuç vermektedir.

** **Ct (Threshold Cycle)**: Floresan değerlerinin eşik değerini geçtiği noktadır. Sistemin PCR ile çoğalan üründe ki floresan miktarının artışını farketmeye başladığı ve PCR ürününün log-lineer fazda eksponensiyal olarak artmaya başladığı zamandır. Δ CT ise hedef ve referans için eşik değeri farkını verir.

Çalışmamızda da Standart doğru analizi ile ulaşılan Ct değerleri referans alındı. Kontrol ve hasta grubu Ct değerleri yorumlanarak, delta Ct, delta delta Ct değerleri hesaplanarak hedef moleküllerin gen ekspresyon düzeyleri için sonuçlar elde edildi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Ct (TresholdCycle) analizi

3.3. Periferik Kan Örneklerinden Protein İzolasyonu ve Western Blot Yöntemi ile Hedef Moleküllerin Protein Ekspresyon Profillerinin Çalışılması

Tüm kan örnekleri 2500 g'de 5 dk santrifüj edildi ve pellet kısmı alınarak tüm protein analiz işlemleri için kullanıldı.

Protein Miktar Tayini

Denovix DS-11 cihazı ile protein miktarı ölçüldü. Denovix DS-11 cihazı temel olarak DNA/RNA ve proteinlerin miktarlarını ve kalitesini tespit etmek için kullanılır. İzole edilmiş DNA ve RNA kontaminasyonunu önlemek ve elde edilmiş kıymetli stoğu harcamamak için çok az miktarda örneğin kullanılması

önemlidir, bu nedenle mikro hacimli spektrofotometreler 0,5-1 µL gibi çok az miktarda örnek kullanır.

Protein Örneklerinin Hazırlanması

Denovix DS-11 cihazı ile yapılan ölçüm sonrası elde edilen protein miktar değerine ve transfer sonrası kullanılacak deteksiyon (Kemiluminesans / Kromojenik) yöntemine göre jele yükleyeceğiniz protein miktarı belirlendi.

10 µl protein mikrosantrifüj tüpüne ilave edildi. 5 µl 2 µl SampleReducing Agent ve 3 µl Ddh20 eklendi. Toplamda 20 µl bir karışım oluşturuldu (Tablo 3.6).

Tablo 3.6. Karışım içeriği

Sample (30-60 µg)	X µl
4x LDS SampleBuffer	5 µl
10x SampleReducing Agent	2 µl
Ddh2O	Örneğe göre tamamlanır.
TOPLAM	20 µl

Hazırlanan örnekler 70°C’de 10 dk boyunca denatüre edildi. Denatüre edilen örnekler 2 dakika buz üzerine alınarak soğuması sağlandı.

3.4. Hoefer SE260 Dikey Jel Sistemi Kullanımı (Bis-Tris Jel ile Kullanımı)

1. Hoefer dikey jel sistemi tankı içerisine yerleştirildi. %4-12’lik Bis-TrisGradient jeli (İnvitrogen, NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel, CaT: NP0321BOX, Lot:120471) plastik ambalajından çıkartılıp, jel kaseti üzerinde yer alan beyaz bant söküldü ve jel kuyucuklarını bozmadan jel tarağı dikkatlice çıkarıldı.
2. Jel kasetinin alçak kısmı Hoefer’a bakacak şekilde dikey jel sistemi tankı içerisine yerleştirildi. Diğer tarafa diğer Jel kasetini alçak kısmı BufferCore’a bakacak şekilde yerleştirildi.
3. Jel sıkıştırma aparatını dikey jel tankı yerleştirilip herhangi bir dengesizlik engellendi.

4. 20x MES Running Buffer'dan (Thermo Fisher, B0002) 25 ml alıp bir mezür'eklendi ve üzerine 475 ml distile su ekleyerek 1X MES buffer'a sulandırıldı.
5. Hazırlanan running buffer ile ilk önce buffercore içinde kalan üst buffer odasını jel kuyucuklarının üzerini 0,5 cm geçene kadar dolduruldu. Kalan buffer alt buffer odasına ilave edildi.
6. Örnekleri yüklemeyen önce 200 µl'lik pipete temiz bir pipet ucu takıldı ve kuyucuklar pipetaj yapılarak temizlendi.
7. Jel kasetinde yer alan kuyucuklardan en başta ki ve sondakine 5 ul marker(NZY Colour Protein Marker II)yüklendi.
8. Kalan kuyuculara hazırlanan protein örneğinden 20ul protein örneği yüklendi.

Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra;

1. Dikey jel sisteminin kapağını kapatılıp, elektrot kablolarını renk kodlarına göre güç kaynağına bağlandı.
2. Örnekler 110V'da 55 dakika yürütüldü.
3. Yürütme işlemi sonunda jel güç kaynağı ve dikey jel sisteminin elektrot kablolarını güç kaynağından çıkarılıp kapağı açıldı. Jel sıkıştırma aparatı çıkarıldıktan sonra jel kaseti çıkarıldı.
4. Jel kaseti, jel bıçağı kullanılarak kenar bağlantıları kopartılarak açıldı. Jelin tarak kısımları ve alt tarafında ki kalın jel kesilerek uzaklaştırıldı. İçerisinde distile su bulunan bir kap içerisine dikkatlice atıldı.
5. Blotlama kısmında HOEFER TE70XP Sistemi kullanıldı. Blotlama için membran üstüne dikkatli bir şekilde jel, jelin üzerine blotlama kağıdı yerleştirildi. Cihazın kapağı dikkatlice kapatıldı. Cihaza blotlama bilgileri girildi ve kısa bir süre sonra işlem tamamlandı.
6. Membran dikkatli bir şekilde distile su içerisine alındı.
7. Not: Bu aşamadan sonra membranın artık tersi düzü olduğu için düz tarafı kurşun kalem ile numaralandırılma yapıldı.
8. Bu aşamadan sonra Western Breeze Kit kullanıldı(Anti-Dicer antikoru (rabbit), Anti-Drosha antikoru (rabbit), Anti-DGCR8 antikoru (rabbit), Anti-Exportin5 antikoru (rabbit), Anti-Argonaute2 antikoru (rabbit)).

9. Bloklama için; dilüent A: 2 ml, Dilüent B: 3 ml, Distile su: 5 mL eklenir ve 90 dk yavaş shakerda bekletilir ya da bloklama için pbsle hazırlanan %2'lik pbs-bsa karışımı kullanıldı.
10. Bu aşamadan sonra membran 20 ml distile su ile 2x5 dk yıkandı.
11. Primer antikorlar datasheetinde belirtilen oranda sulandırıldı.
12. Örn: Connexin1:500
13. Örn: Wwox1:500
14. Örn: GAPDH 1:500
15. Antikorları sulandırmak için DilüentA: 2 ml, DilüentB: 1 ml, Distile su: 7ml + 20 µl primer antibody eklenerek gece boyu bekletildi.
16. Membran 3x5 dk distile su ile hızlı shakerda yıkandıktan sonra üzerine 10 ml sekonder antikor eklendi ve 45 dk yavaş karıştırıcıda bekletildi.
17. Daha sonra membran 3x5 dk 20 ml Antibody Wash ile hızlı karıştırıcıda yıkandı.
 - a) 2x2 dk 20 ml distile su ile hızlı karıştırıcıda yıkandı.
 - b) 5 ml Chromogenic substrate eklendi ve yavaş karıştırıcıda inkübe edildi. 1-60 dk arasında mor bantlar görülmeye başlandı. Kemiluminesans görüntüleme için 2.375 µl subtrate ve 0.125 µl enhancer mix yapılarak membrana eklendi ve cihazda görüntülendi.
 - c) 2x2 dk 20 ml dwater ile hızlı karıştırıcıda yıkandı.
 - d) Elde edilen sonuçlar GeneTools programıyla analiz edilir.

Hedef gen bölgesine spesifik primerlerle birlikte reaksiyona katılan ve yeşil floresan ışımaya veren SYBER Green probu aracılığıyla cihaz üzerinde ölçülen floresan ışımaya değerlerinin 3 teknik tekrar üzerinden Ct değeri ortalaması alındı ve referans gen olarak kullanılan (pozitif kontrol) referans gen ile normalize edildi. Burada primer dimerleri ile spesifik ampikon ışımaları eğri sabitesi baz alınarak standart eğri kıyaslaması ile ayrıldı. Normalizasyonla, karşılaştırmalı kuantifikasyon için $\Delta\Delta Ct$ (= Fold Change: mRNA ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi) aritmetik formülü ile hesaplandı (93).

$\Delta CT = CT(\text{hedef}) - CT(\text{referans, i.e., GAPDH})$ $\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{örnek}) - \Delta CT(\text{kontrol})$
 $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Endojen referansa göre normalize edilen hedef gen miktarındaki kat artışı)

$2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak normalize gen ekspresyonları ve ekspresyon değişimleri hesaplandı. İstatistiksel analizlerde normalize edilmiş gen ekspresyon değerleri kullanıldı. İstatistiksel analiz için Ki-kare testi, bağımlı örneklem t testi ve korelasyon analizi kullanıldı. P değeri 0.05'ten küçük olanlar anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

Çalışmaya ağır TBH'lı (hasta grubu) 21 ve travmaya maruz kalan fakat beyin hasarı olmayan 21 kontrol grubu hastası olmak üzere 42 kişi dahil edilmiştir.

Hasta grubunun yaş ortalaması ortalama 40.2 [(18-73)±19], kontrol grubunun ise 53.8 [(27-86)±20.7] bulunmuştur.

Hasta grubunun % 76.2'sini erkekler oluştururken, % 23.8'ini kadın cinsiyet oluşturmuştur. Kontrol grubunda ise % 66.7 erkek, % 33.3 kadın cinsiyet vardır.

Hasta grubunda yaralanma nedeni olarak en sık araç dışı trafik kazası (ADTK) (% 52.4), ikinci sıklıkta araç içi trafik kazası (AİTK) (% 28.6) üçüncü sıklıkta ise düşme (% 19) bulunmuştur. Kontrol grubunda ise en sık düşme (% 76.2), ikinci sıklıkta AİTK (% 14.3), üçüncü sıklıkta ise ADTK (% 9.5) saptanmıştır.

Hasta grubunda 13 hasta ASA I statüsündeyken (% 61.9), kontrol grubunda 8 hasta ASA I (% 38) olarak saptanmıştır.

Hastaların demografik veriler açısından cinsiyet ve özgeçmişlerinde istatistiksel anlamlı fark saptanmazken, gruplar arasında yaş ve travma nedenleri anlamlı olarak farklı bulunmuştur (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Hasta ve Kontrol gruplarının sosyodemografik özellikleri

Demografik özellikler	Hasta grubu	Kontrol grubu	p değeri
Yaş	40.2±19	53.8±20.7	0.03
Cinsiyet (K/E)	5/16	7/14	0.50
Boy (cm)	171±7.6	171±10.8	0.94
Kilo (kg)	72±10.8	75±11.3	0.46
Travma cinsi			0.001
ADTK	11	2	
AİTK	6	3	
Düşme	4	16	
Özgeçmiş			0.12
Özellik yok	8	13	
ASA I	13	8	

Hasta grubunda giriş GKS skorları ortalama 6.1±1.7, 30 günlük takipten sonra ise ortalama 11.9±4.3 saptanmıştır. Hasta grubunda her iki zaman diliminde GKS skorları arasında artış açısından anlamlı fark bulunmuştur (p<0.05). Kontrol grubundaki tüm hastaların hastaneye kabul ve 30 gün sonrasında hesaplanan GKS skoru 15'ti.

