

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ACİL TIP ANABİLİM DALI



**Kafa Travması Oluşturulan Ratlarda Esculetinin
Posttravmatik Nöronal Hasarda Anti-enflamatuvar
Anti-oksidan Etkisinin Araştırılması**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

MEHMET ÇORUMLU

TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Beliz Öztok Tekten

BOLU, KASIM - 2023

KABUL VE ONAY SAYFASI

Mehmet Çorumlu tarafından hazırlanan “**Kafa Travması Oluşturulan Ratlarda Esculetinin Posttravmatik Nöronal Hasarda Anti-Enflamatuvar Anti-Oksidan Etkisinin Araştırılması**” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Acil Tıp Anabilim Dalı’nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

29/11/2023

Jüri Üyeleri

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Beliz Öztok Tekten
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Üye
Doc. Dr. Kaan Çelik
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Üye
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Enes Demirel
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

İmza

ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir,
- aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Teze ilişkin Turnitin adlı programında enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı %30'u geçmemektedir.

Bu çalışma için Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulundan 2023/09 sayısı ile etik izin alınmıştır.

DR. MEHMET ÇORUMLU

ÖZET

**KAFA TRAVMASI OLUŞTURULAN RATLARDA ESCULETİNİN
POSTTRAVMATİK NÖRONAL HASARDA ANTI-ENFLAMATUAR
ANTI-OKSİDAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI
TIPTA UZMANLIK TEZİ
DR . MEHMET ÇORUMLU
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ACİL TIP ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜYESİ BELİZ ÖZTOK TEK TEN)

BOLU, KASIM - 2023

XII + 52

GİRİŞ VE AMAÇ: Kafa travması ve sonrasında gelişen travmatik beyin hasarı dünyada ve ülkemizde ölüm ve sakatlıklara neden olan önemli bir problemdir. Kafa travması sonrası travmatik sekonder beyin hasarına yönelik tedavi seçenekleri sınırlıdır. Bu çalışmada bir kumarin türevi olan eskuletinin kafa travması sonrası nöroprotektif etkisini ve sekonder travmatik beyin hasarına neden olan oksidatif stres ile aşırı inflamatuvar cevaba olan etkisini görmeyi amaçladık.

MATERYAL VE METOD: Eskuletinin travmatik sekonder beyin hasarındaki etkisini göstermek amacıyla 48 adet erkek wistar albino rat ile kafa travması oluşturularak deney yapılmıştır. 48 adet rat 8 gruba ayrılmıştır. Sakrifikasyon sonrası elde edilen sağ hemisfer beyin dokusu örneklerinden immünohistokimyasal boyama yapıp ve histopatolojik değişiklikler incelendi. Ratların sol hemisferler beyin dokuları homojenize edilerek ELİSA yöntemi ile Nrf-2, HO-1, Tnf-alfa değerleri incelenmiştir.

BULGULAR: Yapılan histopatolojik incelemede kafa travması oluşturulan ve eskuletin tedavisi verilen ratlarda nöronal dejenerasyonun az, sağlıklı nöronların özellikle de 100mg/kg verilen grupta daha fazla olduğu görülmüştür.(p<0,01) Kafa travması oluşturulan ve eskuletin tedavisi verilmeyen grupta nöronal dejenerasyon fazla sağlıklı nöron sayısının diğer gruplara göre daha az olduğu görülmüştür. (p <0,01) Kafa travması oluşturulmayan ve eskuletin verilen gruplarla kontrol grubu ile anlamlı fark gözlenmemiştir. (p>0,05) ELİSA yöntemi ile değerlendirilen gruplar Nrf-2, HO-1, Tnf-alfa sonuçları ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark görülemedi.

SONUÇ: Çalışmamızda kafa travması oluşturulan ratlarda eskuletinin nöroprotektif etkisinin olduğu, bu nöroprotektif etkisinin kullandığımız eskuletin dozuna bağlı olduğunu gördük. Eskuletinin travmatik sekonder beyin hasarındaki nöroprotektif etkisinin kullandığımız oksidatif stres belirteçleri ve onların parçası olduğu koruyucu mekanizmalar üzerinden etkilemediğini düşünmekteyiz.

ANAHTAR KELİMELELER: Eskuletin, Rat, Kafa travması, Oksidatif Stres, Aşırı İnflamatuvar Cevap, Nrf-2, HO-1, Tnf-alfa, Travmatik Sekonder Beyin Hasarı

ABSTRACT

MEDICAL SPECIALITY THESIS
CHOOSE YOUR PROGRAM
NAME AND SURNAME OF THE AUTHOR
BOLU ABANT IZZET BAYSAL UNIVERSITY
FACULTY OF MEDICINE
DEPARTMENT OF EMERGENCY MEDICINE

(SUPERVISOR: ASST. PROF. BELİZ ÖZTOK TEK TEN)

BOLU, NOVEMBER 2020

XII + 52

INTRODUCTION: Traumatic brain injury and subsequent traumatic brain damage are significant problems worldwide and in our country, leading to death and disability. Treatment options for traumatic secondary brain damage after head trauma are limited. In this study, we aimed to investigate the neuroprotective effect of esculetin, a coumarin derivative, after head trauma and its effect on oxidative stress and excessive inflammatory response leading to secondary traumatic brain damage.

MATERIALS AND METHODS: An experiment was conducted by inducing head trauma in 48 male Wistar albino rats to demonstrate the effect of esculetin on traumatic secondary brain damage. The 48 rats were divided into 8 groups. Immunohistochemical staining was performed on brain tissue samples obtained from the right hemisphere after sacrifice, and histopathological changes were examined. The left hemisphere brain tissues of the rats were homogenized for ELISA analysis of Nrf-2, HO-1, and Tnf-alpha values.

RESULTS: Histopathological examination revealed that neuronal degeneration was less in rats with induced head trauma and treated with esculetin, particularly in the group administered 100mg/kg (p 0.01). In the group with head trauma induction but no esculetin treatment, neuronal degeneration was more pronounced, and the number of healthy neurons was lower compared to other groups (p 0.01). No significant difference was observed between groups not subjected to head trauma and those given esculetin (p 0.05). When the ELISA results of the groups evaluating Nrf-2, HO-1, and Tnf-alpha were compared, no statistically significant difference was observed.

CONCLUSION: Our study found a neuroprotective effect of esculetin in rats with induced head trauma, and this neuroprotective effect was dose-dependent on the administered esculetin. We discovered that the neuroprotective effect of esculetin in traumatic secondary brain damage was not mediated through the oxidative stress markers we used and their associated protective mechanisms.

KEYWORDS: Esculetin, Rat, Head Trauma, Oxidative Stress, Excessive Inflammatory Response, Nrf-2, HO-1, Tnf-alpha, Traumatic Secondary Brain Damage

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
ETİK BEYAN	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLO LİSTESİ	ix
FOTOĞRAF LİSTESİ	x
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	xi
TEŞEKKÜR	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. KAFA TRAVMASI İNSİDANSI	4
2.2. TRAVMATİK BEYİN HASARI SINIFLAMASI	5
2.3. TRAVMATİK BEYİN HASARINDA KLİNİK PREZENTASYON VE TEDAVİLER_	6
2.3.1. FOKAL BEYİN HASARI_	6
2.3.2. DİFFÜZ BEYİN HASARI	10
2.4. TRAVMATİK BEYİN HASARININ MEKANİZMASI	11
2.4.1. PRİMER TRAVMATİK BEYİN HASARI	12
2.4.2. SEKONDER TRAVMATİK BEYİN HASARI	12
2.5. OKSİDATİF STRES	12
2.6. NÖROİNFLAMASYON	13
2.7. SEKONDER HASAR TEDAVİSİNİN ÖNEMİ VE SEÇENEKLERİ	13
2.8. ESKULETİN	14
2.9. OKSİDATİF STRES BELİRTEÇLERİ	15
2.9.1. NÜKLEER FAKTÖR-ERİTROİD-2 (NRF-2)	15
2.9.2. HEMEOKSİJENAZ-1 (HO-1)	15
2.9.3. NRF2/HO-1 SİNYAL YOLU	15
2.10. NÖROİNFLAMASYON BELİRTEÇLERİ	16

2.10.1. TUMÖR NEKROZ FAKTÖRÜ-ALFA (TNF-A)	16
2.10.2. NRF2/HO-1 SİNYAL YOLU VE TNF-A	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN RATLAR VE ÖZELLİKLERİ	21
3.2. HAYVAN REFAHI	21
3.3. ÇALIŞMA GRUPLARI	21
3.4. TRAVMA ÖNCESİ RATLARIN GAZ ANESTEZİYE ALINMASI	23
3.5. SAKRİFİKASYON VE ÖRNEK ALINMASI	23
3.6. KAFA TRAVMASI AĞIRLIK DÜŞÜRME MODELİ	24
3.7. ESCULETİN TEDAVİSİ İNTRAPERİTONEAL ESCULETİN VERİLMESİ İLACIN HAZIRLANMASI	24
3.8. ELİSA ÇALIŞMASI	25
3.9. HİSTOPATOLOJİK İŞLEMLER	26
3.9.1. DOKU ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI	26
3.9.2. KESİT ALMA	27
3.9.3. KREZİL VİOLET BOYAMA İŞLEMİ	27
3.9.4. BEYİN DOKUSUNUN HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ	29
3.10. HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRİLME İÇİN İSTATİSTİKSEL ANALİZ	29
3.11. ELİSA SONUÇLARININ İSTATİSTİKSEL ANALİZİ	29
4. BULGULAR	30
4.1. BEYİN DOKUSUNUN HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ	30
4.2. TRAVMA OLUŞTURULAN BEYİN DOKUSUNDA HO-1 DÜZEYİNİN ÖLÇÜLMESİ (ELİSA)	32
4.3. TRAVMA OLUŞTURULAN BEYİN DOKUSUNDA NRF 2 DÜZEYİNİN ÖLÇÜLMESİ (ELİSA).	34
4.4. TRAVMA OLUŞTURULAN BEYİN DOKUSUNDA TNF-ALFA DÜZEYİNİN ÖLÇÜLMESİ (ELİSA)	36
5. TARTIŞMA	38
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	42
7. KAYNAKLAR	44

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Glaskow Koma Skorlamasi.....	5
Tablo 3.1. Beyin dokularına ait doku takip aşamaları.....	27
Tablo 3.2. Krezil violet boyama prosedürü.....	28
Tablo 4.2. Ratların ELİSA yöntemi ile ölçülen HO-1 düzeyleri.....	32
Tablo 4.3. ELİSA yöntemi ile ölçülen HO-1 düzeylerinin karşılaştırılması.....	32
Tablo 4.4. Ratların ELİSA yöntemi ile ölçülen Nrf-2 düzeyleri	34
Tablo 4.5. ELİSA yöntemi ile ölçülen Nrf-2 düzeylerinin karşılaştırılması.....	34
Tablo 4.6. Ratların ELİSA yöntemi ile ölçülen TNF-Alfa düzeyleri.....	36
Tablo 4.7. ELİSA yöntemi ile ölçülen TNF-Alfa düzeylerinin karşılaştırılması.....	36

FOTOĞRAF LİSTESİ

Sayfa

Fotoğraf 2.1. Travmatik kontüzyona bağlı gelişen beyin dokusundaki kanama alanları.....	7
Fotoğraf 2.2. Subaraknoid kanama	8
Fotoğraf 2.3. Epidural Hematom.....	9
Fotoğraf 2.4. Subdural Hematom.....	10
Fotoğraf 2.5. Aksonal yaralanmaya bağlı gri ve beyaz cevher ayrımının yapılamadığı beyin dokusu.....	11
Fotoğraf 3.1. Travma modelini oluşturmak için yapılan düzeneğin uzak görünümü	19
Fotoğraf 3.2. Gaz anestezi sonrası travma modeli oluşturmak için ratın düzeneğe yerleştirilmesi.....	19
Fotoğraf 3.3. İsofluran ile gaz anestezi oluşturmak için kullanılan şeffaf hazne ...	23
Fotoğraf 3.4. Sakrifikasyon sonrası beyin dokusunun çıkarılması	24
Fotoğraf 3.5. Hassas terazi ile eskuletin miktarı ve ratlara kilogram başına verilecek miktarın belirlenmesi	25
Fotoğraf 4.1. Sıçan beyin dokusunda korteks bölgesine ait ışık mikroskopik görüntüleri.....	31

KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

BBB	: Kan Beyin Bariyeri
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
CO	: Karbonmonoksit
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESC	: Eskületin
GST	: Glutasyon-S-Transferaz
GKS	: Glasgow Koma Skalası
GPX	: Glutasyon Peroksidaz
HO-1	: Hemeoksijenaz-1
I/R	: Iskemi/Reperfüzyon
Keap1	: Kelch Benzeri ECH İle İlişkili Protein 1
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
NAFLD	: Alkol-Dışı Yağlı Karaciğer Hastalığı
NQO-1	: NAD(P)H: Kinon Oksidoreduktaz-1
NF-κb	: Nükleer Faktör Kappa B
Nrf-2	: Nükleer Faktör-Eritroid-2 İle İlişkili Faktör
Nrf2-ARE	: Nrf-2 Antioksidan Cevap Elemanı
ROS	: Reaktif Oksijen Radikalleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TBH	: Travmatik Beyin Hasarı
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü-Alfa

TEŞEKKÜR

Sabırla ve büyük bir ilgiyle bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde bana yardımcı olan gelecekteki meslek hayatımda bana verdiği kıymetli bilgilerden faydalanabileceğimi düşündüğüm kıymetli hocam tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Beliz ÖZTOK TEKTEN'e

Gerek eğitim ve gerekse idari konularda acil servisimizin zevkle çalışabileceğimiz bir ortam haline gelmesi için elinden gelen her türlü fedakârlığı gösteren değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Kaan ÇELİK'e, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Enes DEMİREL'e

Acil tıp kliniğinde beraber çalıştığım çok değerli uzman doktorlara, asistan doktor arkadaşlarıma, hemşire, sağlık memuru ve diğer tüm çalışma arkadaşlarıma, Bugünlere gelmemde maddi manevi her türlü desteği benden esirgemeyen annem Fikriye ÇORUMLU babam Mustafa ÇORUMLU kardeşim Samet ÇORUMLU eşim hayat arkadaşım Ayşenur ÇORUMLU ve biricik kızım Başak Duru ÇORUMLU'ya

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

Travma dünyada en çok ölüme neden olan durumlardan biridir. Bu ölümlerin yarısını kafa travmasına bağlı santral sinir sistemi yaralanmaları oluşturur. ^{1,2}

Kafa travması ve sonrasında gelişen travmatik beyin hasarı halk sağlığını tehdit eden önemli bir problemdir. Gelişmekte olan ülkelerde özellikle genç nüfusta ölüm ve sakatlığa neden olması sebebiyle acil servislerde tıbbi ve ekonomik açıdan önemli bir yer tutar. ^{3,4}

Dünyada her sene yaklaşık 50 milyon kafa travması ve buna bağlı travmatik beyin hasarı vakası bildirilmektedir. ⁵

Travmatik beyin hasarı patofizyolojik süreçlere göre 2 ye ayrılır. Bunlar primer ve sekonder travmatik beyin hasarıdır. Primer travmatik beyin hasarı travma esnasında kafatasına doğrudan mekanik kuvvet etkisi ile oluşur. Primer travmatik beyin hasar sonucu beyinde kontüzyon, Travmatik intrakraniyal hematomlar, Konküzyon, Diffüz aksonal hasar gibi değişiklikler meydana gelebilir. Primer travmatik beyin hasarı tedavisinde ana prensip kafa içi basıncını düşürüp beyin perfüzyon basıncını medikal ve cerrahi teknikler bir arada kullanılarak düzenlemektir. ⁶

Sekonder travmatik beyin hasarı ise primer beyin hasarından saatler günler sonra oksidatif stres ve aşırı inflamatuvar yanıt etkisi ile oluşur. ⁷⁻⁹ Sekonder travmatik beyin hasarına yönelik tedavi seçenekleri kısıtlıdır. Klinik çalışmalar travmatik beyin hasarına bağlı sekonder hasarın tedavi edilmesinin önemli terapötik hedef olması gerektiğini göstermektedir. ^{10,11}

Oksidatif stress antioksidan sistemler ve reaktif oksijen türevleri arasındaki dengesizlik nedeniyle meydana gelir. Oksidatif stresin kaynağı oksijen ve nitrojen kaynaklı reaktif maddelerdir. Beyin antioksidan sistemlerinin yetersiz olması nedeniyle oksidatif strese karşı savunmasız bir organdır. Oksijen tüketiminin fazla olması sebebiyle reaktif oksijen radikallerinin (ROS) travma sonrası üretiminin fazla olmasına neden olur. Beynin bu yapısal özellikleri oksidatif strese yatkınlığını artırır. ¹²⁻¹⁴ Klinik ve deneysel çalışmalarda travmatik beyin hasarı sonrası beyinde oksidatif stresin geliştiği ve 6 aya kadar devam ettiğini göstermektedir.

