



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PUNİCİC ASİT UYGULAMASININ
SIÇANLARDA AKUT TRAVMATİK BEYİN HASARI SONRASINDA
NÖROPROTEKTİF ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan: Mesut METE
DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ

MANİSA-2023



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PUNİCİC ASİT UYGULAMASININ SIÇANLARDA AKUT TRAVMATİK
BEYİN HASARI SONRASINDA NÖROPROTEKTİF ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan: Mesut METE
DOKTORA TEZİ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ

Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ	(Tez Danışmanı)
Prof. Dr. Necip KUTLU	(Jüri Üyesi)
Prof. Dr. Elgin Türköz ULUER	(Jüri Üyesi)
Doç. Dr. Özlem YILMAZ	(Jüri Üyesi)
Doç. Dr. Serap CILAKER	(Jüri Üyesi)

I. BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilemeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışım olmadığını beyan ederim.

Mesut METE



II. TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca engin bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, bilimsel düşünmeyi öğreten, meslekî gelişimim için imkânlar sunan, prensipleri ve çalışma disipliniyle daima örnek olan tez çalışmamın fikir babası değerli abim ve hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU'ya

Deneyimleri ile yol gösteren, bilgisini ve tecrübesini esirgemeyen danışmanım sayın Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ'a

Çalışmam sırasında desteğini esirgemeyen, her aşamada yanımda olan, yol gösteren, çok kıymetli hocam sayın Prof. Dr. Beyhan GÜRCÜ'ye

Tez yapımının her aşamasında yanımda olan ve desteklerini her an yanımda hissettiğim, çok değerli kardeşlerim Araş. Gör. Şuheda ALPAY ve Araş. Gör. Fatih ÇÖLLÜ'ye

Elektroensefalografi sonuçlarının yorumlanmasında bilgi ve tecrübesiyle desteğini esirgemeyen kardeşim Öğr. Gör. Dr. H. Fehmi ÖZEL'e,

MCBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve çalışanlarına ve Tıp Fakültesi Dekanlığına,

Tüm MCBÜ Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı ailesine,

Bu günlere gelmemde sonsuz emeği bulunan maddî ve manevî desteklerini esirgemeyen başta ANNEM ve BABAMA, abim Murat, ablam Meltem, kız kardeşim Melike'ye, hayat arkadaşım sevgili eşim Tülay ve hayat kaynaklarım canım kızlarım Mira Su ve Azra'ya yürek dolusu sevgi ve saygılarımla...

III. KISALTMA VE SİMGELER

TBH	Travmatik beyin hasarı
NO	Nitrik oksit
eNOS	Endotelial NOS
iNOS	İndükleenebilir NOS
nNOS	Nöronal NOS
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
BOS	Beyin omurilik sıvısı
HIF-1α	Hipoksi indüklenebilir faktör-1 alfa
GSNO	S-nitrosoglutasyon
p-Tau	Hiperfosforile tau
TRAF6	TNF reseptörle ilişkili faktör 6
MDA	Malondialdehit
NQO1	Kinon oksidoredüktaz-1
HO1	Hem oksijenaz-1
SOD	Süperoksit dismutaz
ROS	Reakti oksijen türleri
H₂O₂	Hidrojen peroksit
OH	Hidroksil radikali
ONOO-	Peroksinitrit
NO₂	Nitrojen dioksit
ONOOH	Peroksinitöz asit
BBB	Kan-beyin bariyeri
BDNF	Beyin kaynaklı nörotrofik faktör

TNFSF15	Tümör nekroz faktörü süper ailesi-15
mTBH	Hafif TBH
EEG	Elektroensefalografi
qEEG	Kantitatif EEG
EPSP	Eksitatör postsinaptik potansiyeller
İPSP	İnhibitör postsinaptik potansiyeller
ND	Nörodejeneratif hastalıklar
CLnA	Konjuge α -linolenik asit
CLA	Konjuge linoleik asit
PuA	Punisik asit
PSO	Nar Çekirdeği Yağı
NOS	Nitrik oksit sentaz
SOD	Süperoksit dismutaz
NBT	Nitroblue tetrazolyum
PBS	Fosat tampon solusyonu
TUNEL	Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling
DAB	Diaminobenzidin
HRP	Yaban turpu peroksidaz
NeuN	Nöronal nükleer protein
C. longa	Zerdeçal
COX-2	Siklooksijenaz-2
CAT	Katalaz
GPx	Glutasyon peroksidaz
ALA	Alfa lipoik asit
LUT	Luteolin
PDGFR-β	Trombosit türevli büyüme faktörü reseptörü-beta
ZO-1	Zonula okludens-1
DEX	Deksmetomidinin
PI3K	Fosfatidilinositol-3-kinaz
2ME2	2-metoksiestradiol
ACF	Akriflavin
DMOG	Dimetiloksalilglisin
TRAIL	Tümör nekroz faktörü ilişkili apoptozu indükleyen ligand

PSD-95	Postsinaptik yoğunluk proteini-95
Chat	Kolin asetiltransferaz
IF	İmmüno Floresan
IHC	İmmünohistokimya
Th	Tirozin hidroksilaz
GFAP	Glial fibril asidik protein



IV. İÇİNDEKİLER

1 Giriş	1
2 Genel Bilgiler	6
2.2.1. Hipokampus	6
2.2.2. TBH	8
2.2.3. Oksidatif Stress ve NOS	13
2.2.4. Hipoksi ve HIF	16
2.2.5. Damarlanma ve VEGF	17
2.2.6. Nöron belirteci ve NeuN	18
2.2.7. Elektroensefalografi ve Eektrokortikografi	19
2.2.8. PA	23
2.2.9. Amaç	25
3. Gereç ve Yöntem	28
3.1. Deney Protokolü	28
3.2. TBH	28
3.3. Klinik Değerlendirme	30
3.4. Biyokimyasal Değerlendirme	30
3.6.1. Histopatolojik Değerlendirme	31
3.7. Histokimyaal Boyama	31
3.8. İndirekt immunohistokimya boyaması	31
3.9. TUNEL Boyaması	32
3.10. Western Blot	33
3.11. İstatistiksel analiz	34
3.12. EEG	34
4. Bulgular	36
4.1. Klinik Skarlama	36
4.2. Biyokimya	36
4.3. Makroskobik bulguları	38
4.4. Mikroskobik bulgular	41
4.4.1. Histokimya bulguları	41
4.4.2. İmmünohistokimya bulguları	43
4.4.2. İmmunperossidaz bulguları	43
4.4.2.1. eNOS Bulguları	43
4.4.2.2. VEGF Bulguları	45

4.4.2.3. HIF1a Bulguları	46
4.4.2.4. NeuN İHK	48
4.4.3. İmmunofloresan Bulguları	50
4.4.3.1. eNOS Bulguları	50
4.4.3.2. VEGF Bulguları	52
4.4.3.3. HIF1a Bulguları	54
4.4.3.4. NeuN Bulguları	56
4.5. Western Blot bulguları	58
4.6. EEG Bulguları	59
5. Tartışma	61
6. Sonuç	70
7. Kaynaklar	71

V. TABLO VE ŞEKİLLER DİZİNİ

TABLolar

Tablo 4.2.1. SOD analizi skorları ile istatistiksel analizi	37
Tablo 4.2.2. MDA analizi skorları ile istatistiksel analizi.	38
Tablo 4.3.1 Makroskobik skorlar ile istatistiksel analizi.	40
Tablo 4.3.2 Makroskobik skorlar ile istatistiksel analizi.	41
Tablo 4.4.1.1. HE boyama görüntü ve skorlar ile istatistiksel analizi.	43
Tablo 4.4.2.1. eNOS İHK boyama görüntü ve skorlar ile istatistiksel analizi.	45
Tablo 4.4.2.2. VEGF İHK boyama görüntü ve skorlar ile istatistiksel analizi.	46
Tablo 4.4.2.3. HIF1a İHK boyama görüntü ve skorlar ile istatistiksel analizi.	48
Tablo 4.4.2.3. NeuN İHK boyama görüntü ve skorlar ile istatistiksel analizi.	50
Resim 4.1.1. Klinik skorlamada kullanılan parametreler	36
Resim 4.4.1.1. HE boyama görüntü ve skorlar ile istatistiksel analizi.	43
Resim 4.4.3.2.1 VEGF boyama görüntüsü	53
Resim 4.4.3.2.2. VEGF İF boyama görüntüsü	54
Resim 4.4.2.1. eNOS İHK boyama görüntü ve skorlar ile istatistiksel analizi.	54
Resim 4.4.2.2. VEGF İHK boyama görüntü ve skorlar ile istatistiksel analizi.	46
Resim 4.4.2.3. HIF1a İHK boyama görüntü ve skorlar ile istatistiksel analizi.	48
Resim 4.4.2.3. NeuN İHK boyama görüntü ve skorlar ile istatistiksel analizi.	50
Resim 4.4.3.1. HE boyama görüntü	50
Resim 4.4.3.1.1. eNOS İF boyama görüntü	51
Resim 4.4.3.2.1 VEGF İF boyama görüntü.	61
Resim 4.4.3.2.2 VEGF İF boyama görüntü.	62
Resim 4.4.3.3.1 HIF1a İF boyama görüntü.	55
Resim 4.4.3.3.2. HIF1a İF boyama görüntü.	55

Resim 4.4.3.3.1. NeuN İF boyama görüntü.	57
Resim 4.4.3.4.2. NeuN İF boyama görüntü.	58
Resim 4.5.1 Western blot	59
Resim 4.6.1 EEG.	60
ŞEKİLLER	
Şekil 1.2.1 Hipokampüs anatomisi	6
Şekil 1.2.2. Hipokampüs histolojisi	10
Şekil 2.2.2.1. TBH	13
Şekil 2.2.3.1 TBH ile oluşan değişiklikler	14
Şekil 2.2.3.1. Oksidatif stres	16
Şekil 2.2.4.1. HIF1a	17
Şekil 2.2.5.1. VEGF	18
Şekil 2.2.6.1. NeuN	19
Şekil 2.2.7. Elektroensefalografi	20
Şekil 2.2.9.1. Nar tohumu yağının biyoaktif bileşenleri	26
Şekil 2.2.9. PA ile TBH tedavisi	27
Şekil 3.1.1. Klinik skorlama	28
Şekil 3.2.1. Ağırlık düşürme sistemi	29
Şekil 3.3.1. Klinik skorlama	30
Şekil 3.12.1 EEG	35

Tezin Başlığı: Punicic Asit Uygulamasının Sıçanlarda Akut Travmatik Beyin Hasarı Sonrasında Nöroprotektif Etkisinin Araştırılması

Öğrencinin adı: Mesut METE

Danışman: Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ

Anabilim Dalı: Histoloji-Embriyoloji

ÖZET

Amaç: Travmatik Beyin Hasarı (TBH), dünya çapında, özellikle çocuklarda ve genç erişkinlerde önemli bir ölüm ve sakatlık nedenidir. TBI şiddet, mekanizma veya diğer özelliklere göre sınıflandırılabilir. Enflamasyon, apoptoz, oksidatif stres ve iskemi, TBH sonrası nöronal kaybın altında yatan önemli patofizyolojik mekanizmalardan bazılarıdır. Punisik Asid (PA), kısmi başlangıçlı nöbetlerin ve nöropatik ağrının ek tedavisi için onaylanmış bir antikonvülsan bileşiktir. Bu çalışma, bir TBH sıçan modelinde PA için olası nöroprotektif etkilerini araştırmayı amaçladı.

Gereç ve Yöntemler: Kırk erişkin erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar 5 gruba (n: 8) ayrıldı. Grup 1: Kontrol grubu, Sadece cilt kesisi yapıldı. Grup 2: Sham grubu, TBH sonrasında sadece normal beslenen sıçanları içermektedir. Grup 3: TBH sonrasında normal beslenmeye ek olarak 1 gr/ gün PA gavaj yoluyla verildi. Grup 4: 3 gr/ gün PA, Grup.5: 5 gr/ gün PA kullanıldı. Her grup için TBH 3 gün sonra beyin örnekleri toplandı. Beyin örnekleri ve kan histopatolojik ve biyokimyasal yöntemlerle değerlendirildi. İmmunohistokimya sonuçları western blot ile doğrulandı. Ayrıca elektroensefalografi monitörizasyon sonuçları karşılaştırıldı.

Bulgular: Oksidatif stres belirteçleri olan Malondialdehit (MDA) seviyesi PA tedavisi ile azalırken süperoksit dismutaz (SOD) arttı. iNOS ve eNOS immünreaktivitesi, TBH örneklerine kıyasla PA tedavisi ile anlamlı ($P<0,05$) olarak azaldı. Damarlanma için VEGF TBH grubuna göre ile PA ile anlamlı ($P<0,05$) arttı. Hipoksi için bakılan HIF-1 α dağılımı TBH grubuna göre ile PA ile anlamlı ($P<0,05$) azaldı. Olgun nöron nükleus için bakılan NeUN TBH grubuna göre ile PA ile anlamlı ($P<0,05$) arttı. PA ile tedavi edilen grupta EEG'nin delta gücü kontrol grubu değerlerine benzer bulundu.

Sonuç: TBH sonrası PA uygulamasının histolojik, immunohistokimyasal, biyokimyasal, western blot ve EEG ile gösterilen yararlı etkisinin klinik anlamı olabileceğini gösterdi. Bu etkinin hasta yaşam kalitesini artıracığı düşünöldü.

Anahtar kelimeler: Elektroensefalografi; Punisik Asid; Nöroprotektif; Travmatik Beyin Hasarı.



Title: Investigation of the Neuroprotective Effect of Punicic Acid Application After Acute Traumatic Brain Injury in Rats

Student: Mesut METE

Adviser: Ass. Prof. Dr. Erdoğan KOCAMAZ

Department: Histology-Embriology

ABSTRACT

Objective: Traumatic Brain Injury (TBI) is an important cause of death and disability worldwide, especially in children and young adults. TBI can be classified by severity, mechanism, or other characteristics. Inflammation, apoptosis, oxidative stress and ischemia are some of the important pathophysiological mechanisms underlying neuronal loss after TBI. Punicic Acid (PA) is an anticonvulsant compound approved for the adjunctive treatment of partial onset seizures and neuropathic pain. This study aimed to investigate possible neuroprotective effects for PA in a rat model of TBI.

Materials and methods: Forty adult male Wistar albino rats were used. Rats were divided into 5 groups (n: 8). Group 1: Control group, Only skin incision was made. Group 2: The sham group included only normally fed rats after TBI. Group 3: After TBI, 1 g/day PA was given by gavage in addition to the normal diet. Group 4: 3 g/day PA, Group.5: 5 g/day PA was used. Brain samples were collected 3 days after TBI for each group. Brain samples and blood were evaluated by histopathological and biochemical methods. Immunohistochemistry results were confirmed by western blot. In addition, electroencephalography monitoring results were compared.

Results: Malondialdehyde (MDA) levels, which are oxidative stress markers, decreased with PA treatment, while superoxide dismutase (SOD) increased. iNOS and eNOS immunoreactivity were significantly ($P<0.05$) reduced with PA treatment compared to TBI samples. VEGF for vascularization increased significantly ($P<0.05$) with PA compared to TBI group. The distribution of HIF-1 α for hypoxia decreased significantly ($P<0.05$) with PA compared to the TBI group. NeUN for mature neuron nuclei increased significantly ($P<0.05$) with PA compared to TBI group. The delta power of EEG in the group treated with PA was similar to the values of the control group.

Conclusion: It showed that the beneficial effect of PA application after TBI, demonstrated by histological, immunohistochemical, biochemical, western blot and

EEG, may have clinical significance. It was thought that this effect would increase the patient's quality of life.

Key words: Electroencephalography; Punicic Acid; neuroprotective; Traumatic Brain Injury.



1.GİRİŞ

Travmatik beyin hasarı (TBH) dünya çapında morbidite ve mortalitesi yüksek acil bir durumdur. Hastaneye başvuran hastaların çoğuna hafif beyin hasarı tanısı konmakla birlikte hastalarda uzun dönemde kalıcı hasarlar bırakabilmektedir. Uzun sürebilen tedavi süreci, üretkenliğin de azalması ile toplumun mali yükünü arttırmaktadır. Gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerde farklı oranlarda olmakla birlikte TBH'nin büyük kısmı düşmeler ve taşıt kazalarından kaynaklanmaktadır. Yaşlara göre bakılacak olursa; 1 yaş altında kaza dışı travmalar, çocukluk yaş grubunda düşmeler, gençlerde spor yaralanmaları, erişkinlerde taşıt kazaları ve yaşlılarda düşmeler önde gelen kafa travması nedenleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Erkekler TBH'ye kadınlardan daha fazla maruz kalmaktadır. Ölüm oranları hafif kafa travmaları için %0, orta kafa travmaları için %7-10 ve ağır kafa travmaları için ise %30 oranındadır. Hastaların yaklaşık %20'si hastaneye yatmaktadır. Yılda yaklaşık 200.000 kişi bu travmalara bağlı olarak ölmekte veya sakat kalmaktadır. Kafa travmaları öldürücü, sakat bırakıcı ve uzun süre tedavi ve bakım gerektiren bir patoloji olup istatistiksel olarak ölüm nedenleri arasında dördüncü sırayı almaktadır. Bu tez çalışmasında sıçan kafa travması modellemesi ile anti-inflamatuvar ve antioksidan etkisi bulunan, Punicic Asit için akut kafa travmasında tedavi edici etkisi incelenmiştir. PA, p38MAPKinase/Ser345-p47phox-eksenini ve miyeloperoksidaz yeniden salınımını hedefleyerek TNF- α ile indüklenen NADPH oksidaz hazırlamanın inhibisyonu yoluyla anti-inflamatuvar etki gösterir. NADPH oksidaz, ise serbest radikallerin üretme birincil işlevine sahiptir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, NADPH oksidaz enzimlerinin genetik ve farmakolojik inhibisyonunun nöroprotektif olduğunu ve iskemik ve travmatik beyin hasarını takiben patolojinin zararlı yönlerini azaltabildiğini göstermiştir. PA'nın inflamatuvar barsak hastalığı, nekrotizan enterokolit gibi hastalıklarda etkinliğinin saptanmasına ek olarak kanser, diyabet ve obeziteye karşı etkinliğinin olduğu bildirilmiştir (Huang H ve ark 2022).

Nitrik oksit (NO) son yıllarda tanınan, birçok biyolojik olayda önemli rolü olan, çok kısa yarı ömürlü bir serbest radikaldir. NOS in genetik olarak farklı üç izoformu tespit edilmiştir. Bunlar; düşük miktarda üretilerek vasküler tonüsü ayarlayan bir konstitutif endotelial izoform (eNOS), yine düşük miktar üretilen sinaptik

şekillenme ve nörotransmisyonu düzenleyen bir konstitutif nöronal izoform (nNOS) ve yüksek miktarda üretilerek, immün/inflamatuar olaylarda rol alan ve hücre aracılı immün cevapta etkili bir komponent olan uyarılabilir form (iNOS)dur. nNOS ve eNOS izoenzimleri NO üretimi için Ca^{++} kalmodulin kompleksine bağımlıdır, buna karşın iNOS bundan bağımsızdır. NO fizyolojik konsantrasyonlarda, hemen hemen tüm organ sistemlerinde değişik biyolojik etkilere sahiptir. NO'nın santral sinir sisteminde önemli bir transmitteri olan glutamat ile çok sıkı ilişkisi vardır. Glutamat tarafından başlatılan sinirsel ileti işlevi, olaya NO'nın eklenmesiyle devam etmektedir. Bu özellikleri nedeni ile NO'nun postravmatik beyin fizyopatolojisinde önemli rolü olduğu sanılmaktadır. Literatürde NOS aktivitesiyle ilgili ve travmadaki rolünü gösteren az çalışma mevcuttur. Çalışmamız PA'nın NOS'la ilişkisine de ışık tutacak nitelik taşımaktadır (Fesharaki-Zadeh A 2022, Hakiminia B ve ark 2022, French A ve ark 2021).

TBH genellikle beyindeki damar sisteminde önemli hasara yol açar ve bunu takiben serebral hipoperfüzyon, iskemi, hipoksi, kanama, kan-beyin bariyeri bozulması ve ödem oluşur. TBH takip eden sekeller, bir dizi fizyolojik ve psikolojik alanda nörolojik işlev bozukluğuna neden olur. Yaralanmadan sonra vasküler fonksiyonu eski haline getirmenin önemi göz önüne alındığında, ortaya çıkan araştırmalar, TBH sonrası vasküler yanıtı ve vasküler onarımın temel hücrel ve moleküler bileşenlerini anlamaya odaklanmıştır. Vasküler onarım mekanizmalarının daha eksiksiz bir şekilde anlaşılması gerekmektedir ve bu, yalnızca TBH için değil, potansiyel olarak vasküler ilişkili beyin yaralanmaları için de yeni vaskülojenik tedavilerin geliştirilmesine yol açabilir. TBH'nın vasküler etkilerini, yaralanmaya geçici yanıtını ve TBH'de arteriyel ve venöz onarım için varsayılan biyobelirteçler tanımlanmıştır (Salehi A ve ark 2017).

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), hipoksi, sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından tetiklenen ve ayrıca adenosin 2B reseptörünün aktivasyonu ile indüklenen önemli bir anjiyogenez düzenleyicisidir. VEGF, çeşitli deneysel beyin hasarı modellerinde nöroprotektif olup TBH sonrası beyinde artar. Pediatrik TBH sonrası BOS'ta VEGF artmaktadır ve bu artış BOS adenosin artışı ile ilişkilidir. Adenosin, çocuklarda klinik TBH sonrası beyin omurilik sıvısında (BOS) artan nöroprotektif bir pürin metabolitidir. Bu sonuçlar, beyin vasküler rejeneratif yanıtının bir bileşeninin, TBH sonrasında hızla başladığını ve yaralanmadan birkaç gün sonra devam ettiğini göstermektedir (Shore PM ve ark 2004).

Beyin sarsıntısı olarak da adlandırılan hafif TBH, motor kusurlara, bilişsel bozukluklara ve hafifçe tehlikeye atılmış nörodavranışlara yol açan sekelleri başlatır. TBH'nin akut fazı, nöroinflamasyon ve nitroksidatif patlama ile ilişkiliyken, kronik faz, nörorepair süreci ve rejenerasyonun uyarılma eksikliğini gösterir. Hipoksi/iskeminin ana düzenleyicisi olan hipoksi indüklenbilir faktör-1 alfa (HIF-1 α), nöro-onarım sürecini uyarır ve böylece beyin travmasından sonra fonksiyonel iyileşmeye yardımcı olur. HIF-la'nın aktivitesi, HIF-la'nın S-nitrosilasyon mekanizması yoluyla NO tarafından düzenlenir. S-nitrosilasyon, S-nitrosoglutatyon (GSNO) ve peroksinitrit gibi NO metabolitleri tarafından dinamik olarak düzenlenir. GSNO stabilize eder ve peroksinitrit, HIF-la'yı istikrarsızlaştırır. Eksojen olarak uygulanan GSNO'nun sadece HIF-la'yı stabilize ettiği ve HIF-la'ya bağımlı genleri indüklediği değil, aynı zamanda rejenerasyon sürecini uyardığı ve TBI hayvanlarında fonksiyonel iyileşmeye yardımcı olduğu bulunmuştur (Khan M ve ark 2017).

TBH, hiperfosforile tau'nun (p-Tau) patolojik birikimi ile karakterize edilen bilişsel bozulma ve demansın çeşitli ilerleyici nörodejeneratif bozuklukları için en güçlü çevresel risk faktörlerinden birini oluşturur. İnsan TBH ile ilişkili tauopatide bildirilen patolojik özelliklere odaklanılarak, farelerde kapalı kafa TBH modelinin uzunlamasına histopatolojik karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Erkek C57BL/6 J fareleri, bir ağırlık düşürme paradigması kullanılarak art arda 5 gün boyunca günde bir kez TBH'ye tabi tutulmuştur. 1. hafta, 4. hafta ve 24. haftada histolojik analizler (AT8, TDP-43, pTDP-43, NeuN, GFAP, Iba-1, MBP, SMI-312, Prusya mavisi, IgG, β APP, alfa-sinüklein) yapılmıştır. TBH dan 1 hafta sonra, p-Tau birikimi korpus kallosum ve superior longitudinal fissüre bitişik perivasküler boşluklarla sınırlıyken. TBH dan 4 ila 24 hafta sonra, serebral korteksin yüzeysel katmanlarının yanı sıra meme gövdelerinde ve kortikal perivasküler, subpial ve periventriküler lokasyonlarda ilerleyici p-Tau birikimi gözlenmiştir. Kortikal histopatolojiler arasında mikrovasküler yaralanma, nöroaksonal seyrelme, astroglial ve mikrogliyal aktivasyon yer alır. Yaygın olarak bildirilen ilişkili patolojiler arasında nöronal kayıp (%23), aksonal kayıp (%43), mikrogliyal aktivasyon ve astroglioz (her biri %50) ve beta amiloid birikimi (%29) yer alır (Kahriman A ve ark 2021).