Tablo 4.2. Hasta grubu TresholdCycle (CT) değerleri

	DICER1	DROSHA	XPO5	DGRC8	AG02		DICER1	DROSHA	XPO5	DGRC8	AG02
H1-1	19,77	19,3	30,39	22,55	27,9	H2-1	22,78	24,48	30,04	32,23	32,41
H1-2	24,68	21,82	33,63	28	33,05	H2-2	26,56	26,35	33,79	25,17	32,53
H1-3	24	21	32,49	34,55	29,53	H2-3	28,02	26,53	35,7	19,1	35,13
H1-4	22,91	22,49	33,64	31,61	30,85	H2-4	23,04	23,32	32,25	20,13	31,69
H1-5	25,13	17,67	27,57	33,33	17,17	H2-5	25,32	23,07	32,18	25,06	31,08
H1-6	26,99	19,83	24,1	24,06	20,11	H2-6	20,02	24,69	30,71	24,3 *	
H1-7	28,74	25,22	35,49	36,15	33,9	H2-7	28,27	24	34,19	23,4	31,04
H1-8	26,67	24,02	35,52	32,29	34,43	H2-8	26,88	19,03	31,48	18,42	32,89
H1-9	24,98	24,39	34,51	28,32	33,57	H2-9	26,01	22,35	32,2	26,23	33,25
H1-10	25,03	30,96	34,11	36,75	19,27	H2-10	23,54	21,53	33,68	20,13	25,9
H1-11	25,35	25,72	36,72	27,61	34,16	H2-11	22,26	21,26	29,47	19,8	24,11
H1-12	26,44	24,59	32,3	27,19	20,07	H2-12	*	27,11	31,19	18,41	37,88
H1-13	21,5	19,35	30,83	36,31	19,03	H2-13	26,58	20,99	29,02	31,06	20,52
H1-14	28,02	26,35	33,13	26,12	30,22	H2-14	27,02	24,32	32,03	20,5	31,29
H1-15	25,89	24,54	32,52	24,5	31,34	H2-15	26,42	20,5	32,06	19,77	32,44
H1-16	25,68	27,57	37,04	27,52	32,8	H2-16	23,46	20,57	31,46	21,09	32,43
H1-17	20,72	22,02	34,34 *		30,21	H2-17	16,52	20,22	28,48	21,68	27,72
H1-18	23,86	20,32	27,37	20,88	21,93	H2-18	19,86	21,77	29,76	20,88	26,22
H1-19	26,57	24,58	32,42	20,67	34,09	H2-19	26,57	26,43	32,64	28,27	32,17
H1-20	19,76	25,78	34,3	22,43	26,92	H2-20	20,1	21,25	29,19	20,96	23,91
H1-21	16,78	19,64	38,16	32,7	24,88	H2-21	21,86	21,21	29	20,3	20,45

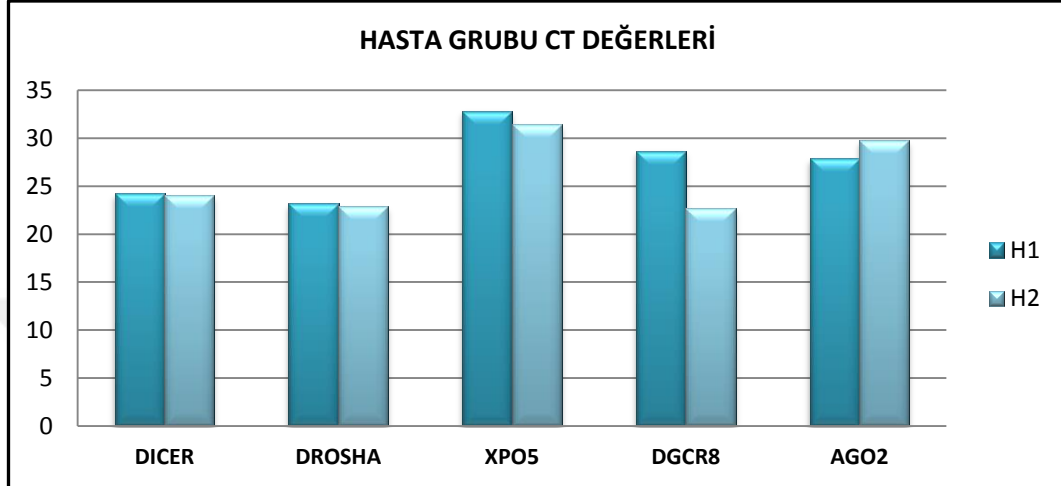
(H1: Travma günü, H2: Travma sonrası 72. saat)

Tablo 4.3. Kontrol grubu TresholdCycle (CT) değerleri

	DICER1	DROSHA	XPO5	DGCR8	AGO2		DICER1	DROSHA	XPO5	DGCR8	AGO2
K1-1	25,24	24,28	29,44	30	26,93	K2-1	23,85	23,49	27,33	37,68	35,31
K1-2	17,29	19,98	30,11	29,67	29,09	K2-2	21,1	22,06	30,52	41,39	19,5
K1-3	26,32	24,74	31,53	36,76	31,52	K2-3	23,91	22,06	27,37	29,2	27,3
K1-4	29,89	26,72	29,24	18,94	17,74	K2-4	21,72	22,06 *		18,26	23,68
K1-5	19,46	19,57	33,44	36,7	30,49	K2-5	26,54	22,46	30,12	17,11	19,86
K1-6	26,59	25,33	34,32	36,95	36,84	K2-6	25,66	17,4	28,43	21,19	17,38
K1-7	28,26	26,36	27,59	19,25	18,27	K2-7	26,52	26,1	33,7	34,51	31,52
K1-8	27,41	26,68	25,9	23,95	27,67	K2-8	23,77	26,07	32,84	35,86	26,43
K1-9	19,66	20,56	27,12	31,42	15,9	K2-9	19,48	18,94	30,27	19,03	22,1
K1-10	19,23	18,77	30,06	22,36	17,08	K2-10	20,33	19,72	28,65	21,23	22,26
K1-11	19	16,82	26,54	18,17	14,98	K2-11	19,68	18,69	27,39	20,05	18,41
K1-12	27,22	26,04	32,93	27,73	31,84	K2-12	26,38	26,61	31,33	32,24	20,66
K1-13	27,03	26,52	31,49	36,67	29,51	K2-13	22,98	21,91	27,86	37,07	19,82
K1-14	21,03	19,33	29,55	18,37 *		K2-14	19,27	19,02	28,45	24,18	18,54
K1-15	22,77	20,55	27,83	36,7 *		K2-15	22,76	20,39	27,52	39,29	19,12
K1-16	27,41	26,13	27,33	19,07	32,82	K2-16	24,12	24,41	33,34	20,02	35,2
K1-17	25,49	22,26	29,94	33,18	33,24	K2-17	24,01	25,53	33,41	18,99	32,8
K1-18	24,35	22,55	34,5	20,14	38,63	K2-18	26,14	24,09	32,69	20,61	32,08
K1-19	22,74	22,78	33,19	35,1	32,42	K2-19	29,65	27,42	24,65	39,02	32,96
K1-20	23,92	21,41	30,14	35,05	32,79	K2-20	23,98	23,6	32,61	29,14	30,86
K1-21	25,78	22,15	33,24	31,89	29,69	K2-21	20,99	22,26	33,23	32,61	23,73

(K1: Travma günü, K2: Travma sonrası 72. saat)

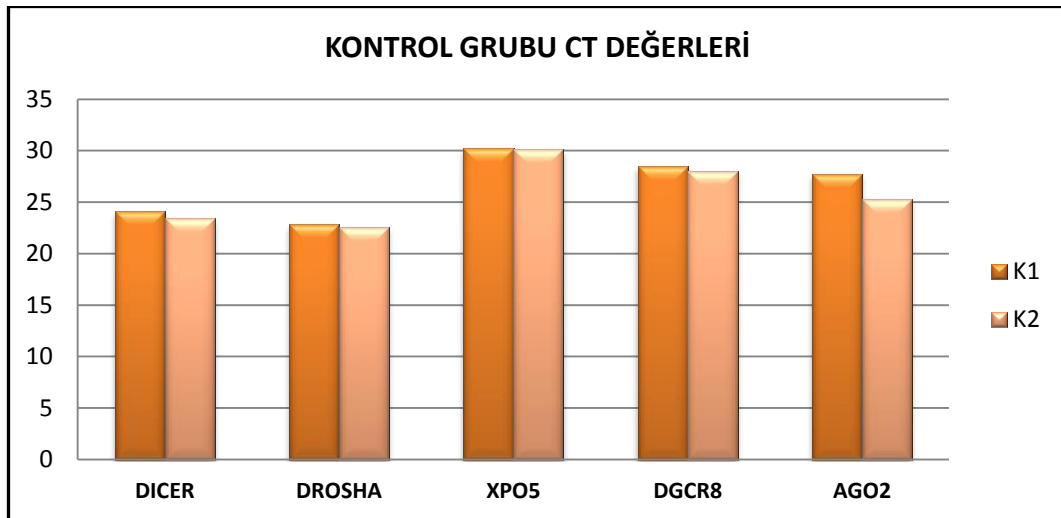
Hasta grubunda travma sonrası 4-6. saatte ve travmadan 72 saat sonrasında ölçülen normalize gen ekspresyonları arasında (Dicer p:0.13; Drosha p: 0.41; Exportin5 p:0.18; DGCR8 p:0.29; Argonaute2 p:0.57) anlamlı fark görülmemiştir (Şekil 4.1).



(H1: Travma sonrası 4-6. saat, H2: Travma sonrası 72. saat) ($p > 0.05$)

Şekil 4.1. Hasta grubu TresholdCycle (CT) ortalamalarının karşılaştırması

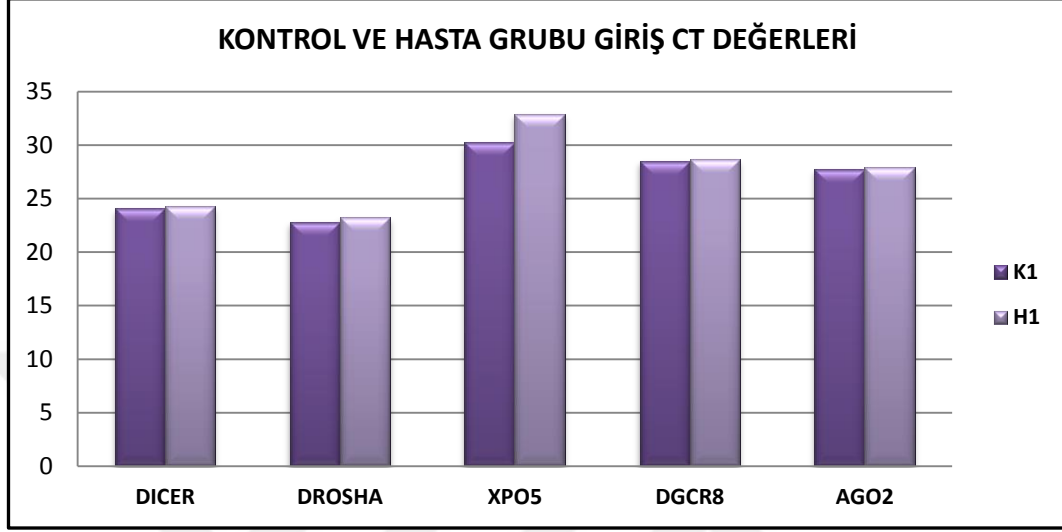
Kontrol grubunda travma sonrası 4-6. saatlerde ve 72 saat sonra ölçülen normalize gen ekspresyon düzeyleri arasında (Dicer 0.74; Drosha p: 0.98; Exportin5 p: 0.78; DGCR8 p: 0.17; Argonaute p: 0.94) anlamlı fark bulunmamıştır (Şekil 4.2).