Nöroinflamasyon iç ve dış etmenlere karşı kendini savunma durumuna alması yani beyin savunma mekanizmasıdır.¹⁵ Travma sonrası aşırı inflamatuvar cevap kan beyin bariyeri (BBB) bütünlüğünü bozar, beyin ödemi şiddetlendirir, periferik immün hücrelerin infiltrasyonunu ve nöral apoptozu artırır ve travmatik beyin hasarı kliniğini kötüleştirir.^{16,17} Travmatik beyin hasarını takiben nöroinflamasyonun ve oksidatif stresin tedavi edilebileceği ve hastaların prognozlarının iyileştirilebileceği yeni ve etkili yöntemlerin formüle edilmesi zorunludur.

Eskuletin benzopiron sınıfına ait Antioksidan, antiinflamatuvar, anti-apoptotik, antikanser, antidiyabetik, nöroprotektif etkilere sahip doğal bir kumarindir. Eskuletin güçlü antioksidan özelliğini yapısındaki iki hidroksil grubundan alır. Anti-inflamatuvar etkisini ise inflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-1 β , IL-6, CCL2 ve indüklenebilir nitrik oksit sentetaz) üretimini azaltarak ve nükleer faktör kappa B (NF- κ B) sinyal yolunu inhibe ederek gösterir.¹⁸ Eskuletin kanser, diyabet, ateroskleroz, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, alkol-dışı yağlı karaciğer hastalığı gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan tedavi seçeneği olması beklenmektedir.¹⁹⁻²³

Oksidatif stres belirteçleri travmatik beyin hasarının şiddeti ve sonuçlarını değerlendirmek için kullanılabilir.²⁴

Oksidatif stres yanıtının ana düzenleyicisi Nükleer faktör-eritroid-2 ile ilişkili faktör (Nrf2) fizyolojik koşullarda sitoplazmada Keap1 (Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1)'e bağlı inaktif şekilde bulunur. Oksidatif stres durumlarında Nrf2 Keap1 den ayrılıp çekirdeğe taşınır ve antioksidan enzimleri aktif edecek olan Nrf2-ARE (antioxidant response element) yolunu aktive eder. Aktifleşen bu antioksidan enzimler hücrede antioksidan, anti-enflamasyon, anti-apoptoz ve ek hücre sel koruması sağlar.^{25,26}

Stres tarafından uyarılan bir reaktif protein olan hemeoksijenaz-1 (HO-1), Nrf2 tarafından düzenlenen faz II detoksifikasyon enzimlerinden biridir.

Nrf2/HO-1 sinyal yolu, antioksidan enzim seviyelerini artırmanın ana yollarından biridir. Bu yolu düzenlemek oksidatif strese bağlı patolojilerin tedavi ve önlenmesi açısından önemlidir.

TNF- α (Tümör nekroz faktörü-alfa) CD4+ lenfositler, NK (Natural killer) hücreleri, nötrofiller, mast hücreleri, eozinofiller, mikroglia, makrofajlar tarafından

Üretilen akut faz reaksiyonu oluşturan sistemik inflamasyonda görev alan hücre sinyal glikoproteinidir. Doku ve kanda inflamasyon sonrası ilk saptanan sitokindir TNF- α inflamatuvar süreçleri NF- κ B üzerinden başlatır. Eskuletin NF- κ B üzerinden anti-inflamatuvar etki gösterir.¹⁸

Çalışmamızda deney hayvanlarında oluşturulan kafa travmasına bağlı gelişen sekonder beyin hasarında, TNF- α ve Nrf2/HO-1 biyobelirteçleri üzerinden eskuletinin antioksidan, antinflamatuvar, nöroprotektif etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kafa travması

Kafa travması skalp yaralanmalarından kafatası kemik kırıkları ve yaygın beyin hasarına kadar değişen klinik durumu ifade eder.²⁷

Kafa travması ve sonucunda oluşan travmatik beyin hasarı acil serviste çok sık karşılaşılan yüksek mortalite ve morbidite ile ilişkili bir durumdur.

Travmatik beyin hasarı dış kuvvetlerin etkisi ile oluşan beyin fonksiyonlarındaki azalma olarak tanımlanır. Klinik bulguları kısa süreli konfüzyondan, koma, ciddi sakatlık ve/veya ölüme kadar geniş bir yelpazede ortaya çıkabilir. Hastalarda oluşan işlev bozuklukları ağır ekonomik yüklerle neden olmaktadır.²⁸

Travmatik beyin hasarına bağlı ölümlerin %90'ı ilk 48 saat içerisinde intrakranial basıncın artışı veya beyin sapı herniasyonuna bağlı geliştiği düşünülmektedir.⁵

2.2. Kafa travması insidansı

Dünya genelinde yılda yaklaşık 50 milyon travmatik beyin hasarı vakası bildirilmektedir. Amerika birleşik devletlerinde travmatik beyin hasarı insidansı 686/100.000 yıl, ölüm insidansı 16,6/100.000 yıl olarak bulunmuştur.¹³ Avrupada ise travmatik beyin hasarı insidansı 262/100.000 yıl, ölüm hızının ise 10,5/100.000 yıl olduğu bulunmuştur. Tüm dünya ülkeleri arası travmatik beyin hasarı insidansı 50 ila 686/100.000 yıl arasında değişmektedir. ²⁹

Toplumdaki beyin hasarı erkeklerde kadınlardan 2 kat fazla görülmektedir. Travmatik beyin hasarı insidansı 0-4 yaş, 15-24 yaş, ve >75 yaş olarak 3 farklı yaşta pik yapar. Kafa travmasının dünyadaki en sık sebebi trafik kazaları olup düşmeler, iş kazaları, spor yaralanmaları, darp diğer nedenleridir. ³⁰⁻³²

Türkiyede 2006 yılında yapılan bir çalışmada acil servise kafa travması ile başvuran hastalarda en sık nedenlerin yüksekte düşme (%40) ve motorlu araç kazası (%37) olduğu görülmüştür.³

2.3. Travmatik beyin hasarı sınıflaması

Travmatik beyin hasarı en sık glaskow koma skorlaması kullanılarak sınıflandırılır. Travmatik beyin hasarı glaskow koma skorlamasına göre; hafif, orta ve şiddetli olarak 3 e ayrılır. Glaskow koma skorlaması hafif beyin hasarında 14-15, orta beyin hasarında 13-9, şiddetli beyin hasarında 8-3 şeklinde sınıflandırılır.³³

DEĞERLENDİRME KRİTERLERİ	
GÖZ YANITI (E):	
Gözler spontan açık	4
Gözlerini sözel uyarıyla açar	3
Gözlerini ağrılı uyararla açar	2
Gözlerini tüm uyarılara rağmen açmaz	1
MOTOR YANIT (M):	
Komutlara uyar	6
Ağrılı uyarı verildiğinde lokalize eder	5
Ağrılı uyararla geri çekme hareketi uygular	4
Ağrılı uyarana anormal fleksör yanıt verir (dekortike pozisyon)	3
Ağrılı uyarana anormal ekstansör yanıt verir (deserebre pozisyon)	2
Tepki Vermez	1
SÖZEL YANIT (V):	
Oryante	5
Uyumsuz kendi kendine saçma cevaplar verir	4
Birbiriyle bağlantısı olmayan kelimeler söyler	3
İnleme şeklinde anlamsız sesler çıkarır	2
Verbal yanıt yok	1
TOPLAM	3-15

Tablo 2.1 : Glaskow Koma Skorlamasi

2.4. Travmatik beyin hasarında klinik prezentasyon ve tedaviler

Tanı, hastanın fiziksel muayene ve görüntüleme yöntemleri kullanılarak konur. Bilgisayarlı tomografi (BT) veya manyetik rezonans görüntüleme (MRG) gibi görüntüleme teknikleri, beyin hasarının anatomik lokalizasyonu ve şiddetini belirlemek için kullanılır. Prognoz, hasarın derecesine, yerine, hastanın yaşına, genel sağlık durumuna ve tedaviye ne kadar erken başlandığına bağlı olarak değişebilir. Prognozu etkileyen faktörler arasında bilinç kaybının süresi, post-travmatik amnezi, ve GKS (Glasgow Koma Skalası) skoru gibi faktörler yer alır.

2.4.1. Fokal beyin hasarı

2.4.1.1. Kontüzyon

Kontüzyonlar genellikle subfrontal korteks, frontal ve temporal loblarda görülür. Kontüzyonlar künt travmanın olduğu tarafta veya tam zıttı yönde (coup veya counter-coup) gelişebilir. Çoğunlukla girişim gerektirmez kendiliğinden düzelir. Tedavisinde asıl amaç artmış kafa içi basıncı azaltmaktır. Kontüzyonların gerilediği bölgelerde bir kaç gün içerisinde kafa içi kanamalar görülebilir. Koagülopatisi olan hastalarda bu durum daha sık görülür. Koagülopatisi olan hastalarda zihinsel durum değişikliği olursa BT çekilmelidir. ²⁸



Fotoğraf 2.1 : Travmatik kontüzyona bağlı gelişen beyin dokusu içerisindeki kanama alanları ²⁸

2.4.1.2. Travmatik İntrakraniyal Hematomlar

2.4.1.2.1. Subaraknoid kanama

Travmatik subaraknoid kanama beyin omurilik sıvısında kan olmasıdır. Beyin parankimi ve subaraknoid damarların hasar görmesinden kaynaklanır.²⁸ Erken gelişen travmatik subaraknoid kanaması olan hastaların travmatik olmayan subaraknoid kanaması olan hastalara göre 3 kat daha fazla mortalite riski vardır. ³⁴



Fotoğraf 2.2 : Subaraknoid kanama²⁸

2.4.1.2.2. Epidural hematoma

Epidural hematoma, genellikle kafa travması sonucu ortaya çıkar. Kafatasının dış yüzeyi ile beyin zarları arasındaki epidural boşlukta kan birikmesi ile oluşur. En sık temporal kemiğin fraktürü sonrası arteria meningea media yaralanması ile meydana gelmektedir. En sık temporoparietal bölgede görülür. Epidural hematoma, kafa travmasından sonra hızlı bir şekilde ortaya çıkabilir ve tedavi edilmezse yaşamı tehdit edici olabilir. Tedavisi cerrahi yöntemlerle hematomun boşaltılması ve kanamayı durdurmaya yönelik yöntemleri içerir.³⁵

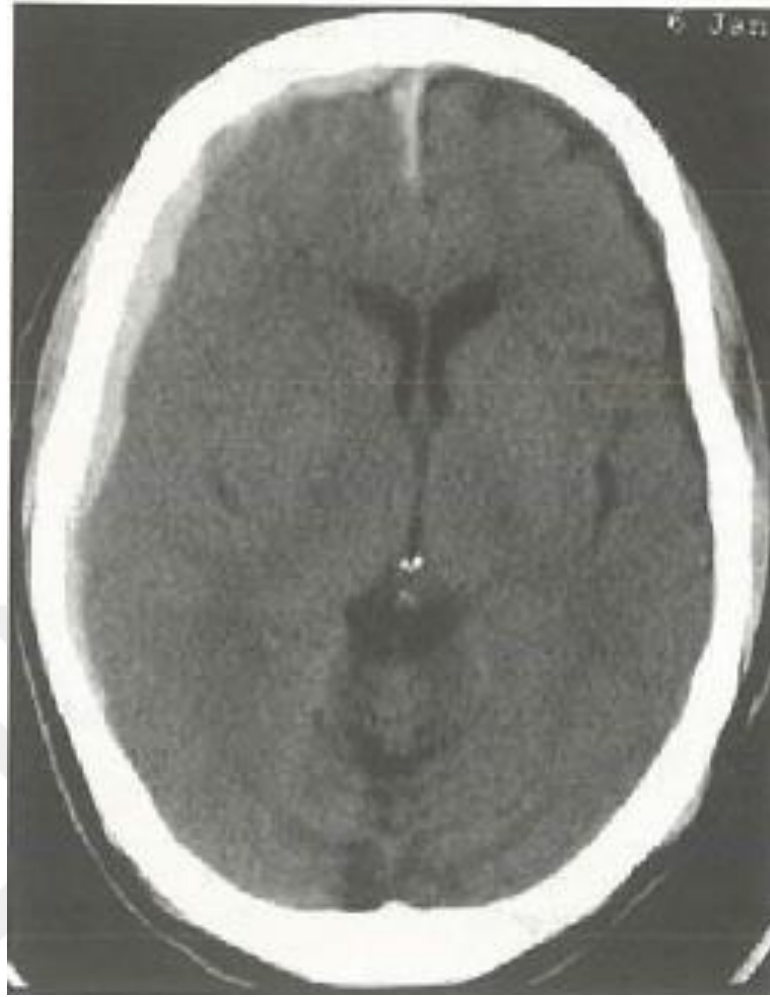


Fotoğraf 2.3 :Epidural Hematom²⁸

2.4.1.2.3. Subdural Hematom

Beyin ve duramater adı verilen beyin zarları arasındaki subdural boşluktan geçen venlerin yırtılması veya gerilmesi ile subdural alanda kan birikmesidir. Subdural hematomlar genellikle daha yavaş bir şekilde gelişebilir ve belirtiler zamanla artabilir. Ölümle sonuçlanan kafa travmalarının %30 undan sorumludur.

35



Fotoğraf 2.4 : Subdural Hematom ²⁸

2.4.1.2.4. Travmatik intraserebral hematom

Erişkinlerde daha sık görülür. Penetran kafa travmaları, kafatası çökme kırıkları, akselerasyon/deselerasyon yaralanmaları en sık sebepleridir. ³⁶

Kontüzyon alanlarında antikoagülan kullanan hastalarda hematom gelişme riski daha yüksektir. ³⁷

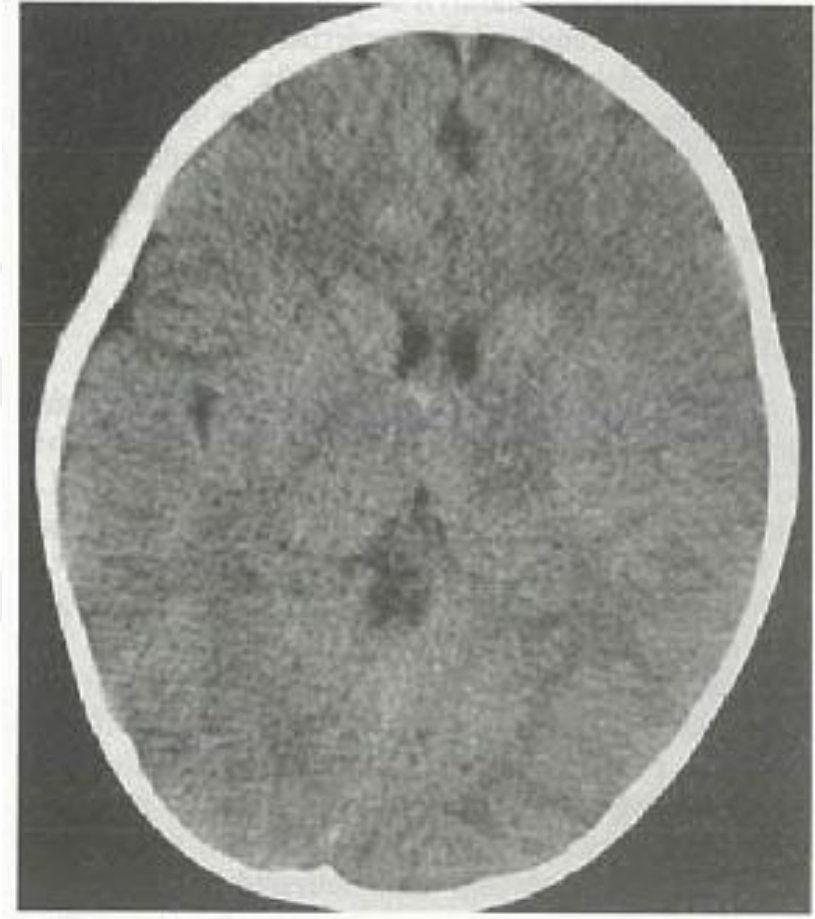
2.4.2. Diffüz Beyin Hasarı

2.4.2.1. Konküzyon

Travmatik beyin hasarının en sık görülen biçimidir. Kranial BT de sıklıkla patoloji saptanmaz. Geçici bilinç kaybı gibi klinik bulgular görülür. Kranial MR da sitotoksik ödem görülebilir. ³⁸ Semptomlar genellikle kendiliğinden geriler.