Apoptozis (programlanmış hücre ölümü), hücre intiharı olarak da bilinen fizyolojik bir olaydır. Embriyolojik gelişim ve erişkin dokunun yaşamının sürdürülmesinde anahtar rol oynar. Organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlı hücreler apoptozis ile genetik olarak kontrol

edilerek ortadan kaldırılır. Travmalarda ortaya çıkan nöronal hasar sonrası görülen hücre ölümlerinin apoptotik mekanizması TUNEL boyamasıyla gösterilmiştir. Hücre ölüm süreci nöroprotektif açıdan önem taşımaktadır (Unnisa A ve ark 2022). Fizyolojik nöronal ölüm, uygun embriyolojik gelişim ve yetişkin hücre döngüsü için gerekli olmakla birlikte, aynı zamanda nörodejenerasyonu da tetikleyebilir. Kaspazlar, apoptoz nedeniyle hücre ölümünün başlıca araçlarıdır ve ölmeye kararlı hücrelerin hücre içi proteinlerinin gerekli bölünmesi için kritik öneme sahiptir. Kaspaz-3, apoptozun ana yürütücüsü olup fizyolojik ve patolojik koşullar sırasında bir dizi hücresel bileşen tarafından düzenlenir. Kaspaz-3'ün aktivasyonu, programlanmış hücre ölümü sırasında DNA onarım proteinlerinin, hücre iskeleti proteinlerinin ve Kaspazla aktive olan DNaz'ın (ICAD) inhibitörünün proteolizasyonuna neden olarak apoptozu tanımlayan morfolojik değişikliklere ve DNA hasarına neden olur. Kaspaz-9, çeşitli uyaranlara yanıt olarak aktive edilen, içsel yolun ek bir önemli parçasıdır. Çeşitli apoptotik durumlarda Kaspaz-9 ve -3'ün gerekliliği, memeli hücrelerinin en az dört farklı apoptotik yola sahip olduğunu düşündürür. (Unnisa A ve ark 2022)

Nöronların ve gliaların apoptozu hem insanlarda hem de hayvanlarda TBH genel patolojisine katkıda bulunur. Hem kafadan yaralanmış insanlarda hem de deneysel beyin yaralanmasını takiben, klasik nekrotik morfoloji sergileyen dejenere hücrelerle birlikte apoptotik hücreler gözlemlenmiştir. Apoptoz geçiren nöronlar, akut port-travmatik dönemdeki kontüzyonlarda ve travmadan sonraki günler ve haftalarda etki alanından uzak bölgelerde tanımlanmıştır. Yaralı beyaz cevher yollarında apoptotik oligodendrositler ve astrositler gözlenmiştir. TBH'yi takiben apoptozun bölgesel ve zamansal modellerini ve travmaya bağlı apoptozun altında yatan olası mekanizmaları gözden geçirilmiştir. Uyarıcı amino asitler, hücre içi kalsiyumdaki artışlar ve serbest radikallerin tümü hücrelerin apoptoza girmesine neden olabilirken, in vitro çalışmalar nöral hücrelerin başka birçok yolla apoptoza uğrayabileceğini belirlemiştir. Pro- ve anti-apoptotik protein faktörleri arasındaki dengede ölümü teşvik eden proteinlerin ekspresyonuna doğru kaymanın, apoptotik hücre ölümünün altında yatan mekanizmalardan biri olabileceği genel olarak kabul edilmektedir. (Raghupathi R ve ark 2000).

TBH, beyin hasarına yol açan ani bir travma olduğunda ortaya çıkan edinilmiş bir beyin hasarıdır. Bu akut kompleks olay, kafaya şiddetli veya ani bir darbe alındığında veya bir nesne kafatasını veya beyni deldiğinde meydana gelebilir.

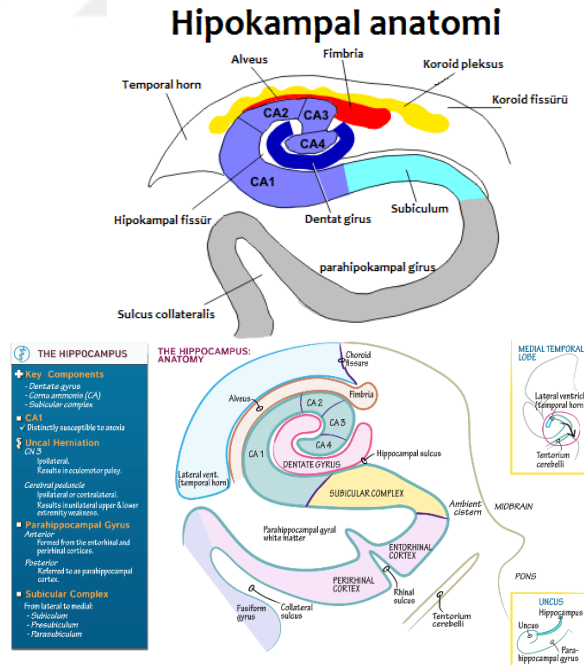
TBH'nin mevcut temel tedavisi, çeşitli farmasötik ajanları, hiperbarik oksijeni ve hipotermiyi içerir. TBH kaynaklı ikincil hasarın özellikle oksidatif stres ile ilişkili olduğuna dair kanıtlar vardır. Bununla birlikte, TBH klinik yönetimi genellikle oksidatif stresini azaltmak ve ikincil yaralanmayı önlemek için antioksidanlar içermektedir. Yapılan çalışmalar, amino asitler, C ve E vitaminleri, progesteron, N-asetilsistein ve enzogenol gibi antioksidan tedavilerin TBH erişkin hastalarda güvenli ve etkili ek tedaviler olabileceğini düşündürmektedir. (Shen Q ve ark 2016). TBH, ölüm ve morbiditenin önemli nedenlerinden biridir ve bu nedenle translasyonel araştırmaların odak noktasıdır.



2. GENEL BİLGİLER

2.2.1 HİPOKAMPÜS

Hipokampus; çok eski çağlardan beri beynin en çok merak edilen ve üzerinde araştırma yapılan bölümü olmuştur. Temporal lobun medial kısmında lateral ventrikülün temporal hornuna komşu bir alanda yer alır. Anatomik özellikleri iyi bilinmekle beraber fizyolojisi ve fonksiyonları hâlâ tam olarak ortaya konamamıştır. Limbik sistemin bir parçası olduğu düşünülmektedir. Önceleri sadece koku ile ilgili bir merkez olduğuna inanılmış, ancak 20.yüzyılın ikinci yarısından itibaren hafıza, duygulanım ve uzaysal öğrenme özelliklerinin de olduğu ortaya konmuştur. Epilepsi cerrahisinde de hedeflerden birisi olan hipokampusun gerek kendi içerisinde gerekse de çevre beyin bölgeleri ile yoğun ve güçlü nöral bağlantıları vardır. Son yıllarda bu bağlantılar ve hipokampusun fonksiyonları ile ilgili pek çok çalışma yapılmış ve hipokampusda konum, zaman, kafa yönlendirme ve sınır hücreleri gibi bazı özgün hücreler olduğu keşfedilmiştir (İzci Y ve Eebaş YC 2015).

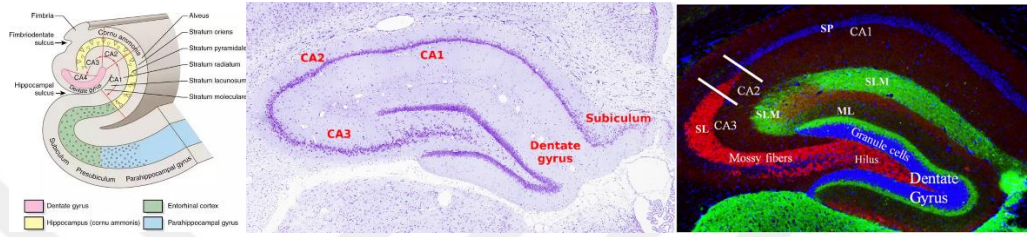


Şekil 1.2.1. Hipokampus anatomisi. Hipokampus, beynin medial temporal lobunda yer alan, hafıza ve yön bulmada önemli rolü olan bölge. Bir gri cevher tabakası olup, lateral ventrikülün alt boynuz tabanı boyunca uzanır. Filogenetik olarak en eski beyin kısımlarındandır. Cornu Ammonis'in İngilizce baş harflerini

temsilen “CA” olarak da ifade edilebilen hipokampus, hücre yapısındaki değişikliklerden dolayı CA1, CA2, CA3 ve CA4 gibi farklı alanlara bölünmüştür. Bunlardan CA1 subikuluma, CA4 ise dentat girusa en yakın olan alandır (İzci Y ve Erbaş YC 2015).

Hipokampus histolojik olarak ince ve birbiriyle bağlantılı pek çok tabakadan oluşur. Bu tabakalar literatürde yazardan yazara değişmekle birlikte genel olarak üzerinde anlaşılan 7 tabaka vardır. Histolojik olarak; ventriküler yüzeyden başlayarak dışa doğru, hipokampusa ait tabakalar şu şekilde sıralanır: 1- Alveus: En derindeki tabakadır. Ventrikül yüzeyine komşudur. Subikulum ve hipokampusa ait piramidal hücre aksonlarını içerir. Hipokampusun en önemli çıktısı (output) olan fimbria/fornikse uzanan aksonlar alveusdan geçerler. 2- Stratum oriens: Esas olarak piramidal hücrelerin bazal dendritleri ile internöronların yerleştiği tabakadır. Buradaki çoğu nöron aksonları alveus liflerine katılır. Diğer hücre aksonları ise, en derinde yer alan stratum molekülareye dek uzanır. 3- Stratum pyramidalis: Karakteristik olarak bu tabakada büyük piramidal ve Golgi tip II hücreleri çoğunluktadır. Piramidal hücrelerin esas olarak gövdeleri bu tabakada bulunur. Çıplak gözle bile görülebilen bir tabakadır. Piramidal hücrelerin tabanı hipokampusun ventriküler yüzeyine dönüktür ve bazal-apikal dendritleri komşu tabakalara (str. Lusidum) kadar uzanır. Aksonları ise stratum oriens’ten geçerek alveus liflerine katılırlar. Bu tabakada yosunsu (Mossy) lifler ile yapılan sinapslar vardır. Ayrıca pek çok internöronun hücre gövdesi burada bulunur. Hipokampusa asıl şeklini veren buradaki piramidal hücrelerin dizilimidir. 4- Stratum lusidum: Hipokampusun en ince tabakalarından birisidir. Sadece CA3 bölgesinde bulunur. Hücresel yönden yoğundur ve çoğunlukla motor tip piramidal hücrelerden oluşur. CA3 alanındaki piramidal hücreler ile dentat girusun granüler hücreleri arasında bağlantı sağlayan yosunsu (mossy) lifler de içerir. Bu lif şebekesi beyindeki en yaygın ve gelişmiş ağıdır. Diğer primatlara göre insanlarda daha belirgin olup CA1 ile CA2 alanlarında bulunmaz. 5- Stratum radiatum: Stratum oriens gibidir. Septal ve komissural lifler içerir. Ayrıca Schaffer kollateral lifleri içerir ki bunlar CA3’dan CA1’e projeksiyon lifleridir. Bu bölgede yüzeyde bulunan bazı internöronlar da bulunur. (basket hücreleri, radial trilinear hücreler vb). 6- Stratum lakünozum: İnce bir tabakadır ve bu da Schaffer kollateral lifleri içerir. Ancak süperfisyal tabakadan entorinal kortekse uzanan bazı perforan lifler de içerirler. Çok ince olduğu için çoğu zaman stratum molekülare ile birlikte anılırlar ve “stratum lakünozum-molekülare”

adıylı tek tabaka olarak da adlandırılırlar. 7- Stratum molekülare: En yüzeyel (dış) tabakadır. Burada da perforan lifler ve piramidal hücrelerin apikal dentritler bulunur. Burası bazı yazarlar tarafından “stratum molekülare” adı altında tek bir tabaka olarak kabul edilirken, bazı kaynaklarda ise bir üst maddede belirtildiğı gibi 6. ve 7. tabakaları birleştirerek “stratum lakünozum–molekülare” ismiyle tek tabaka olarak da incelenmektedir. Histolojik tabakalardan farklı olarak hipokampusu gelen (afferent) ve hipokampusdan çıkan (efferent) yollar vardır (İzci Y ve Erbaş YC 2015).



Şekil 1.2.2. Hipokampus histolojisi.

2.2.2.TBH

TBH yüksek sıklık oranı, genç yetişkinleri daha çok etkilemesi ve hayatta kalanlarda ileri fonksiyonel kısıtlanmaların görülmesi nedeniyle önemli bir sosyal sağlık problemidir (Dikmen SS ve ark 2003). TBH; kapalı kafa yaralanması, açık kafa yaralanması ve penetran kafa yaralanması şeklinde sınıflandırılabilir. Kapalı ve açık kafa yaralanması terimleri kafa ile künt bir cisim arasında olan çarpışmaları tanımlar. Kapalı kafa travması duranın sağlam olduğu ve mekanizması daha çok akselerasyon-deselerasyon sonucu meydana gelen diffüz aksonal yaralanmadır (Sandel ME ve ark 1998). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi, her yıl 1,4 milyon Amerikalının TBH geçirdiğini ve bunların 235.000’inin hastaneye yatırıldığını tahmin etmektedir (Langlois JA ve ark 2004). Travmatik beyin hasarına yola açan mekanizmalar primer ve sekonder yaralanma olarak sınıflandırılabilir. Primer mekanizmalar yaralanma anında oluştuğı halde sekonder yaralanma, primer mekanizmalara organizmanın yanıtıdır ve her ikisi de fokal veya diffüz olabilir (Bontke CF ve ark 1996). Sekonder yaralanma sırasında, hipotansiyon, intrakranial basınç artışı, serebral perfüzyon basınç azalması, nöral hücre membran harabiyeti gibi olaylar görülür. TBH na yanıt olarak hücresel düzeyde glutamat salgılanması AMPA ve NMDA reseptörlerini aktive ederek kalsiyum ve sodyum nöronal geçişini artırır. Sodyum/potasyum oranını

sağlayabilmek için nöronal enerji depoları boşalır, nöronal hücre membranının harabiyeti ile serbest radikaller ve oksidanlar çıkar ve bunlar glutamatın artışına, döngünün devamına yol açar. İntrasellüler kalsiyum artışı ile caspase (proteolitik enzim) gibi enzimler nöronal apoptozise yol açar (Meythaler JM ve ark 1996, Blumenthal I ve ark 2002, Dilmen et al 2015), Piantino et al 2019).

Deneyisel hayvan modelleri TBH'da ikincil yaralanma süreçleri araştırmak ve olası tedavi edici yaklaşımlar için klinik öncesi veri sağlamak için kullanılır. Hayvan modellerinin geliştirilmesi yeni tedavi girişimlerin karakterizasyonu yanı sıra, klinik ortamda yapılamayan insan TBH, biyomekanik hücresel ve moleküler yönlerini incelemek için gereklidir. Deneyisel kafa travmaları modelleri arasında ağırlık düşürme modelleri (Marmarou A ve ark 2004, Ucar T ve ark 2006), Kontrollü kortikal darbe modeli (Dixon CE ve ark 1999), Sıvı perküsyon yaralanma modelleri (McIntosh TK ve ark 1987) sayılabilir.

Beyin hasarına yol açan mekanik faktörlerin anlaşılması hem etkili önlemlerin alınması hem de kafa travmalarının kısa ve uzun dönemdeki olumsuz sonuçlarının minimize edilmesi açısından gereklidir. Travmanın yönü, şiddeti, süresi ve lokalizasyonu kafa travmasının tipinin ve ağırlığının belirlenmesini sağlar. TBH sonrasında sağlıklı beyin fonksiyonlarında meydana gelen değişiklik sonucunda kafa karışıklığı, bilinç düzeyi değişiklikleri, nöbet, koma veya kafaya nüfuz eden travma kuvvetinden kaynaklanan bölgesel duyuşal veya motor nörolojik noksanlıklar ortaya çıkmaktadır (Bruns ve Hauser 2003).

Dünya Sağlık Örgütü, 2020 yılına kadar travmatik beyin hasarının dünya genelinde önde gelen ilk üç ölüm ve sakatlık sebebinden biri olduğu tahmininde bulunmuştur (Coyle, Ponsford ve Hoy 2018). Her yıl 10 milyondan fazla insanın bir TBH ye maruz kaldığı tahmin edilmektedir. Yalnızca Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda yaklaşık 1.7 milyon kişi TBH dan muzdarip olmakta ve bu kişilerin yaklaşık%80'i acil serviste, %16'sı yatarak tedavi edilir iken %3'ü ölmektedir. (Müftü ve ark.2019). TBH yaşlara göre değerlendirildiğinde en yüksek oran çok genç yaş grubunda (0-4 yaş), ergenlerde ve genç yetişkinlerde (15-24 yaş) görülmektedir ve bu yüksek oranı yaşlılar (> 65 y) takip etmektedir (Galgano ve ark. 2017a).

Dünya çapında en sık karşılaşılan TBH sebepleri başta düşme ve motorlu taşıt kazaları olmak üzere, spor ve silahlı faaliyetlerden kaynaklanan kazalardır (Cheng ve ark.2019). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezlerinin değerlendirmesine göre, TBH

sonrası sıklıkla karşılaşılan semptomlar dört kategoride gruplandırılabilir. Bunlar uyku, fiziksel semptomlar (baş ağrısı, baş dönmesi, yorgunluk, denge-sizlik, fotofobi), bilişsel semptomlar (dikkati toplamakta zorlanma, konsantrasyon ve hafıza) ve emosyonel semptomlar (sinirlilik, depresyon ve anksiyete) olarak yer almaktadır (Piantino ve ark.2019).

Yapılan araştırmalarda travmatik beyin yaralanmalarının Avustralya da 100.000 kişiden yaklaşık olarak 107'sini etkilediği tespit edilmiştir. Ülkelerde kafa travmalarının bu kadar az görülmesinin önemli sebeplerinden bir tanesi sınıflandırma kriterlerinin yetersiz standardizasyonu nedeniyle çok sayıda vakanın rapor edilememesidir ya da yeterli düzeyde tanımlanamamasından kaynaklıdır (Coyle, Ponsford ve Hoy 2018).

Travmatik beyin hasarında, hastanın bilinç düzeyini belirleyebilmek adına Glasgow Koma ölçeği kullanılmaktadır. Bu ölçekte hastanın göz yanıtı, sözlü yanıt ve motor yanıt değerlendirilmeye alınarak travmanın ciddiyet derecesi ortaya konmaktadır ve kafa travması sınıflandırılması yapılmaktadır. Glasgow Koma Ölçeği skorunun 13-15 aralığında olması hafif beyin hasarını, 9-12 aralığında olması orta derecede beyin hasarını ve 3-8 aralığında olması ise ciddi beyin hasarının varlığını göstermektedir (Mufti ve ark 2019).

Bu konuda yapılmış hayvan çalışmaları, hafif derecede meydana gelen beyin hasarının beyindeki protein/lipid moleküllerinde bozulmalara, hafif ila orta kuvvetlerdeki beyin hasarının miyelin dejenerasyonuna ve orta ila şiddetli derecede meydana gelen beyin hasarının ise kanlanmada bozulmalara yol açtığını göstermektedir (Thatcher ve ark 2001).

İnsanlarda hafif derece TBH dahi, konsantrasyon güçlüğü, kısa süreli hafıza bozukluğu, düşüncede yavaşlık, depresyon, doğru kelimeyi seçmede güçlük, azalmış dikkat, tepki verme süresinde ve benzeri bilişsel işlevlerin hızında ve etkinliğinde bir azalma ile sonuçlanabilmektedir. Bunun yanında psikososyal bozukluklar da görülebilmektedir (Thatcher ve ark. 2001).

TBH'nda, kontüzyon (ezik), laserasyon (yırtılma) ve intrakraniyal kanamaya neden olabilecek temaslı yaralanmalar fokal beyin hasarı , yaygın aksonal hasara ve beyinde şişmeye neden olan hızlanma/yavaşlama yaralanmaları diffüs (yaygın) beyin hasarı olarak sınıflandırılmaktadır (Werner ve Engelhard 2007).

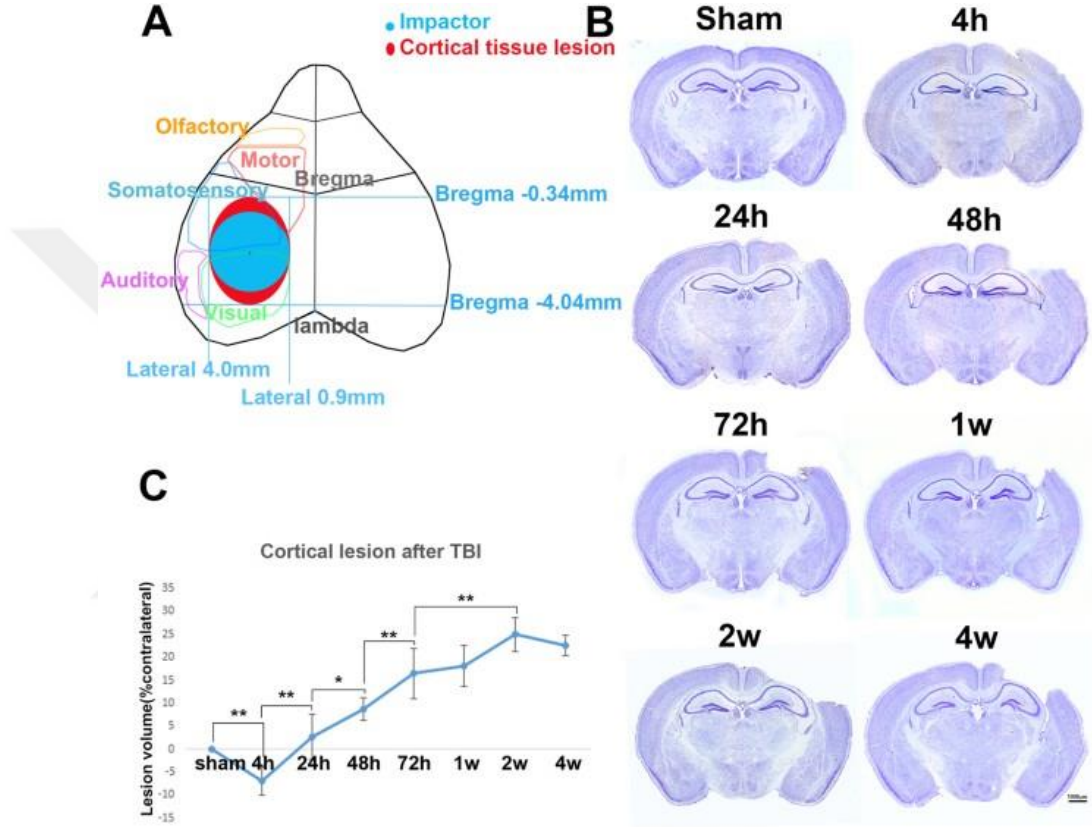
Kafa travmasında birincil yaralanmaya bağlı olarak, doğrudan travmanın neden olduğu doku hasarı ve serebral kan akışında ve beyin metabolizmasında

hasargörölmektedir. Bu evrede anaerobik glikoliz sonucu yoğun laktik asit birikimi, membran geçirgenliğinde artış ve ödem oluşmaktadır. Oluşan hasar sonucunda ATP depoları tükenir ve anaerobik glikoliz yeterli miktarda ATP üretimi sağlayamaz. Sonucunda ATP bağımlı iyon pompaları işlev göremez hale gelir(Dilmen ve ark 2015, Pearn ve ark 2017).