(K1: Travma sonrası 4-6. saat, K2: Travma sonrası 72. saat) ($p > 0.05$)

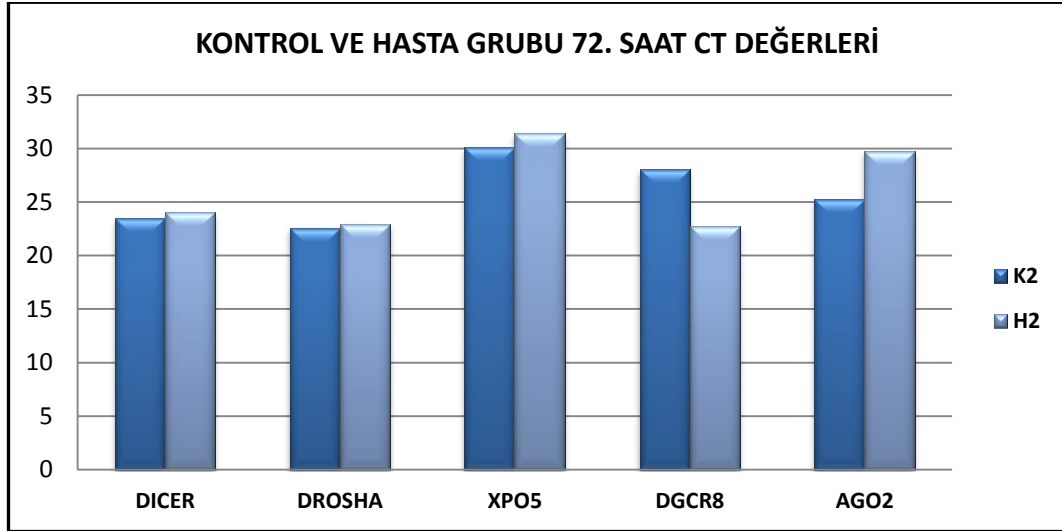
Şekil 4.2. Kontrol grubu TresholdCycle (CT) ortalamalarının karşılaştırması

Dicer, Drosha, Exportin5, DGCR8 ve Argonaute2 hem normalize gen ekspresyon düzeyleri, hem de kat artışları açısından hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p > 0.05$).



(K1: Kontrol grubu, H1: Hasta grubu) ($p > 0.05$)

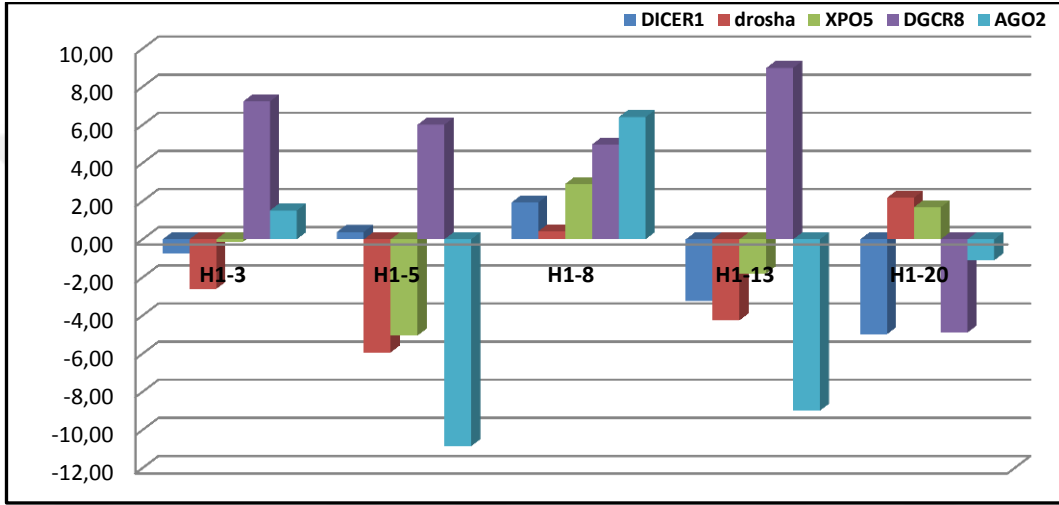
Şekil 4.3. Hasta ve Kontrol grubu travma sonrası 4-6. saat ThresholdCycle (CT) ortalamalarının karşılaştırması



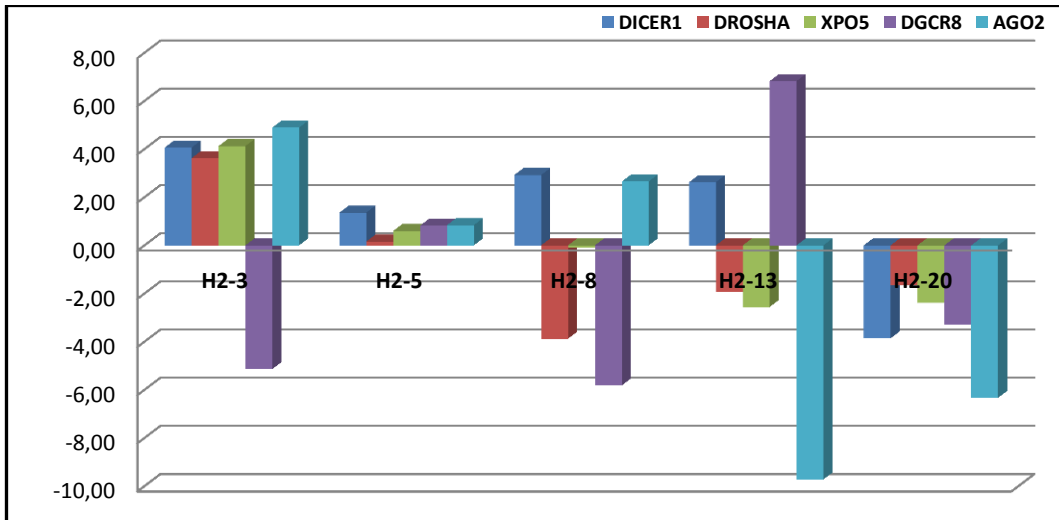
(K2: Kontrol grubu, H2: Hasta grubu) ($p > 0.05$)

Şekil 4.4. Hasta ve Kontrol grubu travma sonrası 72. saat ThresholdCycle (CT) ortalamalarının karşılaştırması

Hastaların klinikleri göz önüne alınarak yapılan incelemede bir hafta gibi kısa bir sürede hızlı bir iyileşme süreci gösterip yoğun bakımdan taburcu olan hastalar H3, H5, H8, H13, H20 olarak tespit edilmiştir. Bu hastaların protein ekspresyon düzeyleri tek tek incelendiğinde Dicer ekspresyonunun bu hastaların hepsinde arttığı saptanmıştır (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6). Bu hasta grubunda takip sürecinde ölçülen parsiyel arteriyel oksijen basıncı değerleri ise ortalama 112,8 mmHg (92-177 mmHg) olarak kaydedilmiştir.

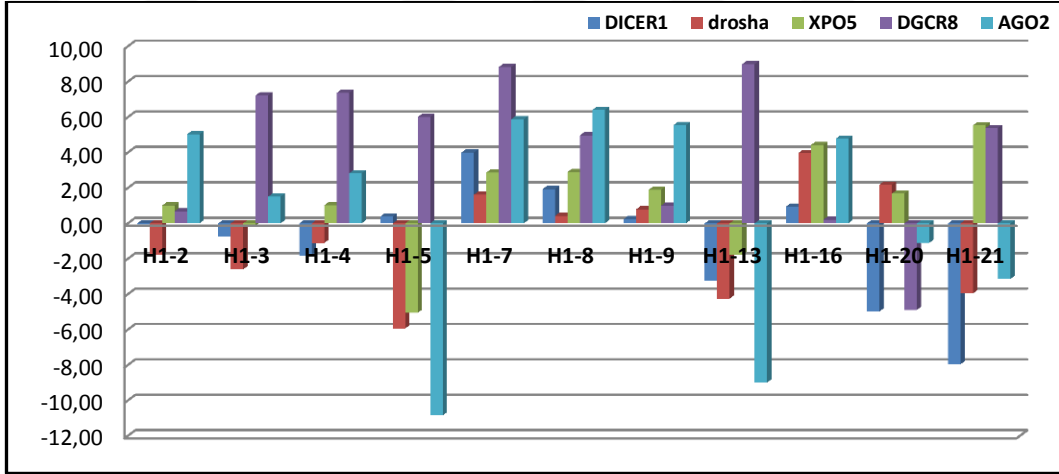


Şekil 4.5. Erken dönemde yoğun bakımdan taburcu olan hastaların travma sonrası 4-6. saat protein ekspresyon profilleri

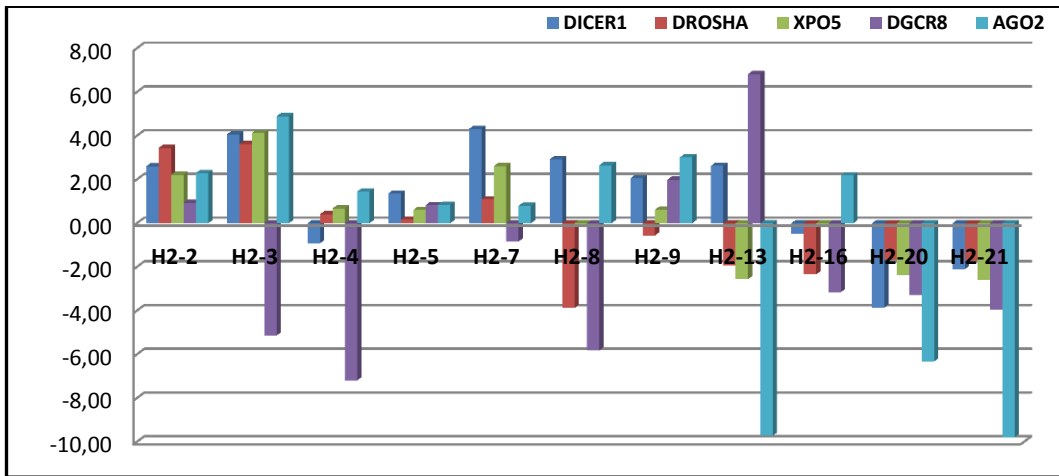


Şekil 4.6. Erken dönemde yoğun bakımdan taburcu olan hastaların travma sonrası 72. saat protein ekspresyon profilleri

Çalışmamıza giriş GKS skoru 8 ve altı olan 21 ağır TBH'lı hasta dahil edilmiştir. Bu hastalardan 11 tanesi 30 günün sonunda hafif TBH sınıfına yükselmiştir (H2, H3, H4, H5, H7, H8, H9, H13, H16, H20, H21). Sınıf değişimi ile Dicer, Drosha, Exportin5, DGCR8, Argonaute2 gen ekspresyon düzeylerinin artışları arasında analiz yapıldığında anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır (Dicer p:0.42; Drosha p:0.71; Exportin5 p:0.35; DGCR8 p:0.3; Argonaute2 p:0.41). Ancak bahsi geçen bu 11 hastanın hepsinde Dicer protein ekspresyon düzeylerinin arttığı, 8 hastada ise Ago2'nin azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.7 ve 4.8). Bu 11 hastada parsiyel arteriyel oksijen basıncı değerleri ortalama 106,4 mmHg (77-177 mmHg) olarak bulunmuştur.