2.4.2.2. Diffüz aksonal hasar

Beynin maruz kaldığı akselerasyon/deselerasyon sonucu meydana gelen aksonal yırtılma yaralanmasıdır. Yaralanma non hemorajik olduğu için BT genellikle normaldir. Diffüz aksonal hasarda tanı MR ile konur. En sık fronto-temporal bölgedeki gri/beyaz cevher ayrımında meydana gelir. Diffüz aksonal hasar travma anında meydana gelen ani bilinç kaybı ile karakterizedir.³⁵



Fotoğraf 2.5: Aksonal yaralanmaya bağlı gri ve beyaz cevher ayrımının yapılamadığı beyin dokusu²⁸

2.5. Travmatik beyin hasarının mekanizması

Travmatik beyin hasarı patofizyolojik süreçlere göre primer ve sekonder beyin hasarı olarak sınıflandırılır. Primer Travmatik beyin hasarı, doğrudan mekanik bir kuvvet nedeniyle oluşurken, sekonder travmatik beyin hasarı oksidatif stres, inflamasyon, otofaji, nöronal ölüm gibi patofizyolojik süreçleri içerir.^{7,8,39}

2.5.1. Primer travmatik beyin hasarı

Primer travmatik beyin hasarı genellikle mekanik nedene ve anatomik bir lezyona bağlıdır. En sık sebep olan mekanizmalar ise akselerasyon /deselerasyon, doğrudan etki, delici yaralanma ve patlamalardır. Primer hasar laserasyon, kontüzyon, intrakraniyal kanamalar ve diffüz aksonal hasarı içerir.⁴⁰

2.5.2. Sekonder travmatik beyin hasarı

Sekonder travmatik beyin hasarı, uzun süreli nöropatolojik değişikliklere yol açan gecikmiş ve uzamış karmaşık bir yanıttır. Sekonder beyin hasarına; aşırı glutamat üretimine bağlı eksitotoksisite, serbet radikal üretimine bağlı oksidatif stres, aşırı nöroinflamatuvar yanıt neden olur.⁹ Sekonder beyin hasarı, primer beyin yaralanmasını takiben saatler veya günler sonra ortaya çıkar. Sekonder nörotoksik kaskad beyin hasarının devam etmesine ve uzun dönemde travmanın neden olduğu hasardan daha kötü nörolojik sonuçların ortaya çıkmasına neden olur.⁴¹ Günümüzde klinik çalışmalar travmatik beyin hasarına bağlı sekonder hasarın tedavi edilmesinin önemli bir terapötik hedef olduğunu gösteriyor.^{10,11}

2.6. Oksidatif stres

Oksidatif strese hücre ve dokulardaki reaktif oksijen türleri (ROS) ile antioksidatif savunma sistemleri arasındaki dengesizlik neden olur. Beyin, vücudun kullandığı toplam oksijen miktarının yaklaşık %20'sini kullanır. Yaralanma sonrası artan oksijen tüketim hızı, reaktif oksijen türleri (ROS) üretme olasılığını artırır.

Oksidatif stres, oksidatif enzimlerin aktivasyonu, nitrik oksitler ve lipid peroksidasyonun yanı sıra glutamaterjik nöronların artmış eksitotoksik aktivasyonunu da içerir.^{14,41,42} Beyin parankimi serbest radikal reaksiyonlarına ve lipid peroksidasyona karşı özellikle hassas olan doymamış yağ asitleri ve çoklu doymamış yağ asitlerini bulundurur. Beyin aynı zamanda serbest radikal yaralanmasıyla doğrudan ilişkili olabilen yüksek miktarda demir içerir.^{12,13,29} Beynin bu yapısal özellikleri oksidatif strese yatkınlığını artırır.

Beynin oksidatif stres'e bağlı hasarı azaltabilecek savunma mekanizmaları diğer organlara göre sınırlıdır.⁴³ Bu nedenle antioksidan mekanizmalar dışarıdan desteklenmelidir.

Hem klinik hem de deneysel travmatik beyin hasarı çalışmalarında beyinde oksidatif stres geliştiği ve oluşan hasarın yaralanmadan sonra 6 ay daha devam ettiği gösterilmiştir.^{12,44}

2.7. Nöroinflamasyon

Normal şartlar altında nöroinflamasyon beyin plastisitesi, doku tamiri ve nöroprotektivite açısından faydalıdır. Nöroinflamasyon iç ve dış etmenlere karşı kendini savunma durumuna almasıdır yani beyin savunma mekanizmasıdır.¹⁵ Mikroglia ve astrositler, travmatik beyin hasarı ile karşılaştıktan sonra aktive olur, bu da travmatik beyin hasarını artıran nöroinflamatuvar mediatörlerin aşırı üretimine yol açar. Aşırı nöroinflamasyon, kan beyin bariyeri (BBB) bütünlüğünü bozar, beyin ödemi şiddetlendirir, periferik immün hücrelerin infiltrasyonunu ve nöral apoptozunu artırır. Bunun sonucunda kafa travması sonucu oluşan anormal inflamatuvar yanıt nöronal ölüme yol açar.^{16,17}

2.8. Sekonder hasar tedavisinin önemi ve seçenekleri

Kafa travmasına bağlı akut travmatik beyin hasarı tedavi seçeneklerinin sınırlı olduğu ciddi bir sağlık sorunudur. Cerrahi tedavi travmatik primer beyin hasarında kullanılan ilk seçenektir fakat sekonder travmatik beyin hasarı tedavisi için FDA onaylı bir tedavi yoktur. Travmatik beyin hasarını takiben nöroinflamasyonun ve oksidatif stresin tedavi edilebileceği ve hastaların prognozunun iyileştirilebileceği yeni ve etkili yöntemlerin formüle edilmesi zorunludur.

Serbest radikal temizleyicileri, antiinflamatuvarlar, antioksidan sistem aktivatörleri, serbest radikal üreten enzimlerin inhibitörlerini ve antioksidan enzimleri içeren bir dizi antioksidan tedavi test edilmiştir.^{45,46} Travmatik beyin hasarı modelinde antioksidan seviyesinin artırılmasının inflamasyonu ve buna bağlı olarak sekonder beyin hasarını azalttığı bildirilmiştir. Antioksidan tedaviler Travmatik beyin hasarı sonrası bilişsel ve fonksiyonel iyileşmeye neden olmuştur, hastalar için umut verici bir tedavi seçeneği sunmaktadırlar.⁴⁷⁻⁴⁹

2.9. Eskületin

Eskületin (ESC), doğal bir benzopiron sınıfına ait bir dihidroksi-kumarindir; *Fraxinus rhynchophylla* Hance'in dal kabuğundan ve gövde kabuğundan elde edilir.

Antioksidan, antiinflamatuvar, anti-apoptotik, antikanser, antidiyabetik, nöroprotektif ve kardiyovasküler koruyucu aktivitelerin yanı sıra antibakteriyel aktivite gibi özelliklerine dayanarak; kanser, diyabet, ateroskleroz, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, alkol-dışı yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) tedavisinde kullanılan bir tedavi seçeneği olması beklenmektedir.^{19-23,50,51}

Kumarin bileşiklerinin biyolojik aktiviteleri ve terapötik uygulamaları kimyasal yapılarına bağlıdır. Eskületin, 6. Ve 7. karbonlarına bağlı 2 hidroksil grubuna sahiptir. Eskületinin hidroksil grupları bu bileşiğin oksidatif stresi inhibe edip güçlü bir antioksidan olmasını sağlar.¹⁹

Eskületin, enflamasyonu azaltmaya yardımcı olur ve bu nedenle enflamatuvar hastalıkların tedavisine katkıda bulunabilir. Eskületinin anti-inflamatuvar etkisini İnflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-1 β , IL-6, CCL2 ve indüklenabilir nitrik oksit sentetaz) üretimini azaltarak ve nükleer faktör kappa B (NF- κ b) sinyal yolunu inhibe ederek gösterir.¹⁸

Yapılan çalışmalarda Esc'nin nöronal apoptozu azaltarak serebral iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı üzerinde kurtarıcı etkisi olduğu bulunmuştur. Nöronlarda NMDA kaynaklı toksisite karşısındaki nöroprotektif etkisini, hücre sel glutatyon seviyesini artırarak göstermiştir.⁵² Başka bir çalışmada Esc'nin serebral I/R hasarı üzerindeki nöroprotektif mekanizmasını incelendiğinde Esc'nin apoptoz belirteci olan kaspaz 3 düzeyini azalttığı görülmüştür.⁵³

Eskületinin nöroprotektif etkisini nöroinflamasyon, oksidatif stres ve nöronal apoptoz azaltarak ortaya çıkarır. Travmatik sekonder beyin hasarında eskületinin bu etkileri aracılığı ile kafa travmasına bağlı ortaya çıkan sekonder hasar tedavisinde kullanılan bir tedavi seçeneği olması beklenmektedir.

2.10. Oksidatif stres belirteçleri

Travmatik beyin hasarı patofizyolojisinin önemli bir bileşeni olan oksidatif stres; nöronal hasar, enflamasyon, hücre ölümü ve nörolojik işlev bozukluğuna katkıda bulunabilir. Oksidatif stres belirteçleri, travmatik beyin hasarının şiddeti ve sonuçlarını değerlendirmek amacıyla kullanılabilir.²⁴

2.10.1. Nükleer faktör-eritroid-2 (Nrf-2)

Nükleer faktör-eritroid-2 ile ilişkili faktör (Nrf)-2, bir transkripsiyon faktörü ve antioksidan savunma yanıtının ana düzenleyicisidir. Hücreleri sitotoksik/oksidatif hasardan korumada önemli bir rol oynar.^{54,55}

Fizyolojik koşullarda, Nrf2, sitoplazmada Keap1 (kelch benzeri ECH ile ilişkili protein1) ile bağlı bulunmaktadır. Yaralanma durumlarında Nrf2 Keap1'den ayrılır ve çekirdeğe taşınır, burada Nrf2-ARE (antioxidant response element) yolunu aktive eder. Bu yol; heme oksijenaz-1 (HO-1), NAD (P) H: kinon oksidoreduktaz-1 (NQO-1), glutatyon peroksidaz (gpx), glutatyon-S-transferaz (GST) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi enzimleri aktifleştirir. Aktifleşen enzimler antioksidan, anti-enflamasyon, antiapoptoz etkilerinin yanı sıra ek hücrel koruma sağlar.^{25,26}

2.10.2. Hemeoksijenaz-1 (HO-1)

Hemeoksijenazlar Hem'i parçalayarak karbonmonoksit (CO), serbest demir, ferritin üretiminde rol oynarlar. Stres tarafından uyarılan bir reaktif protein olan hemeoksijenaz-1 (HO-1), Nrf2 tarafından düzenlenen faz II detoksifikasyon enzimlerinden biridir. Anti-enflamatuar, anti-oksidan, anti-apoptotik ve antitrombotik etkileri vardır.⁵⁶

2.10.3. Nrf2/HO-1 sinyal yolu

Serbest oksijen radikalleri; apoptoz, inflamasyon, mitokondrial depolarizasyon, lipid peroksidasyonu ve hasarlı DNA'nın birikmesine neden olarak birçok hastalığın ilerlemesini hücrel düzede artırır. Antioksidanlar bu hastalıklar için potansiyel bir tedavi yöntemi olabilir. Nrf2/HO-1 sinyal yolu, antioksidan enzimlerin seviyelerini artırmanın ana yollarından biridir.

Hipokampus’de Nrf2/HO-1 yolağının aktivasyonunun travmatik beyin hasarında nöroprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, antioksidan bileşiklerin ve ilaçların kullanılması, Nrf2/HO-1 sinyal yolunun aktivasyonunu kolaylaştırabileceği bulunmuştur. ^{57,58}

2.11. Nöroinflamasyon belirteçleri

2.11.1. Tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α)

TNF- α (Tümör nekroz faktörü-alfa) akut faz reaksiyonunu oluşturan sistemik inflamasyonda yer alan bir hücre sinyal glikoproteinidir. CD4+ lenfositler, NK hücreleri, nötrofiller, mast hücreleri, eozinofiller, mikroglia, makrofajlar tarafından üretilir. TNF- α reseptörleri hücre zarında bulunur.

Doku hasarı ya da fiziksel stres sonrası kanda ilk saptanan sitokindir ve birçok otoimmün hastalıkta inflamasyonun başlamasında ve devam ettirilmesinde önemli rolü bulunmaktadır. ⁵⁹

TNF- α NF- κ B üzerinden inflamatuvar süreçleri başlatır. ⁶⁰ Eskuletin NF- κ B üzerinden anti-inflamatuvar etki gösterir.

2.11.2. Nrf2/HO-1 sinyal yolu ve TNF- α

Travmaya bağlı beyin hasarı sırasında farklı hücre ölüm türlerinin meydana geldiği bulunmuştur, bunlar arasında apoptoz, nekroptoz ve ferroptozis bulunur. ⁶¹⁻⁶³

Nekroptoz, tümör nekroz faktörü alfa (tnf α) ve/veya Fas'ın aktivasyonu ile başlar, bu da bu süreci kaspaz bağımlı apoptozdan ayırır. ⁶⁴

Aktive olmuş reseptörle etkileşen protein 1 (RIPK1) ve reseptörle etkileşen protein 3 (RIPK3), nekrosom kompleksi oluşturmak üzere bir araya gelir, bu da nekroptozun kilit bir düzenleyicisi olarak kabul edilir. Son olarak, nekrosom tarafından fosforile edilen karışık kökenli kinaz alan benzeri psödokinaz (MLKL), hücre zarına bağlanır ve hücre zarının patlamasına ve büyük miktarda enflamatuvar faktörün serbest bırakılmasına yol açar, bu da anormal mikroglial aktivasyonun neden olduğu patolojik süreçle uyumludur. ⁶⁵⁻⁶⁸

Son bulgular, mitokondriyal anormal oksidatif stresin nekroptozu tetiklediğini göstermektedir. ⁶⁹

Çalışmalar oksidatif stresin azaltılması ve Nrf-2/HO-1 sinyal yolu aktivasyonunun travmatik beyin hasarı sonrası nekrotozun bir parçası olabileceğini göstermektedir.⁷⁰



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız tek merkezli prospektif bir çalışmadır. Eskuletinin sekonder travmatik beyin hasarındaki anti-enflamatuar anti-oksidatif anti-apoptotik etkilerini araştırdığımız hayvan deneyi çalışması Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda 48 adet wistar albino erkek rat kullanılmıştır.

Deney grupları:

Grup 1(Kontrol): 6 rattan oluşan kontrol grubu.

Grup 2(ESC 20mg): Travmatik beyin hasarı oluşturulmadan ve travma uygulanan gruplarla eş zamanlı İntraperitoneal 20 mg/kg esc uygulanacak grup.