İkincil yaralanma, travmadan sonra saatler içerisinde görölebileceğı gibi günler ve ayları kapsayan uzun bir periyot sonrasında da ortaya çıkabilmektedir. İkincil yaralanma döneminde iskemi benzeri bir patern ile mitokondri işlev bozuklukları, iyonik dengesizlikler, aşırı nörotransmitter salınımı, lipid peroksidasyonu, hücre membran yıkımı ve nöron ölümlüyle sonuçlanabilmektedir. Glutamat, aspartat gibi eksitator nörotransmitterlerin aşırı salınımı NMDA ve AMPA reseptörlerini uyararak voltaj bağımlı Na^+ ve Ca^{+2} kanallarının aktivasyonu ile terminal membranda aşırı uyarılma meydana getirir. Na^+ ve Ca^{+2} un sürekli hücre içine yönelik akışı hücrelerin ölümlüyle sonuçlanacak bir dizi intraselüler mekanizmayı başlatmaktadır. Hücre içi kalsiyum miktarındaki aşırı artış, lipid peroksidaz, proteaz ve fosfolipazları aktive ederek intrasellüler serbest yağ asidi ve serbest radikallerin konsantrasyonunun artmasına sebep olmaktadır. Ayrıca hücre içi translokaz ve endonükleaz gibi enzimlerin aktivasyonu hücre membranı ve DNA'ya hasar vererek nekroz ve/veya apoptozise neden olabilmektedir. Beynin travmaya karşı enflamatuvar yanıtı çok yönlü olup, merkezi sinir sistemine ait bağışıklık hücrelerinin aktivasyonu, periferik sisteme ait bağışıklık hücrelerinin beyin infiltrasyonu ve enflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve reaktif oksijen türlerinin yukarı regölasyonundan meydana gelmektedir (Werner ve Engelhard 2007, McGinn ve Povlishock 2016). Kafa travmasının tedavisi, morbidite ve mortaliteyi büyük ölçüde azaltacak sekonder beyin hasarını önlemeyi amaçlamaktadır.

Intrakraniyal bölüm üç farklı hacimden meydana gelmiştir. Beyin parankim dokusu en fazla hacme sahip olan intrakraniyal beyin kompartmanıdır ve yaklaşık olarak tüm hacmin %83'ünü oluşturmaktadır. Diğer intrakraniyal kompartmanlar ise beyin omurilik sıvısı (BOS, %11) ve kandır (%6). Bu hacimlerin her biri intrakraniyal homeostatik dengenin düzenlenmesinde sıkı bir ilişki içerisinde. Ancak herhangi bir sebep ile kafa içi hacim normal bileşenlerin hacmini aşacak olursa sistemdeki aksaklığı telafi edici bir dizi mekanizma devreye girmektedir. TBH sonrası beyinde hem sitotoksik hem de vazojenik ödem ve venöz tıkanıklık meydana gelebilmekte ve sonucunda ise intrakraniyal hacimde bir artış görölmektedir. Ancak

beyin dokusunun sıkıştırılamayan bir dokudur. Sonuç olarak, ödemli beyin dokusu başlangıçta serebrospinal sıvının spinal bölmeye ekstrüzyonuna neden olacaktır. Sonunda, kan, özellikle de venöz kaynaklı, beyinden de çıkarılır. Uygun müdahale olmadan ve bazen maksimum müdahaleyle bile, telafi edici mekanizmalar başarısız olur ve nihai sonuç patolojik beyin sıkışması ve ardından ölümdür (Galgano ve ark 2017).

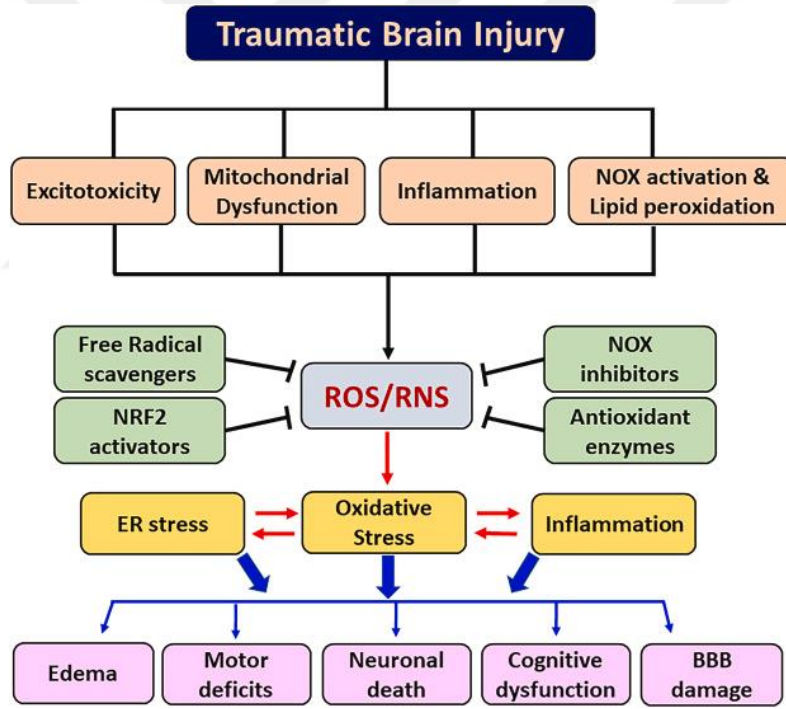


Şekil 2.2.2.1. TBH. Travmatik beyin hasarında (TBH) yer alan karmaşık moleküler mekanizmaları incelemek, TBH için yeni tedaviler geliştirmek için çok önemlidir. TBH için mevcut tedaviler öncelikle hasta stabilizasyonuna ve semptomların hafifletilmesine odaklanmaktadır. Bununla birlikte, alan, kronik patolojiye yol açan hücre ölümü, oksidatif stres ve enflamatuvar kaskadları önlemek için tanımlanmış tedavilerden yoksundur.

2.2.3.Oksidatif Stres ve NOS

TBH enflamatuvar ve oksidatif yollar nedeni ile oldukça karmaşık bir hastalıktır. Doğrudan travmanın neden olduğu birincil yaralanma, TBH sonuçlarının önemli bir belirleyicisi olup ikincil yaralanma nedeni olur.

İnflamasyon, oksidatif stres ve glutamat toksisitesi nedeniyle kalsiyum homeostazı, nöroinflamasyon ve oksidatif dengesizliğe bağlı stres, TBH sonrası yaralanmayı şiddetlendirerek beyin hasarına ve ödemlere yol açarak hücre ölümüne neden olur. Nitrik Oksit (NO) sentaz insanda vasküler endotel, beyin, beyincik, makrofajlardan izole edilmiş olup moleküler ağırlığı 130.000 ile 155.000 arasında değişmektedir. NO santral sinir sisteminde önemli bir nörotransmitter olarak kabul edilmektedir. Glia hücreleri ve nöronlardaki NO sentezi, cGMP sentezi ve glutamat reseptör etkinleşmesi arasında ilişki olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Nitrik oksit (özellikle nitrik oksitle ilişkili iNOS) serebral vazospazm, TBH gibi çeşitli patolojik süreçlerin gelişiminde önemli role sahiptir. Bu yüzden, nitrik oksit sentaz inhibitörleri söz konusu durumların tedavisinde rol alıyor olabilirler.



Şekil 2.2.3.1 TBH ile oluşan primer ve sekonder değişiklikler artan bir enflamasyon, astrogliosis ve ödem ile gerçekleşip nöronların kaybına neden olur. Savunma amaçlı salgılanan parakrin sekresyonlar ile beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) gibi birçok biyolojik faktörün nöron korunmasını sağlaması gerçekleşmektedir. Artan oksidatif stresin nedeni üretilen radikal oksijen formasyonu ve lipid peroksidasyonudur. Astrosit aktivasyonu ve gelişen enflamasyon ödemle sonuçlanmaktadır. Ödemin uzun sürmesi hasarın kalıcılığı

ve şiddeti ile ilişkili olup davranış bozukluklarınaparaleldir. Değişen immün profil bu bozukluklara destek vermektedir.

Serbest oksijen radikalleri veya daha genel olarak reaktif oksijen türleri (ROS) miktarı mitokondriyal oksidatif fosforilasyon zincirlerinde belirlenir. Süperoksit, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH) dahil olmak üzere birçok farklı kısmen indirgenmiş ROS çeşidi vardır. ROS teriminin modern kullanımı hem oksijen radikallerini hem de kolayca serbest radikallere (O_3 , H_2O_2 ve $1O_2$) dönüşen radikal olmayanları içerir. Süperoksit anyonlarının süperoksit dismutaz (hem sitozolde, hem bakır/çinko ile ilişkili izoformda hem de mitokondri manganeez ile ilişkili izoformda bulunan SOD'ler) tarafından dismutasyonu, H_2O_2 üretimi ile sonuçlanır. Nitrik oksit (NO), nörotransmisyon, kan basıncı düzenlemesi, savunma mekanizmaları, düz kas gevşemesi ve bağışıklık düzenlemesi dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçlerde biyolojik aktivitelerde önemli bir oksidatif biyolojik sinyal molekülü olarak hareket eden bol miktarda reaktif bir radikaldir. Üç izoformu vardır. Nöronal NO sentazı (nNOS; tip I), aktive edici mikrogliya (makrofajlar) tarafından çok büyük miktarlarda üretilen indüklenebilir NO sentazı (iNOS; tip II) ve endotelial NO sentazı (eNOS; tip III) içerir.

Nitrik oksit, proteinlerin nitrozilasyonunda yer alabilir; bununla birlikte peroksinitrit, tirozin nitrasyonunu, lipid peroksidasyonunu ve hücreölüm dahil sitotoksiteyi indükleyen oldukça reaktif bir nitrojen türüdür.

Aşırı serbest radikal üretimi (ROS ve RNS) ve enzimatik antioksidan aktivitenin azalması, lipid peroksidasyonu, DNA hasarı, protein oksidasyonu ve hücre fonksiyonlarının bozulması şeklinde hücreölüm hasarla sonuçlanabilecek oksidatif stresin ana nedenleri olarak kabul edilir. ROS ve RNS, nöronal ölüm için hem apoptoz hem de/veya nekroz mekanizmalarında yer alır. TBH için oksidatif stresin patofizyolojik etiyojisi heterojendir ve birçok ölçekte ortaya çıkar. TBH'nin neden olduğu patolojik değişiklikler arasında yaygın aksonal hasar olarak da bilinen aksonal kayma, nörovasküler kompartıman hasarı ve nöronal ağ bozulmasının yanı sıra apoptotik ve nekrotik hücreölüm hasar yer alır. Yaralanma sonrası nöroinflamatuvar yanıt, proinflamatuvar sitokinleri ve serbest radikal oluşumunu içerir. Oksidatif stres, ROS üretimine yol açan biyokimyasal süreçler ile Tablo 1'de listelenen enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan hücreölüm savunma sistemini içeren, ROS'un uzaklaştırılmasından sorumlu süreçler

arasındaki dengesizliğin muhtemel bir sonucudur. Oksidatif stresin mitokondriyal disfonksiyon, kan-beyin bariyeri (BBB) bozulması, duyu-motor disfonksiyonu ve sekonder nöronal hasar nedeniyle beyin ödemi oluşumuna yol açtığı öne sürülmüştür.

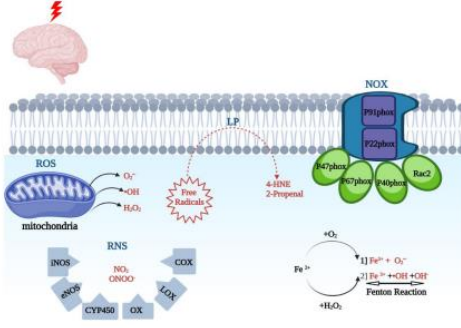
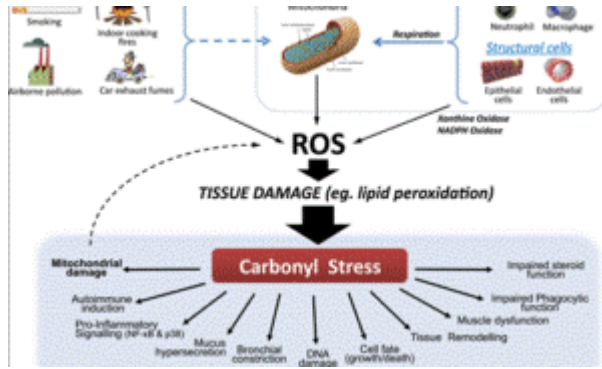


Figure 1. Schematic illustration of the main cellular components involved in the post-TBI oxidative stress process. The NADPH oxidase (NOX) with its two membrane subunits, P91phox and P22phox, and cytoplasmic components, P47phox, P67phox, P40phox, and Rac2, is a key enzymatic unit involved in this process. The reactive oxygen species (ROS), comprised of superoxide ($O_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), and the hydroxyl radical ($\bullet OH$), are products of 1-electron reduction of oxygen. The reactive nitrogen species (RNS), including various nitric oxide compounds, such as peroxynitrite ($ONOO^{\bullet}$) and nitrogen dioxide (NO_2), are the products of multiple enzymes including nitric oxide synthase (iNOS), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), cytochrome P450 (CYP450), cyclooxygenase (COX), lipoxygenase (LOX), and xanthine oxidase (XO). Free iron (Fe^{2+}), an abundant ion within the CNS, participates in two main reactions, including the Fenton reaction, leading to the production of Fe^{3+} , $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$, and OH^- . The phenomena of lipid peroxidation (LP) involves electron transfer from membrane lipids to free radicals, involving a three-step process, and ultimate production of 4-HNE and 2-Prepenal (acrolein). The free radicals are depicted as red vs. the enzymes and proteins are in black. Images created with BioRender.com.



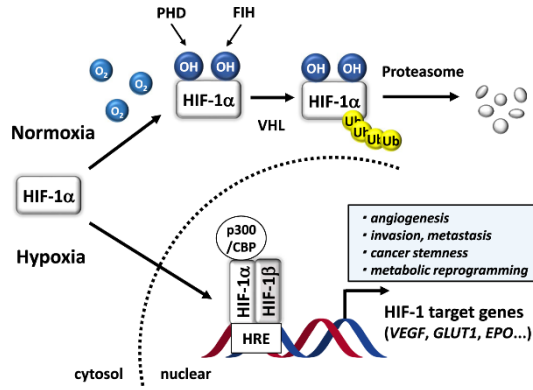
Şekil 2.2.3.1. Oksidatif stres.

2.2.4. Hipoksi ve HIF

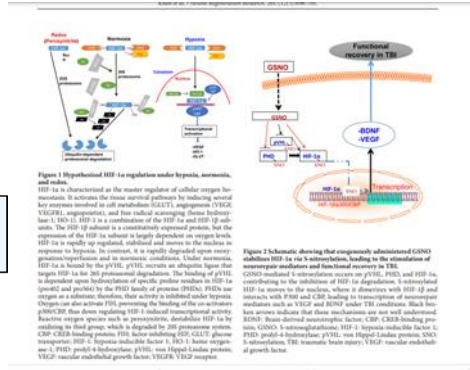
Beyin sarsıntısı olarak da adlandırılan hafif TBH, motor kusurlara yol açan sekelleri başlatır. TBH'nın akut fazı, nöroinflamasyon ve nitroksidatif patlama ile ilişkiliyken, kronik faz, stimülasyon eksikliği gösterir. Tedavi süreci ve rejenerasyon. Hipoksi/iskeminin ana düzenleyicisi olan hipoksi indüklenebilir faktör 1 alfa (HIF-1 α), nöro-onarım sürecini uyarır ve böylece beyin travmasından sonra fonksiyonel iyileşmeye yardımcı olur. HIF-1 α 'nın aktivitesi, HIF-1 α 'nın S-nitrosilasyon mekanizması yoluyla NO tarafından düzenlenir.

Hipoksi ile indüklenebilir transkripsiyonel faktör 1 (HIF-1), hipoksiye yanıt olarak hücre sağkalımının kritik yönleri sırasında gen ekspresyonunun ana düzenleyicisidir. Aktif formu, hücresel oksijen seviyeleri tarafından düzenlenen HIF-

la ve HIF-1 β alt birimlerinden oluşan dimerik bir transkripsiyonel komplekstir. Normoksik koşullar altında HIF-1 α , oksijene bağımlı prolin hidroksilazlar tarafından hidroksile edilir ve hızla yok edilir. Hipoksik koşullar altında, nöroproteksiyon, eritropoez, apoptoz modülasyonu ve hücre proliferasyonunda yer alan çok sayıda hedef genin transkripsiyonu ile sonuçlanan daha kararlı bir aktif kompleks oluşur. (Jin ve ark 2000; Marti ve ark 2000).

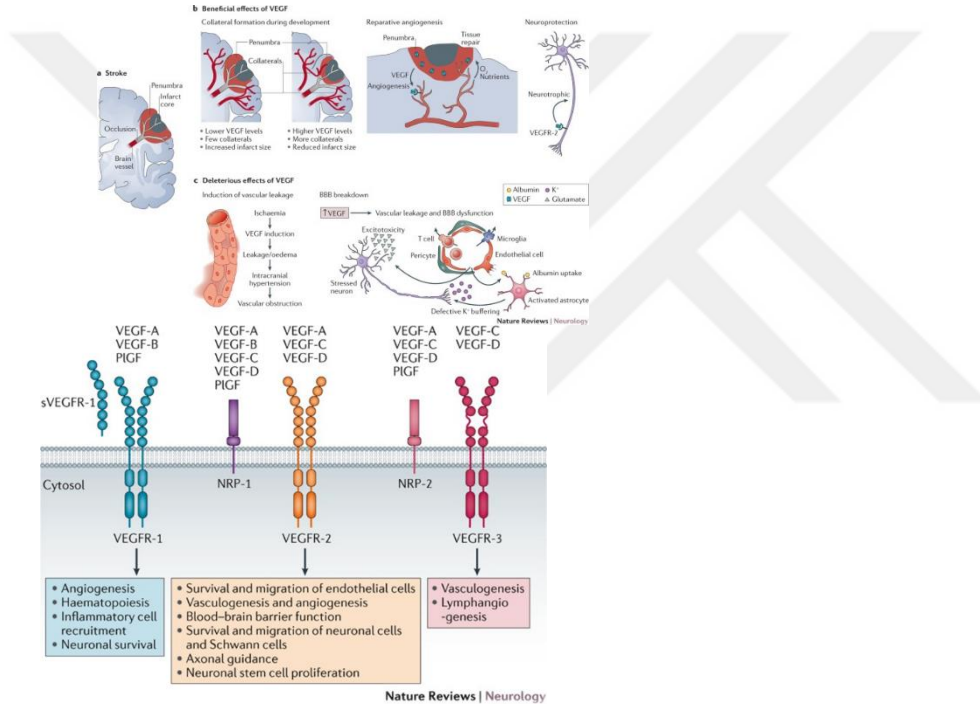
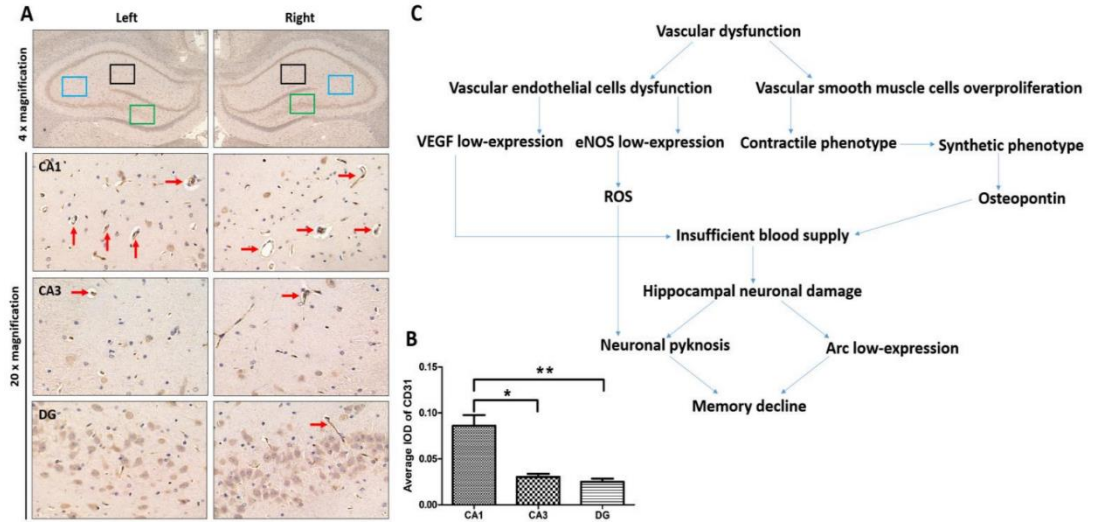


Şekil 2.2.4.1. HIF1 α .



2.2.5. Damarlanma ve VEGF

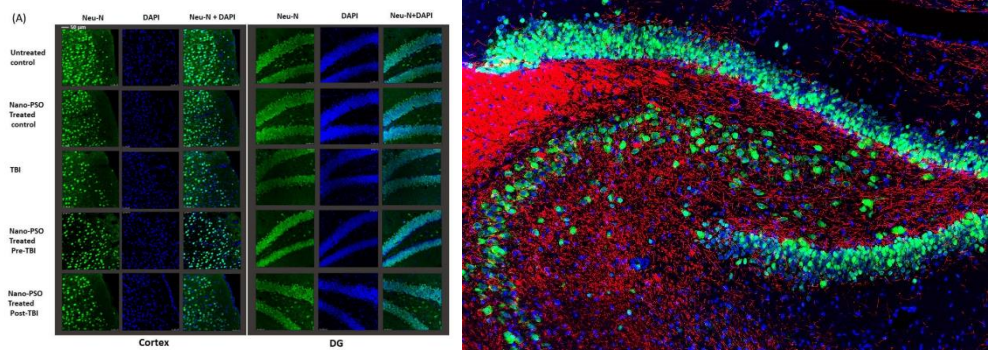
Vasküler endotel büyüme inhibitörü olarak da bilinen tümör nekroz faktörü süper ailesi-15 (TNFSF15), anti-anjiyogenezi ve enflamasyonu modüle eden bir sitokindir. Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), TBH takiben anjiyogenezi ve vasküler geçirgenliği destekler. VEGF ve VEGI dengesi, beyindeki vasküler ve bağışıklık sistemi homeostazının korunmasında önemli bir rol oynayabilir. Bununla birlikte, TBH sonrası dolaşımdaki VEGF ve VEGI'deki dinamik değişiklikler ve plazma VEGF ile plazma VEGI arasındaki korelasyon belirsizliğini korumaktadır.