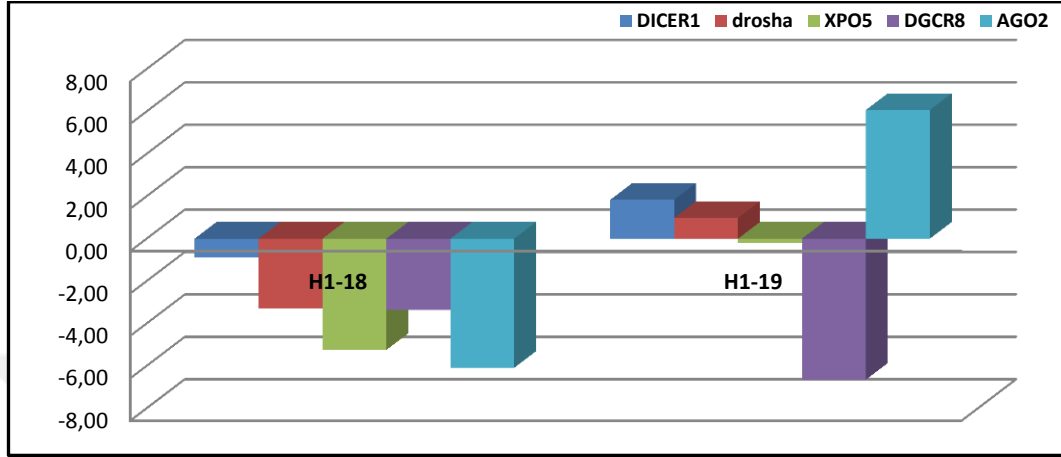


Şekil 4.7. 30. gün sonunda hafif TBH kategorisine giren hastaların travma sonrası 4-6. saat protein ekspresyon profilleri

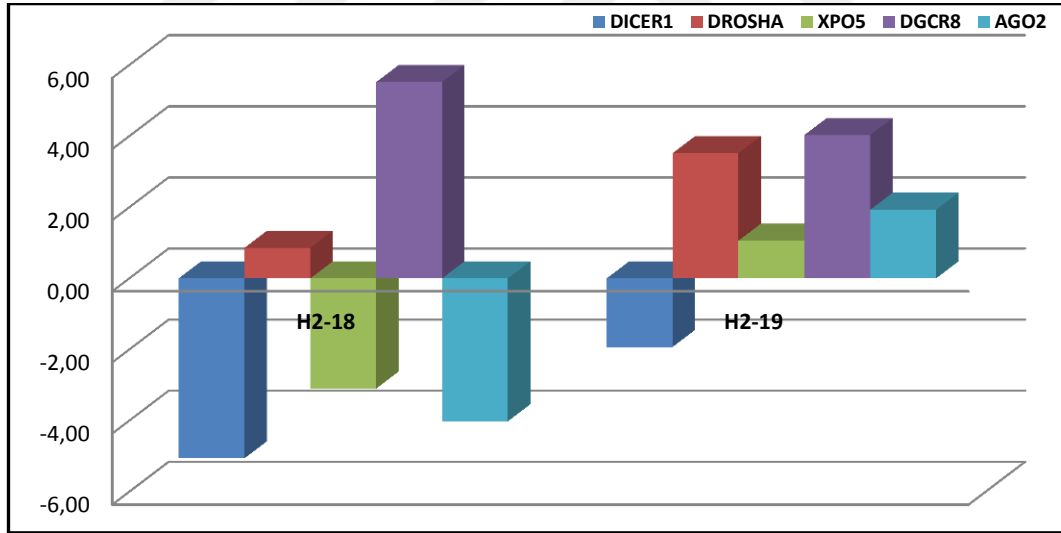


Şekil 4.8. 30. gün sonunda hafif TBH kategorisine giren hastaların travma sonrası 72. saat protein ekspresyon profilleri

Çalışmamızda H18 ve H19 hastalarının GKS skorları klinik takipte kötüleşmiştir. Bu hastaların protein ekspresyon profillerinden Dicer'in azaldığı, DGCR8'in ise arttığı bulunmuştur (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10).



Şekil 4.9. GKS skorları kötüleşen hastaların travma sonrası 4-6. saat protein ekspresyon profilleri



Şekil 4.10. GKS skorları kötüleşen hastaların travma sonrası 72. saat protein ekspresyon profilleri

Gen ekspresyon profili protein düzeyinde ekspresyonu gösteren western blot analizinin sonuçları ile doğrulanmıştır.

5. TARTIŞMA

Yoğun bakım ünitesinde ağır beyin hasarı nedeni ile yatmakta olan hasta sayısı günden güne artmaktadır. Bu hastaların prognoz tahmininde kullanılan klinik ve radyolojik parametrelerin yanı sıra günümüze kadar miRNA'lar da bu amaç için pek çok çalışmanın hedefi haline gelmiştir.

Çalışmamızda miRNA biyogenezinde rol alan Dicer, Drosha, DGCR8, Exportin5 ve Argonaute2'nin protein ekspresyon düzeylerinin farklarının ölçülmüş ve kontrol grubu ile karşılaştırılması yapılmıştır ancak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Çalışmaya dahil edilen hastaların 30 günlük GKS skorlarında anlamlı artış bulunurken, GKS artışı ile protein ekspresyon düzeylerin arasında belirgin bir ilişki saptanamamıştır.

Travmatik beyin hasarında miRNA düzeylerinin ölçüldüğü klinik ve deneysel (hayvan, hücre kültürü çalışması gibi) çalışmalar vardır (94-108). Bu çalışmalarda çeşitli miRNA düzeylerinin arttığı veya azaldığı ve hatta bazı miRNA'ların travmanın erken döneminde azaldığı geç dönemde ise arttığı gösterilmiştir. Ayrıca bu değişikliklerin iyileşme dönemine etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle patolojide rol alan miRNA seviyelerinin homeostatik seviyelere çekilmesi, beyin hasarlı hastaların klinik sonuçlarının iyileştirilmesi imkanı sunabilmektedir. Bu miRNA bazlı tedavi yöntemleri miRNA seviyelerinin arttırıldığı agonizma ya da inhibe edildiği antagonizma yolu ile olabilmektedir (109-110). Sonuç olarak patolojik süreçte rol alan miRNA düzeylerinin saptanmasının ve modifiye edilmesinin, gelecekte geliştirilecek tedavi yaklaşımlarına ışık tutabileceği öngörülmektedir (111).

TBH'da miRNA değişimleriyle ilgili yapılan kısıtlı sayıda klinik çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda çeşitli zaman aralıklarında, spesifik miRNA seviyelerine bakılmıştır (86,96,106,112,113,114).

Yang T ve ark.'nın yaptığı bir klinik çalışmada, 76 travmatik beyin hasarlı hasta ve 38 kontrol grubu dahil edilmiş; travmatik beyin yaralanması tanısı konularak (klinik ve görüntüleme yöntemleri ile) hastaneye yatırılan ve tedavisi konservatif ya da cerrahi olarak yapılan hastalarda serum miR-93, miR-191 ve miR-499 düzeyleri yatış sonrası 21 günlük süre boyunca (2-7 gün, 8-14 günler ve

15-21 günler olmak üzere) kontrol kanlar alınarak ölçülmüştür. Çalışmada, hastalar GKS'ye göre ağır (GKS 3-8), orta (GKS 9-13) ve hafif (GKS 14-15) olmak üzere 3 gruba ayrılmışlardır. Ayrıca klinik sonlanımı belirlemede 9 aylık süre boyunca izlenen hastalar Glasgow Outcome Skoruna (GOS) göre iyi sonlanım (GOS=3-5) ve kötü sonlanım (GOS=1-2) şeklinde 2 gruba ayrılmışlardır. Çalışmada, bu 3 miRNA'nın serum seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında belirgin şekilde arttığı ortaya konmuştur. Ayrıca, travmanın şiddeti arttıkça ve kötü sonlanım gösteren hastalarda bu 3 miRNA'nın serum seviyeleri anlamlı olarak artmış bulunmuştur (112).

Redell ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada travmatik beyin yaralanması sonrası erken dönemde (ilk 24 saatte) hastalar travma ciddiyetini belirlemede kullanılan Glasgow Koma Skalası (GKS)'na göre ağır (GKS ≤ 8) ve hafif (GKS > 12) olmak üzere iki gruba ayrılmışlardır. Çalışmada, ağır kafa travmalı hastalarda miRNA subtiplerinden serum miRNA-16, miRNA-92a ve miRNA-765 düzeylerinde anlamlı artış olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada hafif kafa travmalı hastalarda miRNA-765 düzeyleri değişiklik göstermez iken; miRNA-92a ve miRNA-16 düzeyleri kontrol grubuna göre; anlamlı olarak artmış bulunmuştur. Bu bağlamda, travmatik beyin yaralanması sonrası travma ciddiyetini değerlendirmede sözü edilen mi-RNA subtiplerinin iyi bir marker olabileceği ileri sürülmüştür (106).

MikroRNA'ların yanı sıra miRNA biyogenezinde rol oynayan moleküllerin beyin dokusunda ve nöral kök hücrelerde incelendiği çalışmalar bulunmaktadır. Dicer ve DGCR8 silinmesine bağlı serebellumda nöral prekürsör hücrelerde DNA hasarı ve apoptoz görülmüştür. Bu sonuç da miRNA biyogenez yolağını potansiyel bir tedavi hedefi haline getirmektedir (115). Dicer eksikliğine bağlı olgun miRNA yokluğunun ise santral sinir sisteminde ve diğer organlarda malformasyona neden olduğu deneysel çalışmalar mevcuttur (116). Ratlarda geçici orta serebral arter oklüzyonu sonrası Drosha, Dicer, DGCR8 ve Exportin 5 seviyelerinin değişmediği gösterilmiştir (117). Nöral kök hücrelerde DGCR8 proteininin silinmesine bağlı DNA replikasyonu, protein translasyonu, hücre siklusu progresyonu ve DNA hasar tamirinin azaldığı gösterilmiştir (118). Dicer ve DGCR8'in faredede yetersiz ekspresyonunun sinaptik protein ekspresyonunda, sinaptik iletimde, öğrenme ve hafızada değişimlere neden olduğu gösterilmiştir

(119,120). Ayrıca Dicer ekspresyonu bozuk olan farelerle yapılan çalışmalarda nöronal farklılaşmanın ve apoptozun arttığı ek olarak beyin çeşitli bölgelerinde (korteks, serebellum, hipokampus) anomalilerin geliştiği bulunmuş (121).

MikroRNA işlenmesinde görev alan komponentlerin başta kanser olmak üzere birçok hastalıkla ve klinik seyirle bağdaştırıldığı yayınlar bildirilmiştir (83,122-126). Ek olarak nörolojik hastalıklarla da ilişkilendirildiği çalışmalara da rastlanmaktadır (127,128,129).

McKiernan ve arkadaşlarının hipokampal sklerozlu temporal lob epilepsi tanımlı hastaların beyin dokusunda yaptığı çalışmada ise kontrol grubuna göre Dicer düzeylerinin düşük, AGO düzeylerininse yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca Dicer düzeyinin azalmasına bağlı olarak, aynı hasta grubunda incelenen 380 olgun mikroRNA'nın %54'ünün ekspresyon düzeylerinin azaldığını ve %21'inin ise tespit edilemediğini bildirmişlerdir (127).