Grup 3(ESC 50 mg): Travmatik beyin hasarı oluşturulmadan ve travma uygulanan gruplarla eş zamanlı İntraperitoneal 50 mg/kg esc uygulanacak grup.

Grup 4(ESC 100 mg): Travmatik beyin hasarı oluşturulmadan ve travma uygulanan gruplarla eş zamanlı İntraperitoneal 100 mg/kg esc uygulanacak grup.

Grup 5(ESC 20mg+Kafa Travması): Travmatik beyin hasarı oluşturulacak ve travma sonrası İntraperitoneal 20 mg/kg esc uygulanacak grup.

Grup 6(ESC 50mg+Kafa Travması): Travmatik beyin hasarı oluşturulacak ve travma sonrası İntraperitoneal 50 mg/kg esc uygulanacak grup.

Grup 7(ESC 100mg+Kafa Travması): Travmatik beyin hasarı oluşturulacak ve travma sonrası İntraperitoneal 100 mg/kg esc uygulanacak grup.

Grup 8(Kafa Travması): Sadece travmatik beyin hasarı oluşturulacak grup.

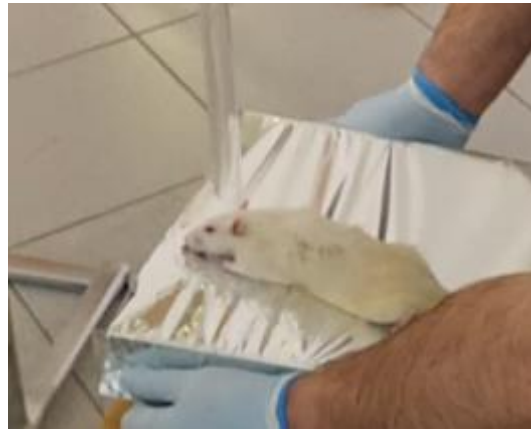
Denek ratlar travmadan önce ve travma sonrası sakrifikasyona kadar 17-21°C sıcaklık ve %50 nemli odalarda 12 saat karanlık 12 saat gündüz olacak şekilde barındırılmıştır. Yem ve su kısıtlaması yapılmamıştır.

Çalışmada kullanılan kafa travması modeli mychasiuk ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır.⁷¹ Bu modelin seçilmesinin nedeni diğer modellere göre daha az mortalite ile sonuçlanması ve travmanın çalışma hipotezine uygun olmasıdır.^{71,72}

Travma 150g ağırlığında, üst ucunda misina ile yükseklik tespiti sağlayan bir halka bulunan, silindirik tek parça metal ağırlık 1,5 metre yüksekliğe ve 2,2cm çapta, şeffaf tüp içinden, 50cm yükseklikten ratın verteksi üzerine düşürülerek oluşturuldu. Sürtünmeyi en aza indirmek için rat Teflon kılavuz üzerinde askıya alındı. Travma oluşturmadan önce ratlara anestezik isofluran ve travma oluşturulacak bölgeye lidokain ile lokal anestezi uygulandı.



Fotoğraf 3.1: Travma modelini oluşturmak için yapılan düzeneğin uzak görünümü



Fotoğraf 3.2: Gaz anestezi sonrası travma modeli oluşturmak için ratın düzeneğe yerleştirilmesi

Wang ve ark 2012de yaptıkları orta serebral arter oklüzyonu sonrası iskemi/reperfüzyon hasarında eskületinin nöroprotektif etkisini araştırdıkları deneyde kullandıkları eskületin dozları referans alınmıştır. Aynı çalışmada intraperitoneal ve intratekal kullanılan eskületin etkinliği arasında fark olmaması nedeniyle çalışmamızda eskületin verilış yöntemi intraperitoneal olarak seçilmiştir.⁵³

Çalışmamızda travmatik beyin hasarı oluşturulan ve oluşturulmayan gruplarda eş zamanlı olarak travma sonrası intraperitoneal eskületin serum fizyolojik içerisinde çözölürölerek verildi.

Kafa travması oluşturulduktan 48 saat sonra ratlar ketamin (90mg /kg) ksilazin (10mg/kg) ile anestezi oluşturulduktan sonra sakrifiye edildi ve örnekler alındı. Beyin dokusu sagittal planda 2 eşit parçaya ayrıldı. Alınan örneklerin yarısı pbs (phosphate buffered saline) içine alınarak – 80 °C de , diğler yarısı ise %10 luk formaldehit içerisinde fikse edilmek üzere saklandı.

Beyinin sol hemisferinde elisa(Enzyme-Linked immunosorbent Assay) yöntemi ile Nükleer faktör-eritroid-2 ile ilişkili faktör (Nrf)-2, Heme Oxygenase-1(HO-1), TNF- α (Tümör nekroz faktörü-alfa) seviyeleri ölçölümüştür.

Elisa çalışmaları için dış alım yapılmıştır. Örnekler Mega Tıp San. Tic. Ltd. Şti'den (Mücahitler Mah. 52012 Cad. No: 10/1, Gaziantep) gönderilmiştir.

Ratlardan alınan sağ hemisfer örnekleri histoloji labaratuvarında incelendi. Örnekler kreazil violet boyama ile boyandı. Abramov'un histolojik skorlama sistemi kullanılarak değlerlendirildi. İnfiltrasyon, hemoraji ve nöronal hasar incelendi.

Doku boyama ve histokimyasal değlerlendirme histoloji çalışmaları Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Histoloji Anabilim Dalı tarafından yapılmıştır.

Hayvan araştırmaları yerel etik kurul onayı

Çalışmamız Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulunun 22/02/2023 tarihli 2023/09 sayılı onayı ile gerçekleştirilmiştir.

Çıkar çatışması ve finansal destek

Çalışma tümüyle çalışmacı tarafından finanse edilmiş olup herhangi bir çıkar çatışması olmadığı beyan edilmiştir.

3.1. Çalışmada kullanılan ratlar ve özellikleri

Çalışmada 48 adet yetişkin Wistar albino erkek rat kullanılmıştır. 10 haftalık 48 adet rat randomize 8 gruba ayrılmıştır. Ağırlıkları 217 -275 gr ölçülmüştür.

Litaratürdeki ağırlık düşme modellerindeki %30'un üzerindeki ölüm oranı dikkate alınarak her grup için 6 rat 8 gruba ayrılmıştır.^{73-75,75}

Gruplar istatistiksel açıdan kabul edilebilir en az sayıda hayvanla benzer çalışmalar dikkate alınarak oluşturulmuştur.

3.2. Hayvan refahı

Denek ratlar travmadan önce ve travma sonrası sakrifikasyona kadar 17-21°C sıcaklık ve %50 nemli odalarda 12 saat karanlık 12 saat gündüz olacak şekilde barındırılmıştır. Yem ve su kısıtlaması yapılmamıştır.

3.3. Çalışma grupları

3.3.1. Grup 1 (Kontrol):

6 rattan oluşan kontrol grubu. Kontrol grubundaki ratlara travma uygulanmamıştır ve intraperitoneal esculetin uygulanmamıştır. Travma oluşturulan gruplarla gruplarla birlikte işlemden 48 saat sonra ketamin/ksilazin anestezisi ile birlikte kardiyak eksanguinasyon yöntemiyle sakrifiye edildi.

3.3.2. Grup 2 (ESC 20mg):

Travmatik beyin hasarı oluşturulmadan ve travma uygulanan gruplarla eş zamanlı İntraperitoneal 20 mg/kg esc uygulanmıştır. İsofluran gazı verilerek genel anestezi uygulanmış ve anestezi etkinliği righting reflex ve ayak ucu sıkıştırılması ile kontrol edilmiştir. Ağırlığın düşeceği alana lidokain ile lokal anestezi yapılmıştır. Ratlara intraperitoneal 20 mg/kg esculetin uygulandı. İşlemden 48 saat sonra ketamin/ksilazin anestezisi ile birlikte kardiyak eksanguinasyon yöntemiyle sakrifiye edildi.

3.3.3. Grup 3 (ESC 50 mg):

Travmatik beyin hasarı oluşturulmadan ve travma uygulanan gruplarla eş zamanlı İntraperitoneal 50 mg/kg esc uygulanmıştır. İsofluran gazı verilerek genel anestezi uygulanmış ve anestezi etkinliği righting reflex ve ayak ucu sıkıştırılması ile kontrol edilmiştir. Ağırlığın düşeceği alana lidokain ile lokal anestezi yapılmıştır. Ratlara intraperitoneal 50 mg/kg esculetin uygulandı. İşlemden 48 saat sonra ketamin/ksilazin anestezisi ile birlikte kardiyak eksanguinasyon yöntemiyle sakrifiye edildi.

3.3.4. Grup 4 (ESC 100 mg):

Travmatik beyin hasarı oluşturulmadan ve travma uygulanan gruplarla zamanlı İntraperitoneal 100 mg/kg esc uygulanmıştır. İsofluran gazı verilerek genel anestezi uygulanmış ve anestezi etkinliği righting reflex ve ayak ucu sıkıştırılması ile kontrol edilmiştir. Ağırlığın düşeceği alana lidokain ile lokal anestezi yapılmıştır. Ratlara intraperitoneal 100 mg/kg esculetin uygulandı. İşlemden 48 saat sonra ketamin/ksilazin anestezisi ile birlikte kardiyak eksanguinasyon yöntemiyle sakrifiye edildi.

3.3.5. Grup 5 (ESC 20mg+Kafa Travması):

Travmatik beyin hasarı oluşturulmuş ve travma sonrası İntraperitoneal 20 mg/kg esc uygulanmıştır. İsofluran gazı verilerek genel anestezi uygulanmış ve anestezi etkinliği righting reflex ve ayak ucu sıkıştırılması ile kontrol edilmiştir. Ağırlığın düşeceği alana lidokain ile lokal anestezi yapılmıştır. Travma oluşturulurken sürtünmeyi en aza indirmek için rat teflon kılavuz üzerinde askıya alındı. 150 gr ağırlık 1,5 metre yükseklikte misina ile tespit edildi. 1,5 metre yükseklikte ve 2,2cm çapta, şeffaf tüp içinden serbest düşüşe bırakıldı. Orta hattından 1 cm kesilerek direnci azaltılan aliminyum folyo üzerine alınan ratın verteksi üzerine düşürüldü. Ratlara intraperitoneal 20 mg/kg esculetin uygulandı. İşlemden 48 saat sonra ketamin/ksilazin anestezisi ile birlikte kardiyak eksanguinasyon yöntemiyle sakrifiye edildi.

3.3.6. Grup 6 (ESC 50mg+Kafa Travması):

Travmatik beyin hasarı oluşturulmuş ve travma sonrası İntraperitoneal 50 mg/kg esc uygulanmıştır. İsofluran gazı verilerek genel anestezi uygulanmış ve anestezi etkinliği righting reflex ve ayak ucu sıkıştırılması ile kontrol edilmiştir. Ağırlığın düşeceği alana lidokain ile lokal anestezi yapılmıştır. Travma oluşturulurken sürtünmeyi en aza indirmek için rat teflon kılavuz üzerinde askıya alındı. 150 gr ağırlık 1,5 metre yükseklikte misina ile tespit edildi. 1,5 metre yükseklikte ve 2,2cm çapta, şeffaf tüp içinden serbest düşüşe bırakıldı. Orta hattından 1 cm kesilerek direnci azaltılan aliminyum folyo üzerine alınan ratın verteksi üzerine düşürüldü. Ratlara intraperitoneal 50 mg/kg esculetin uygulandı. İşlemden 48 saat sonra ketamin/ksilazin anestezisi ile birlikte kardiyak eksanguinasyon yöntemiyle sakrifiye edildi.

3.3.7. Grup 7 (ESC 100mg+Kafa Travması):

Travmatik beyin hasarı oluşturulmuş ve travma sonrası İntraperitoneal 100 mg/kg esc uygulanacak. İsofluran gazı verilerek genel anestezi uygulanmış ve anestezi etkinliği righting reflex ve ayak ucu sıkıştırılması ile kontrol edilmiştir. Ağırlığın düşeceği alana lidokain ile lokal anestezi yapılmıştır. Travma oluşturulurken sürtünmeyi en aza indirmek için rat teflon kılavuz üzerinde askıya alındı. 150 gr ağırlık 1,5 metre yükseklikte misina ile tespit edildi. 1,5 metre

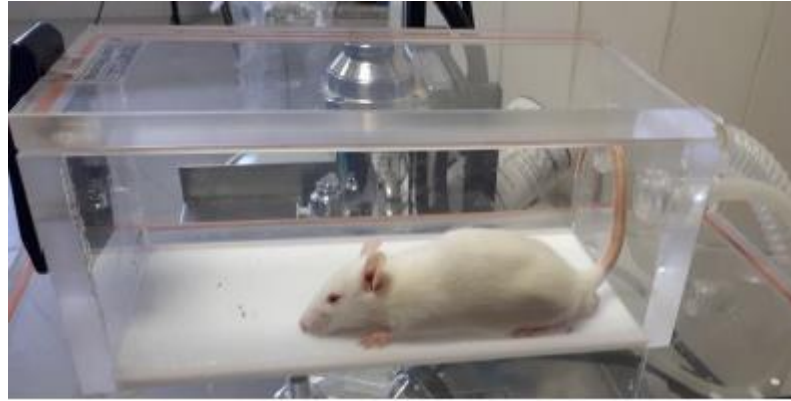
yükseklite ve 2,2cm çapta, şeffaf tüp içinden serbest düşüşe bırakıldı. Orta hattından 1 cm kesilerek direnci azaltılan aliminyum folyo üzerine alınan ratın verteksi üzerine düşürüldü. Ratlara intraperitoneal 100 mg/kg esculetin uygulandı. İşlemden 48 saat sonra ketamin/ksilazin anestezisi ile birlikte kardiyak eksanguinasyon yöntemiyle sakrifiye edildi.

3.3.8. Grup 8 (Kafa Travması):

Sadece travmatik beyin hasarı oluşturulan grup. İsofluran gazı verilerek genel anestezi uygulanmış ve anestezi etkinliği righting reflex ve ayak ucu sıkıştırılması ile kontrol edilmiştir. Ağırlığın düşeceği alana lidokain ile lokal anestezi yapılmıştır. Travma oluşturulurken sürtünmeyi en aza indirmek için rat teflon kılavuz üzerinde askıya alındı. 150 gr ağırlık 1,5 metre yükseklikte misina ile tespit edildi. 1,5 metre yükseklikte ve 2,2cm çapta, şeffaf tüp içinden serbest düşüşe bırakıldı. Orta hattından 1 cm kesilerek direnci azaltılan aliminyum folyo üzerine alınan ratın verteksi üzerine düşürüldü. İşlemden 48 saat sonra ketamin/ksilazin anestezisi ile birlikte kardiyak eksanguinasyon yöntemiyle sakrifiye edildi.

3.4. Travma öncesi ratların gaz anestezide alınması

Travma öncesi ratlar şeffaf gaz anestezisi için kullanılan düzeneğe alınmıştır. İsofluran gazı verilerek genel anestezi uygulanmış ve anestezi etkinliği righting reflex ve ayak ucu sıkıştırılması ile kontrol edilmiştir. Anestezi alan ratlarda ağırlığın düşeceği verteks üzerine lokal anestezi lidokain pamuklu çuçok yardımıyla sürülmüştür. Kontrol grubu da dahil bütün gruplara lokal anestezi(lidokain) ve gaz anestezisi uygulanmıştır.



Fotoğraf 3.3: İsofluran ile gaz anestezisi oluşturmak için kullanılan şeffaf hazne

3.5. Sakrifikasyon ve örnek alınması

Kafa travması oluşturulduktan 48 saat sonra ratlar ketamin (90mg /kg) ve ksilazin (10mg/kg) ile anestezisi oluşturulduktan sonra kardiyak eksanguinasyon yapıldı. Ardından dekapite edilen ratların skalp dokusu sıyrılıp bilateral foramen

magnumdan erişim sağlanarak kranium tek parça halinde disektör ile açıldıktan sonra kafatası uzaklaştırılmıştır. Ardından beyin tek parça halinde çıkarıldı. Beyin dokusu sagittal planda 2 eşit parçaya ayrıldı. Alınan örneklerin sol yarısı pbs içine alınarak – 80 °C de , sağ yarısı ise %10 luk formaldehit içerisinde fikse edilmek üzere saklandı.