Şekil 2.2.5.1. Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF)

2.2.6. Nöron Belirteci ve NeuN:

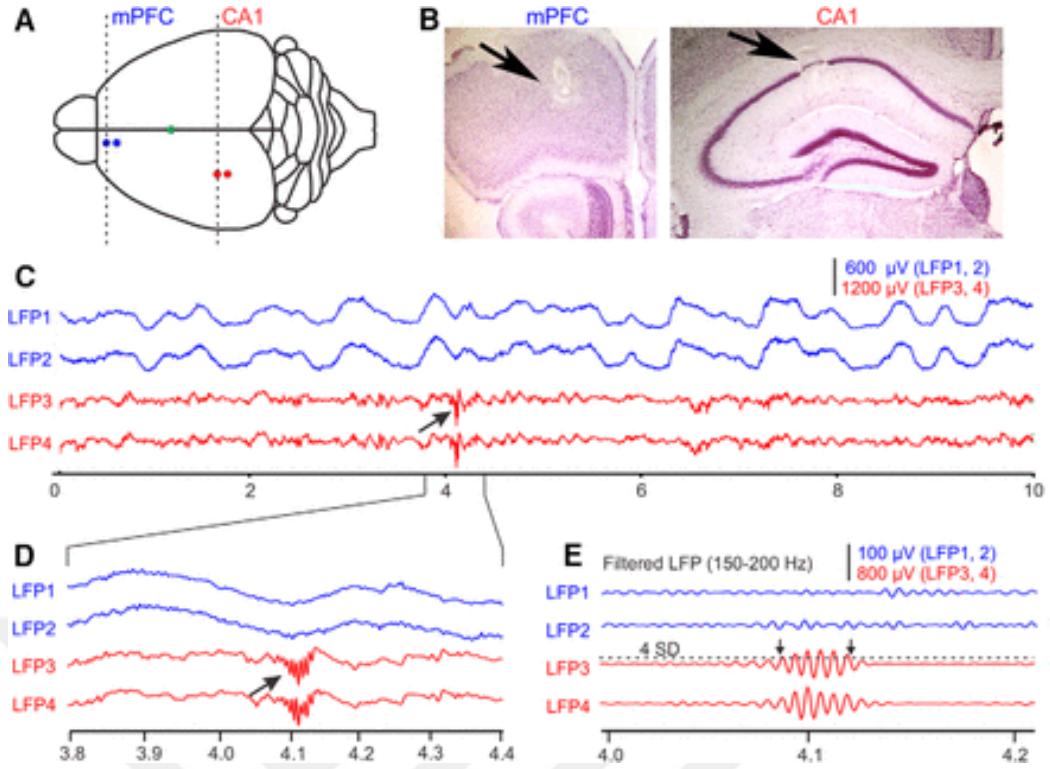
Corhabditis elegans'ta cinsiyet belirleyici bir genin protein ürününe homolog olan bir protein olan NeuN (Fox-3, Rbfox3 veya Hexaribonükleotid Bağlayıcı Protein-3), yaygın olarak nöronlar için bir biyobelirteç olarak kullanılan bir nöronal nükleer antijendir. NeuN proteini, beyindeki nöronların çoğunun çekirdeğinde ve perinükleer sitoplazmasında lokalizedir.



Şekil 2.2.6.1. NeUN proteini, beyindeki nöronların çoğunun çekirdeğinde ve perinükleer sitoplazmasında lokalizedir.

2.2.7. Elektroensefalografi ve Elektrokortikografi:

Hafif TBH (mTBH), elektroensefalografi (EEG) kayıtlarında görülebilen elektrofizyolojik anormalliklerle sonuçlanan beyin hasarına neden olur. TBH sonrası EEG, posterior baskın ritmin yavaşladığını ve saatler içinde normale dönebilen veya haftalar içinde daha yavaş düzelebilen yaygın teta yavaşlamasının arttığını gösterir. Hafif travmatik beyin hasarına özgü net bir EEG veya kantitatif EEG (qEEG) özelliği yoktur. Hafif travmatik beyin hasarından (mTBI) sonra akut EEG değişiklikleri olarak mTBI'dan hemen sonra, epileptiform aktivite (yüksek genlikli keskin dalgalar veya yüksek frekanslı deşarjlar), ardından kortikal aktivitenin tipik olarak 1-2 dakika süren diffüz baskılanması ve ardından 10 içinde normal taban çizgisine dönen yaygın EEG yavaşlaması gelir. En yaygın olarak, artan teta, artan delta veya artan teta: alfa oranı ile ortalama alfa frekansında ani azalma görülür. Elektroensefalografi (EEG) saçlı deri üzerine yerleştirilen elektrotlar yardımıyla serebral biyoelektriksel aktivitenin kaydedilmesi işlemine denir (Picton and Mazaheri 2006). İlk defa Hans Berger tarafından insan beyninden elektriksel aktivite kaydı yapılmıştır. 1929 yılına dayanan tarihine ve alternatif görüntüleme tekniklerine (PET, fMR ve magnetoensefalografiye) rağmen halen serebral biyoelektriksel aktivitenin değerlendirilmesinde kılavuzluk etmektedir. EEG epilepsi tanısının konulması, nöbet sınıflandırılmasında ve hastaların takibinde kullanılmaktadır Buna ek olarak mental durum, uyku bozuklukları, beyin ölümünün değerlendirilmesinde de sıklıkla kullanılan bir tekniktir (Bora ve ark 2008). EEG, düşük maliyetli ve noninvaziv bir teknik olması sebebiyle epilepsi teşhisi için tercih edilmektedir (Acharya ve ark 2019).



Şekil 2.2.7. Elektroensefalografi

Beyinde nöron olarak adlandırılan sinir hücreleri ve yardım görevinde bulunan glial hücreler olmak üzere iki ana hücre sınıfı bulunmaktadır. Her iki hücre sınıfında da hücrelerin dinlenme membran potansiyelleri yaklaşık olarak 80mV'dir ve hücre içi negatif potansiyeldedirler. Hücre zarında meydana gelen negatif potansiyelin kaynağı K^+ , Na^+ , Cl^- ve büyük organik anyonların hücre içi ve dışı dağılımlarındaki farklılıktır. Ca^{++} iyonları ise diğer iyonlara göre daha az miktarda bulunur, ancak önemli bir düzenleyici role sahiptirler. Hücresinin sahip olduğu bu elektriksel potansiyel, enerji kullanılarak K^+ katyonlarının hücrenin içine ve Na^+ 'ın dışarıya aktif taşınmasıyla oluşmaktadır.

Nöronlarda elektriksel aktivite, aksiyon potansiyellerinin ve postsinaptik potansiyellerin (PSP) meydana gelmesi ile oluşur. Hücre membranının elektriksel uyarımı bir eşiği şiddetini aşacak olursa aksiyon potansiyeli meydana getirmektedir. Ancak postsinaptik potansiyeller eşik altı olaydır. Nöron membranında Na^+ iyonuna geçirgenlikteki hızlı artış sebebiyle hücre içeresine yoğun miktarda Na^+ iyonunun akışı gerçekleşmektedir. Bu akış hücre içerisindeki potansiyelin hızlı bir şekilde artmasına ve iç ile dışı ortam arasındaki potansiyelin hücre içinde negatiften pozitif (yaklaşık +30 mV) doğru değişimine neden olmaktadır. Daha sonra K^+ iyonlarına karşı membran geçirgenliğinde meydana gelen artış K^+ iyonlarının ise hücre

içerisinden dışarısına doğru çıkışına izin vermekte, Na^+ iyonları için ise geçirgenlikte azalmaya sebep olmaktadır. Hücre içi ortamın elektriksel farkı dış ortama göre negatifleşir yani eski konumuna geri döner. Bu şekilde aksiyon potansiyeli oluşmuş olur."Ya hep ya hiç" kuralın uygun olarak eşik üstü uyaranlar için, sabit büyüklükte bir aksiyon potansiyeli üretilirken, eşik altı uyaranlar için nöronda aksiyon potansiyeli gerçekleşmez. Oluşan aksiyon potansiyeli diğer bir nöron hücrelerine aktarılırken sinaptik aralıkta bir sonraki nöronun postsinaptik zarının geçirgenliğinde bir değişikliğe sebep olacak nörotransmitterlerin (aracı kimyasalların) salınımını sağlamaktadır. Presinaptik nörondan salınan nörotransmitterler postsinaptik nöron membranında reseptörü ile bağlantı kurarak iyonların zardan geçirgenliğine sebep olurlar ve zar boyunca potansiyeller yaratılır. Sinaptik aktivitenin eksitator ya da inhibitör olarak etki göstermesi postsinaptik membranın depolarize ya da hiperpolarize olması ile ilişkilidir. Eksitator postsinaptik potansiyeller (EPSP), hücre içine pozitif yüklü iyonların akımını kolaylaştırarak hücrenin depolarize olmasını sağlamaktadır. İnhibitör postsinaptik potansiyeller (İPSP) ise hücre dışına K^+ iyon akımını artırarak ya da hücre içerisine Cl^- girişini sağlayarak hiperpolarizasyona neden olurlar. Binlerce, hatta milyonlarca nöronun (özellikle kortikal piramidal hücrelerin) net EPSP ve İPSP'lerinin toplamının meydana getirdiği elektriksel akım, yüzeysel EEG aktivitesini oluşumunu sağlamaktadır.

Farklı frekanstaki ritimlerin EEG'ye sağladığı katkı, deneğin yaşına ve davranışsal durumuna, özellikle de uyanıklık düzeyine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Picton ve Mazaheri 2006).

Delta ritmi, 4 Hz den daha yavaş olan elektriksel aktivitelerdir. Derin uyku (NREM III ve IV) sırasında yetişkin bireylerde görülebilmektedir. Ancak istirahat halindeki uyanık yetişkilerde delta aktivitesinin varlığı mutlak bir patolojinin varlığını gösterir. (Picton ve Mazaheri 2006). Buna karşın süt çocuklarında delta aktivitesi normaldir ve sıklıkla görülmektedir.

Teta ritmi Frekansı 4-7 Hz arasındadır. Çocuklarda belirgin olarak görülen teta ritimleri yetişkin insanlarda serebral gelişimi takiben nadir olarak görülmektedir. Bununla birlikte, kemirgenlerde baskındır; yüksek genliğe ve karakteristik testere dişi şekline sahiptir. Kemirgenlerdeki teta ritimlerinin beyin yapıları arasındaki bilgi transferinde bir geçit mekanizması görevi gördüğü varsayılmaktadır. İnsanlarda, teta bandındaki aktivite duygusal veya bazı bilişsel durumlarda ortaya çıkabilir;

patolojinin neden olduğu alfa ritimlerinin yavaşlamasıyla da bağlantılı olabilir. Yetişkinlerde fokal veya lateralize teta aktivitesinin tespiti bölgesel bir serebral patoloji göstergesi olabilirken, diffüz teta aktivitesinin varlığı nörolojik hastalıklarda sıklıkla karşılaşılan bir durumdur.

Alfa ritimleri, uyanık durumda, gözler kapalı ve rahat bir konumdayken baskındır. Alfa ritmi frekans aralığı 8-13 Hz dir. Yetişkinlik düzeyinde ise sıklıkla alfa ritminin 9-11 Hz aralığında olduğu görülmektedir. En fazla başın arka bölgelerinde (parietal ve oksipital bölgelerde) bulunmasına rağmen santral ve temporal bölgelerde de görülmektedir. Görsel uyarılma, dikkat, zihinsel aktivite gibi bilişsel fonksiyonlar alfa ritminin zayıflamasına veya baskılanmasına sebep olur (Picton ve Mazaheri 2006). Sağlıklı bireylerde EEG kaydında alfa aktivitesi baskındır ancak serebral patoloji görülenlerde, antikonvulzan kullananlarda, ileri yaşlarda alfa ritminde azalma görülebilmektedir. Bunun tersine çocuklarda ve tirotoksik ileri yaşlılarda alfa ritminde artışlar tespit edilebilmektedir. Alfa aktivitesinde iki hemisfer arasında amplitütler değerlendirildiğinde hafif bir asimetrinin olabileceği görülmektedir. Bunun sebebinin de genellikle sağ hemisferin dominant hemisfer olmaması ve kranium kalınlığının farklarından doğabileceği düşünülmektedir. Alfa ritmi baskılanması ve amplitütteki artış hemisferde bir lezyonun varlığını işaret edebilmektedir.

Beta ritmi, 13-30 Hz frekansa sahip , artan uyanıklık ve odaklanmış dikkat ile bilişsel performansın aktif olarak sergilendiği durumlarda ortaya çıkan ritmik bir elektriksel aktivitedir (Picton ve Mazaheri 2006). Ayrıca Rem uykusu, uykuya dalma, yüzeysel uyku ve hızlı göz hareketlerinin belirgin olduğu zamanlarda beta ritmi sıklıkla görülmektedir. Beta ritmi, barbitüratlar ve benzodiazepinler gibi çeşitli farmakolojik ajanlardan etkilenebilmektedir.

Gama ritmi 30 Hz den daha yüksek frekansa sahip ritimlere denir. Gama aktivitesinin bilgi işleme (duyusal uyarıların anlamlandırılması) ve istemli hareketlerin hayata geçirilmesiyle bağlantılı olduğu bilinmektedir (Picton ve Mazaheri 2006) Bora ve ark 2008).

2.2.8.PA

Dünya çapında milyonlarca insan nörodejeneratif hastalıklardan (ND'ler) etkilenmektedir. ND'ler, yüksek düzeyde enflamatuvar biyobelirteçler ve oksidatif stres koşullarının eşlik ettiği ilerleyici hasar ve sinir hücrelerinin ölümü ile

karakterize edilir. Nar (*Punica granatum*) tohumu yağının ana biyoaktif bileşeni olan punisik asit, güçlü anti-oksidatif ve anti-enflamatuar etkiler gösteren konjuge α -linoleik asidin bir omega-5 izomeridir ve geniş bir yelpazeye karşı olumlu etkisine katkıda bulunur.. Punisik asit, peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptörlerin ekspresyonunu artırarak oksidatif hasarı ve inflamasyonu azaltır. Ek olarak, GLUT4 proteininin ekspresyonunu ve kalpain hiperaktivasyonunun inhibisyonunu artırarak beta-amiloid birikintilerinin oluşumunu ve tau hiperfosforilasyonunu azaltabilir. Yüksek düzeyde punisik asit içeren mikrokapsüllü nar, HDL'de antioksidan PON1 aktivitesini artırır. Punisik asidin beyindeki sınırlı geçirgenliği nedeniyle, beyindeki punisik asidin biyolojik aktivitesini arttırmak ve nörolojik bozuklukların semptomlarını azaltmak için çeşitli dağıtım formülasyonları geliştirilmiştir. Punisik asit, Alzheimer, Parkinson ve Huntington hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde önemli bir nutrasötik bileşiktir.

Nar (*Punica granatum*), Punicaceae familyasına ait Batı Asya kökenli eski ve uyarlanabilir bir meyvedir. Orta Doğu, Asya, Avrupa ve Amerika ülkeleri de dahil olmak üzere dünyanın her yerinde, özellikle subtropikal ve tropik bölgelerde değişken iklim koşullarında yetiştirilmektedir. Meyvenin toplam ağırlığının yaklaşık %50'si, önemli bir fenolik bileşik, mineral ve kompleks polisakkarit kaynağı olan kabuğa karşılık gelir. Nar meyvesinin yenilebilir kısmı ise su, şeker, pektin ve tohumlardan (%10) zengin taneler (%40) içerir. Nar tohumları, yararlı etkilerine katkıda bulunan polifenoller ve yağ asitleri gibi birçok bileşen içerir. Nar Çekirdeği Yağı (PSO), toplam tohum ağırlığının yaklaşık %12'sini ve %20'sini temsil eder. PSO 14 yağ asidi içerir, bunların en bol olanı %50-80 punisik asit, bunu linoleik asit (%13-20), palmitik asit (%6-9), stearik asit (%2-3), oleik asit (%8-9), linolenik asit (%0,06-0,08) ve araşidik asit (%0,68-0,90) takip eder. PSO'nun ana biyoaktif bileşeni olan punisik asidin, osteoporoz gibi çok çeşitli hastalıklara karşı olumlu etkisine katkıda bulunan, anti-obezite özelliklerine sahip, antioksidan ve lipid metabolizması ile ilgili ekspresyonu artıran güçlü bir anti-oksidatif etki sağladığı gösterilmiştir. Kendi başına punisik asit, anti-inflamatuar, anti-diyabetik, anti-obezite, anti-proliferatif ve anti-karsinojenik özellikler gibi geniş bir biyolojik etki yelpazesine sahiptir. Punisik asit, konjuge α -linolenik asidin (CLnA) bir omega-5 izomeridir ve konjuge linoleik asit (CLA) ile yapısal benzerlikler gösterir. Punisik asit için açıklanan ana biyolojik mekanizma, hücre farklılaşması ve proliferasyonunda yer alan genlerin ekspresyonunu kontrol eden, lipid

metabolizmasında yer alan enzimleri ve glukoz homeostazını düzenleyen peroksizom proliferatörle aktive olan reseptörlerin (PPAR'lar) diferansiyel ekspresyonunun modülasyonunu içerir. Ek olarak, PPAR'lar, proinflamatuvar biyobelirteçlerin aktivasyonu ve üretimi ile yakından ilişkilidir. Punisik asidin antioksidan ve antienflamatuvar özellikleri, ND'lerin tedavisinde yararlı etkiler sağlayabilirken, ND'lerin ilerlemesiyle ilgili farklı yollarda etkileşime girme şekli, ona diğer antioksidatif nutrasötiklere göre avantajlar sağlayabilir. Doğada, punisik asidin (PuA) en bol kaynağı nardır (*Punica granatum*) ve nihai miktarı meyve genotipine bağlıdır. Punisik asidin açıklanan ana özellikleri arasında hidroksilleri temizleme, metal şelatlama ve azaltma yeteneği vardır (Guerra-Vázquez CM ve ark 2022).

2.2.9. AMAÇ

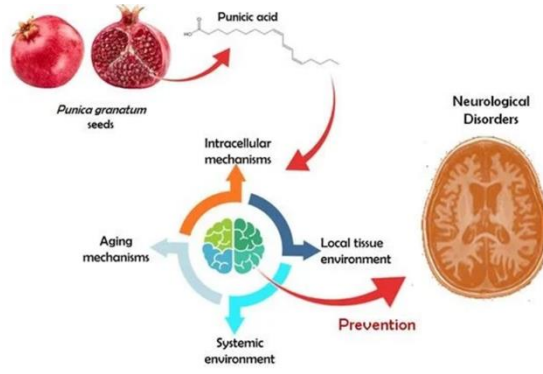
TBH yüksek sıklık oranı, genç yetişkinleri daha çok etkilemesi ve hayatta kalanlarda ileri fonksiyonel kısıtlanmaların görülmesi nedeniyle önemli bir sosyal sağlık problemidir. Travmatik beyin hasarına yola açan mekanizmalar primer ve sekonder yaralanma olarak sınıflandırılabilir. Primer mekanizmalar yaralanma anında olduğu halde sekonder yaralanma, primer mekanizmalara organizmanın yanıtıdır ve her ikisi de fokal veya diffuz olabilir. Sekonder yaralanma sırasında, hipotansiyon, intrakranial basınç artışı, serebral perfüzyon basınç azalması, nöral hücre membran harabiyeti gibi olaylar görülür. TBH na yanıt olarak hücresel düzeyde glutamat salgılanması AMPA ve NMDA reseptörlerini aktive ederek kalsiyum ve sodyum nöronal geçişini artırır. Sodyum/potasyum oranını sağlayabilmek için nöronal enerji depoları boşalır, nöronal hücre membranının harabiyeti ile serbest radikaller ve oksidanlar çıkar ve bunlar glutamatın artışına, döngünün devamına yol açar. İntrasellüler kalsiyum artışı ile caspase (proteolitik enzim) gibi enzimler nöronal apoptozise yol açar (Vonder Haar C ve ark 2016).

Deneysel hayvan modelleri TBH'da ikincil yaralanma süreçleri araştırmak ve olası tedavi edici yaklaşımlar için klinik öncesi veri sağlamak için kullanılır. Hayvan modellerinin geliştirilmesi yeni tedavi girişimlerin karakterizasyonu yanı sıra, klinik ortamda yapılamayan insan TBH, biyomekanik hücresel ve moleküler yönlerini

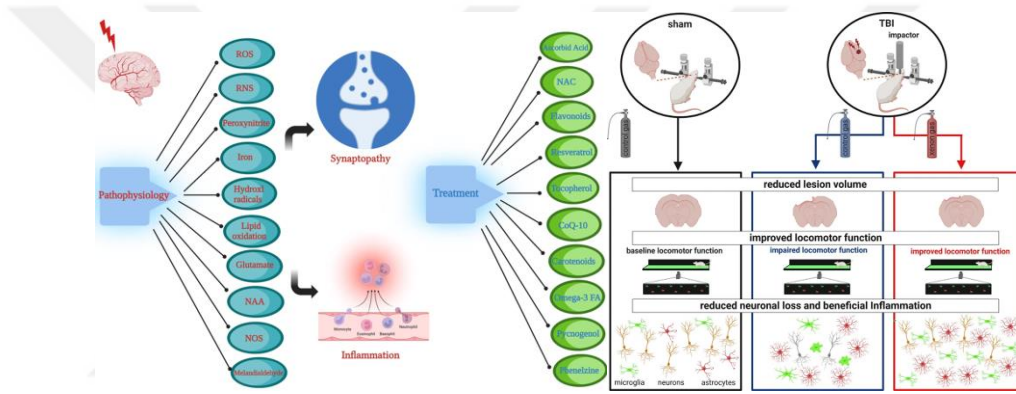
incelemek için gereklidir. Deneysel kafa travmaları modelleri arasında ağırlık düşürme modelleri, Kontrollü kortikal darbe modeli, Sıvı perküsyon yaralanma modelleri sayılabilir (Vonder Haar C ve ark 2016)

Beyin hasarına yol açan mekanik faktörlerin anlaşılması hem etkili önlemlerin alınması hem de kafa travmalarının kısa ve uzun dönemdeki olumsuz sonuçlarının minimize edilmesi açısından gereklidir. Travmanın yönü, şiddeti, süresi ve lokalizasyonu kafa travmasının tipinin ve ağırlığının belirlenmesini sağlar. Punicic Asit (PA), Nar Çekirdeği Yağının (PSO) yaklaşık %70-80'ini oluşturan çoklu doymamış bir yağ asididir. PA'nın metabolizmasını ve biyoyararlanımını değerlendirmek için hayvanlar üzerinde çok sayıda farmakokinetik çalışma yapılmıştır. Etkinlik denemelerinin sonuçları, PA'nın dolaşımdaki konjuge linoleik aside (c9t11) kolayca metabolize olduğuna dair önemli kanıtlar ortaya koymuştur. PA'nın sıçanlara 24 saatlik bir süre boyunca oral yoldan verilmesi, PA'nın plazma ve böbrek, karaciğer, beyin, kalp ve yağ dokuları gibi sıçanların diğer organlarında (CLA) metabolizmasını sağladığı belirlenmiştir. c9t11 konjuge linoleik asit ise insan vücudunun korunmasında biyolojik olarak önemli bir rol oynamaktadır. PA' in çeşitli hayvan modellerinde yapılan çalışmalar sonrasında diyabet/insülin intoleransı üzerine etkileri potansiyel olarak faydalı olduğu bulunmuştur. Tüm bunlara ek olarak Nar çekirdeği yağının yüksek yağlı bir diyetin neden olduğu obeziteyi önlediği ve farelerde insülin duyarlılığını arttırdığı gösterilmiştir (Vonder Haar C ve ark 2016).

Herhangi bir terapötik müdahalenin çok yönlü olması ve aynı anda farklı hücresel değişiklikleri modüle etme yeteneğine sahip olması gerekir. Farklı farmasötik etkileşimler nedeniyle, farklı ilaçların kombinasyonları uyum içinde iyi çalışmaz ve olumsuz fizyolojik koşullara neden olur. TBH'yi takiben terapötik bir müdahale olarak doğal bileşiklerin kullanılma olasılığını araştırmaya yönelik araştırmalar başlamıştır. Bu bileşikler normalde çok düşük toksisiteye sahiptir ve diğerleriyle azaltılmış etkileşimlere sahiptir. Bu fitokimyasallardan bazıları, ikincil yaralanma kaskadının temel bileşenlerini dengelemek için olası terapötik müdahaleler potansiyeline sahip gibi görünmektedir (Vonder Haar C ve ark 2016).



Şekil 2.2.9.1 Nar (*Punica granatum*) tohumu yağının ana biyoaktif bileşeni olan punisik asit, güçlü anti-oksidatif ve anti-enflamatuar etkiler gösteren konjuge α -linoleik asidin bir omega-5 izomeridir ve geniş bir yelpazeye karşı olumlu etkisine katkıda bulunur.



Şekil 2.2.9.2 PA ile TBH tedavisi amaçlandı.