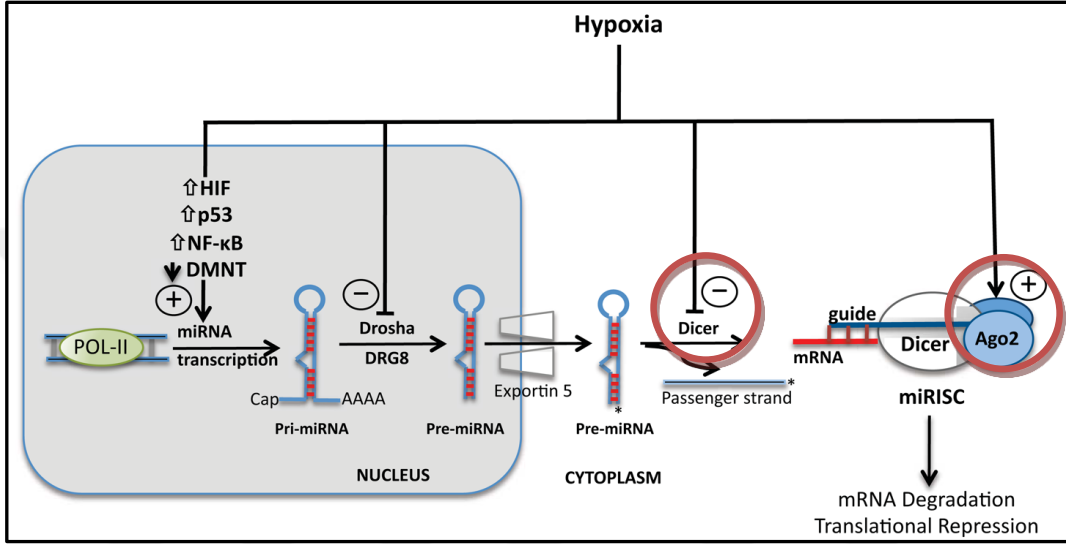
He ve arkadaşlarının depresyon tanımlı hastaları ve sağlıklı gönülleri karşılaştırdığı bir çalışmada ise DGCR8 genindeki varyasyonun depresyon riskini belirgin olarak arttırdığı bildirilmiştir (128).

Jafari ve arkadaşlarının, multiple sklerozlu hastaların kan örneklerinden Drosha, Dicer ve DGCR8 düzeylerinin bakıldığı çalışmada, bu protein düzeylerinin hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunduğu tespit edilmiştir (129).

TBH'da sekonder hasar nedenlerinden biri hipoksidir. Hipoksinin ağır TBH'dan sonra morbidite ve mortaliteyi arttırdığı ve kognitif fonksiyonları kötüleştirdiği birçok çalışmada kanıtlanmıştır (55,130,131).

Hipoksinin miRNA biyogenezinde birçok noktada etki ettiğine dair veriler mevcuttur (132) (Şekil 5.1). Wu ve ark.'ları yaptıkları deneysel bir çalışmada, hipoksinin tip I kollajen prolil-4-hidroksilaz aracılığıyla Ago2'nin birikmesine yol açtığını göstermişler (133). İbrahim ve ark.'ları ise farelerde hepatosellüler kanser modeli oluşturdukları bir deneyde, kanserli hücrelerde hipoksiye bağlı gelişen Dicer down-regülasyonunu (azalmış ekspresyonu) göstermişlerdir (134). Meme kanseri hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada da yine benzer şekilde hipoksiye maruz kalan hücrelerde Dicer mRNA ve protein seviyelerinde belirgin bir azalma saptanmış (135). Over kanseri oluşturulan farelerde yapılan bir çalışmada,

hipoksik şartlarda ekspresyonu artan miRNA 630'un Dicer'ı inhibe ettiğini ve anti-miR-630 ve anti-vasküler endotelial growth faktör kombinasyon tedavisinin Dicer ekspresyonunu arttırdığını ve tümör büyümesi ve metastazını azalttığı gösterilmiş (136). Bu veri sayesinde hipoksi aracılı patofizyolojik süreçlerde yeni terapötik yaklaşımların geliştirilebileceği öngörülebilir.



Şekil 5.1. MiRNA biyogenezinin hipoksi aracılı regülasyonu (132)

Çalışmamızda hem 1 haftada taburcu olan (H3, H5, H8, H13, H20) ve hem de ağır TBH sınıfından hafif TBH sınıfına yükselen hastalarda (H2, H3, H4, H5, H7, H8, H9, H13, H16, H20, H21) Dicer ekspresyonlarının belirgin bir şekilde arttığını gözlemledik. Kısa dönemde yoğun bakımdan taburcu olan hastalarda bir sekonder hasar faktörü olan hipoksinin mevcut olmadığı göz önüne alındığında bu hastalarda Dicer'in hücresel anlamda beyin dokusunda makul bir şekilde işlevini yerine getirdiği ve klinik seyrin buna bağlı olarak iyileştiği sonucuna varılabilir. Ayrıca ağır TBH sınıfından hafif TBH sınıfına yükselen 11 hastanın 8'inde (%72) Ago2 protein ekspresyon düzeylerinin azaldığını tespit ettik ve bu veri de hipoksi varlığında Ago2'nin arttığını gösteren çalışmalarla uyumludur.

Travmatik beyin hasarlı hastaları klinik sınıflaması ve takibinde GKS skoru uzun yıllardır kullanılan bir yöntemdir. GKS skorunun bir defaya mahsus ölçülmesinin kısıtlılıkları mevcuttur ve bu nedenle aralıklı olarak ölçülmesi gerekmektedir (137). Azalan bir GKS skoru, başlangıçta düşük olan bir GKS

skoruna göre kötü sonuçları tahmin etmede daha başarılı iken (138,139), yükselme eğiliminde olan bir GKS iyileşmiş sonuçları göstermektedir (137). Çocuklarda da, GKS skorunda iyileşme sağkalım oranlarını arttırmaktadır (140).

Çalışmamızda hastaların prognoz tayini için başlangıç ve 30 gün sonra GKS skorları ölçülmüştür. Sedasyon ve nöromusküler blokaj gibi tedaviler GKS skorunun optimizasyonunu bozduğu için hastaların GKS değerlendirmesi bu gibi tedavilerin uygulanmadığından veya uygulandıysa da etki süresinin sonlandığından emin olunduktan sonra yapılmıştır.

Çalışmada TBH'ı oranının motorlu taşıt kazalarında daha fazla olduğu bulunmuştur. Literatür tarandığında uyumlu sonuçların olduğu çalışmalar mevcuttur, ancak düşmeye bağlı travmaların TBH epidemiyolojisinde daha sık olduğunu bildiren yayınlar da vardır (8,141).

İstatistiksel anlamlı çıkan bir diğer demografik veri yaştır. TBH grubunda (hasta grubu) yaş kontrol grubuna göre anlamlı düşük çıkmıştır ve bu veri önceki çalışmalarla uyumludur (7,8).

Çalışmamızda travma sonrası ilk 3 günde cerrahi geçiren hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir. Böylece hem hasta hem de kontrol grubunda, miRNA biyogenezinde rol alan proteinlerin düzeylerine etki edebilecek ek faktörlerden biri elimine edilerek hasta standartizasyonu optimize edilmeye çalışılmıştır.

Bu çalışmada özgün olarak tüm miRNA düzeylerini etkileyebilecek olan sentez proteinlerinin düzeylerine bakılmıştır ve literatür tarandığında benzer bir çalışma bulunamamıştır.

Çalışmanın kısıtlılıkları arasında örneklem sayısının az olması, hastaların kısa bir dönem (30 gün) sonunda takip edildikten sonra klinik değişimlerinin kaydedilmesi ve uzun dönem sonuçların çalışmaya dahil edilmemesi sayılabilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

İnsan ve deneysel çalışmalar, kafa travmalı hastalarda; travmatik beyin yaralanmasının tanısının, şiddetinin ve prognozunun olası göstergeleri için serumda ve beyin omurilik sıvısında biyobelirteçler olarak çeşitli spesifik mikroRNA'ları tanımlamıştır. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar doğrultusunda ağır TBH'lı hastalarda miRNA biyogenez komponentlerinden Dicer, Drosha, Exportin5, DGCR8 ve Argonaute2 proteinlerinin ekspresyon değişimleri istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Ancak hasta bazında ekspresyon değişimleri incelendiğinde ağır TBH sınıfından hafif TBH sınıfına yükselerek belirgin GKS artışı saptanan hastaların Dicer ekspresyonlarının arttığı ve Ago2 ekspresyonunun da bu grupta çoğu hastada azaldığı fark edilmiştir. Kısa sürede yoğun bakımdan taburcu olan hastalarda ise yine Dicer ekspresyon profilinin arttığı gözlemlenmiştir.

Literatür tarandığında TBH ile miRNA biyogenezinde rol alan proteinler arasında ilişkiye yönelik klinik bir çalışmaya rastlanamamıştır. Çalışmamızda hasta sayısının az olması nedeni ile istatistiksel analizin anlamlı olmaması beklenen bir sonuçtur. Bu nedenle bu konuda daha fazla örneklem sayılı ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. ÖZET

Yoğun Bakımda Takip Edilen Travmatik Beyin Hasarlı Hastalarda MikroRNA Biyogenezinde Yer Alan Komponentlerin Ekspresyon Düzeylerinin Prognozla İlişkisi

Travmatik beyin hasarlı hastaların yoğun bakım ünitesi takibinde klinik, radyolojik ve elektrofizyolojik veriler prognozu değerlendirmede katkı sağlasa bile kesin bir prognostik belirteç günümüzde henüz bulunamamıştır. MikroRNA'lar küçük, 19-28 nükleotidden oluşan, protein sentezini posttranskripsiyonel düzeyde regüle eden, endojen, kodlanmayan RNA molekülleridir. miRNA biyogenezi çekirdekte ve sitoplazmada olmak üzere iki basamakta gerçekleşir. Bu basamaklarda özelleşmiş moleküller görev yapmaktadır. Bunlardan en spesifik olanları RNaz III ailesinden olan Drosha enzimi ve kofaktörü Pasha (DGCR8), taşıma reseptörü olan Exportin5, yine RNaz III ailesine ait bir enzim olan Dicer endonükleazı, kararlı zincir seçilimini sağlayan Argonaute proteindir. MikroRNA sentezinde görev alan moleküllerin işlevlerini doğru yapamamaları halinde sentezi hedeflenen mikroRNA'nın da fonksiyonunun bozulduğu bilinmektedir.

Son yıllarda mikroRNA'lar çeşitli hastalıklarda biyobelirteç olarak araştırılmaktadır. Yapılan klinik ve deneysel çalışmalar, travmatik beyin hasarında düzeyleri ölçülen, prognostik ve diagnostik açıdan değerli birçok mikroRNA göstermiştir. Ancak travmatik beyin hasarlı hastalarda mikroRNA biyogenez komponentlerinin seviyeleriyle ilgili veriler kısıtlıdır.

Çalışmamızda Akdeniz Üniversitesi Anestezi Yoğun Bakım Üniteleri'ne kabul edilen ve travmatik beyin hasarı gelişen 21 hastanın travma sonrası sonrası 4-6. saat ve 72. saatte alınan kan örneklerinden Dicer, Drosha, DGCR8, Exportin5 ve Argonaute2 seviyelerinin ölçülmesi ve kontrol grubu ile karşılaştırılması planlanmaktadır. Çalışmanın kontrol grubunu travma nedeni ile yoğun bakımda takip edilen fakat beyin hasarı tanısı olmayan 21 hasta oluşturacaktır. Erken (travma sonrası 4-6. saatler) ve geç (72. saat) dönemde ölçülen protein

düzeylelerinin farklı olup olmadığının saptanması ve bu değışimin prognoza etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar doğrultusunda ağır TBH'lı hastalarda miRNA biyogenez komponentlerinden Dicer, Drosha, Exportin5, DGCR8 ve Argonaute2 proteinlerinin ekspresyon değışimleri istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Ancak hasta bazında ekspresyon değışimleri incelendiğinde ağır TBH sınıfından hafif TBH sınıfına yükselen hastaların Dicer ekspresyonlarının arttığı ve Ago2 ekspresyonunun da bu grupta çoğu hastada azaldığı fark edilmiştir. Kısa sürede yoğun bakımdan taburcu olan hastalarda ise yine Dicer ekspresyon profilinin arttığı gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Travmatik Beyin Hasarı, Prognoz, MikroRNA, MikroRNA Biyogenezi

8. ABSTRACT

The Relationship Between Prognosis of Expression Levels of Components in MicroRNA Biogenesis in Patients with Traumatic Brain Injury in Intensive Care

A definitive prognostic marker has not been found yet, although clinical, radiological and electrophysiological data contribute to the prognosis of traumatic brain injury patients. MicroRNAs are small, endothelial, non-coded RNA molecules consisting of 19-28 nucleotides that regulate protein synthesis at the post-inflammatory level. The miRNA biogenesis takes place in two steps: the nucleus and the cytoplasm. Specialized molecules serve in these steps. The most specific of these are the Drosha enzyme from the RNase III family and the cofactor Pasha (DGCR8), the transport receptor; Exportin5, the Dicer endonuclease, an enzyme belonging to the RNase III family; the Argonaute protein that provides stable chain selection. It is known that if the molecules involved in microRNA synthesis are not able to function correctly, the function of the targeted microRNA is impaired.