Fotoğraf 3.4: Sakrifikasyon sonrası beyin dokusunun çıkarılması

3.6. Kafa travması ağırlık düşürme modeli

Travma oluşturulurken sürtünmeyi en aza indirmek için rat teflon kılavuz üzerinde askıya alındı. Aliminyum folyo üzerinde direnci azaltmak amacıyla orta hattında 1 cm kesi uygulandı. Her işlem sonrası aliminyum folyo özdeş olarak tekrar uygulandı. Aliminyum folyo üzerindeki rat yerden 3 cm yükseklikte tutuldu. Ağırlık çarpmadan önce aliminyum folyo gergin bir biçimde tutuldu. 150 gr ağırlık 1,5 metre yükseklikte misina ile tespit edilmiştir. 1,5 metre yükseklikte ve 2,2cm çapta, şeffaf tüp içinden serbest düşüşe bırakıldı. Orta hattından 1 cm kesilerek direnci azaltılan Aliminyum folyo üzerine alınan ratın verteksi üzerine düşürüldü. Misina uzunluğu ağırlığın istenilen yerde durması için ölçülmüş ve ona uygun kısaltılmıştır. Ağırlık vertekse vurup travma oluşturduktan sonra folyo yırtılıp tarlar 180derece dönüş yapıp alttaki süngere çarpmıştır. Her ratda travma oluşturduktan sonra düzenek kontrol edilmiş ve materyaller yeniden yerleştirilmiştir.

3.7. Esculetin uygulaması

20, 50 ve 100 mg/kg olarak hassas terazide ölçülerek 100 µl serum fizyolojik ile çözündürülerek intraperitoneal uygulandı.



Fotoğraf 3.5: Hassas terazi ile eskuletin miktarı ve ratlara kilogram başına verilecek miktarın belirlenmesi

3.8. Elisa çalışması

Çalışmanın ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ile gerçekleştirilen, Nükleer faktör-eritroid-2 ile ilişkili faktör (Nrf-2), Heme Oxygenase-1(HO-1), Tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) ölçümleri Mega Tıp San. Tic. Ltd. Şti'den (Mücahitler Mah. 52012 Cad. No: 10/1, Gaziantep) hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir.

Sakrifasyon sonrası PBS içerisindeki sol hemisfer homojenize edildi. 50 mikrolitre dilue standartlardan pipetlenir diğer kuyucuklara 40 mikrolitre numune pipetlendi. Sonra 10 mikrolitre nefa antibody (biotinlated) sonra tüm kuyucuklara yine 50 mikrolitre strepavidin hrp pipetlendi. İyice karıştırıldı yaklaşık 1 dk dikkatli şekilde dökmeden .60 dakika 37 derecede inkübe edildi. 2. İnkübasyondan sonra 3 kez yıkama işlemi yapıldı yıkama solüsyonu konsantre olduğu için örneğin konsantre tampon 25 ml ise 500 ml ye distile su ile tamamlandı. İnkübasyondan sonra 3 kez yıkama işlemi yapıldı. 50 mikrolitre substrate'a pipetlendi sonra 50 mikrolitre substrat b pipetlendi 10 dakika karanlıkta bekletildi. Oda ısısında 50 mikrolitre stop solüsyon pipetlendi 450 nm okuma işlemi yapılır 10 konsantrasyon için grafik çizdirildi. Grafikte elde edilecek olan değer absorbanstan konstantarsyona çevrildi.

3.9. Histopatolojik işlemler

3.9.1. Doku örneklerinin hazırlanması

Deneyisel işlemlerinin sonunda tüm gruptaki sıçanlar anestezi altına alınarak beyin dokuları diseke edildi. Beyinlerin sağ ve sol hemisferleri birbirinden ayrıldı. Histopatolojik incelemeler için sağ hemisferler kullanıldı. Ardından 2 hafta boyunca %10'luk nötral formalin kullanılarak fiksasyon işlemi başlatıldı. Solüsyonlar 3 günde bir değiştirildi. 2 haftalık fiksasyon süresinin tamamlanmasını takiben sağ beyin hemisferleri doku takip kasetlerine yerleştirilip uygun etiketleme yapılarak akarsuda bir gece boyunca bekletildi ve formalin dokudan uzaklaştırıldı. Akarsuda tutulan dokular öncelikle alkol serilerinden (%70, %80, %96, %100) geçirilerek dehidrate edildi. Sonrasında ksilen ile şeffaflaştırılan dokuların paraplast ile infiltrasyonu sağlandı. Sıcak parafin içerisinde alınan dokular düzgün bir zemin üzerinde kare şekli verilen içleri parafin ile doldurulmuş L demirleri içerisine gömüldü. Daha sonra tüm gruplar hazırlanan dikdörtgen şeklindeki küçük kartonların L demirleri içerisine dokuya değmeyecek şekilde yerleştirilmesiyle isimlendirildi ve böylece doku takip işlemi süreci tamamlandı (**Tablo 3.1**).

Kimyasallar	Süre
% 70'lik alkol	1 saat
% 80'lik alkol	1 gece
% 96'lık alkol	1 saat
% 100'lük alkol	2 saat
% 100'lük alkol	2 saat
% 100'lük alkol	2 saat
Ksilen	1 saat
Ksilen	1 saat
Ksilen	1 saat
Paraplast	1 saat 30 dakika
Paraplast	1 saat 30 dakika

Tablo 3.1 : Beyin dokularına ait doku takip aşamaları

3.9.2. Kesit alma

Parafine gömülü kesitlerden ışık mikroskopik analizler için rotary mikrotom (Leica RM2125RT) kullanılarak 4 µm kalınlığında kesitler sistematik rastgele örnekleme kuralına uygun bir şekilde 1/100 örnekleme ile alındı. Ardından tüm gruplara ait alınan kesitler su sıcaklığı 42°C olan ve içerisinde dokuların lama daha kuvvetli bir şekilde yapışması için toz jelatin bulunan benmari havuzuna konuldu. Benmari havuzundan alınan kesitler, boyama işlemlerinin yapılabilmesi için lamlara alındı ve 58°C'lik sıcaklıktaki etüvde bir gece süresince bekletilerek dokulardan paraplastın uzaklaştırılması sağlandı ve ışık mikroskopik analizler için tüm kesitler krezil violet ile boyandı.

3.9.3. Krezil violet boyama işlemi

Sıçanlara ait beyin dokusu kesitleri 100 ml distile suda 0,1 gr cresyl violetin çözülmesi ile elde edilen krezil violet boyama prosedürüne göre boyandı (**Tablo 3.2**). Tüm gruptaki kesitler boyamaya dâhil edilmeden önce tek bir kesitte pilot

Çalışma yapılarak boyanın dokuya nüfuz etme süresi belirlendi. Daha sonra tüm gruplara ait lamalar belirlenen pilot boyama prosedürüne uygun bir şekilde ilgili boya ile boyanarak entellan ile kapatıldı ve birkaç gün boyunca temiz bir zemin üzerinde bekletilerek kuruması sağlandı.

Kimyasallar	Süre
Ksilen (x4)	30 dakika
% 100'lk alkol (x2)	10 dakika
% 96'lık alkol	10 dakika
% 80'lik alkol	10 dakika
% 70'lik alkol	10 dakika
Distile su	5 dakika
Krezil violet	4 dakika
Distile su	5 dakika
% 70'lik alkol	5 dakika
% 80'lik alkol	5 dakika
% 96'lık alkol	5 dakika
Krezil violet ayrıştırıcısı	Daldırıp ıkarma
% 96'lık alkol	5 dakika
% 100'lk alkol	5 dakika
Ksilen (x2)	40 dakika
Entellan	Kapama

Tablo 3.2: Krezil violet boyama prosedürü

3.9.4. Beyin dokusunun histolojik değerlendirilmesi

Beyin dokusundaki hasarın değerlendirilmesi Nikon Eclipse 80i light fotomikroskopta korteks bölgesinde nöronal dejenerasyon, vasküler dilatasyon ve hücresel şişme gibi değişiklikler dikkate alınarak yapıldı. Beş farklı alan seçilerek bu morfolojik parametreler semikantitatif olarak 0-3 arasında skorlandı. Değişiklik olmaması durumunda skor 0, %25'den daha az değişiklikte skor 1, % 25-75 değişiklik olması skor 2, % 75'dan fazla, değişiklik olması skor 3 olarak değerlendirildi. Bu bağlamda; gruplar arasında karşılaştırma yapılarak kantitatif sonuç elde edildi. Her parametre aynı histolog tarafından hangi doku örneğinin hangi gruba dahil olduğunu bilmeden ve doku örnekleri içinden rastgele seçim yapılarak gerçekleştirildi.

3.10. Histolojik değerlendirilme için istatistiksel analiz

Çalışmada kapsamında istatistiksel analizler için SPSS programı (SPSS version 21,0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanıldı. Kullanılan veriler, Median (IQR) olarak ifade edildi. Gruplara ait verilerin normallik testleri sonucunda grupların normal dağılım göstermediği saptandı. Parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi ve Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanıldı. Yapılan istatistiksel değerlendirmede $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

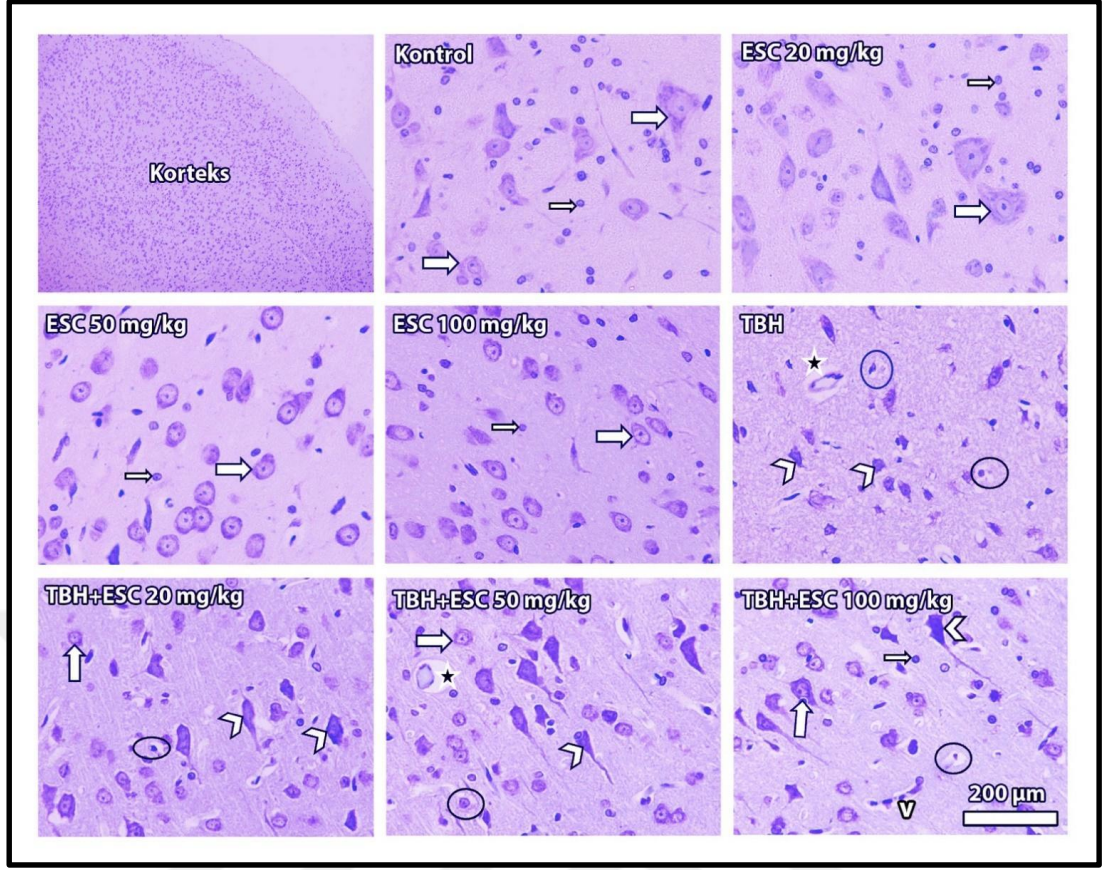
3.11. Elisa sonuçlarının İstatistiksel analizi

Çalışmanın ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ile gerçekleştirilen, Nükleer faktör-eritroid-2 ile ilişkili faktör (Nrf-2), Heme Oxygenase-1(HO-1), Tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) ölçüm sonuçlarından elde edilen bulgular değerlendirilirken SPSS 25 (Statistical Package for the Social Sciences, version 25) istatistik programı kullanıldı. Normal dağılımı Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Tanımlayıcı istatistikler sayısal değişkenler için ortalama, standart sapma olarak verildi. Sayısal verilerde iki bağımsız grubun karşılaştırılmasında bağımsız örneklem t testi, normal dağılıma uymayan verilerde Mann Whitney U, ikiden fazla grubun karşılaştırılmasında ise normal dağılıma uymayan verilerde Kruskal Wallis testi kullanıldı. $P < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Beyin Dokusunun Histolojik Değerlendirilmesi

Kontrol grubu ile kafa travması oluşturulmayan eskuletinin 20 mg/kg, 50 mg/kg ve 100 mg/kg verildiği gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark görülmediği gözlemlendi ($p>0,05$). İlgili gruplara ait kesitlerde, incelenen bölgenin genel yapısının ve nöronların normal morfolojik yapıda olduğu izlendi. Işık mikroskopik düzeyde yapılan incelemede buradaki nöronların perikaryonlarının sınırlarının belirgin olduğu saptandı. Travmatik beyin hasarı oluşturulan grupta ise kontrol grubuna nazaran çok fazla sayıda dejenere nöron ve hücresel şişmenin olduğu ve normal yapıdaki nöronların az sayıda olması dikkat çekti. Bu grupta yer alan hücrelerin hücre sınırlarının net bir şekilde ayırt edilememesinin yanı sıra dar ve koyu boyanmış sitoplazmaya sahip nöronlar ile dejenere olmuş hücre artığı olası yapılar sıkça gözlemlendi ($p<0,01$). Ayrıca, TBH+ESC 100 mg/kg grubunda hücre ve çekirdek sınırları net olarak gözlemlenebilen sağlıklı nöronlar TBH grubuna göre fazlaydı ($p<0,01$).