İlaçların insanlarda travmatik beyin hasarını tedavi etmedeki sayısız başarısızlığından dolayı, daha fazla araştırmacı kombinasyon terapileriyle ilgilenmeye başlamıştır. Bu büyük ölçüde, eksitotoksisite, oksidatif stres, ödem, nöroinflamasyon ve hücre ölümüne neden olan yaralanmadan kaynaklanan hasarın çok modlu doğasından kaynaklanmaktadır. Çoklu ilaç tedavileri, ikincil yaralanma kaskadının birçok yönünü hedefleme potansiyeline sahipken, daha önceki birçok terapi belirli bir yöne odaklanmıştır. Diğer terapileri desteklemek için kullanılabilecek vitaminler, mineraller ve besinlerdir. Bunların çoğu düşük toksisiteye sahiptir. Son 20 yılda, beyin hasarı için besinlerin takviyesine ve suprafizyolojik dozajına olan ilgi artmış ve gerçekten de birçok vitamin (B2, B3, B6, B9, C, D, E), şifalı bitkiler ve geleneksel ilaçlar (ginseng, Gingko biloba) dahil olmak üzere deneysel modellerde beyin hasarı için nutrasötik tedavi kategorisinde öne çıkan birkaç tedavi klinikte kullanılmaya başlamıştır. Ek olarak

Flavonoidler ve diğ er besinler (magnezyum, çinko, karnitin, omega-3 yağ asitleri) klinik tedaviler için g     bir potansiyele sahiptir (Vonder Haar C ve ark 2016).

Bu  alışmada TBH için PA terapötik etkinliğı oksidatif stres, damarlanma, hipoksi ve apoptoz açısından incelenmesi ve EEG ile ilişkilendirilmesi amaçlandı.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Deney Protokolü

Çalışma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapılmış olup 40 adet, ağırlıkları 300±350 gr arasında değişen 10-12 haftalık erişkin erkek sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar 3 gün boyunca (adaptasyon için) herhangi bir sağlık problemi belirtisine karşı bekletilmiştir. Çalışma boyunca hayvanlar stabil koşullar altında (22°C sıcaklık, %30-70 nem, aydınlık/karanlık döngüsü 12/12 saat) tutulmuştur. Kuru pelletler ve çeşme suyu ile beslenmeleri sağlanmıştır. Deney grupları;

Grup 1: Kontrol grubu, Sadece cilt kesisi yapılacak bunun dışında hiçbir uygulama yapılmadı, n:8

Grup 2: Sham grubu, kafa travması sonrasında normal beslenen sıçanları içermektedir n: 8

Grup 3: Kafa travması sonrasında normal beslenmeye ek olarak 1,2 gr/ gün Punicic asit gavaj yoluyla 3 gün süreyle verildi. n: 8

Grup 4: Kafa travması sonrasında normal beslenmeye ek olarak 2,4 gr/ gün Punicic asit gavaj yoluyla 3 gün süreyle verildi. n: 8

Grup.5: Kafa travması sonrasında normal beslenmeye ek olarak 3,6 gr/ gün Punicic asit gavaj yoluyla verildi. n: 8

Travma ve tedavi grubundaki sıçanlara, kraniektomi yapıldıktan sonra travma modeli olarak yüksekte ağırlık düşürme yöntemi uygulandı. Travma sonrası PA uygulaması hergün gavaj yolu ile gerçekleştirildi. Histopatolojik ve biyokimyasal analizlerle nöroprotektif etkinlik için oksidatif stres ve apoptoz açısından değerlendirilmek üzere örnekler alındı. EEG çekimleri yapıldı.

3.2. TBH

Çalışmamızda uygulanan Marmarou'nun darbe hızlandırma ağırlık düşürme modeli, yaygın bir aksonal yaralanma modelini indüklemek için kullanılır. 300-450 gr arasında değişkenlik gösteren çelik ağırlık, 1 m'lik yükseklikten pleksiglas tüpün

içinden geçirilerek düşürülür. Pelksiglas tüpün iç yüzeyi 20 mm, dış yüzey ise 25 mm çapta olup iç yüzey sürtünmeyi azaltmak için ince bir yağlayıcı ile sıvanır. Kask olarak 2 mm kalınlığında çelik disk kullanılır. Anestezi uygulanmış sıçanların her birinin kafa derisi traş edilir ve orta hat insizyonu yapılarak periost açılır. Metalik disk, kemik mumu kullanılarak kafatasının orta kısmına sabitlenir. Hayvanlar köpük yatak üzerine prone pozisyonda yerleştirilir. Daha sonra pleksiglas tüpün alt ucu doğrudan kaskın üzerine gelecek şekilde düzenlenir ve belirlenen ağırlık düşürülür. Tekrarlanan darbeleri önlemek için ağırlığa esnek olmayan bir ip bağlanır.



Şekil 3.2.1: Kafa travması çalışmamızda kullandığımız ağırlık düşürme sistemi. Mavi ok: İç çapı 20 mm, dış çapı 25 mm olan cam boru, Kırmızı ok:450 gr arasında değişkenlik gösteren çelik ağırlık, Beyaz ok: Kask olarak kullanılan 2 mm kalınlığında çelik disk.

3.3.Klinik Değerlendirme

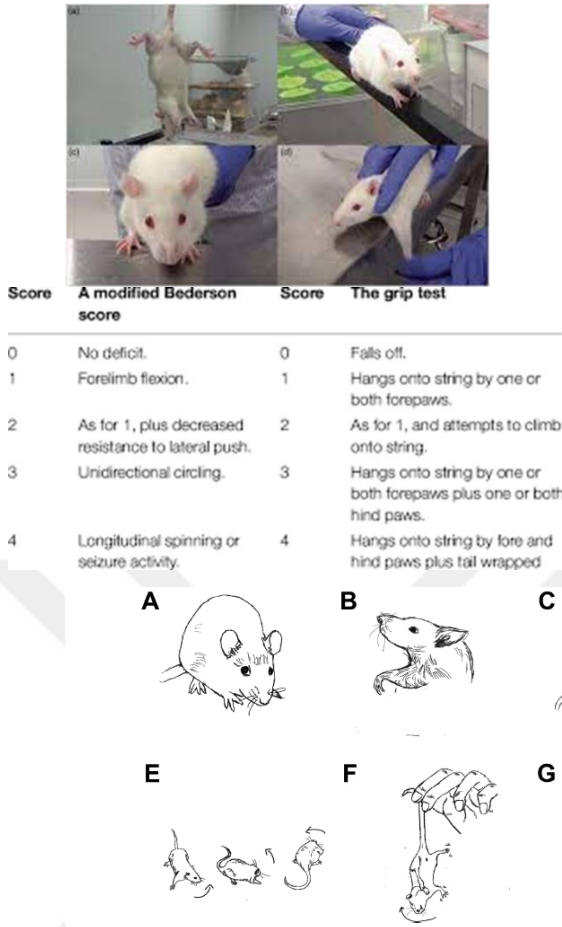


Figure 1 Graphical representation of motor function scores.

Notes: Rats with no deficit were scored 0 (A); rats with forelimb flexion influencing wrist (B) or shoulder (C) were scored 1; rats with forelimb flexion plus decreased resistance to lateral push were scored 2 (D); rats with unidirectional circling to the deficit side were scored 3 (E); rats with longitudinal spinning to the deficit side (F) or seizure activity (G) were scored 4; rats with no movement were scored 5 (H).

Şekil 3.3.1. Klinik skortlama

3.4.Biyokimyasal Değerlendirme

Hayvanlar öldürülmeden önce, alınan kardiyak kan numuneleri, serum ve plazmayı ayırmak için 4°C'de 4,500 dev/dak'da 5 dakika santrifüjlendi. Süperoksit dismutaz (SOD) enzimini saptama yöntemi prensibi, nitroblue tetrazolyumun (NBT) süperoksit üreticisi ksantin-ksantokinaz sistemi tarafından indirgenmesine dayanmaktadır. SOD aktivitesi birim/g (U/ml) doku proteini olarak ifade edildi. Lipid peroksidasyon ölçümü Esterbauer yöntemi kullanılarak yapıldı. 90 - 95 °C'de tiyobarbütirik asit ile reaksiyona giren malondialdehit (MDA) pembe bir kromojen oluşturur. On beş dakika sonra örnekler hızla soğutuldu ve absorbanları 532 nm'de spektrofotometrik olarak okundu. Elde edilen değerler µmol/g protein olarak ifade edildi (Mete ve ark 2021).

3.6.1. Histopatolojik Değerlendirme

Deneyin sonlandırılmasını takiben sıçanlar genel anestezi altında (10 mg/kg ksilazin ve 75 mg/kg Ketamin), ötenazileri yapıldıktan sonra beyin beyincik dokuları çıkarılarak %10' luk formalin içerisinde 24–72 saat tespit edilmiştir. Akar suda formalinden kurtarıldıktan sonra örnekler rutin doku takip prosedürünü takiben parafin bloklara gömülmüştür. Parafin bloklardan mikrotom ile yaklaşık 5 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Bu kesitler her bir adezivli lamda 3–4 adet olacak şekilde dizilmiştir. Kesitler 56°C derecede de etüv içinde deparafinize edildikten sonra çeşme suyunda yıkanıp histopatolojik inceleme için Hemotoksilen–Eozin boyası ile boyandı (Mete ve ark 2021).

3.7. Histokimyasal Boyama:

Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile alınan 5 µm'lik parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilene tabi tutulmuştur. Ardından rehidratasyon işlemi için %95'den %60'a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akarsu altında yıkanmıştır. Kesitler 2 dakika hematoksilin ile boyamanın ardından, fazla boyanın dokudan uzaklaştırılması için 5 dakika akar suda yıkanan kesitler 30 saniye eozin ile boyanmıştır. Aynı şekilde 5 dakika akar su altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan ile kapatılmıştır. Işık mikroskopunda incelenerek gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildi (Mete ve ark 2021).

3.8. İndirekt İmmunohistokimya Boyaması:

Alınan kesitler immunohistokimyasal boyama için bir gece 60 °C'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika iki saat değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından %95'ten %60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletilmiştir. Dakopen ile sınırlandırılan %0,5'lik tripsin solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük H₂O₂ uygulanmıştır. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS; Posphate buffer solution) ile yıkanan kesitlere bloklama amacıyla 1 saat bloklama solusyonu ile

muamele edilmiştir. Bloklama solusyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikolar anti-eNOS, anti-VEGF, anti-HIF1a ve anti-NeuN ile bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün tampon solusyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikoruna ile 30'ar dakika boyanmıştır. Yine üç defa 5'er dakika tampon solusyonu solusyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB ile 5 dk boyanmıştır. Mayer's hematoksilin ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyumuna ile kapatılmıştır. İmmunohistokimyasal değerlendirme incelenerek zayıf (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirilmiştir. Boyanan hücre miktarı H-skor yöntemiyle hesaplanıp veriler istatistiksel olarak analiz edilmiştir (Mete ve ark 2021).

3.9.TUNEL Boyaması:

Apoptotik hücre ölümünün belirlenmesinde Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL) boyama yöntemi kullanılmıştır. Alınan 5 µm'lik kesitler deparafinizasyon işlemini takiben önce distile suda daha sonra 3 defa 5'er dk PBS ile yıkılmıştır. Yıkandıktan sonra 1/500 oranında PBS ile dilüe edilen 20-µg/ml Proteinaz-K 37°C'de 15 dak. uygulanmıştır. 5'er dakika 3 kez PBS ile yıkamayı takiben 5 dak. %3'lük hidrojen peroksit ile muamele edildikten sonra yeniden 5'er dakika 3 kez PBS ile oda ısısında yıkanmıştır. Örnekler 5 dak. Equilibration buffer ile oda ısısında tutulduktan sonra TdT-enzimi ile nemli atmosferik ortamda 37 °C de 60 dak. plastik slipler kesitleri kapatacak şekilde bekletilmiştir. Sürenin ardından Stop Wash Buffer ile 10 dak. bekletildikten sonra Antidioksigenin Peroksidaz Konjugatı ile 30 dak. muamele edilen örnekler 5'er dakika 3 kez PBS ile yıkandı. Ardından DAB (Diaminobenzidin) ile boyama yapıldı, birkaç kez distile su ile yıkanmıştır. Artalan boyaması Mayer's Hematoksilini ile yapılmıştır. Kör yöntemle TUNEL pozitif hücreler saptanmış ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Mete ve ark 2021).

3.10. Western Blot

Örneklerin 3 gün sonunda beyinleri çıkarılarak sıvı nitrojen içinde donduruldu. RNA izolasyonuna kadar -80°C'de saklandı. Beyin dokuları homojenleştirildi ve proteinler, eksiksiz, Mini, EDTA içermeyen (Roche Applied Science, Waltham, MA, USA) proteaz kokteyli ve RIPA lizis tamponu (Millipore, Milford, MA, ABD)

kullanılarak özümlendi. Protein konsantrasyonu, BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, IL, ABD) ile belirlendi. HIF-1 α (100 ug) veya nestin ve VEGF (sırasıyla 50 ug) için eşit miktarlarda protein, %6-12 SDS-poliakrilamid jellerinde (USB Fueling Innovation, Cleveland, OH, ABD) ayrıldı. Proteinler, saf nitroselüloz zarlara (Bio-Rad, Richmond CA, ABD) aktarıldı.

Membranlar bloke edici tampon, %5 yağsız kuru süt içinde oda sıcaklığında 1 saat döndürülerek inkübe edildi. Membranlar daha sonra fare HIF1 α monoklonal antikoru (1:500; Millipore), fare VEGF monoklonal antikoru (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, ABD) ve fare nestin monoklonal antikoru (1:1,000; Millipore) ile inkübe edildi gece boyunca 4 °C'de. Yıkamaların ardından zarlar, peroksidazla konjuge edilmiş anti-fare immünoglobulin (1:4,000; Santa Cruz Biotechnology) ile 1 saat inkübe edildi. Yıkama tamponunda durulandıktan sonra, bağlı antikor sinyali, geliştirilmiş Immobilon Western Chemiluminescent yaban turpu peroksidaz (HRP) substratı (Millipore) ile geliştirildi. Her bir bandın miktar tayini, bir protein sinyal taramasından (Fuji LAS 3000 görüntü analiz sistemi; Fujifilm Medical Systems, Stanford, CT, ABD) sonra dansitometri analizi (Scion yazılımı; NIH yazılımı, Bethesda, MD, ABD) ile yapıldı. HRP (Sigma; 1:25,000) ile konjuge edilmiş fare anti-p-aktin monoklonal antikoru, protein kantitasyonu için bir yükleme kontrolü olarak immünooblottlarda tespit edildi (Mete ve ark 2021).

3.11. İstatistiksel Analiz:

İmmunohistokimyasal boyama sonuçları H-skor ile incelenerek değerlendirilmiştir. Boyanma oranı semikantitatif olarak derecelendirildi ve 0 = hücrelerin %1'den azında boyanma; 1+ = hücrelerin %1- 10'unda boyanma; 2+ = hücrelerin %11-50'sinde boyanma; 3+ = hücrelerin %51-80'inde boyanma; 4+ = hücrelerin %80'inden fazlasında boyanma ile boyanma şiddeti de 0 = boyanma yok; 1 = soluk; 2 = orta dereceli; 3 = yoğun olarak kör yöntemle belirlenmiştir. Daha sonra “(1+boyanma şiddeti/3) x boyanma oranı” formülü ile toplam skor hesaplanmıştır. Elde edilen bulgular ile gruplar arasındaki farklılık Tek yönlü-ANOVA testi ile saptandı ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir (Mete ve ark 2021).

3.12 EEG

Kafa travmasının ardından sıçanlar stereotaksi aletine sabitlenmiştir. Kafa derisinde rostrokaudal yönde bir insizyon yapıldıktan sonra, toplamda 5 adet vida elektrodu, iki vida elektrodu sağ ve sol somatokorteks kafatası kemiğine, bregma referanslı 3 mm bilateral ve 4 mm rostralde, iki vidalı elektrot bregma referanslı 3 mm bilatera ve 4 mm caudalde, referans elektrot ise sağ somatokorteks kafatası kemiğine bregma referanslı 2 mm lateral ve 7 mm caudal olacak şekilde yerleştirilmiştir. Ardından kafatasına elektrotları dental akrilik ile açık alan kalmayacak şekilde sabitlenmiştir. Tüm hayvanların gruplarda belirtilen günlerde ve dakikalarda EEG kayıtları alınmıştır. Kayıtlar Powerlab/SP8 ADInstruments (Australia) kayıt sistemi kullanılarak alınmıştır. Örnekleme hızı 4000 Hz olarak seçilmiştir. EEG verileri Fourier analizi ile değerlendirilmiştir. Kafa Travması epilepsi modelinde EEG Kayıtlarının 4dk'lık periyodu analiz edilmiştir. PTZ epilepsi modelinde ise nöbet süreleri temel alınmıştır. Ölçüm ve hesaplamalarda LabChart 7 yazılımı kullanılmıştır. EEG dalga frekansları Delta: 0-4 Hz, Teta: 4-8 Hz, Alfa: 8-12 Hz ve Beta: 12-30 Hz olarak belirlenmiştir. Tüm kayıt sürecinin ardından hayvanların genel anestezi altında ötenazileri yapılmıştır (Mete ve ark 2021).

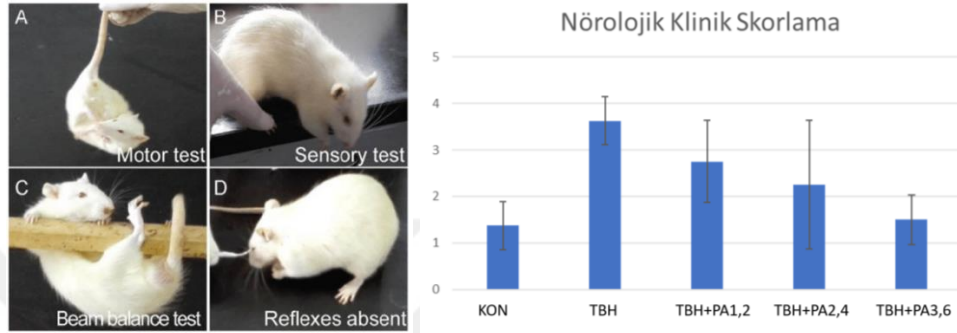


Şekil 3.12.1. EEG.

4.BULGULAR

4.1 Klinik Skorlama

Deneklerin deneyin sonlandırılmasından önce yapılan nörolojik klinik muayenelerinde (**Resim 4.1.1**) TBH ile gerileyen skorlarının PA uygulaması ile anlamlı bir şekilde önlendiği saptandı (**Tablo 4.1.1**).



Comparison	Difference	q	P value
KONT vs TBH	-2.250	7.568 ***	P<0.001
KONT vs TBH+PA1,2	-1.375	4.625 *	P<0.05
TBH vs TBH+PA2,4	1.375	4.625 *	P<0.05
TBH vs TBH+PA3,6	2.125	7.147 ***	P<0.001
TBH+PA1,2 vs TBH+PA3,6	1.250	4.204 *	P<0.05

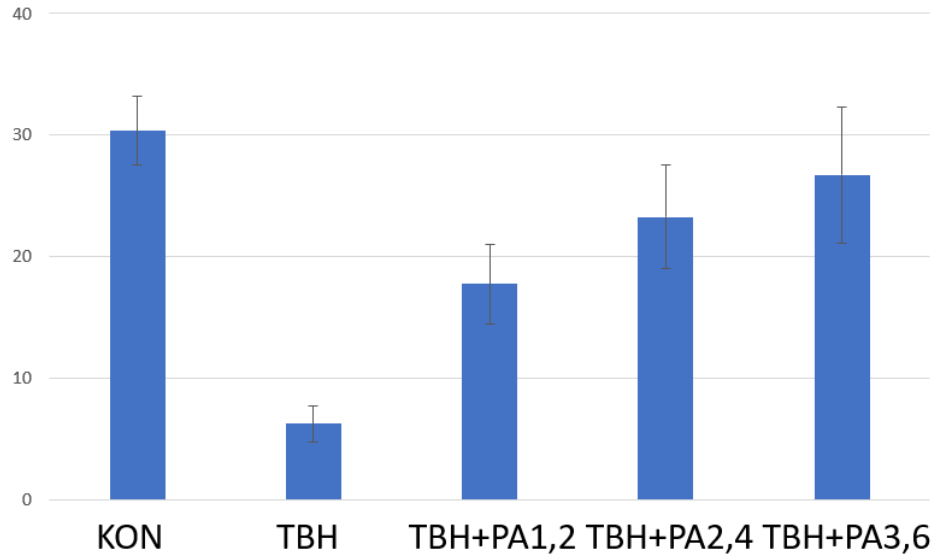
Comparison	Difference	q	P value
KONT vs TBH	-2.250	7.568 ***	P<0.001
KONT vs TBH+PA1,2	-1.375	4.625 *	P<0.05
TBH vs TBH+PA2,4	1.375	4.625 *	P<0.05
TBH vs TBH+PA3,6	2.125	7.147 ***	P<0.001
TBH+PA1,2 vs TBH+PA3,6	1.250	4.204 *	P<0.05

Resim 4.1.1. Klinik skorlamada kullanılan parametreler ve skorlar ile istatistiksel analizi.

4.2 Biyokimya

SOD seviyesi ile belirlenen antioksidan enzim miktarı TBH sonrası azalırken PA uygulaması ile anlamlı bir şekilde arttığı bulundu (**Tablo 4.2.1**).

Süperoksit Dismutaz

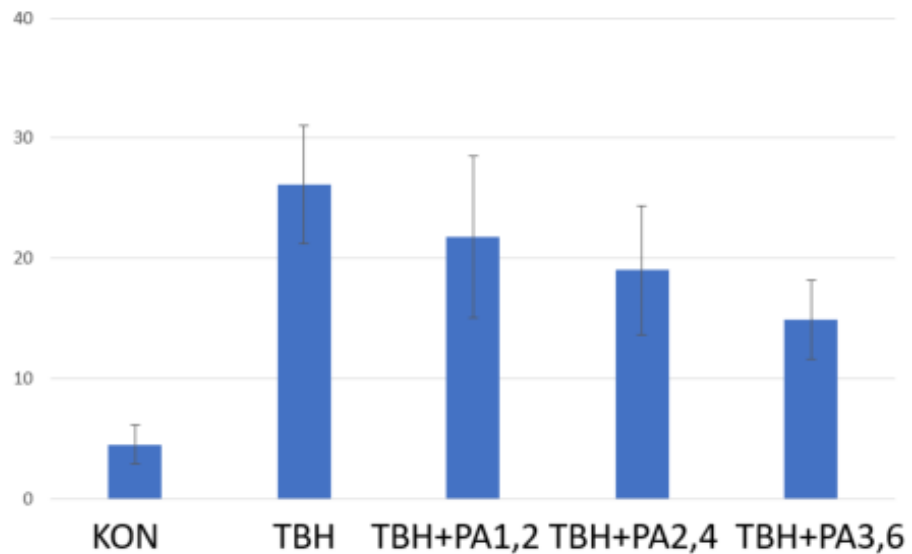


Comparison	Difference	q	P value
KONT vs TBH	24.125	18.202	*** P<0.001
KONT vs TBH+PA1,2	12.625	9.525	*** P<0.001
KONT vs TBH+PA2,4	7.125	5.376	** P<0.01
TBH vs TBH+PA1,2	-11.500	8.677	*** P<0.001
TBH vs TBH+PA2,4	-17.000	12.826	*** P<0.001
TBH vs TBH+PA3,6	-20.500	15.467	*** P<0.001
TBH+PA1,2 vs TBH+PA2,4	-5.500	4.150	* P<0.05
TBH+PA1,2 vs TBH+PA3,6	-9.000	6.790	*** P<0.001

Tablo 4.2.1. SOD analizi skorları ile istatistiksel analizi.

MDA seviyesi ile belirlenen lipid peroksidasyonu TBH sonrası yükselirken PA uygulaması ile anlamlı bir şekilde gerilediği bulundu (**Tablo 4.2.2**).