In recent years microRNAs have been investigated as biomarkers in various diseases. Clinical and experimental studies have shown many microRNAs that are valuable in terms of prognostic and diagnostic levels, which are measured in traumatic brain injury. However, data on the levels of microRNA biogenesis components are limited in patients with traumatic brain injury.

In our study, it was planned to measure Dicer, Drosha, DGCR8, Exportin5 and Argonaute2 levels of 21 patients who were admitted to Akdeniz University Anesthesia Intensive Care Units and who had traumatic brain injury in the 4-6. hours and 72 hours after the trauma and compared with the control group. The control group of the study consisted of 21 patients who were followed up in the intensive care unit due to the trauma but were not diagnosed with brain injury. It is aimed to determine whether the protein levels measured in early (post-traumatic 4-6. hours) and late (72 hours) period are different and to determine the effect of this change on prognosis.

According to the results of our study, the expression changes of Dicer, Drosha, Exportin5, DGCR8 and Argonaute2 proteins from miRNA biogenesis components were not found statistically significant in patients with severe TBI. However, when we investigate the patients one by one, it was noticed that Dicer expression of the patients who increased from severe TBI to mild TBI class increased and that the expression of Ago2 decreased in most patients in this group. It was observed that Dicer expression profile was increased in patients who were discharged from the intensive care unit in a short time.

Key Words: Traumatic Brain Injury, Prognosis, MicroRNA, MicroRNA Biogenesis

9. KAYNAKLAR

1. Hyder AA, Wunderlich CA, Puvanachandra P, Gururaj G, Kobusingye OC. The impact of traumatic brain injuries: a global perspective. *Neuro Rehabilitation* 2007; 22: 341–53.
2. Gökalp Z. Nöroşirürji Ders Kitabı, Mars Matbaası, Ankara 1998.
3. Paşaoğlu A. Erişkinde Kafa Travmaları. Temel Nöroşirürji Cilt I, Türk Nöroşirürji Derneği Yayınları 2005, Ankara; 316-23.
4. Erbenği A. History and development of neurosurgery in Anatolia. *Turkish Neurosurgery* 1993; 3: 1-5.
5. Schouten JW, Maas AIR. Youmans Neurological Surgery, 2012. Chapter 323; Epidemiology of Traumatic Brain Injury; 3271-3272.
6. Sut N, Memis D. Intensive care cost and survival analyses of traumatic brain injury. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 2010; 16: 149-54.
7. Kraus JF, McArthur DL, Silverman TA, Jayarama M. Epidemiology of brain injury. Narayan RK (eds), *Neurotrauma*. McGraw Hill Company, New York 1996; 16-17.
8. Jennet B, Lindsay KW. Kafa travması sıklığı, nedenleri ve sonuçları. Özcan OE, Turgut M, Açıkgöz M (çev.) *Temel Nöroşirürji'den*, 5. Baskı. Ankara, Güneş Kitabevi 1995; 229-40.
9. Steyerberg EW, Mushkudiani N, Perel P, Butcher I, Lu J, McHugh GS, et al. Predicting outcome after traumatic brain injury: development and international validation of prognostic scores based on admission characteristics. *PLoS Med* 2008; 5: 1251–61.
10. MRC CRASH Trial Collaborators, Perel P, Arango M, Clayton T, Edwards P, Komolafe E, Poccock S, et al. Predicting outcome after traumatic brain injury: practical prognostic models based on large cohort of international patients. *BMJ* 2008; 336: 425–9.
11. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet* 1974; 2: 81-4.
12. Kathryn E, Saatman KE, Duhaime AC, Bullock R, Maas AIR, Valadka A, Manley GT. Classification of traumatic brain injury for targeted therapies *Journal of Neurotrauma* 2008; 25: 719-38.
13. Hemphill JC, Phan N. Traumatic brain injury: Epidemiology, classification, and pathophysiology. <http://www.uptodate.com/contents/traumatic-brain-injury-epidemiology-classification-and-pathophysiology>. Apr 13, 2013

14. Surgeons, A.C.o., ATLS, W. Chapleau, Editor 2011; 6: 132-51.
15. Heegaard WG, Biros MH. Head Injury. Rosen's Emergency Medicine. 8th Edition 2013; 41: 339-67.
16. Wright DW, Merck LH. Head Trauma in Adults and Children Judith E. Tintinalli's Emergency Medicine: A Comprehensive Study Guide 2010; 7(21): 4064-91. McGraw-Hill Professional.
17. Dawodu ST. Traumatic brain injury (TBI) -Definition, epidemiology, pathophysiology. <http://emedicine.medscape.com/article/326510-overview>(Mar 03, 2015)
18. Castilla LR. Closed head trauma. <http://emedicine.medscape.com/article/251834-overview> (Nov 26, 2014)
19. Puntis M, Smith M. Critical care management of adult traumatic brain injury, Anaesthesia and Intensive Care Medicine 2017; 18(5): 233-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpaic.2017.02.008>
20. Jamieson KG, Yelland JDN. Extradural hematoma: Report of 167 cases. J Neurosurg 1968; 29: 12-23.
21. Foulkes M, Eiscnberg HM, Jane JA, Marmarou A, Marshall LF. The traumatic coma data bank design, methods and baseline characteristics. J Neurosurg 1991; 75: 8-13.
22. Korkmaz Dilmen Ö, Akçıl EF, Tunalı Y. Intensive care treatment in traumatic brain injury. Turk J Anaesth Reanim 2015; 43(1): 1-6.
23. Penn RD. Cerebral edema and neurological function: CT, evoked responses and clinical examination, in Advances in Neurology 1980; 28: 383-99.
24. Wilkinson HA. Intracranial pressure. In: Youmans JR (ed). Neurological Surgery (Vol. 2) 3th ed. Philadelphia: WB Saunders 1990; 661-95.
25. Timofeev I. Intracranial compartment and intracranial pressure. Özgen S, Çil H (çev). In: Nöroanestezi ve Nöro-Yoğun Bakımın Esesları. Aypar Ü, Uzun Ş (çev ed). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri 2013; 26-31.
26. Miller JD, Butterworth JF, Gudeman SK, Faulkner JE, Choi SC, Selhorst JB, et al. Further experience in the management of severe head injury. J Neurosurg 1981; 54(3): 289-99.
27. Miller JD, Beker DP, Ward JD. Significance of intracranial hypertension in severehead injury. J Neurosurg 1977; 47: 503-16.
28. Robert D. Increased Intracranial Pressure. Clin Ped Emerg Med 2008; 9: 83-7.
29. Soldatos T, Karakitsos D, Chatzimichail K, Papathanasio M, Gouliamos A, Karabinis A Optic nerve sonography in the diagnostic evaluation of adult brain injury. Critical Care 2008; 12(3): R67.

30. Stoica BA, Faden AI. Cell death mechanisms and modulation in traumatic brain injury. *Neurotherapeutics* 2010; 7(1): 3-12.
31. Roy SS, Hajnoczky G. Calcium, mitochondria and apoptosis studied by fluorescence measurements. *Methods* 2008; 46(3): 213-23.
32. Uguz AC, Naziroglu M, Espino J, Bejarano I, Gonzalez D, Rodriguez AB, et al. Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and -9 activities. *J Membr Biol* 2009; 232(1-3): 15-23.
33. Raghupathi R, Graham DI, McIntosh TK. Apoptosis after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2000; 17: 927-38.
34. Eldadah BA, Faden AI. Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. *J Neurotrauma* 2000; 17: 811-29.
35. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 1999; 6(11): 1028-42.
36. Weingärtner J, Lotz K, Faltermeier A. The role of apoptosis in early embryonic development of the adenohypophysis in rats. *Head Face Med* 2008; 23(4): 13.
37. Osier N, Carlson SW, DeSana AJ, Dixon CE. Chronic Histopathological and Behavioral Outcomes of Experimental Traumatic Brain Injury in Adult Male Animals. *J Neurotrauma* 2015; 32(23): 1861-82.
38. Uzan M, Erman H, Tanriverdi T, Sanus GZ, Kafadar A, Uzun H. Evaluation of apoptosis in cerebrospinal fluid of patients with severe head injury. *Acta Neurochir (Wien)* 2006; 148(11): 1157-64.
39. Ritossa F. Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones* 1996; 1: 8-97.
40. Kim JY, Yenari MA. The immune modulating properties of the heat shock proteins after brain injury. *Anat Cell Biol* 2013; 46(1): 1-7.
41. Zhang J, Tao DQ, Zhao H, Yin ZY. Expression of Hsp70 and Caspase-3 in rabbits after severe traumatic brain injury. *China J Traumatol* 2012; 15(6): 338-41.
42. Wang F, Li YH. Expression of HSP70 mRNA in hippocampus of rats after diffuse axonal injury. *Pub Med* 2011; 27(4): 250. PMID: 21913551 (Article in Chinese)
43. Carney N, Totten AM, O'Reilly C, Ullman JS, Hawryluk GW, Bell MJ, Bratton SL, et al. Guidelines for the Management of Severe Traumatic Brain Injury, Fourth Edition. *Neurosurgery* 2016; 24(1): 1-106. doi: 10.1227/NEU.0000000000001432.
44. Becker DP, Gade GF, Miller JD. Prognosis head injury. In: Youmans JR (Ed). *Neurological Surgery*. Philadelphia: WD Saunders Company 1990; 3(69): 2194-230.