Fotoğraf 4.1: Sıçan beyin dokusunda korteks bölgesine ait ışık mikroskopik görüntüleri. **Kalın ok:** Sağlıklı nöron; **ince ok:** Glia hücresi; **ok başı:** Dejenere nöron; **yıldız:** vasküler dilatasyon; **çember:** hücresel şişme; **v:** damar. Krezil violet x 400

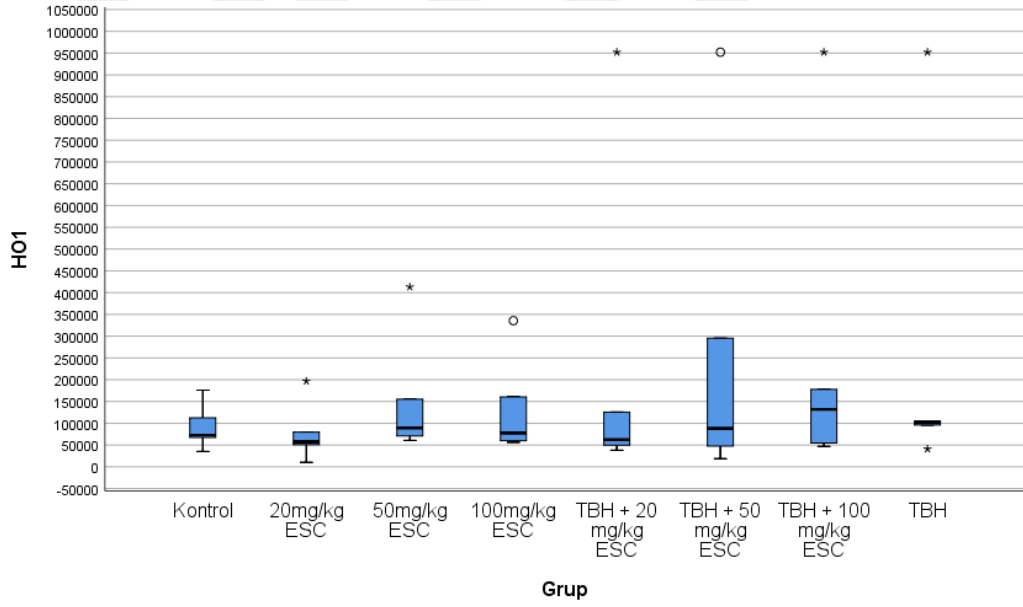
	Gruplar								P value
	Kontrol	ESC 20 mg/kg	ESC 50 mg/kg	ESC 100 mg/kg	TBH+ESC 20 mg/kg	TBH+ESC 50 mg/kg	TBH+ESC 100 mg/kg	TBH	
Nöronal dejenerasyon Med (IQR)	0 (0-0,25) ^a	0.5 (0-1,25) ^{ac}	0.5 (0-1,25) ^{ac}	0.5 (0-1,25) ^{ac}	0.5 (0-2) ^{abc}	1 (1-2) ^{abc}	0 (0-0,5) ^{ac}	3 (3-3) ^{bd}	0,002
Vasküler dilatasyon Med (IQR)	1 (0-1) ^a	1 (0-1,25) ^{ac}	0,5 (0-2) ^{ac}	1 (0,75-1,25) ^{ac}	1 (0,75-2,25) ^{abc}	1 (0-2,25) ^{abc}	1 (0-1) ^{ac}	3 (2,75-3) ^{bd}	0,018
Hücresel şişme Med (IQR)	1 (0,75-1) ^a	1 (0-2) ^{ac}	1 (0-2) ^{ac}	1 (0-2) ^{ac}	1,5 (0,75-2,25) ^{abc}	1 (0-3) ^{abc}	1 (0-1,25) ^{ac}	3 (2,75-3) ^{bd}	0,039

Tablo 4.2 : Deney gruplarının histopatolojik değişimlere göre karşılaştırılması

4.2. Travma Oluşturulan Beyin Dokusunda HO-1 Düzeyinin Ölçülmesi (ELİSA)

HO-1	Grup1(Kontrol):	Grup 2(ESC 20mg):	Grup 3(ESC 50 mg):	Grup 4(ESC 100 mg):	Grup 5(ESC 20mg+TBH):	Grup 6(ESC 50mg+TBH):	Grup 7(ESC 100mg+TBH):
1. Rat	70.100	10.017	155.123	335.466	125.467	94.882	177.811
2. Rat	176.081	196.635	60.621	59.843	49.656	47.347	46.906
3. Rat	35.223	79.492	79.633	56.172	69.394	295.199	177.375
4. Rat	67.106	62.504	98.931	81.020	55.040	81.557	54.573
5. Rat	75.978	52.541	413.015	160.463	952.152	952.152	952.152
6. Rat	112.380	50.761	70.895	73.952	38.070	18.445	86.428

Tablo 4.2 : Ratların ELİSA yöntemi ile ölçülen HO-1 düzeyleri



Tablo 4.3 : ELİSA yöntemi ile ölçülen HO-1 düzeylerinin karşılaştırılması

20 mg/kg ESC, 50mg/kg ESC ve 100mg/kg ESC gruplarının HO1 değerleri arasında istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p=0,220$)

TBH + 20 mg/kg ESC, TBH + 50 mg/kg ESC, TBH + 100 mg/kg ESC ve TBH gruplarının HO1 değerleri arasında istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p=0,845$)

20 mg/kg ESC grubuyla TBH + 20 mg/kg ESC grubu arasında HO1 değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p=0,818$)

50 mg/kg ESC grubuyla TBH + 50 mg/kg ESC grubu arasında HO1 değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p_{10}=0,873$)

100 mg/kg ESC grubuyla TBH + 100 mg/kg ESC grubu arasında HO1 değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p_{13}=0,749$)

Kontrol grubuyla 20 mg/kg ESC grubu arasında HO1 değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p_{16}=0,675$)

Kontrol grubuyla 50 mg/kg ESC grubu arasında HO1 değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p_{19}=0,423$)

Kontrol grubuyla 100 mg/kg ESC grubu arasında HO1 değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p_{22}=0,749$)

Kontrol grubuyla TBH + 20 mg/kg ESC grubu arasında HO1 değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p_{25}=0,749$)

Kontrol grubuyla TBH + 50 mg/kg ESC grubu arasında HO1 değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p_{28}=0,631$)

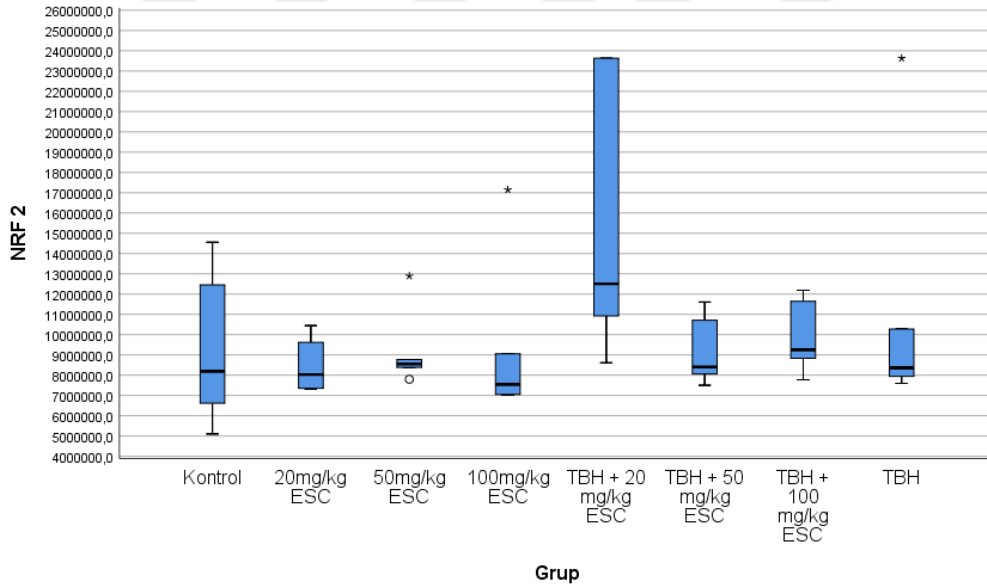
Kontrol grubuyla TBH + 100 mg/kg ESC grubu arasında HO1 değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p_{31}=0,337$)

Kontrol grubuyla TBH grubu arasında HO1 değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p_{34}=0,423$)

4.3. Travma Oluşturulan Beyin Dokusunda NRF 2 Düzeyinin Ölçülmesi (ELİSA)

NRF 2	Grup1(Kontrol):	Grup 2(ESC 20mg):	Grup 3(ESC 50 mg):	Grup 4(ESC 100 mg):	Grup 5(ESC 20mg+TBH):	Grup 6(ESC 50mg+TBH):	Grup 7(ESC 100mg+TBH):
1. Rat	8.770.348	8.046.944	8.772.729	7.136.185	10.920.034	7.499.854	7.770.785
2. Rat	7.609.731	8.017.388	8.446.305	7.055.389	8.610.576	8.193.533	9.514.017
3. Rat	6.616.266	7.301.669	7.797.938	7.013.157	11.580.812	8.621.864	8.997.952
4. Rat	12.455.716	9.620.066	8.383.107	9.052.481	13.432.470	8.063.702	11.640.976
5. Rat	5.103.620	7.352.559	12.892.670	17.145.654	23.631.092	11.604.745	12.187.745
6. Rat	14.559.263	10.443.761	8.655.993	7.953.759	23.631.092	10.708.909	8.835.328

Tablo 4.4: Ratların ELİSA yöntemi ile ölçülen Nrf-2 düzeyleri



Tablo 4.5: ELİSA yöntemi ile ölçülen Nrf-2 düzeylerinin karşılaştırılması

20 mg/kg ESC, 50mg/kg ESC ve 100mg/kg ESC gruplarının NRF 2 değerleri arasında istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p=0,431$)

TBH + 20 mg/kg ESC, TBH + 50 mg/kg ESC, TBH + 100 mg/kg ESC ve TBH gruplarının NRF 2 değerleri arasında istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p=0,120$)

20 mg/kg ESC grubuyla TBH + 20 mg/kg ESC grubu arasında NRF 2 değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p_9=0,053$)

50 mg/kg ESC grubuyla TBH + 50 mg/kg ESC grubu arasında NRF 2 değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p_{11}=0,631$).

100 mg/kg ESC grubuyla TBH + 100 mg/kg ESC grubu arasında NRF 2 değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p_{14}=0,200$).

Kontrol grubuyla 20 mg/kg ESC grubu arasında NRF 2 değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p_{17}=0,661$).

Kontrol grubuyla 50 mg/kg ESC grubu arasında NRF 2 değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p_{20}=0,631$).

Kontrol grubuyla 100 mg/kg ESC grubu arasında NRF 2 değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p_{23}=0,873$).

Kontrol grubuyla TBH + 20 mg/kg ESC grubu arasında NRF 2 değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p_{26}=0,076$).

Kontrol grubuyla TBH + 50 mg/kg ESC grubu arasında HO1, NRF 2 ve TNF Alfa değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p_{29}=0,966$).

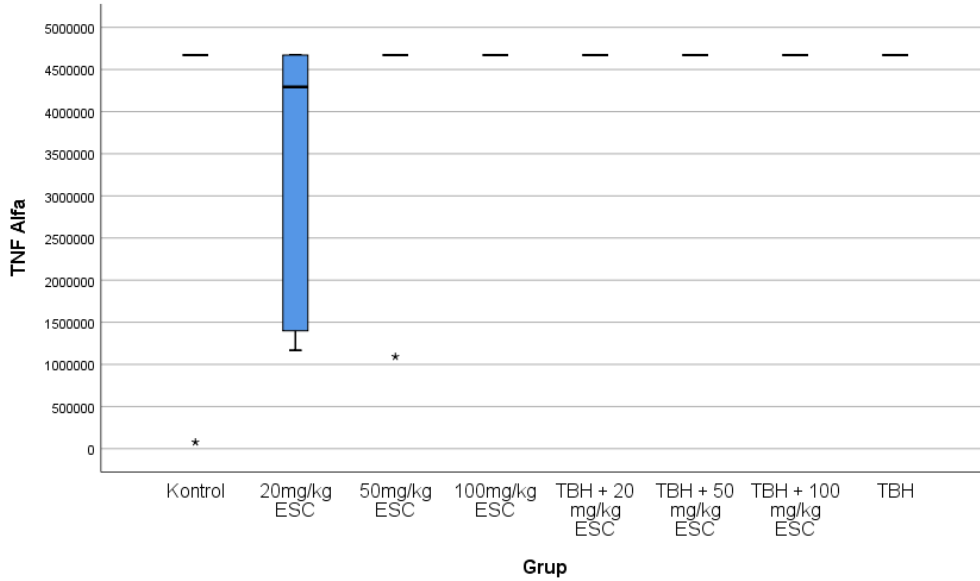
Kontrol grubuyla TBH + 100 mg/kg ESC grubu arasında NRF 2 değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p_{32}=0,705$).

Kontrol grubuyla TBH grubu arasında NRF 2 değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($P_{35}=0,631$).

4.4. Travma Oluşturulan Beyin Dokusunda TNF-Alfa Düzeyinin Ölçülmesi (ELİSA)

TNF-Alfa	Grup1(Kontrol):	Grup 2(ESC 20mg):	Grup 3(ESC 50 mg):	Grup 4(ESC 100 mg):	Grup 5(ESC 20mg+TBH):	Grup 6(ESC 50mg+TBH):	Grup 7(ESC 100mg+TBH):
1. Rat	4.670.806	1.168.177	4.670.806	4.670.806	4.670.806	4.670.806	4.670.806
2. Rat	4.670.806	4.670.806	4.670.806	4.670.806	4.670.806	4.670.806	4.670.806
3. Rat	4.670.806	1.398.283	4.670.806	4.670.806	4.670.806	4.670.806	4.670.806
4. Rat	77.278	4.670.806	4.670.806	4.670.806	4.670.806	4.670.806	4.670.806
5. Rat	4.670.806	4.670.806	1.091.814	4.670.806	4.670.806	4.670.806	4.670.806
6. Rat	4.670.806	3.915.804	4.670.806	4.670.806	4.670.806	4.670.806	4.670.806

Tablo 4.6: Ratların ELİSA yöntemi ile ölçülen TNF-Alfa düzeyleri



Tablo 4.7: ELİSA yöntemi ile ölçülen TNF-Alfa düzeylerinin karşılaştırılması

20 mg/kg ESC, 50mg/kg ESC ve 100mg/kg ESC gruplarının TNF Alfa değerleri arasında istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p=0,164$)

TBH + 20 mg/kg ESC, TBH + 50 mg/kg ESC, TBH + 100 mg/kg ESC ve TBH gruplarının TNF Alfa değerleri arasında istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p=1,00$).

20 mg/kg ESC grubuyla TBH + 20 mg/kg ESC grubu arasında TNF Alfa değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p=0,59$).

50 mg/kg ESC grubuyla TBH + 50 mg/kg ESC grubu arasında TNF Alfa değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p_{12}=0,317$).

100 mg/kg ESC grubuyla TBH + 100 mg/kg ESC grubu arasında TNF Alfa değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p_{15}=1,00$).

Kontrol grubuyla 20 mg/kg ESC grubu arasında TNF Alfa değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p_{18}=0,391$).

Kontrol grubuyla 50 mg/kg ESC grubu arasında TNF Alfa değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p_{21}=0,402$).

Kontrol grubuyla 100 mg/kg ESC grubu arasında TNF Alfa değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p_{24}=0,317$).

Kontrol grubuyla TBH + 20 mg/kg ESC grubu arasında TNF Alfa değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p_{27}=0,317$).

Kontrol grubuyla TBH + 50 mg/kg ESC grubu arasında TNF Alfa değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p_{30}=0,317$).

Kontrol grubuyla TBH + 100 mg/kg ESC grubu arasında TNF Alfa değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p_{33}=0,317$).

Kontrol grubuyla TBH grubu arasında TNF Alfa değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmedi ($p_{36}=0,317$).

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda eskuletinin serbest düşme ağırlık modeli yöntemiyle kafa travması oluşturulan ratlarda sekonder travmatik beyin hasarına neden olan oksidatif stres ve aşırı inflamasyona bağlı değişiklikler üzerindeki etkisini araştırmayı amaçladık. Litaratürde travmatik beyin hasarında antioksidan seviyelerinin artırılmasının inflamasyonu ve bununla birlikte sekonder beyin hasarını azalttığı, bilişsel ve fonksiyonel iyileşmeye neden olduğunu gösteren bir çok çalışma bulunmaktadır.⁴⁷⁻⁴⁹

Eskuletin antioksidan, anti inflamatuvar, anti apoptotik, anti kanser, anti diyabetik, nöroprotektif etkilere sahip olan doğal bir kumarindir. Çin geleneksel tıbbında kullanılan eskuletin kanser, diyabet, ateroskleroz, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, alkol-dışı yağlı karaciğer hastalığı gibi birçok hastalıkta kullanılması beklenen bir tedavi seçeneği olma yolunda ilerlemektedir.^{19-23,51}

Sekonder travmatik beyin hasarı patofizyolojisinin önemli bir bileşeni olan oksidatif stres; nöronal hasar, enflamasyon, hücre ölümü ve nörolojik işlev bozukluğuna katkıda bulunan bir faktördür. Bu nedenle oksidatif stres belirteçleri, travmatik beyin hasarının şiddeti ve sonuçlarını değerlendirmek için kullanılabilir.