Malondialdehid

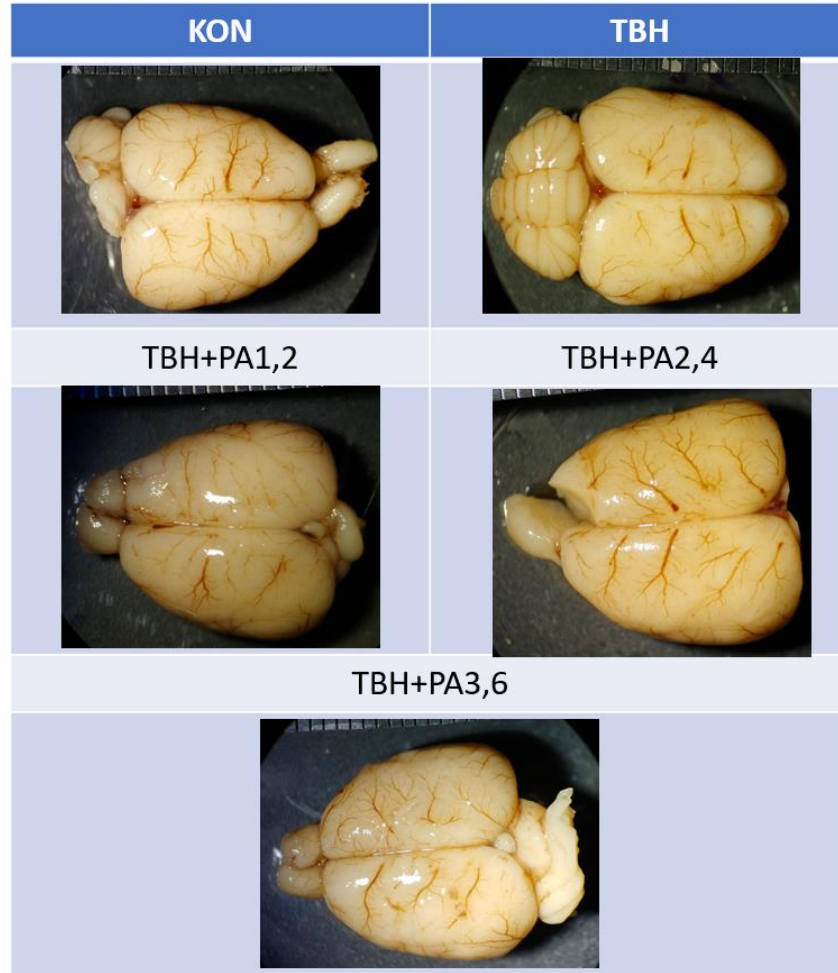


Comparison	Difference	q	P value
KONT vs TBH	-21.625	12.897 ***	P<0.001
KONT vs TBH+PA1,2	-17.250	10.288 ***	P<0.001
KONT vs TBH+PA2,4	-14.500	8.648 ***	P<0.001
KONT vs TBH+PA3,6	-10.375	6.187 ***	P<0.001
TBH vs TBH+PA2,4	7.125	4.249 *	P<0.05
TBH vs TBH+PA3,6	11.250	6.709 ***	P<0.001
TBH+PA1,2 vs TBH+PA3,6	6.875	4.100 *	P<0.05

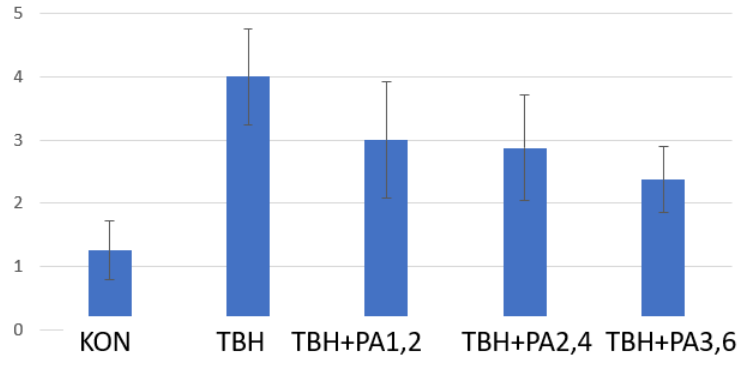
Tablo 4.2.2. MDA analizi skorları ile istatistiksel analizi.

4.3 Makroskopik Bulguları

Çıkarılan beyin örneklerinden çekilen fotoğraflarda (**Resim 4.3.1**) TBH sonrası azalan damar genişliğinin PA uygulaması ile anlamlı bir şekilde arttığı saptandı (**Tablo 4.3.1**).



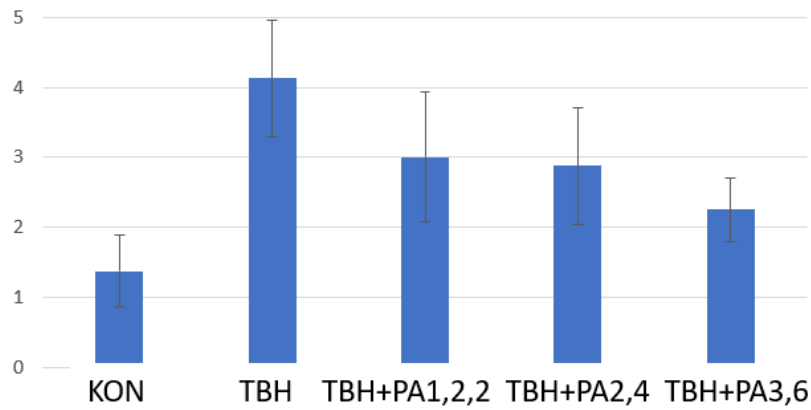
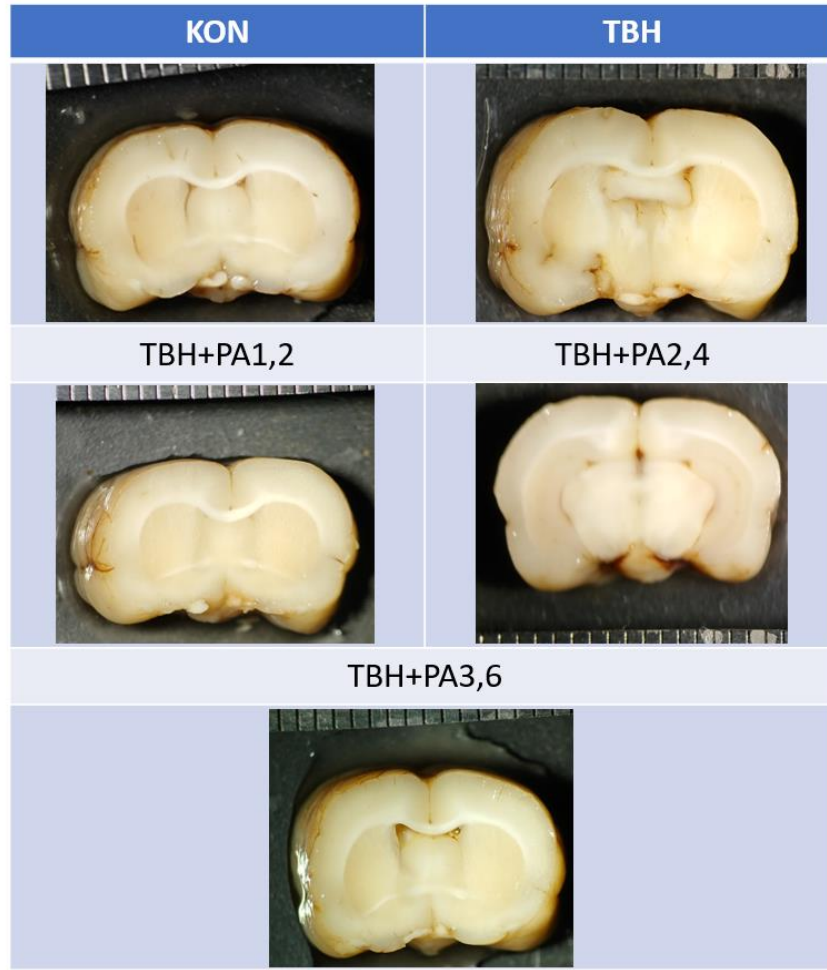
Makroskopik Skorlama



Comparison	Difference	q	P value
KONT vs TBH	-2.750	10.772 ***	P<0.001
KONT vs TBH+PA1,2	-1.750	6.855 ***	P<0.001
KONT vs TBH+PA2,4	-1.625	6.365 ***	P<0.001
KONT vs TBH+PA3,6	-1.125	4.407 *	P<0.05
TBH vs TBH+PA2,4	1.125	4.407 *	P<0.05
TBH vs TBH+PA3,6	1.625	6.365 ***	P<0.001

Tablo 4.3.1 Makroskopik skorlar ile istatistiksel analizi.

Çıkarılan beyin örneklerinden çekilen fotoğraflarda (**Resim 4.3.2**) TBH sonrası artan hasarlı bölgelerin PA uygulaması ile anlamlı bir şekilde azaldığı saptandı (**Tablo 4.3.2**).



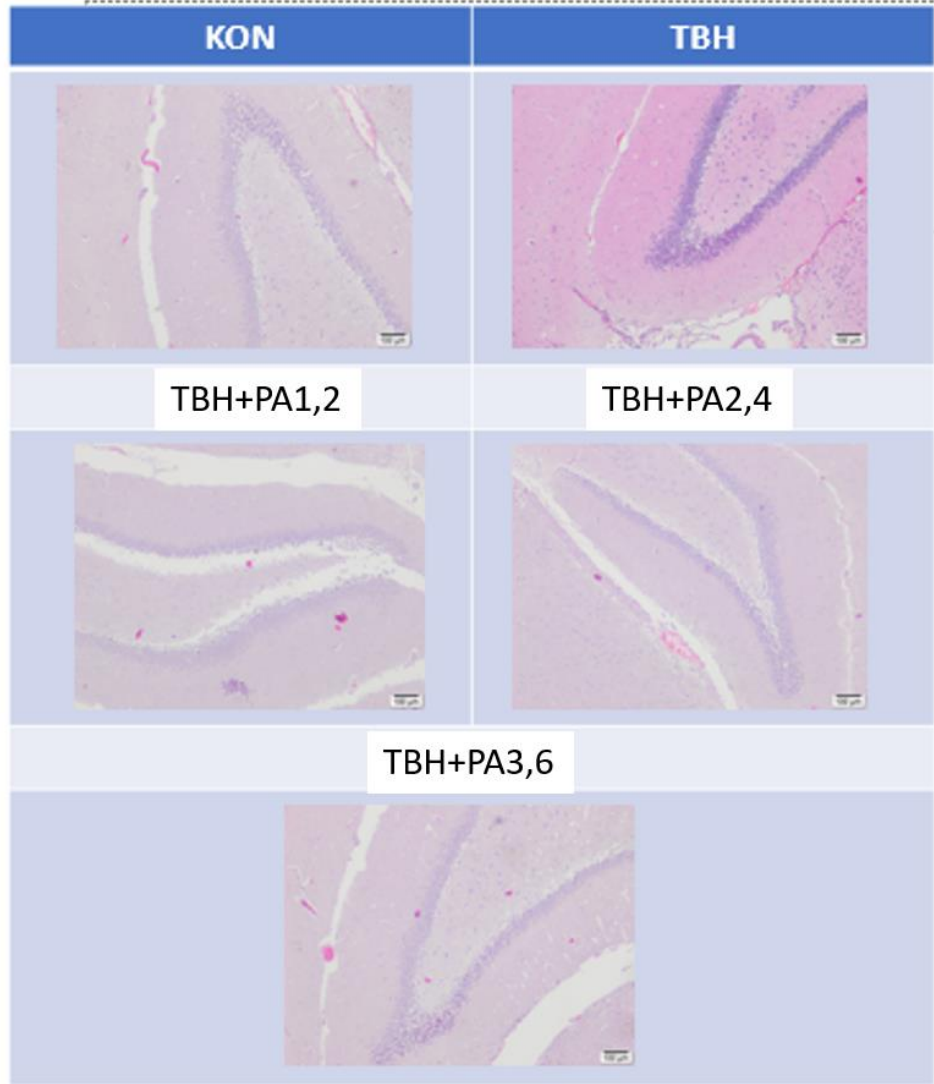
Comparison	Difference	q	P value
KONT vs TBH	-2.750	10.522 ***	P<0.001
KONT vs TBH+PA1,2	-1.625	6.218 ***	P<0.001
KONT vs TBH+PA2,4	-1.500	5.739 **	P<0.01
TBH vs TBH+PA1,2	1.125	4.305 *	P<0.05
TBH vs TBH+PA2,4	1.250	4.783 *	P<0.05
TBH vs TBH+PA3,6	1.875	7.174 ***	P<0.001

Tablo 4.3.2 Makroskopik skorlar ile istatistiksel analizi.

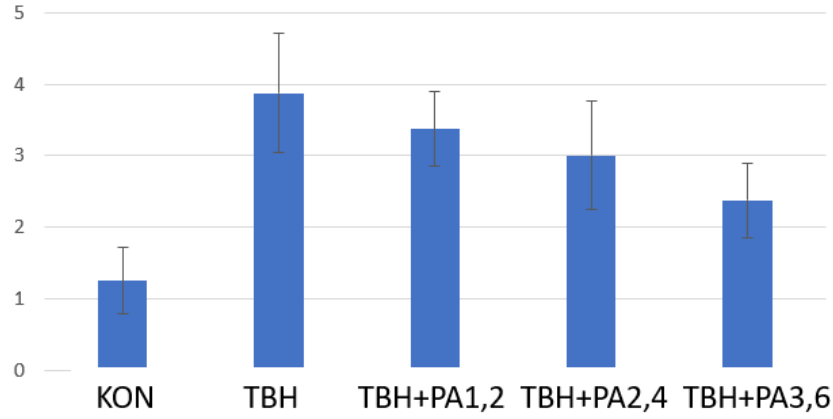
4.4 Mikroskopik Bulguları

4.4.1 Histokimya Bulguları

HE boyamalarında normal histolojik görünüm ile karşılaştırıldığında TBH ile HK hücre yoğunluğunda ve tabaka kalınlığında azalma, hücrelerde disorganizasyon, artmış vakuolleşme ve piknosis, genelde yaygın dilate kapillerler gözlenmektedir. Yaygın anoksik nöronlar, nöronlarda küçülme ve şekil bozuklukları ile piknotik hücreler gözlenmektedir (**Resim 4.4.1.1**). TBH sonrası PA uygulamasının oluşan hasarı anlamlı bir şekilde geriletlediği gözlemlendi (**Tablo 4.4.1.1**).



Hematoksilen Eozin Skorlama



Comparison	Difference	q	P value
KONT vs TBH	-2.625	12.883	*** P<0.001
KONT vs TBH+PA1,2	-2.125	10.429	*** P<0.001
KONT vs TBH+PA2,4	-1.500	7.362	*** P<0.001
KONT vs TBH+PA3,6	-1.125	5.521	** P<0.01
TBH vs TBH+PA2,4	1.125	5.521	** P<0.01
TBH vs TBH+PA3,6	1.500	7.362	*** P<0.001
TBH+PA1,2 vs TBH+PA3,6	1.000	4.908	* P<0.05

Resim ve Tablo 4.4.1.1. HE boyama görüntü ve skorlar ile istatistiksel analizi.

4.4.2 İmmünohistokimya Bulguları

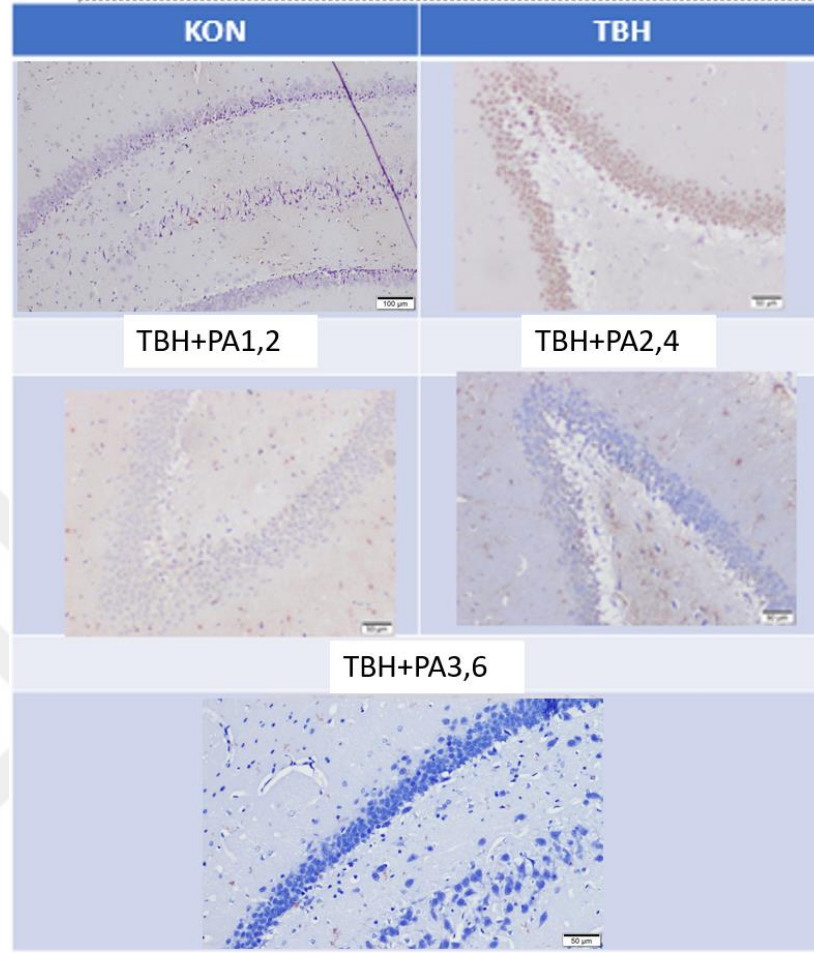
Patolojik değişikliklerin protein ekspresyonları açısından değerlendirilmesinde primer antikorlar; Endotelial Nitrik Oksit Sentaz (eNOS), anti-vasküler endotelial büyüme faktörü (Anti-VEGF), hypoxia inducible factor 1 alpha (anti-HIF1a) ve nöronal nükleer protein (anti-NeuN) antibody ile inkübe edildi ve ekspresyonlarının değerlendirilmesi yapıldı. Apoptosis, Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL) ile değerlendirildi.

4.4.2 İmmünperoksidaz Bulguları

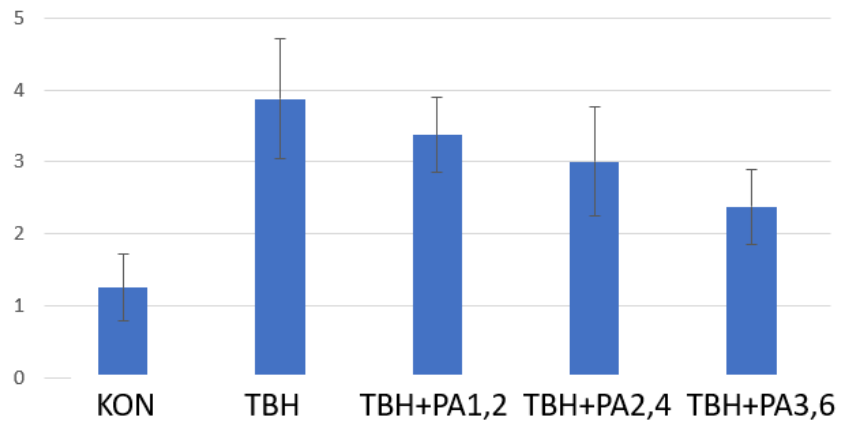
4.4.2.1 eNOS Bulguları

Nitrik oksit (NO), TBH için hem ikincil hasarda hem de nörolojik iyileşmede rol oynayan inflamatuvar bir üründür. NO üretiminin yeri, zamanlaması, miktarı ve türü rolünü belirler. eNOS tarafından üretilen NO öncelikle hasarı artırırken sonrasında penumbral kan akışını artırarak TBH için yarar sağlar. HK için oksidatif stres

belirteci olarak kullanılan eNOS ekspresyonunun (**Resim 4.4.2.1**) TBH ile oldukça artarken PA uygulamaları ile anlamlı olarak gerilediği saptandı (**Tablo 4.4.2.1**).



Nitröz Oksid Sentaz



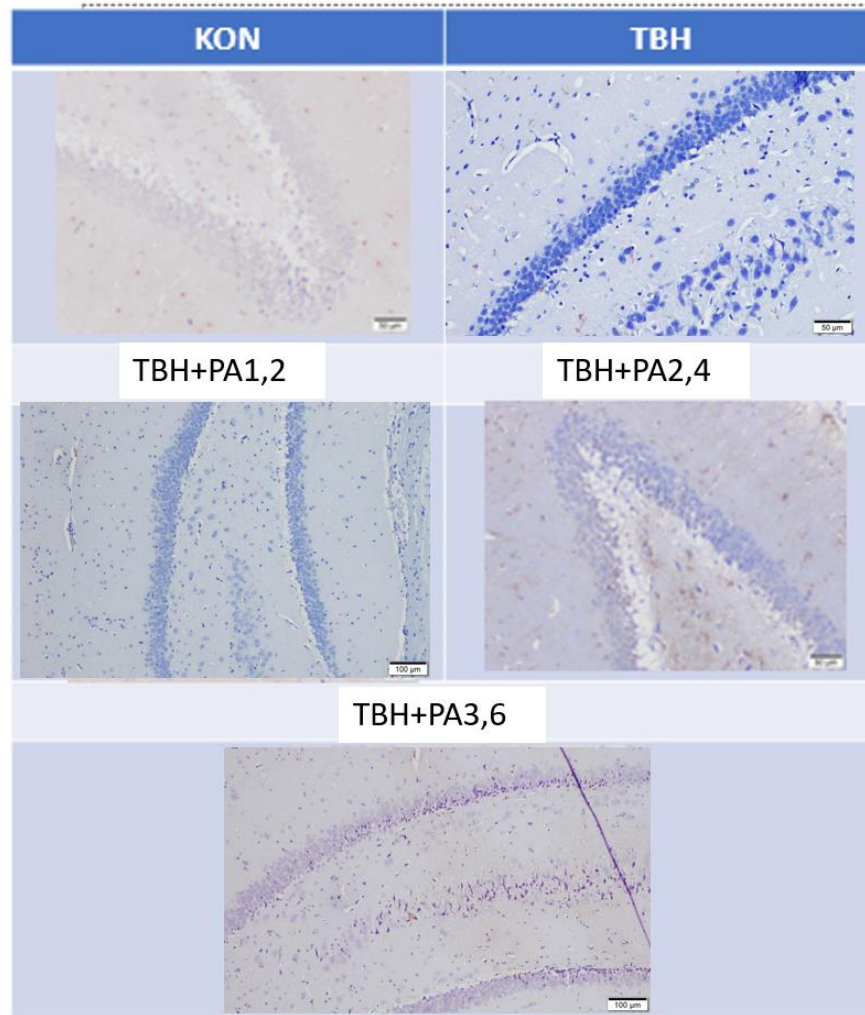
Comparison	Difference	q	P value
KONT vs TBH	-82.250	23.625 ***	P<0.001
KONT vs TBH+PA1,2	-61.500	17.665 ***	P<0.001
KONT vs TBH+PA2,4	-41.125	11.812 ***	P<0.001
KONT vs TBH+PA3,6	-24.750	7.109 ***	P<0.001

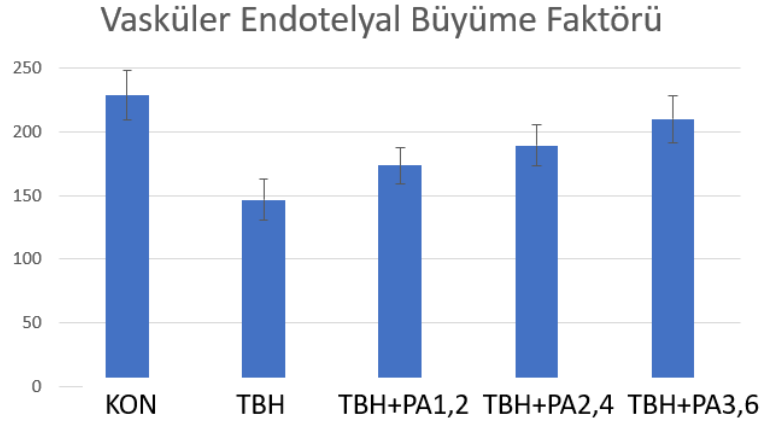
TBH vs TBH+PA1,2	20.750	5.960	**	P<0.01
TBH vs TBH+PA2,4	41.125	11.812	***	P<0.001
TBH vs TBH+PA3,6	57.500	16.516	***	P<0.001
TBH+PA1,2 vs TBH+PA2,4	20.375	5.852	**	P<0.01
TBH+PA1,2 vs TBH+PA3,6	36.750	10.556	***	P<0.001
TBH+PA2,4 vs TBH+PA3,6	16.375	4.703	*	P<0.05

Resim ve Tablo 4.4.2.1. eNOS İHK boyama görüntü ve skorlar ile istatistiksel analizi.