45. Schouten JW, Maas AIR. Youmans Neurological Surgery, 2012. Chapter 327; Neurochemical Pathomechanisms in Traumatic Brain Injury; 3323.
46. Bruns J Jr, Hauser WA. The Epidemiology of traumatic brain injury: A review. *Epilepsia* 2003; 44(Suppl. 10): 2-10.
47. Mushkudiani NA, Engel DC, Steyerberg EW, Butcher I, Lu J, Marmarou A, et al. Prognostic value of dermorphics in traumatic brain injury: Results from the IMPACT Study. *J Neurotrauma* 2007; 24(2): 259-69.
48. Wardlaw JM, Easton VJ, Statham P. Which CT features help predict outcome after head injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; 72: 188-92.
49. Signorini DF, Andrews PJD, Jones, PA, Wardlaw JM, Miller JD. Predicting survival using simple clinical variables: a case study in traumatic brain injury. *Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; 66: 20-5.
50. Lu J, Marmarou A, Choi S, Maas A, Murray G, Steyerberg EW. Mortality from traumatic brain injury. *Acta Neurochir* 2005; 95: 281-5.
51. Butcher I, McHugh GS, Lu J, Steyerberg EW, Hernandez A V, Mushkudiani NA, et al. Prognostic value of cause of injury in traumatic brain injury: Results from the IMPACT Study. *J Neurotrauma* 2007; 24(2): 281-6.
52. Demetriades D, Kuncir E, Brown CVR, Martin M, Salim A, Rhee P, et al. Early prediction of mortality in isolated head injury patients: A New Predictive Model. *J Trauma* 2006; 61: 868-72.
53. Butcher I, Maas AIR, Lu J, Marmarou A, Murray GD, Mushkudiani NA, et al. Prognostic value of admission blood pressure in traumatic brain injury: Results from the IMPACT Study. *J Neurotrauma* 2007; 24(2): 294-302.
54. Mchugh GS, Engel DC, Butcher I, Steyerberg EW, Lu J, Mushkudiani NA, et al. Prognostic value of secondary Insults in traumatic brain injury: Result from the IMPACT study. *J Neurotrauma* 2007; 24(2): 287-93.
55. Murray GD, Butcher I, McHugh GS, Lu J, Mushkudiani NA, Maas AIR, et al. Multivariable prognostic analysis in traumatic brain injury: Results from the IMPACT Study. *J Neurotrauma* 2007; 24(2): 329-37.
56. Schaan M, Jaksche H, Boszyck B. Predictors of outcome in head injury: Proposal of a new scaling system. *J Trauma* 2002; 52(4): 667-74.
57. Ghajar J. Traumatic Brain Injury. *Lancet* 2000; 356: 923-29.
58. Ökten Aİ, Ergün R, Beşkonaklı E, Akdemir G, Bostancı U, Gezici Aİ, et al. Kafa travmasında prognozu ve ölüm oranını etkileyen unsurlar. *Türk Nöroşirürji Dergisi* 1997; 7: 51-9.
59. Marmarou A, Lu J, Butcher I, Mchugh GS, Murray GD, Steyerberg EW et al. Prognostic value of the Glasgow coma scale and pupil reactivity in traumatic brain

- injury assessed Pre-Hospital and on Enrollment: An IMPACT Analysis. *J Neurotrauma* 2007; 24(2): 270–80.
60. Hsiao KY, Hsiao CT, Weng HH, Chen K-H, Lin L-J, Huang Y-M. Factors predicting mortality in victims of blunt Trauma brain injury in emergency department settings. *Emerg Med J* 2008; 25: 670-3.
 61. Arbabi S, Jurkovich G.J, Wahl WL, Franklin GA, Hemmila MR, Taheri PA et al. Comparison of prehospital and hospital data in trauma patients. *J Trauma* 2004; 56: 1029-32.
 62. Perel P, Edwards P, Wentz R, Roberts I. Systematic review of prognostic models in traumatic brain injury. *BMC Med Inform Decis Mak* 2006; 6: 38-47.
 63. Udekwu P, Kromhout-Schiro S, Vaslef S, Baker C, Oller D. Glasgow coma scale score, mortality, and functional outcome in head-injured patients. *J Trauma* 2004; 56: 1084-9.
 64. Maas AIR, Steyerberg EW, Butcher I, Dammers R, Lu J, Marmarou A et al. Prognostic value of computerized tomography scan characteristics in traumatic brain injury: Result from the IMPACT study. *J Neurotrauma* 2007; 24(2): 303-14.
 65. Marshall LF, Marshall SB, Klauber MR, Clark MB, Eisenberg HM, Jane J et al. A new classification of head injury based on computerized Tomography; Traumatic Coma Data Bank *J Neurotrauma* 1992; 9: 287-92.
 66. Karasu A, Sabancı P.A, Cansever T, Hepgöl KT, İmer M, Dolaş İ, ve ark. Kafa travmalı hastalarda epidemiyolojik çalışma. *Ulus Travma Derg* 2009; 15(2): 159–63
 67. Mirzai H, Yağlı N, Tekin İ. Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi acil birimine başvuran kafa travmalı olguların epidemiyolojik ve klinik özellikleri. *Ulus Travma Derg* 2005; 11(2): 146–52.
 68. Şimşek O, Süt N, Kılınçer C, Hamamcıoğlu MK, Memiş D. Yalnız kafa yaralanması olan olguda sonuç tahmini. *Türk Nöroşirürji Dergisi* 2010; 20: 107-8.
 69. Mathur P. Infections in traumatised patients: A growing medico-surgical concern. *Indian J Med Microbiol* 2008; 26(3): 212-6.
 70. Arslan A. Kafa Travmalı Olgularda Enfeksiyonun Erken Dönem Tedavi Maliyeti Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi. *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Uzmanlık Tezi*, Edirne 2009.
 71. Narry KV. Small RNAs: Classification, Biogenesis, and Function. *Mol Cells* 2005; 19(1): 1-15.
 72. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor. *Cancer Metastasis Rev* 2009; 28(3-4): 369-78.

73. Saydam F, Değirmenci İ, Güneş HV. MikroRNA'lar ve Kanser. *Dicle Medical Journal* 2011; 38(1): 113-20.
74. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. Elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75(5): 843-54.
75. Ruvkun G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* 2001; 294(5543): 797-9.
76. Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y. The microRNA pathway and cancer. *Cancer Sci* 2010; 101(11): 2309-15.
77. Sun W, Li YSJ, Huang HD, Shyy JYJ, Chien S. MicroRNA: A Master Regulator of Cellular Processes for Bioengineering Systems. *Annu Rev Biomed Eng* 2010; 12: 1-27.
78. Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA. *RNA* 2005; 11(12): 1753-61.
79. Vasilatou D, Papageorgiou S, Pappa V, Papageorgiou E, Dervenoulas J. The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *European J Haematol* 2009; 84(1): 1-16.
80. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294(5543): 862-4.
81. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 10513-8.
82. Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 4402-7.
83. Celen E, Ertosun MG, Kocak H, Dinckan A, Yoldas B. Expression Profile of MicroRNA Biogenesis Components in Renal Transplant Patients. *Transplant Proc* 2017; 49(3): 472-476. doi: 10.1016/j.transproceed.2017.01.019
84. Mas VR, Dumur CI, Scian MJ, Gehrau RC, Maluf DG. MicroRNAs as biomarkers in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2013; 13(1): 11-9.
85. Fischer H. USA Military Casualty Statistics: Operation New Dawn, Operation Iraqi Freedom, and Operation Enduring Freedom. CRS Report for Congress. Prepared for Members and Committees of Congress: Congressional Research Service 2013; 1-12.
86. Martinez B, Peplow PV. MicroRNAs as diagnostic markers and therapeutic targets for traumatic brain injury. *Neural Regen Res* 2017; 12(11): 1749-61.

87. Pan YB, Sun ZL, Feng DF. The Role of MicroRNA in Traumatic Brain Injury, *Neuroscience* 2017; 367: 189-99. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.10.046>
88. Shapira Y, Setton D, Artru AA, Shohami E. Blood-brain barrier permeability, cerebral edema, and neurologic function after closed head injury in rats. *Anesth Analg* 1993; 77(1): 141–8. [PubMed:8317722]
89. Başkaya MK, Rao AM, Doğan A, Donaldson D, Dempsey RJ. The biphasic opening of the blood brain barrier in the cortex and hippocampus after traumatic brain injury in rats. *Neurosci Lett* 1997; 226(1): 33–6. [PubMed: 9153635]
90. Bam M, Yang X, Zumbun EE, Ginsberg JP, Leyden Q, Zhang J, et al. Decreased AGO2 and DCR1 in PBMCs from War Veterans with PTSD leads to diminished miRNA resulting in elevated inflammation. *Transl Psychiatry* 2017; 7(8): 1222. doi:10.1038/tp.2017.185
91. Rostami Mogaddam M, Safavi Ardabili N, Shafaei Y, Maleki N, Jafari N, Jafari A. Overexpression of Drosha, DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR8), and Dicer mRNAs in the pathogenesis of psoriasis. *J Cosmet Dermatol* 2017; 16: 48-53. <https://doi.org/10.1111/jocd.12336>
92. Downregulation and tumor-suppressive role of XPO5 in hepatocellular carcinoma, Yandong Li1, *Mol Cell Biochem* 2016; 415: 197–205. doi: 10.1007/s11010-016-2692-3
93. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001; 25: 402–8.
94. Sun L, Zhao M, Wang Y, Liu A, Lv M, Li Y, Yang X, Wu Z. Neuroprotective effects of miR-27a against traumatic brain injury via suppressing FoxO3a-mediated neuronal autophagy, *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 482(4): 1141-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.001.
95. Chandran R, Sharma A, Bhomia M, Balakathiresan NS, Knollmann-Ritschel BE, Maheshwari RK. Differential expression of microRNAs in the brains of mice subjected to increasing grade of mild traumatic brain injury, *Brain Inj* 2016; 1-14, DOI: 10.1080/02699052.2016.1213420.
96. Bhomia M, Balakathiresan NS, Wang KK, Papa L, Maheshwari RK. A Panel of Serum MiRNA Biomarkers for the Diagnosis of Severe to Mild Traumatic Brain Injury in Humans. *Sci Rep* 2016; 6: 28148. doi: 10.1038/srep28148
97. You WD, Tang QL, Wang L, Lei J, Feng JF, Mao Q, Gao GY, Jiang JY. Alteration of microRNA expression in cerebrospinal fluid of unconscious patients after traumatic brain injury and a bioinformatic analysis of related single nucleotide polymorphisms. *Chinese Journal of Traumatology* 2016; 19: 11-5.

98. Sabirzhanov B, Stoica BA, Zhao Z, Loane DJ, Wu J, Dorsey SG, Faden AI. miR-711 upregulation induces neuronal cell death after traumatic brain injury. *Cell Death and Differentiation* 2016; 23: 654–68.
99. Meissner L, Gallozzi M, Balbi M, Schwarzmaier S, Tiedt S, Terpolilli NA, Plesnila N. Temporal profile of microRNA expression in contused cortex following traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma* 2016; 33(8): 713-20. doi: 10.1089/neu.2015.4077.
100. Sharma A, Chandran R, Barry ES, Bhomia M, Hutchison MA, et al. Identification of Serum MicroRNA Signatures for Diagnosis of Mild Traumatic Brain Injury in a Closed Head Injury Model. *PLoS ONE* 2014; 9(11): 112019. doi: 10.1371/journal.pone.0112019.
101. Sandhir R, Gregory E, Berman NE. Differential response of miRNA-21 and its targets after traumatic brain injury in aging mice. *Neurochem Int* 2014; 78: 117–21. doi:10.1016/j.neuint.2014.09.009.
102. Sun TY, Chen XR, Liu ZL, Zhao LL, Jiang YX, Qu GQ, Wang RS, Huang SZ, Liu L. Expression profiling of microRNAs in hippocampus of rats following traumatic brain injury. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2014; 34(4): 548-53. doi: 10.1007/s11596-014-1313-1.
103. Sabirzhanov B, Zhao Z, Stoica BA, Loane DJ, Wu J, Borroto C, Dorsey SG, Faden AI. Downregulation of miR-23a and miR-27a following experimental traumatic brain injury induces neuronal cell death through activation of proapoptotic Bcl-2 proteins. *J Neurosci Official J Soc Neurosci* 2014; 34: 10055-71.
104. Balakathiresan N, Bhomia M, Chandran R, Chavko M, McCarron RM, Maheshwari RK. MicroRNA let-7i is a promising serum biomarker for blast-induced traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2012; 29(7): 1379–87, doi: 10.1089/neu.2011.2146 (2012).
105. Zhang Y, Liao Y, Wang D, He Y, Cao D, Zhang F, Dou K. Altered expression levels of miRNAs in serum as sensitive biomarkers for early diagnosis of traumatic injury. *J Cell Biochem* 2011; 112(9): 2435-42. doi: 10.1002/jcb.23168.
106. Redell JB, Moore AN, Ward NH, 3rd Hergenroeder GW, Dash PK. Human traumatic brain injury alters plasma microRNA levels. *J Neurotrauma* 2010; 27: 2147–56, doi: 10.1089/neu.2010.1481 (2010).
107. Lei P, Li Y, Chen X, Yang S, Zhang J. Microarray based analysis of microRNA expression in rat cerebral cortex after traumatic brain injury. *Brain Research* 2009; 1284: 191–201.