24

İnvitro yapılan bir deneyde, kafa travması sonrası aktifleşen Nrf-2/HO-1 yolunun oksidatif stresi ve nekroptozu azalttığı travmatik sekonder beyin hasarında aşırı inflamatuvar cevabı azalttığı görülmüştür. Nrf-2/HO-1 yolu inflamatuvar cevabı ve oksidatif stres seviyesini gösterebilir bu nedenle sekonder travmatik beyin hasarının seviyesi hakkında bilgi verebilir.⁷⁰

TNF- α sistemik inflamasyonda görev alan ve inflamasyon durumlarında kanda ilk saptanan sitokindir. TNF- α NF- $\kappa\beta$ üzerinden inflamatuvar süreçleri başlatır.⁶⁰

Eskuletin de NF- $\kappa\beta$ üzerinden anti-inflamatuvar etkisini gösterir. TNF- α beyin dokusundaki seviyesi aşırı inflamatuvar yanıtı gösterdiği için eskuletinin anti-inflamatuvar etkisini göstermekte kullanılabilecek iyi bir belirteçtir.

Wang C. Ve arkadaşlarının farelerde orta serebral arter oklüzyonu modeli ile iskemi/reperfüzyon hasarı oluşturarak yapılan çalışmada eskuletinin intraperitoneal uygulanmasının intraventriküler uygulama ile aynı sonuçlara yol açtığı görülmüştür. Çalışmamızda bu çalışmayı referans alarak eskuletinin intraperitoneal uygulamayı tercih ettik.⁵³

Çalışmamızda kullandığımız eskületin dozları Wang C. Ve arkadaşlarının farelerde orta serebral arter oklüzyonu modeli ile iskemi/reperfüzyon hasarı oluşturarak yapılan çalışmada kullandıkları 10mg/kg, 50mg/kg, 100mg/kg intraperitoneal dozlar örnek alınarak belirlenmiştir.⁵³

Kontrol grubu ve travmatik beyin hasarı oluşturulmadan intraperitoneal eskületin verilen gruplarda (ESC 20mg/kg, ESC 50 mg/kg, ESC 100mg/kg) nöronal dejenerasyon, vasküler dilatasyon ve hücresel şişme gibi histolojik değerlendirme parametreleri açısından değişiklik saptanmadı. Kontrol grubu ve travma oluşturulmadan intraperitoneal eskületin verilen gruplarda nöronların ve çekirdek sınırlarının belirgin olduğu, nöronların yapısının doğal olduğu görülmüştür. Travma oluşturulmayan gruplarda sekonder travmatik beyin hasarı oluşmamış ve nöronal dejenerasyon, vasküler dilatasyon ve hücresel şişme gibi histolojik değişikliklere rastlanmamıştır. Kontrol grubu ile travmatik beyin hasarı oluşturulmayıp eskületin verilen gruplar arasında histolojik incelemede fark olmaması, travma oluşturulmayan gruplarda eskületin verilmesinin sekonder travmatik beyin hasarı oluşturulmayan gruplarda eskületinin histolojik değişikliğe yol açmadığı görülmüştür. Eskületinin daha farklı dozlarda ve daha büyük örneklem içeren çalışmalarda etkinliğinin araştırılması açısından yapılacak farklı çalışmalara ihtiyacımız vardır.

Travmatik beyin hasarı oluşturulan ve eskületin verilmeyen grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında travmatik beyin hasarı oluşturulan ve eskületin verilmeyen ratlarda çok sayıda nöron dejenerasyonu, hücresel şişmenin olduğu ve normal histolojik yapıdaki nöronların daha az sayıda olduğu görüldü. Bu grupta ayrıca hücre sınırlarının net şekilde ayırt edilemediği, ve koyu boyanmış sitoplâzmaya sahip nöronlar ile dejenere olmuş hücre artışı olması muhtemel yapılar daha sık görülmüştür. Bu grupta sekonder travmatik beyin hasarı oluşturulup eskületin verilmediği için sadece hasara ait histopatolojik değişiklikler görülmüştür. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Travmatik beyin hasarı oluşturulan ve eskületin verilmeyen grupta bu histopatolojik değişikliklerin görülmesi kullandığımız travma modelinin başarılı olduğunu göstermektedir.⁷¹

Travmatik beyin hasarı oluşturulan ve eskületin verilmeyen grup ile travmatik beyin hasarı oluşturulan ve eskületin verilen gruplar (ESC 20mg/kg+TBH, ESC 50 mg/kg+TBH, ESC 100mg/kg+TBH) nöronal dejenerasyon, vasküler dilatasyon ve

hücresel şişme gibi histolojik değerlendirme parametreleri göz önüne alınarak karşılaştırıldığında; eskuletin verilen gruplarda eskuletin verilmeyen gruplara göre nörodejenerasyon ve hücresel şişme gibi histopatolojik değişikliklere daha az rastlanmıştır. Eskuletinin nöroprotektif etkisi sekonder beyin hasarı olan ratlarda histopatolojik olarak gösterilmiştir. Travmatik beyin hasarı oluşturulan ve 100 mg/kg eskuletin verilen grupta hücre ve çekirdek sınırları net olarak gözlenebilen sağlıklı nöronların diğer gruplara göre daha fazla olduğu görülmüştür. Çalışmamızda travmatik sekonder beyin hasarı oluşturulan ve intraperitoneal eskuletin verilen gruplarda eskuletin dozunun artırılması ile nöroprotektif etkisinin arttığı görülmüştür. Travmatik sekonder beyin hasarında eskuletinin nöroprotektif etkinliğinin farklı dozlarda araştırıldığı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anti-oksidan anti-inflamatuar ve nöroprotektif etkileri olan eskuletinin orta serebral arter oklüzyonu ile oluşturulan iskemi/reperfüzyon hasarı üzerindeki koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, eskuletinin 100mg/kg, 50mg/kg intraperitoneal verilmesinin iskemi/reperfüzyon hasarı üzerindeki nöroprotektif etkilerinin olduğu bulunmuştur.⁵² Çalışmamız literatürle uyumlu olmakla beraber ileri düzeyde yapılacak çalışmalarla bu konunun daha da aydınlatılmasının bilimsel literatüre geniş ölçüde katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

Çalışmamızda Nrf-2 ve Nrf-2 sinyal yolu elemanlarından HO-1 travma sonrası kurban edilen ratların beyin dokularından Elisa yöntemiyle çalışılmıştır.

Kontrol grubu ile kafa travması oluşturulmamış ve 20 mg/kg, 50mg/kg, 100mg/kg dozlarda intraperitoneal eskuletin verilmiş gruplar karşılaştırılmış ve gruplar arasında Nrf2 ve HO1 değerlerinde anlamlı fark saptanmamıştır. Kafa travması oluşturulmayan ve 20 mg/kg, 50mg/kg, 100mg/kg dozlarda intraperitoneal eskuletin verilen gruplar kendi içlerinde karşılaştırıldığında verilen eskuletin dozuna bağlı Nrf2, HO1 değerlerinde artış saptanmamıştır. Sekonder travmatik beyin hasarı olmayan beyin dokusunda eskuletinin bu yolu aktive etmediği görülmüştür. Eskuletinin Nrf2/HO-1 sinyal yoluaktivasyonunu etkilediğini gösteren yeterli sayıda çalışma bulunmamakla beraber Rubio ve arkadaşları lösemi hücrelerinde eskuletinin bu yolu aktive ettiğini göstermiştir.

Kontrol grubu ile kafa travması oluşturulan ve 20 mg/kg, 50mg/kg, 100mg/kg intraperitoneal eskuletin verilen gruplar karşılaştırıldığında Nrf2 ve HO1 değerlerinde artış saptanmadı. Kafa travması oluşturulan ve 20 mg/kg, 50mg/kg,

100mg/kg intraperitoneal eskületin verilen gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında Nrf2 ve HO1 değerlerinde doza bağımlı anlamlı bir artış görülmedi. Travmaya oluşturulan gruplar içerisinde farklı dozlarda eskületin verilen gruplar kendi aralarında ve kontrol grubuyla yapılan karşılaştırmalarında Nrf2-HO-1 değerleri açısından anlamlı bir fark olmadığı görülmüş. Bu da travmaya maruz kalan gruplarda eskületinin Nrf2 yolu üzerinden etkisinin kısıtlı olduğu yada olmadığını düşündürmüştür. Çalışmamız literatürle uyumlu olmayıp benzer şekilde kafa travması oluşturulan farklı ajanlar ile antioksidan anti inflamatuvar yanıtı ölçüldüğü çalışmalarda Nrf2/HO-1 düzeylerinin arttığı gösterilmiştir.⁷⁶⁻⁷⁸

Kafa travması oluşturulan ve 20, 50, 100 mg/kg intraperitoneal eskületin verilen gruplar ile kafa travması oluşturulmayan ve 20, 50, 100 mg/kg intraperitoneal eskületin verilen gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında travmaya bağılı Nrf2 ve HO1 değerlerinde anlamlı değişim saptanmadı.

Aynı dozda eskületin uygulanan kafa travması oluşturulan ve kafa travması oluşturulmayan gruplarda, eskületinin çalışmamızda uygulanan doz aralığında Nrf2/HO-1 sinyal yolu aktivasyonu yapmadığı görülmüştür. Bu bize eskületinin Nrf2/HO-1 sinyal yolu üzerindeki etkisinin kısıtlı olduğu yada etkisinin olmadığını düşündürmektedir. Gelecekte daha yüksek dozlarda eskületin verilerek Nrf-2/HO-1 etkinliğinin araştırıldığı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Literatürde kafa travmasında bağılı sekonder hasarda eskületinin anti inflamatuvar ve antioksidan etkinliğinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamıştır. Bu sebeple sonuçlarımızın literatürle uyumu hakkında tarafımızca bir yorum yapılamamaktadır. Her ne kadar kafa travması ve sekonder travmatik beyin hasarı ile ilgili olmasa da eskületinin farklı hastalıklarda Nrf2 sinyal yolunu aktive ettiği gösterilmiştir.⁷⁹ Bu konunun daha da aydınlatılması bilimsel literatüre geniş ölçüde katkı sağlaması açısından önem arz eder.

TNF Alfa değerlerinin travmaya maruz kalan veya travmaya maruz kalmayan gruplarda aynı değerleri vermesi ve gruplar arasında istatistiksel farkın bulunmaması Elisa yöntemiyle çalışılan materyal ya da kitlerde sorun olabileceğini düşündürmüştür. TNF Alfa değerleri tartışmaya alınmamıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda eskuletinin serbest düşme ağırlık modeli yöntemiyle kafa travması oluşturulan ratlarda sekonder travmatik beyin hasarına neden olan oksidatif stres ve aşırı inflamasyona bağlı değişiklikler üzerindeki etkisini araştırdık.

Kullandığımız kafa travması modelinde travmatik beyin hasarı oluşturulan ve eskuletin verilmeyen grup ile, kontrol grubu veya eskuletin verilen diğer gruplara göre daha fazla dejenere nöron hücresel şişme olduğu görülmüş ve kullanılan kafa travması modelinde rat kaybı olmadan travma modeli başarılı bir şekilde oluşturulmuştur.

Çalışmamızın histolojik incelemesinde 100 mg/kg eskuletin verilen ve kafa travması oluşturulan grupta hücre ve çekirdek sınırları net olarak gözlenebilen sağlıklı nöronların diğer gruplara göre daha fazla olduğu görüldü. Nöronal dejenerasyon, vasküler dilatasyon ve hücresel şişme gibi değişikliklerin travmatik beyin hasarı oluşturulan ve eskuletin verilmeyen grupta en fazla olduğu görülmüştür. Eskuletinin nöroprotektif etkisinin en fazla 100 mg/kg eskuletin uygulanan grupta gördük.

Antioksidan mekanizmalarının ana düzenleyicisi Nrf2 ve Nrf2 sinyal yolu enzimlerinden HO-1 travma sonrası kurifiye edilen ratların beyin dokularından elisa yöntemi ile çalışılmıştır.

Çalışmamızdaki kontrol grubu ile kafa travması oluşturulmadan intraperitoneal 20, 50, 100 mg/kg eskuletinin intraperitoneal verilen gruplarda Nrf2 HO-1 değerlerinde artış olmadığı görülmüş. Travmatik sekonder beyin hasarı oluşturulmayan gruplarda eskuletinin Nrf2/HO-1 üzerinde etkisi olmadığını gördük.

Çalışmamızdaki kafa travması oluşturulan ve intraperitoneal 20 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg eskuletin uygulanan gruplar kendi aralarında ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; Nrf2 sinyal yolu aktivasyonu ve HO-1 düzeylerinde artış saptanmamıştır. Eskuletinin travmada farklı dozlardaki etkisini görmek amacıyla travmaya maruz kalan ve kalmayan gruplarda aynı doz eskuletin verilen gruplar karşılaştırıldığında, Nrf2 sinyal yolu aktivasyonu ve HO-1 düzeylerinde artış saptanmamıştır.

Çalışmamızda kafa travmasına bağlı sekonder hasar gelişen ratlarda eskuletinin nöroprotektif etkisini Tnf-alfa, Nrf-2 ve HO-1 biyobelirteçleri ile gösteremedik. Bu konuda farklı biyobelirteçlerle daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda kafa travması oluşturulan ratlarda eskuletin uygulaması travmaya maruziyetten sonra dakikalar içerisinde yapıldı. Sekonder travmatik beyin hasarı kafa travmasından saatler sonra ortaya çıkan ve etkisi 6 aya kadar devam eden bir patolojik süreçtir. Çalışmamızda eskuletinin doz bağımlı etkilerinin değişmesinin ve biyobelirteçlerde anlamlı değişiklikler olmamasının bu süre ile ilgili olabileceğini düşünmekteyiz. Bu çalışmamızla ilgili ciddi bir kısıtlılık olarak karşımıza çıkmıştır. Gelecekte yapılacak çalışmalarda farklı eskuletin tedavi rejimleri ve uygulama süreleri ile farklı çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Eskuletinin kafa travmasındaki nöroprotektif etki mekanizması hakkındaki bilgilerimiz sınırlı olduğundan eskuletin kafa travmasına bağlı sekonder beyin hasarındaki etkilerini araştırmak için yeni ve daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Injury : a leading cause of the global burden of disease : 2000. Accessed December 27, 2023. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/injury-a-leading-cause-of-the-global-burden-of-disease-2000>
2. Evans JA, van Wessem KJP, McDougall D, Lee KA, Lyons T, Balogh ZJ. Epidemiology of traumatic deaths: comprehensive population-based assessment. *World J Surg.* 2010;34(1):158-163. doi:10.1007/s00268-009-0266-1
3. Karasu A, Sabancı PA, Cansever T, et al. Kafa travmalı hastalarda epidemiyolojik çalışma. *Ulus Travma Ve Acil Cerrahi Derg.* 2009;15(2):159-163.
4. Gökalp HZ, Erongun U. *Nöroşirürji Ders Kitabı. Ankara: Mars Matbaası, 1988: 7-31.*
5. Park E, Bell JD, Baker AJ. Traumatic brain injury: can the consequences be stopped? *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can.* 2008;178(9):1163-1170. doi:10.1503/cmaj.080282
6. Härtl R, Gerber LM, Iacono L, Ni Q, Lyons K, Ghajar J. Direct transport within an organized state trauma system reduces mortality in patients with severe traumatic brain injury. *J Trauma.* 2006;60(6):1250-1256; discussion 1256. doi:10.1097/01.ta.0000203717.57821.8d
7. Cellular and Molecular Mechanisms of Secondary Neuronal Injury following Traumatic Brain Injury - Translational Research in Traumatic Brain Injury - NCBI Bookshelf. Accessed December 27, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326718/>
8. Akamatsu Y, Hanafy KA. Cell Death and Recovery in Traumatic Brain Injury. *Neurotherapeutics.* 2020;17(2):446-456. doi:10.1007/s13311-020-00840-7
9. Cornelius C, Crupi R, Calabrese V, et al. Traumatic brain injury: oxidative stress and neuroprotection. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19(8):836-853. doi:10.1089/ars.2012.4981
10. Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth.* 2007;99(1):4-9. doi:10.1093/bja/aem131