4.4.2.2 VEGF Bulguları

Damar ve damarlanma belirteci olarak VEGF ekspresyonunu endotel, nöron ve diğer hücrelerinde saptandı (**Resim 4.4.2.2**). TBH ile oldukça azalırken PA uygulamaları ile anlamlı olarak attığı saptandı (**Tablo 4.4.2.2**).



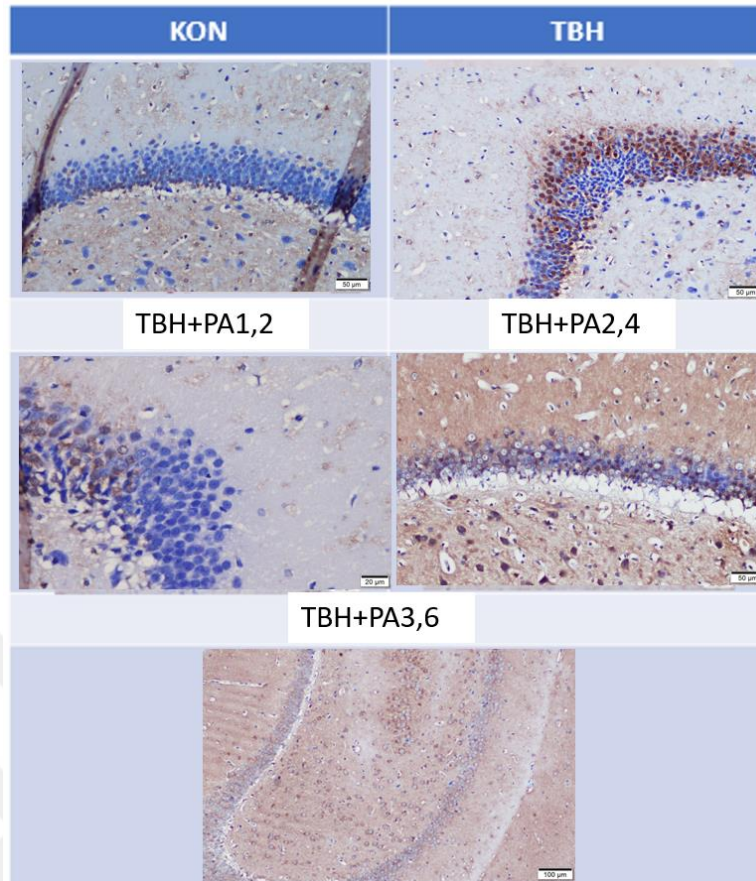


Comparison	Difference	q	P value
=====			
KONT vs TBH	82.125	13.780 ***	P<0.001
KONT vs TBH+PA1,2	55.125	9.250 ***	P<0.001
KONT vs TBH+PA2,4	39.250	6.586 ***	P<0.001
TBH vs TBH+PA1,2	-27.000	4.531 *	P<0.05
TBH vs TBH+PA2,4	-42.875	7.194 ***	P<0.001
TBH vs TBH+PA3,6	-63.625	10.676 ***	P<0.001

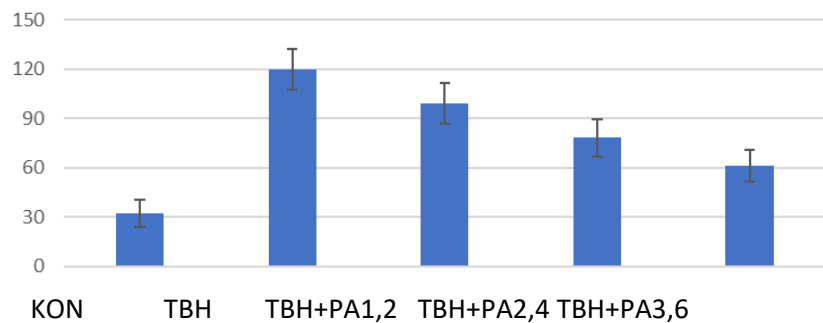
Resim ve Tablo 4.4.2.2. VEGF İHK boyama görüntü ve skorlar ile istatistiksel analizi.

4.4.2.3 HIF1a Bulguları

Hipoksi belirteci olarak HIF1a ekspresyonunu endotel, nöron ve diğer hücrelerinde saptandı (**Resim 4.4.2.3**). TBH ile oldukça artarken PA uygulamaları ile anlamlı olarak azaldığı bulundu (**Tablo 4.4.2.3**).



Hipoksi İndüklenebilir Faktör – HIF1a



Comparison	Difference	q	P value
KONT vs TBH	-87.125	22.510	*** P<0.001
KONT vs TBH+PA1,2	-66.625	17.213	*** P<0.001
KONT vs TBH+PA2,4	-45.875	11.852	*** P<0.001
KONT vs TBH+PA3,6	-28.750	7.428	*** P<0.001
TBH vs TBH+PA1,2	20.500	5.296	** P<0.01
TBH vs TBH+PA2,4	41.250	10.657	*** P<0.001
TBH vs TBH+PA3,6	58.375	15.082	*** P<0.001
TBH+PA1,2 vs TBH+PA2,4	20.750	5.361	** P<0.01
TBH+PA1,2 vs TBH+PA3,6	37.875	9.785	*** P<0.001

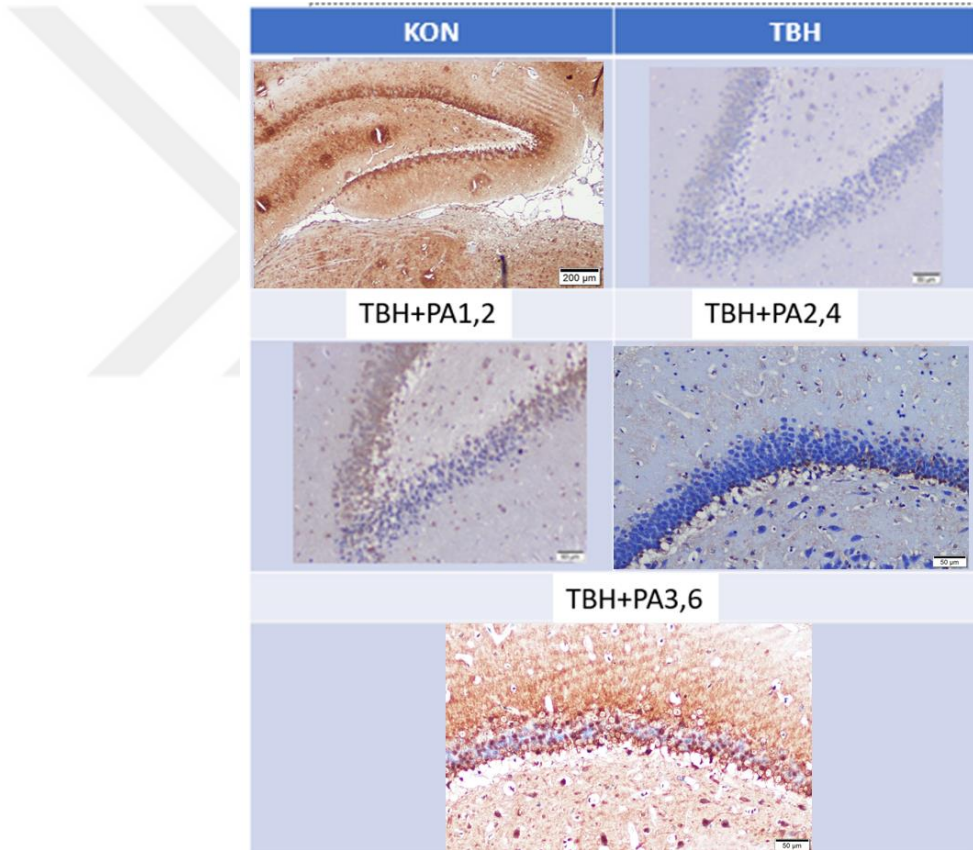
TBH+PA2,4 vs TBH+PA3,6

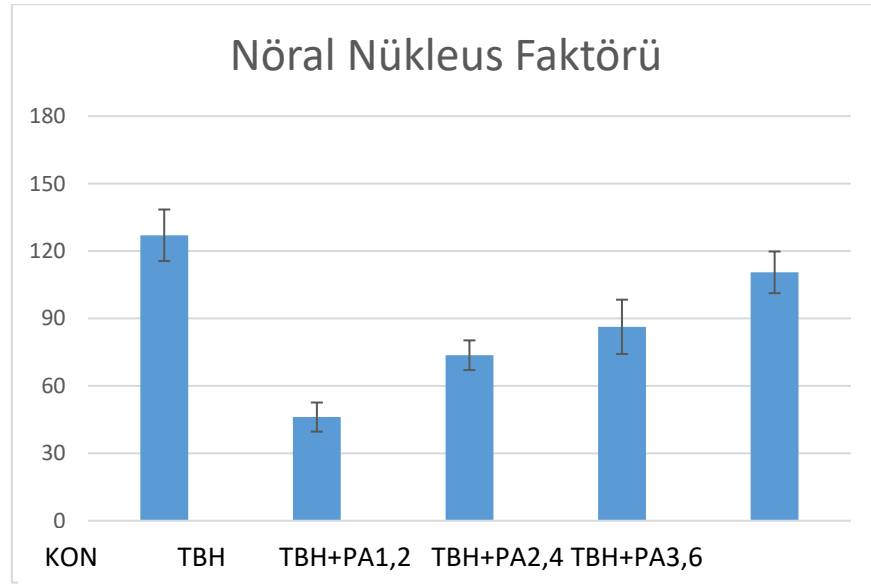
17.125 4.424 * P<0.05

Resim ve Tablo 4.4.2.3. HIF1a İHK boyama görüntü ve skorlar ile istatistiksel analizi.

4.4.2.4 NeuN İHK

NeuN antikoru nöronlarda bulunan DNA bağlayıcı bir belirteç olup nörona özgü protein için spesifiktir. NeuN protein dağılımları görünüşe göre hem fetal hem de yetişkin beyindeki nöronal çekirdekler, perikarya ve bazı proksimal nöronal süreçlerle sınırlıdır, ancak bazı nöronlar her yaşta NeuN tarafından tanınmaz. Olgun nöronların belirteci olarak kullanılır. HK görüntülerinde (**Resim 4.4.2.4**). TBH ile oldukça azalırken PA uygulamaları ile anlamlı olarak arttığı saptandı (**Tablo 4.4.2.4**).





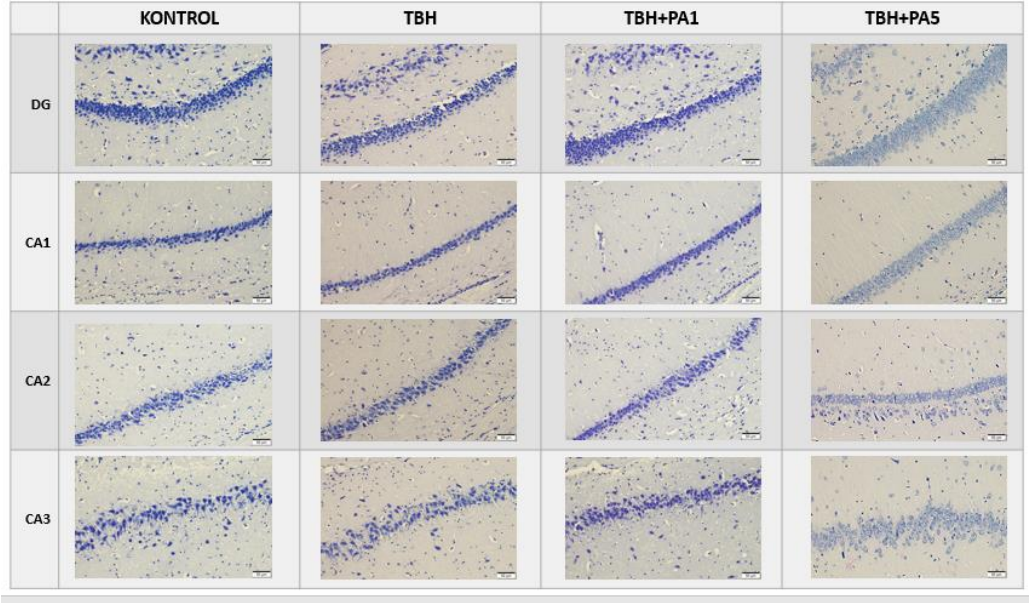
Comparison	Difference	q	P value
KONT vs TBH	80.875	24.134 ***	P<0.001
KONT vs TBH+PA1,2	53.375	15.928 ***	P<0.001
KONT vs TBH+PA2,4	40.750	12.160 ***	P<0.001
KONT vs TBH+PA3,6	16.500	4.924 *	P<0.05
TBH vs TBH+PA1,2	-27.500	8.206 ***	P<0.001
TBH vs TBH+PA2,4	-40.125	11.974 ***	P<0.001
TBH vs TBH+PA3,6	-64.375	19.210 ***	P<0.001
TBH+PA1,2 vs TBH+PA3,6	-36.875	11.004 ***	P<0.001
TBH+PA2,4 vs TBH+PA3,6	-24.250	7.237 ***	P<0.001

Resim ve Tablo 4.4.2.3. NeuN İHK boyama görüntü ve skorlar ile istatistiksel analizi.

4.4.3 İmmunfloresan bulguları

HK alanlarına özgü histolojik görüntülerde TBH için PA uygulamasının etkileri incelendi (**Resim 4.4.3.1**).

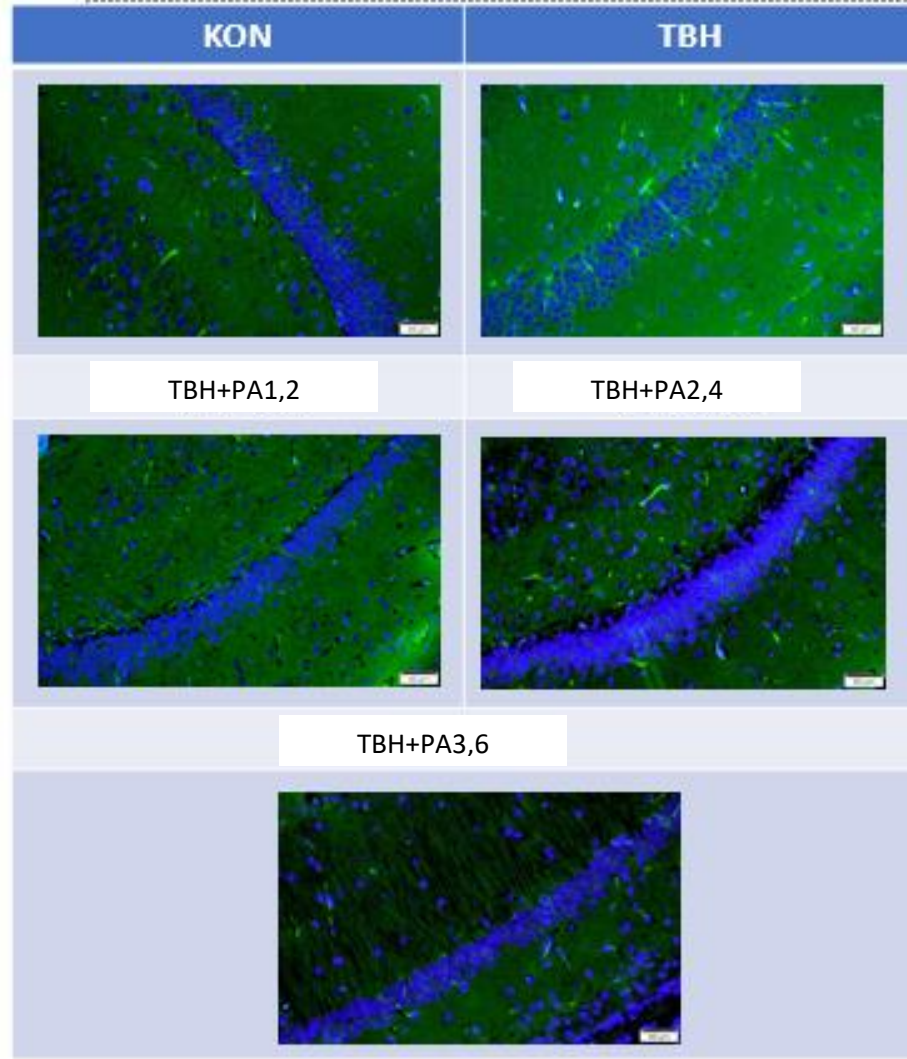
KON TBH TBH+PA1,2 TBH+PA3,6



Resim 4.4.3.1. HE boyama görüntü.

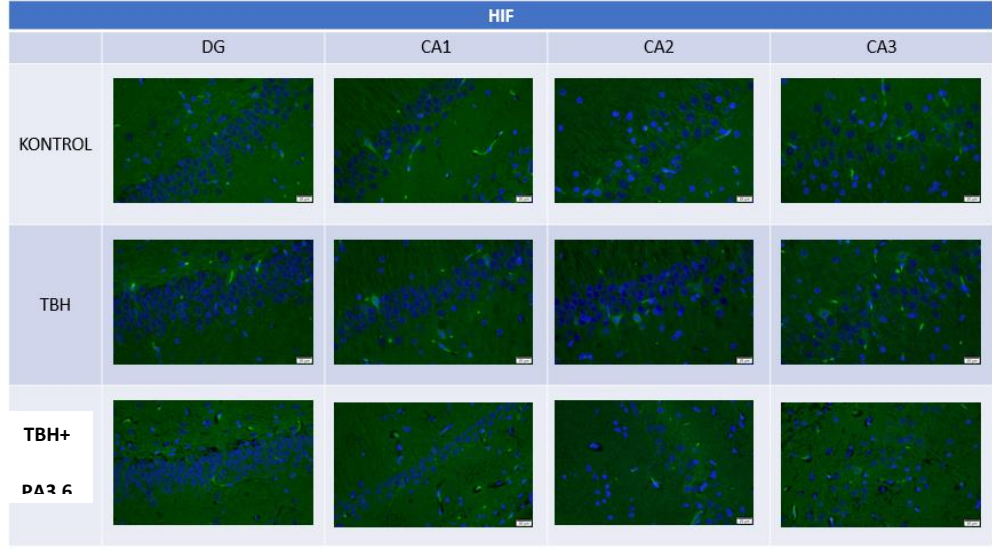
4.4.3.1 eNOS Bulguları

Hücrelerin DAPI ile çekirdeklerinin İHK ile eNOS ekspresyonlarının izlenebildiği birleştirilmiş HK görüntülerinde (**Resim 4.4.3.1**) oksidatif stresin TBH ile oldukça artarken PA uygulamaları ile azaldığı saptandı.



Resim 4.4.3.1.1. eNOS İF boyama görüntü

HK alanlarına özgü IF görüntülerde TBH için PA uygulamasının etkileri incelendi (**Resim 4.4.3.3.1**).

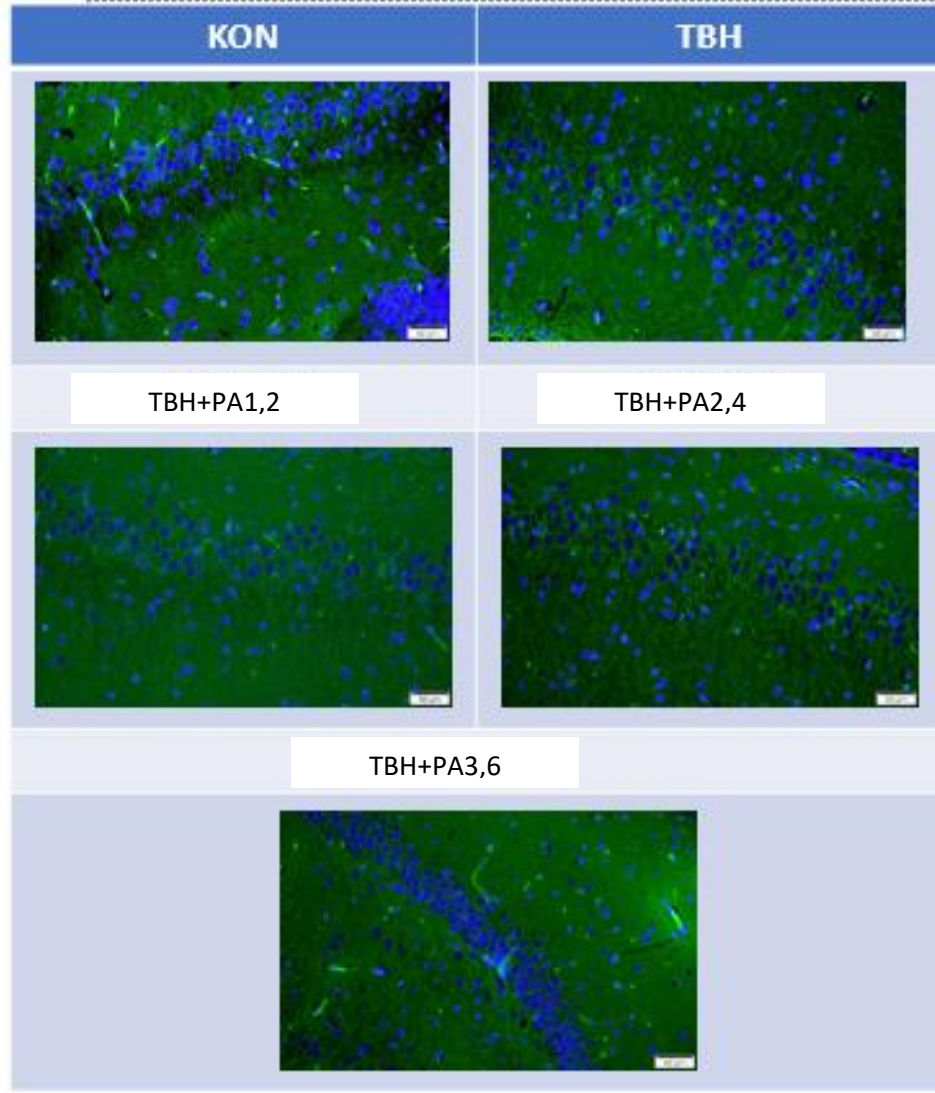


Resim 4.4.3.3.1 eNOS İF boyama görüntü.

•

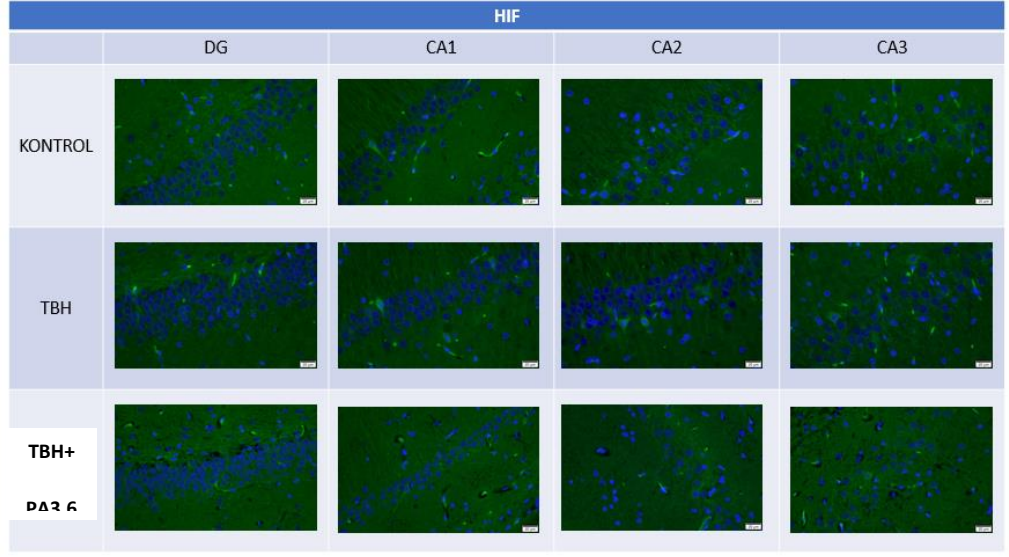
4.4.3.2 VEGF Bulguları

Hücrelerin DAPI ile çekirdeklerinin İHK ile VEGF ekspresyonlarının izlenebildiği birleştirilmiş HK görüntülerinde (**Resim 4.4.3.2**) damarlanmanın TBH ile oldukça artarken PA uygulamaları ile azaldığı saptandı.