108. Redell JB, Liu Y, Dash PK. Traumatic brain injury alters expression of hippocampal microRNAs: potential regulators of multiple pathophysiological processes. *J Neurosci Res* 2009; 87: 1435–48.
109. Bader AG, Brown D, Winkler M. The promise of microRNA replacement therapy. *Cancer Res* 2010; 70: 7027–30. 10.1158/0008-5472.CAN-10-2010
110. Czech MP. MicroRNAs as therapeutic targets. *N Engl J Med* 2006; 354: 1194–5. 10.1056/NEJMcibr060065
111. Bhalala OG. The Emerging Impact of microRNAs in Neurotrauma Pathophysiology and Therapy. Authors Editors In: Kobeissy FH, editor. *SourceBrain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2015. Chapter 26. *Frontiers in Neuroengineering*
112. Yang T, Song J, Bu X, Wang C, Wu J, Cai J, et al. Elevated serum miR-93, miR-191, and miR-499 are noninvasive biomarkers for the presence and progression of traumatic brain injury. *J Neurochem* 2016; 137: 122–9. 10.1111/jnc.13534
113. Mitra B, Rau TF, Surendran N, Brennan JH, Thaveenthiran P, Sorich E, et al. Plasma micro-RNA biomarkers for diagnosis and prognosis after traumatic brain injury: a pilot study. *J Clin Neurosci* 2017; 38: 37-42. 10.1016/j.jocn.2016.12.009
114. Di Pietro V, Ragusa M, Davies D, Su Z, Hazeldine J, Lazzarino G, et al. MicroRNAs as novel biomarkers for the diagnosis and prognosis of mild and severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2017; 34: 1948–56. 10.1089/neu.2016.4857
115. Swahari V, Nakamura A, Baran-Gale J, Garcia I, Crowther AJ, Sons R', Gershon TR, et al. Essential Function of Dicer in Resolving DNA Damage in the Rapidly Dividing Cells of the Developing and Malignant Cerebellum. *Cell Rep* 2016; 14: 216-24.
116. Giraldez AJ, Cinalli RM, Glasner ME, Enright AJ, Thomson JM, Baskerville S et al. MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* 2005; 308: 833–8.
117. Dharap A, Bowen K, Place R, Li LC, Vemuganti R. Transient focal ischemia induces extensive temporal changes in rat cerebral microRNAome. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009; 29(4): 675-87. doi: 10.1038/jcbfm.2008.157. Epub 2009 Jan 14.
118. Liu Z, Zhang C, Khodadadi-Jamayran A, Dang L, Han X, Kim K, Li H, Zhao R. Canonical microRNAs Enable Differentiation, Protect Against DNA Damage, and Promote Cholesterol Biosynthesis in Neural Stem Cells. *Stem Cells and Development* 2016; 25(3). doi: 10.1089/scd.2016.0259

119. Fenelon K, Mukai J, Xu B, Hsu PK, Drew LJ, et al. Deficiency of Dgcr8, a gene disrupted by the 22q11.2 microdeletion, results in altered short-term plasticity in the prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 4447-52.
120. Konopka W, Kiryk A, Novak M, Herwerth M, Parkitna JR, et al. MicroRNA loss enhances learning and memory in mice. *J Neurosci* 2010; 30: 14835–42.
121. Jauhari A, Yadav S. MiR-34 and MiR-200: Regulator of Cell Fate Plasticity and Neural Development. *Neuromolecular Med* 2019. doi:10.1007/s12017-019-08535-9.
122. Diaz-Garcia CV, Agudo-Lopez A, Perez C, Lopez-Martin JA, Rodriguez-Peralto JL, de Castro J, Cortijo A, et al. Dicer1, drosha and miRNAs in patients with non-small cell lung cancer: Implications for outcomes and histologic classification. *Carcinogenesis* 2013; 34: 1031–8.
123. Merritt WM, Lin YG, Han LY, Kamat AA, Spannuth WA, Schmandt R, Urbauer D, et al. Dicer, drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *N Engl J Med* 2008; 359: 2641–50.
124. Chiosea S, Jelezcova E, Chandran, U, Acquafondata M, McHale T, Sobol RW, Dhir R. Up-regulation of dicer, a component of the MicroRNA machinery, in prostate adenocarcinoma. *Am J Pathol* 2006; 169: 1812–20.
125. Kim B, Lee JH, Park JW, Kwon TK, Baek SK, Hwang I, Kim S. An essential MicroRNA maturing microprocessor complex component dgcr8 is up-regulated in colorectal carcinomas. *Clin Exp Med* 2014; 14: 331–6.
126. Zhu DX, Fan L, Lu RN, Fang C, Shen WY, Zou ZJ, Wang YH, et al. Downregulated dicer expression predicts poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Sci* 2012; 103: 875–81.
127. McKiernan RC, Jimenez-Mateos EM, Bray I, Engel T, Brennan GP, et al. Reduced Mature MicroRNA Levels in Association with Dicer Loss in Human Temporal Lobe Epilepsy with Hippocampal Sclerosis. *PLoS ONE* 2012; 7(5): e35921. doi:10.1371/journal.pone.0035921
128. He Y, Zhou Y, Xi Q, Cui H, Luo T, Song H, Nie X, Wang L, Ying B. Genetic variations in microRNA processing genes are associated with susceptibility in depression. *DNA and Cell Biology* 2012; 31(9): 1499–506. DOI: 10.1089/dna.2012.1660
129. Jafari N, Shanghaghi H, Mahmoodi D, Shirzad Z, Alibeiki F, Bohlooli S, Dogaheh HP. Overexpression of microRNA biogenesis machinery: Drosha, DGCR8 and Dicer in multiple sclerosis patients. *J Clin Neurosci* 2015; 22(1): 200-3. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocn.2014.06.106>

130. Alali AS, Temkin N, Vavilala MS, Lele AV, Barber J, Dikmen S, Chesnut RM. Matching early arterial oxygenation to long-term outcome in severe traumatic brain injury: target values. *J Neurosurg* 2019; 8: 1-8. doi:10.3171/2018.10.JNS18964.
131. Chesnut RM, Marshall LF, Klauber MR, Blunt BA, Baldwin N, Eisenberg HM, Jane JA, Marmarou A, Foulkes MA. The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury. *J Trauma* 1993; 34(2): 216-22. PubMed PMID: 8459458.
132. Nallamshetty S, Chan SY, Loscalzo J. Hypoxia: a master regulator of microRNA biogenesis and activity. *Free Radic Biol Med* 2013; 64: 20–30. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.022
133. Wu C, So J, Davis-Dusenbery BN, Qi HH, Bloch DB, Shi Y, Lagna G, Hata A. Hypoxia potentiates microRNA-mediated gene silencing through posttranslational modification of Argonaute2. *Mol Cell Biol* 2011; 31(23): 4760-74. doi: 10.1128/MCB.05776-11.
134. Ibrahim AA, Schmithals C, Kowarz E, Köberle V, Kakoschky B, Pleli T, Kollmar O, et al. Hypoxia Causes Downregulation of Dicer in Hepatocellular Carcinoma, Which Is Required for Upregulation of Hypoxia-Inducible Factor 1 α and Epithelial-Mesenchymal Transition. *Clin Cancer Res* 2017; 23(14): 3896-905. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1762.
135. Bandara V, Michael MZ, Gleadle JM. Hypoxia represses microRNA biogenesis proteins in breast cancer cells. *BMC Cancer* 2014; 14: 533. doi: 10.1186/1471-2407-14-533.
136. Rupaimoole R, Ivan C, Yang D, Gharpure KM, Wu SY, Pecot CV, Previs RA, et al. Hypoxia-upregulated microRNA-630 targets Dicer, leading to increased tumor progression. *Oncogene* 2016; 35(33): 4312-20. doi: 10.1038/onc.2015.492.
137. Winkler JV, Rosen P, Alfry EJ. Prehospital use of the Glasgow Coma Scale in severe head injury. *J Emerg Med* 1984; 2: 1–6.
138. Marshall LF, Gautille T, Klauber MR, et al. The outcome of severe closed head injury. *J Neurosurg* 1991; 75: 28–36.
139. Servadei F, Nasi MT, Cremonini AM, Guiliani G, Cenni P, Nanni A. Importance of a reliable admission Glasgow Coma Scale score for determining the need for evacuation of posttraumatic subdural hematomas: a prospective study of 65 patients. *J Trauma* 1998; 44(5): 868–73.
140. White JR, Farukhi Z, Bull C, Christensen J, Gordon T, Paidas C, Nichols DG. Predictors of outcome in severely head-injured children. *Crit Care Med* 2001; 29(3): 534–40.

141. Peeters W, van den Brande R, Polinder S, Brazinova A, Steyerberg EW, Lingsma HF, Maas AI. Epidemiology of traumatic brain injury in Europe. *Acta Neurochir (Wien)* 2015; 157(10): 1683-96. doi: 10.1007/s00701-015-2512-7.
142. Genda Y, Arai M, Ishikawa M, Tanaka S, Okabe T, Sakamoto A. microRNA changes in the dorsal horn of the spinal cord of rats with chronic constriction injury: A Taq TaqMan[®] Low Density Array Study. *Int J Mol Med* 2013; 31: 129-37.
143. Grieco SF, Welmeshev D, Magistri M, Eldar-Finkelman H, Fagghi MA, Jope RS, Beurel E. Ketamine up-regulates a cluster of intronic miRNAs within the serotonin receptor 2C gene by inhibiting glycogen synthase kinase-3. *World J Biol Psychiatry* 2017; 18(6): 445-56. doi: 10.1080/15622975.2016.1224927



10. EKLER

Ek 1. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onayı

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

2017

KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Morfoloji Binası A Blok 1. Kat No: A1-05 Kampüs /ANTALYA
	TELEFON	0 (242) 249 69 54
	FAKS	0 (242) 249 69 03
	E-POSTA	etik@akdeniz.edu.tr
	ETİK KURUL KODU	2012-NAEK-20
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Suat Hayri SANLI	
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Yoğun Bakımda Takip Edilen Travmatik Beyin Hasarlı Hastalarda MikroRna Biyogenezinde Yer Alan Komponentlerin Ekspresyon Düzeylerinin Prognozla İlişkisi	
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 199	Tarih: 01/03/2017
	Yukarıda bilgileri verilen çalışmanın bütçesinin Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir. Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	

Öğr. Gör. Dr. M. Levent ÖZGÖNÜL
Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Murat CANPOLAT
Oye (uzun)

Prof. Dr. Arın TASATARGİL
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Neziye KUDRİMOĞLU
Oye

Prof. Dr. Selahattin KUMRU
Oye

Prof. Dr. Dilek İNAN
Oye

Doç. Dr. Feriye ÖZKAN
Oye

Doç. Dr. Dile KİPMEN KORGUN
Oye (uzun)

Doç. Dr. Oğuz DURSUN
Oye (uzun)

Yrd. Doç. Dr. Mehmet TÜRKAY
Oye

Yrd. Doç. Dr. Arzu NUR
Oye

Dr. İsmail NUR
Oye

Turgut ALTUN
Oye

Av. Mustafa AÇIKEL
Oye