11. Maas AIR, Roozenbeek B, Manley GT. Clinical trials in traumatic brain injury: past experience and current developments. *Neurother J Am Soc Exp Neurother.* 2010;7(1):115-126. doi:10.1016/j.nurt.2009.10.022
12. Wang HC, Lin YJ, Shih FY, et al. The Role of Serial Oxidative Stress Levels in Acute Traumatic Brain Injury and as Predictors of Outcome. *World Neurosurg.* 2016;87:463-470. doi:10.1016/j.wneu.2015.10.010
13. Herbert V, Shaw S, Jayatilleke E, Stopler-Kasdan T. Most free-radical injury is iron-related: it is promoted by iron, hemin, holoferritin and vitamin C, and inhibited by desferoxamine and apoferritin. *Stem Cells Dayt Ohio.* 1994;12(3):289-303. doi:10.1002/stem.5530120305
14. Abdul-Muneer PM, Chandra N, Haorah J. Interactions of oxidative stress and neurovascular inflammation in the pathogenesis of traumatic brain injury. *Mol Neurobiol.* 2015;51(3):966-979. doi:10.1007/s12035-014-8752-3
15. DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem.* 2016;139 Suppl 2(Suppl 2):136-153. doi:10.1111/jnc.13607
16. Hegdekar N, Lipinski MM, Sarkar C. N-Acetyl-L-leucine improves functional recovery and attenuates cortical cell death and neuroinflammation after traumatic brain injury in mice. *Sci Rep.* 2021;11(1):9249. doi:10.1038/s41598-021-88693-8
17. Zhao P, Li C, Chen B, et al. Up-regulation of CHMP4B alleviates microglial necroptosis induced by traumatic brain injury. *J Cell Mol Med.* 2020;24(15):8466-8479. doi:10.1111/jcmm.15406
18. Cheng YJ, Tian XL, Zeng YZ, et al. Esculetin protects against early sepsis via attenuating inflammation by inhibiting NF- κ B and STAT1/STAT3 signaling. *Chin J Nat Med.* 2021;19(6):432-441. doi:10.1016/S1875-5364(21)60042-0
19. Traykova M, Kostova I. Coumarin Derivatives and Oxidative Stress. *Int J Pharmacol.* 2005;1. doi:10.3923/ijp.2005.29.32
20. Kok SH, Yeh CC, Chen ML, Kuo MYP. Esculetin enhances TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation in human oral

- cancer SAS cells. *Oral Oncol.* 2009;45(12):1067-1072. doi:10.1016/j.oraloncology.2009.07.018
21. Witaicenis A, Seito LN, Di Stasi LC. Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Chem Biol Interact.* 2010;186(2):211-218. doi:10.1016/j.cbi.2010.03.045
 22. Kim S hyung, Kang K ah, Zhang R, et al. Protective effect of esculetin against oxidative stress-induced cell damage via scavenging reactive oxygen species. *Acta Pharmacol Sin.* 2008;29(11):1319-1326. doi:10.1111/j.1745-7254.2008.00878.x
 23. He Y, Li C, Ma Q, Chen S. Esculetin inhibits oxidative stress and apoptosis in H9c2 cardiomyocytes following hypoxia/reoxygenation injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;501(1):139-144. doi:10.1016/j.bbrc.2018.04.195
 24. Fesharaki-Zadeh A. Oxidative Stress in Traumatic Brain Injury. *Int J Mol Sci.* 2022;23(21):13000. doi:10.3390/ijms232113000
 25. Shen B, Zhao C, Wang Y, et al. Aucubin inhibited lipid accumulation and oxidative stress via Nrf2/HO-1 and AMPK signalling pathways. *J Cell Mol Med.* 2019;23(6):4063-4075. doi:10.1111/jcmm.14293
 26. Qiu YL, Cheng XN, Bai F, Fang LY, Hu HZ, Sun DQ. Aucubin protects against lipopolysaccharide-induced acute pulmonary injury through regulating Nrf2 and AMPK pathways. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* 2018;106:192-199. doi:10.1016/j.biopha.2018.05.070
 27. Kraus JF, Black MA, Hessol N, et al. The incidence of acute brain injury and serious impairment in a defined population. *Am J Epidemiol.* 1984;119(2):186-201. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a113737
 28. *Tintinalli's Emergency Medicine A Comprehensive Study Guide, 9th Edition* Tintinalli, Ma, Yealy, Meckler, Stapczynski, Cline, and Thomas ISBN: 1260019934 Page:1683- 1695.
 29. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015;4:180-183. doi:10.1016/j.redox.2015.01.002

30. Johnson WD, Griswold DP. Traumatic brain injury: a global challenge. *Lancet Neurol.* 2017;16(12):949-950. doi:10.1016/S1474-4422(17)30362-9
31. Maas AIR, Menon DK, Adelson PD, et al. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *Lancet Neurol.* 2017;16(12):987-1048. doi:10.1016/S1474-4422(17)30371-X
32. Lingsma HF, Roozenbeek B, Steyerberg EW, Murray GD, Maas AIR. Early prognosis in traumatic brain injury: from prophecies to predictions. *Lancet Neurol.* 2010;9(5):543-554. doi:10.1016/S1474-4422(10)70065-X
33. Kaur P, Sharma S. Recent Advances in Pathophysiology of Traumatic Brain Injury. *Curr Neuroparmacol.* 2018;16(8):1224-1238. doi:10.2174/1570159X15666170613083606
34. Friedman JA, Ebersold MJ, Quast LM. Post-traumatic cerebrospinal fluid leakage. *World J Surg.* 2001;25(8):1062-1066. doi:10.1007/s00268-001-0059-7
35. ABC of Imaging in Trauma | Wiley. Accessed December 27, 2023. <https://www.wiley.com/en-us/ABC+of+Imaging+in+Trauma-p-9781444327205>
36. Warburton AL, Shepherd JP. Development, utilisation, and importance of accident and emergency department derived assault data in violence management. *Emerg Med J EMJ.* 2004;21(4):473-477.
37. Hartings JA, Bullock MR, Okonkwo DO, et al. Spreading depolarisations and outcome after traumatic brain injury: a prospective observational study. *Lancet Neurol.* 2011;10(12):1058-1064. doi:10.1016/S1474-4422(11)70243-5
38. Yoles E, Wheeler LA, Schwartz M. Alpha2-adrenoreceptor agonists are neuroprotective in a rat model of optic nerve degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40(1):65-73.
39. Zeng Z, Zhang Y, Jiang W, He L, Qu H. Modulation of autophagy in traumatic brain injury. *J Cell Physiol.* 2020;235(3):1973-1985. doi:10.1002/jcp.29173
40. Ferreira APO, Rodrigues FS, Della-Pace ID, et al. The effect of NADPH-oxidase inhibitor apocynin on cognitive impairment

- induced by moderate lateral fluid percussion injury: role of inflammatory and oxidative brain damage. *Neurochem Int.* 2013;63(6):583-593. doi:10.1016/j.neuint.2013.09.012
41. Sande A, West C. Traumatic brain injury: a review of pathophysiology and management. *J Vet Emerg Crit Care San Antonio Tex* 2001. 2010;20(2):177-190. doi:10.1111/j.1476-4431.2010.00527.x
 42. Eastman CL, D'Ambrosio R, Ganesh T. Modulating neuroinflammation and oxidative stress to prevent epilepsy and improve outcomes after traumatic brain injury. *Neuropharmacology.* 2020;172:107907. doi:10.1016/j.neuropharm.2019.107907
 43. Floyd RA, Carney JM. Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann Neurol.* 1992;32 Suppl:S22-27. doi:10.1002/ana.410320706
 44. Tyurin VA, Tyurina YY, Borisenko GG, et al. Oxidative stress following traumatic brain injury in rats: quantitation of biomarkers and detection of free radical intermediates. *J Neurochem.* 2000;75(5):2178-2189. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0752178.x
 45. Wang H, Zhou XM, Wu LY, et al. Aucubin alleviates oxidative stress and inflammation via Nrf2-mediated signaling activity in experimental traumatic brain injury. *J Neuroinflammation.* 2020;17(1):188. doi:10.1186/s12974-020-01863-9
 46. Kalra S, Malik R, Singh G, et al. Pathogenesis and management of traumatic brain injury (TBI): role of neuroinflammation and anti-inflammatory drugs. *Inflammopharmacology.* 2022;30(4):1153-1166. doi:10.1007/s10787-022-01017-8
 47. Wang J, Jiang C, Zhang K, et al. Melatonin receptor activation provides cerebral protection after traumatic brain injury by mitigating oxidative stress and inflammation via the Nrf2 signaling pathway. *Free Radic Biol Med.* 2019;131:345-355. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.014
 48. Fang J, Wang H, Zhou J, et al. Baicalin provides neuroprotection in traumatic brain injury mice model through Akt/Nrf2 pathway. *Drug Des Devel Ther.* 2018;12:2497-2508. doi:10.2147/DDDT.S163951

49. Zeng J, Chen Y, Ding R, et al. Isoliquiritigenin alleviates early brain injury after experimental intracerebral hemorrhage via suppressing ROS- and/or NF- κ B-mediated NLRP3 inflammasome activation by promoting Nrf2 antioxidant pathway. *J Neuroinflammation*. 2017;14(1):1-19. doi:10.1186/s12974-017-0895-5
50. Zhang L, Xie Q, Li X. Esculetin: A review of its pharmacology and pharmacokinetics. *Phytother Res*. 2022;36(1):279-298. doi:10.1002/ptr.7311
51. Tymianski M. Emerging mechanisms of disrupted cellular signaling in brain ischemia. *Nat Neurosci*. 2011;14(11):1369-1373. doi:10.1038/nn.2951
52. Lee CR, Shin EJ, Kim HC, Choi YS, Shin T, Wie MB. Esculetin inhibits N-methyl-D-aspartate neurotoxicity via glutathione preservation in primary cortical cultures. *Lab Anim Res*. 2011;27(3):259-263. doi:10.5625/lar.2011.27.3.259
53. Wang C, Pei A, Chen J, et al. A natural coumarin derivative esculetin offers neuroprotection on cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *J Neurochem*. 2012;121(6):1007-1013. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07744.x
54. Zhao X, Sun G, Zhang J, et al. Transcription factor Nrf2 protects the brain from damage produced by intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2007;38(12):3280-3286. doi:10.1161/STROKEAHA.107.486506
55. Casili G, Campolo M, Paterniti I, et al. Dimethyl Fumarate Attenuates Neuroinflammation and Neurobehavioral Deficits Induced by Experimental Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2018;35(13):1437-1451. doi:10.1089/neu.2017.5260
56. Qiao H, Sai X, Gai L, et al. Association between heme oxygenase 1 gene promoter polymorphisms and susceptibility to coronary artery disease: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2014;179(9):1039-1048. doi:10.1093/aje/kwu024
57. Li B, Nasser MI, Masood M, et al. Efficiency of Traditional Chinese medicine targeting the Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Biomed Pharmacother*. 2020;126:110074. doi:10.1016/j.biopha.2020.110074
58. Hertel M, Braun S, Durka S, Alzheimer C, Werner S. Upregulation and activation of the Nrf-1 transcription factor in the lesioned

- hippocampus. *Eur J Neurosci.* 2002;15(10):1707-1711. doi:10.1046/j.1460-9568.2002.01992.x
59. Vilcek J. First demonstration of the role of TNF in the pathogenesis of disease. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2008;181(1):5-6. doi:10.4049/jimmunol.181.1.5
 60. Kaneko T, Tahara S, Takabayashi F. Suppression of lipid hydroperoxide-induced oxidative damage to cellular DNA by esculetin. *Biol Pharm Bull.* 2003;26(6):840-844. doi:10.1248/bpb.26.840
 61. Degterev A, Huang Z, Boyce M, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol.* 2005;1(2):112-119. doi:10.1038/nchembio711
 62. Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature.* 2015;517(7534):311-320. doi:10.1038/nature14191
 63. Stockwell BR, Angeli JPF, Bayir H, et al. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *CELL.* 2017;171(2). Accessed December 27, 2023. <https://findanexpert.unimelb.edu.au/scholarlywork/1248021-ferroptosis--a-regulated-cell-death-nexus-linking-metabolism--redox-biology--and-disease>
 64. You Z, Savitz SI, Yang J, et al. Necrostatin-1 reduces histopathology and improves functional outcome after controlled cortical impact in mice. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28(9):1564-1573. doi:10.1038/jcbfm.2008.44
 65. Sun L, Wang H, Wang Z, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell.* 2012;148(1-2):213-227. doi:10.1016/j.cell.2011.11.031
 66. Mulay SR, Desai J, Kumar SV, et al. Cytotoxicity of crystals involves RIPK3-MLKL-mediated necroptosis. *Nat Commun.* 2016;7(1):10274. doi:10.1038/ncomms10274
 67. Rickard JA, O'Donnell JA, Evans JM, et al. RIPK1 regulates RIPK3-MLKL-driven systemic inflammation and emergency

- hematopoiesis. *Cell*. 2014;157(5):1175-1188.
doi:10.1016/j.cell.2014.04.019
68. Perry VH, Holmes C. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*. 2014;10(4):217-224.
doi:10.1038/nrneurol.2014.38
 69. Fulda S. Regulation of necroptosis signaling and cell death by reactive oxygen species. *Biol Chem*. 2016;397(7):657-660.
doi:10.1515/hsz-2016-0102
 70. Zhao P, Wei Y, Sun G, et al. Fetuin-A alleviates neuroinflammation against traumatic brain injury-induced microglial necroptosis by regulating Nrf-2/HO-1 pathway. *J Neuroinflammation*. 2022;19(1):269. doi:10.1186/s12974-022-02633-5
 71. Mychasiuk R, Farran A, Esser MJ. Assessment of an experimental rodent model of pediatric mild traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2014;31(8):749-757. doi:10.1089/neu.2013.3132
 72. Ucar T, Tanrioer G, Gurer I, Onal MZ, Kazan S. Modified experimental mild traumatic brain injury model. *J Trauma*. 2006;60(3):558-565. doi:10.1097/01.ta.0000209172.75637.db
 73. Takase H, Washida K, Hayakawa K, et al. Oligodendrogenesis after traumatic brain injury. *Behav Brain Res*. 2018;340:205-211.
doi:10.1016/j.bbr.2016.10.042
 74. Segi-Nishida E. The Effect of Serotonin-Targeting Antidepressants on Neurogenesis and Neuronal Maturation of the Hippocampus Mediated via 5-HT1A and 5-HT4 Receptors. *Front Cell Neurosci*. 2017;11:142. doi:10.3389/fncel.2017.00142
 75. Alenina N, Klempin F. The role of serotonin in adult hippocampal neurogenesis. *Behav Brain Res*. 2015;277:49-57.
doi:10.1016/j.bbr.2014.07.038
 76. Zhang XS, Lu Y, Li W, et al. Astaxanthin ameliorates oxidative stress and neuronal apoptosis via SIRT1/NRF2/Prx2/ASK1/p38 after traumatic brain injury in mice. *Br J Pharmacol*. 2021;178(5):1114-1132. doi:10.1111/bph.15346
 77. Gao Y, Zhang H, Wang J, et al. Annexin A5 ameliorates traumatic brain injury-induced neuroinflammation and neuronal ferroptosis by modulating the NF- κ B/HMGB1 and Nrf2/HO-1 pathways. *Int*

78. Li C, Yu TY, Gong LR, Mu R, Zhang Y, Yu JB. Involvement of Nrf-2/HO-1 pathway in sevoflurane-induced cognitive improvement in rats with traumatic brain injury. *Behav Brain Res.* 2021;405:113200. doi:10.1016/j.bbr.2021.113200
79. Zhang Y, Li Z, Wu H, Wang J, Zhang S. Esculetin alleviates murine lupus nephritis by inhibiting complement activation and enhancing Nrf2 signaling pathway. *J Ethnopharmacol.* 2022;288:115004. doi:10.1016/j.jep.2022.115004