Resim 4.4.3.2.1 VEGF İF boyama görüntü.

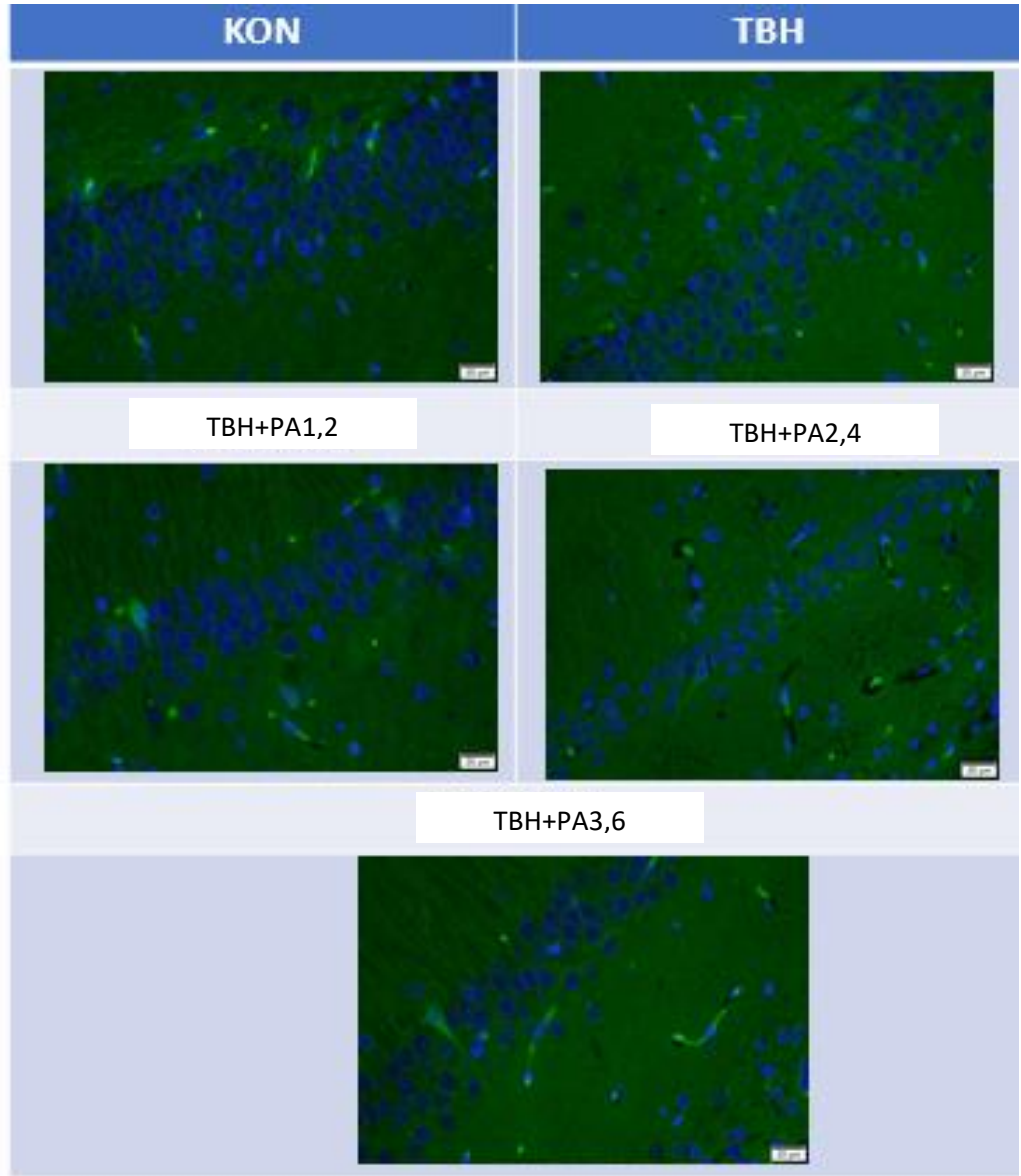
HK alanlarına özgü IF görüntülerde TBH için PA uygulamasının etkileri incelendi (**Resim 4.4.3.3.1**).



Resim 4.4.3.2.2 VEGF İF boyama görüntü.

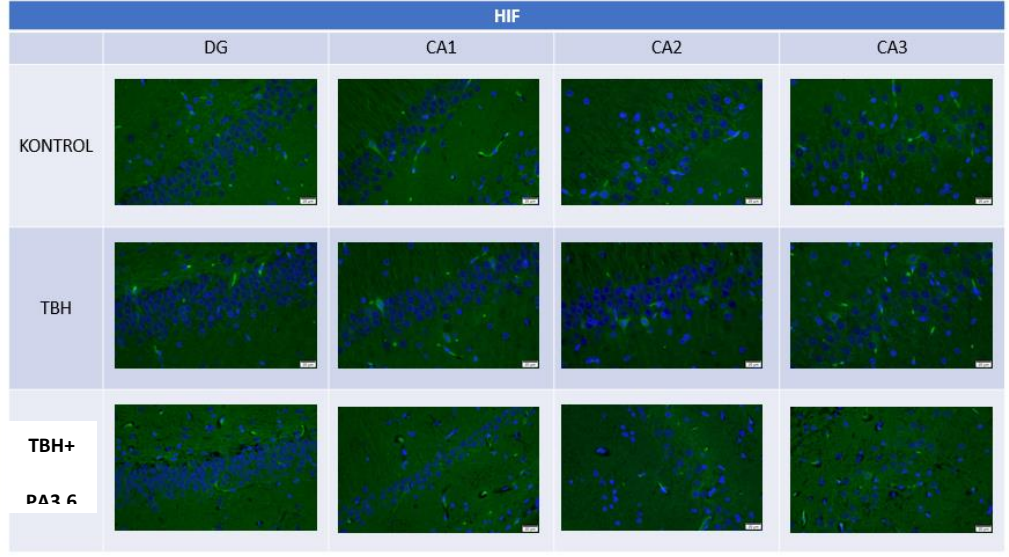
4.4.3.3 HIF1a Bulguları

Hücrelerin DAPI ile çekirdeklerinin İHK ile HIF1a ekspresyonlarının izlenebildiği birleştirilmiş HK görüntülerinde (**Resim 4.4.3.3.1**) hipoksinin TBH ile oldukça artarken PA uygulamaları ile azaldığı saptandı.



Resim 4.4.3.3.1 HIF1a İF boyama görüntü.

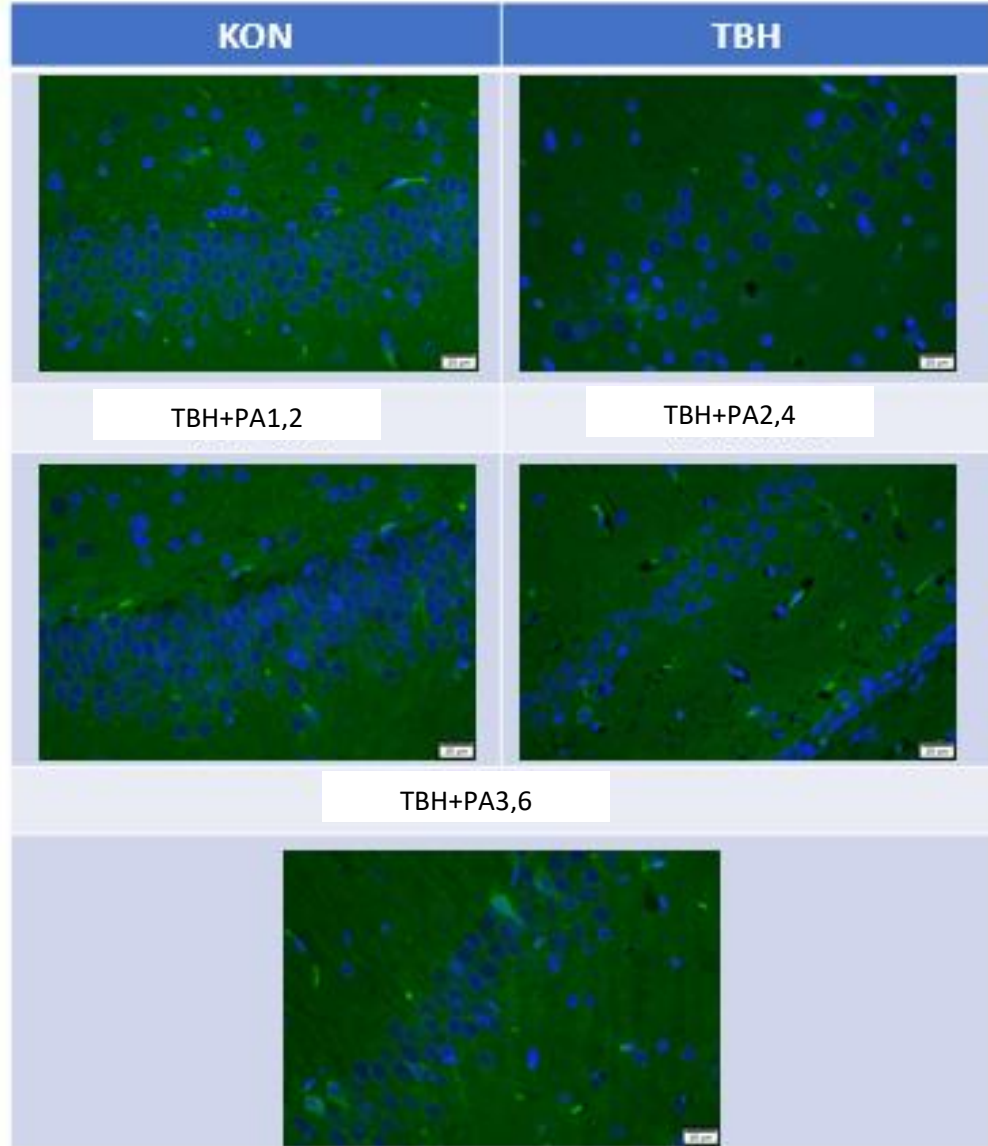
HK alanlarına özgü IF görüntülerde TBH için PA uygulamasının etkileri incelendi (**Resim 4.4.3.3.2**).



Resim 4.4.3.3.2. HIF1a İF boyama görüntü.

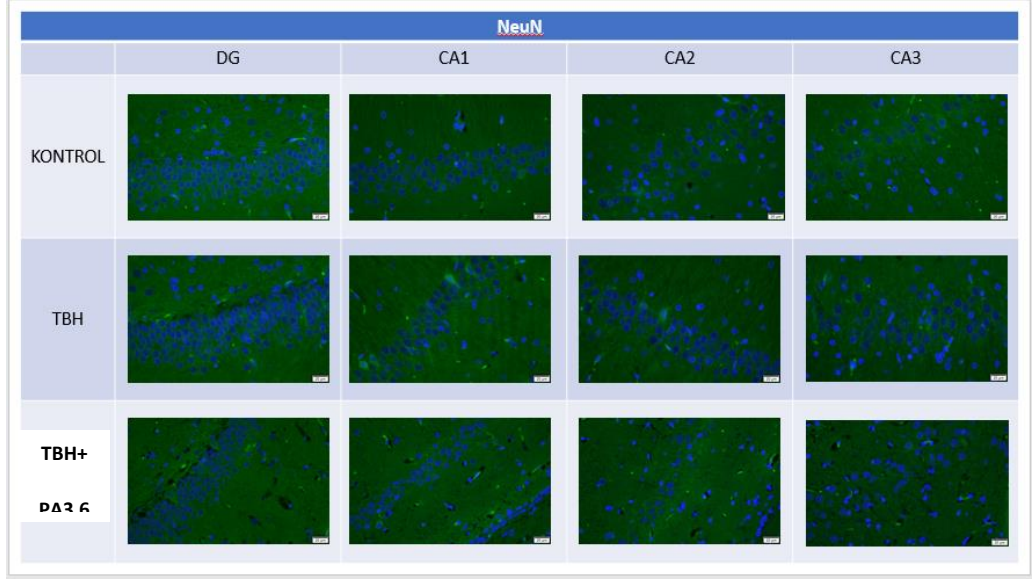
4.4.3.4 NeuN Bulguları

Hücrelerin DAPI ile çekirdeklerinin İHK ile NeuN ekspresyonlarının izlenebildiği birleştirilmiş HK görüntülerinde (**Resim 4.4.3.4.1**) olgun nöronların TBH ile oldukça azalırken PA uygulamaları ile arttığı bulundu.



Resim 4.4.3.3.1. NeUN İF boyama görüntü.

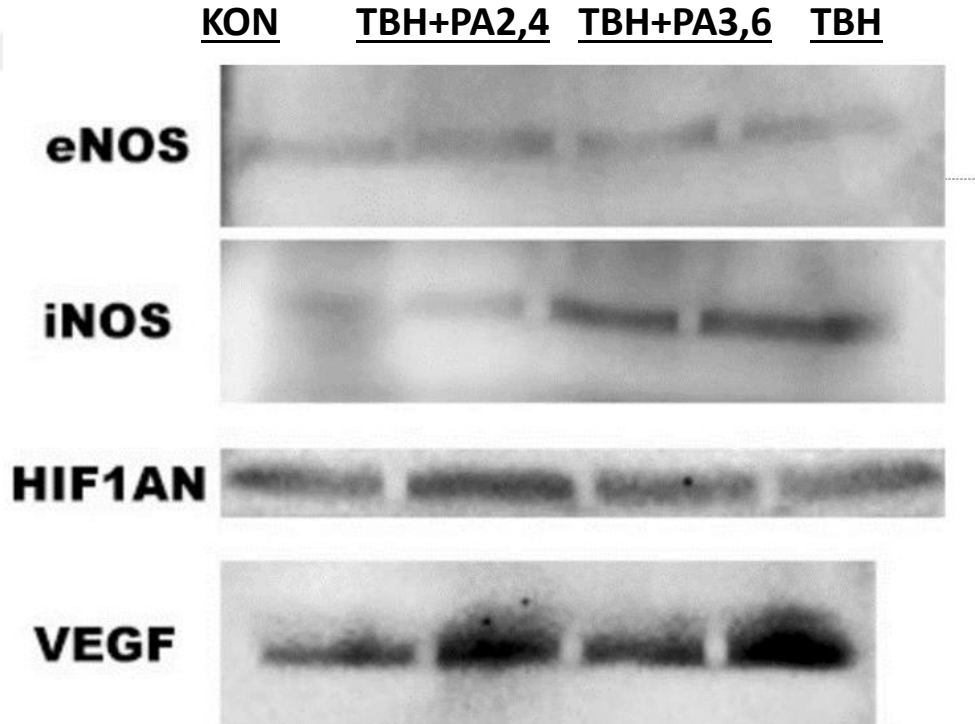
HK alanlarına özgü IF görüntülerde TBH için PA uygulamasının etkileri incelendi (**Resim 4.4.3.4.1**).



Resim 4.4.3.4.2. NeuN İF boyama görüntü.

4.5. Western Blot bulguları

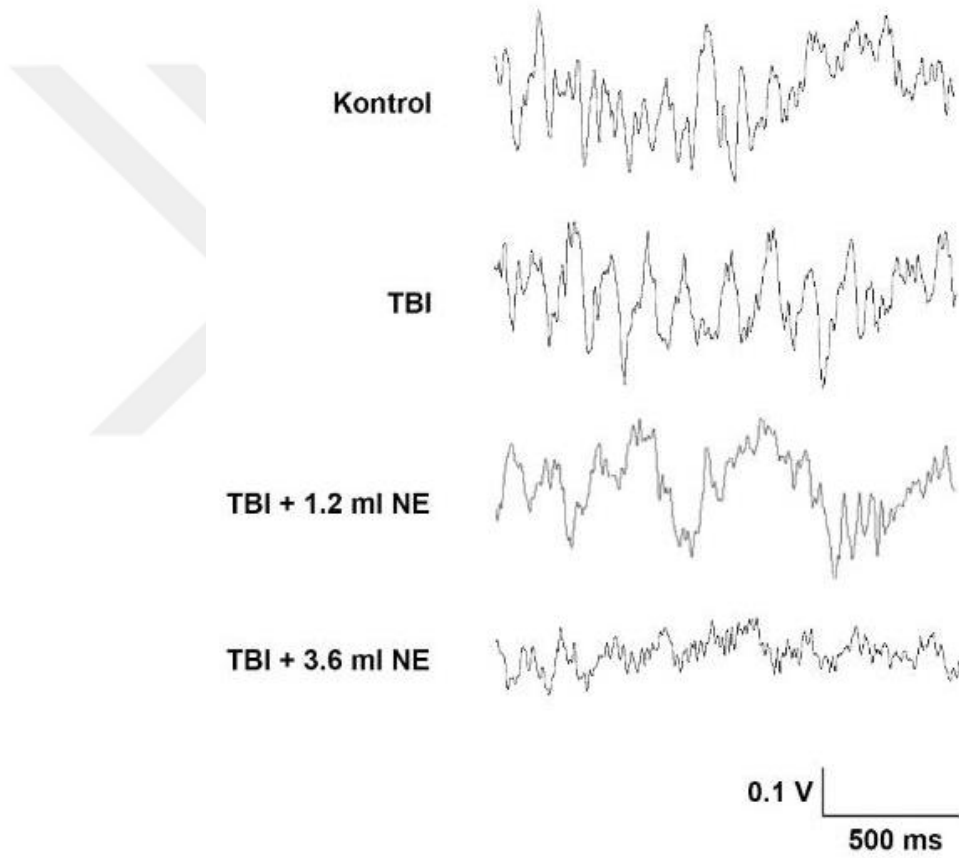
İHK bulgularının desteklenmesi amacı ile yapılan western blot analizlerinde İHK ile uyumlu sonuçlar elde edildi (**Resim 4.5.1**).

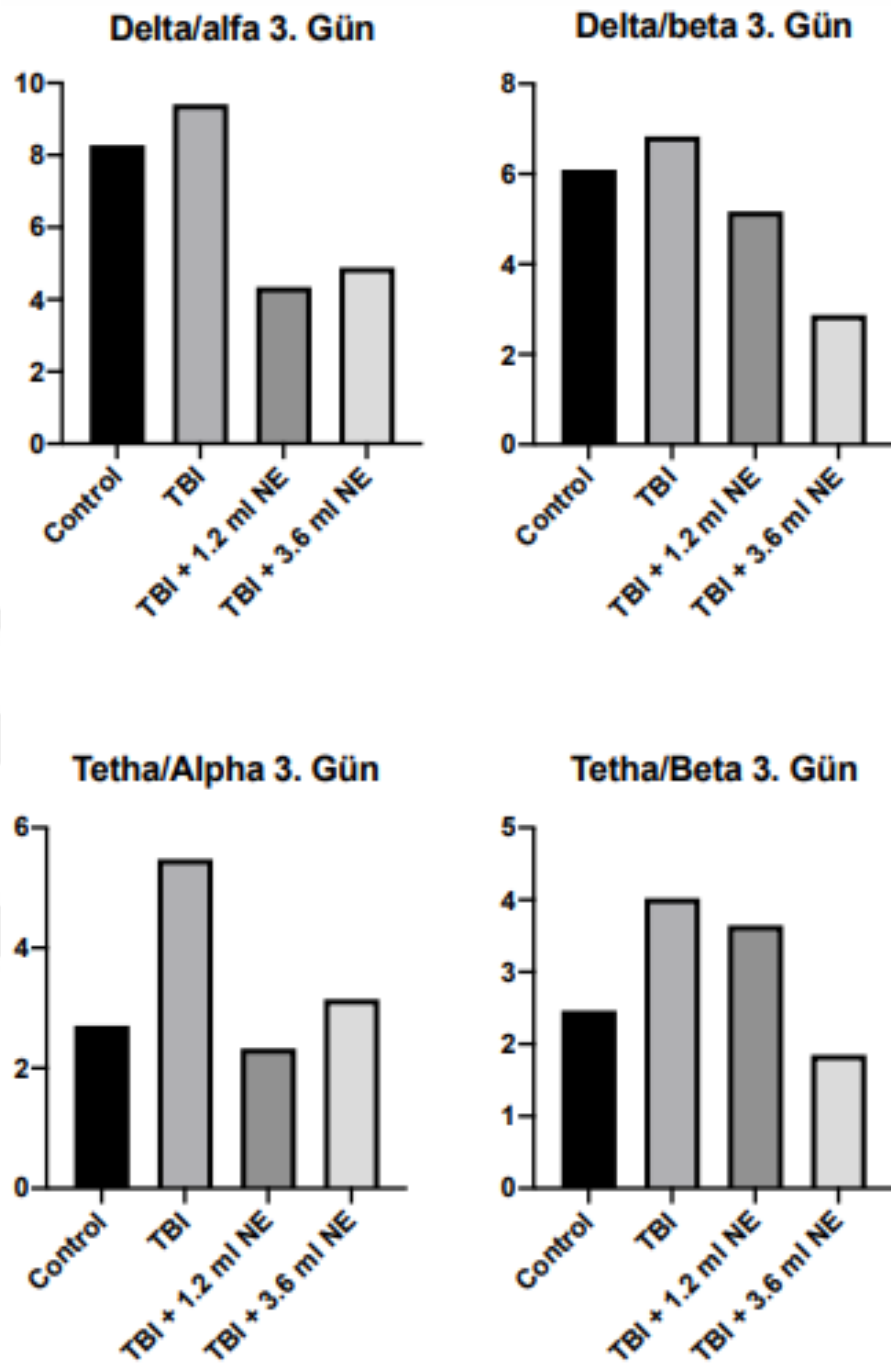


Resim 4.5.1 Hücre lizatlari ile yapılan Western blot yönteminde proteinlere karşı antikorlarla tespit edilen protein ekspresyonunun varlığı incelendi.

4.6. EEG bulguları

Grafiklerden de anlaşılaçağı üzere nar ekstratı uygulanan hayvanlarda travma sonrası delta/alfa, delta/teta, teta/alfa ve teta/beta oranlarında kontrol grubuna benzer şekilde bir oranla karşılaşılmıştır. 3,6 ml uygulanan PA in travmanın etkilerini azaltma açısından uygun doz olduğı tespit edilmiştir. Travmatik beyin hasarının 72 saat içerisinde beyin dalgalarında alfa ve beta dalgalarında azalmaya sebep olabileceğı delta ve teta dalgalarında ise artışa sebep olabileceğı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Çalışmamızda da literatürle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.





Resim 4.6.1 EEG.

TARTIŞMA

Bu çalışmada TBH için PA tedavisinin etkisi incelendi. Oksidatif stres belirteçleri olan Malondialdehit (MDA) seviyesi PA tedavisi ile azalırken süperoksit dismutaz (SOD) arttı. iNOS ve eNOS immünreaktivitesi, TBH örneklerine kıyasla PA tedavisi ile anlamlı ($P<0.05$) olarak azaldı. Damarlanma için VEGF TBH grubuna göre PA ile anlamlı ($P<0.05$) arttı. Hipoksi için bakılan HIF-1 α dağılımı TBH grubuna göre ile PA ile anlamlı ($P<0.05$) azaldı. Olgun nöron nükleus için bakılan NeUN TBH grubuna göre ile PA ile anlamlı ($P<0.05$) arttı. İF boyamalarda ekspresyonların hücresel dağılımı incelendi. İHK bulguları western blot ile doğrulandı. PA ile tedavi edilen grupta EEG'nin delta gücü kontrol grubu değerlerine benzer bulundu.

TBH literatüre benzer şekilde gerçekleştirildi. KON ve TBH hasarı önceki çalışmalara benzer şekilde anlamlı bulundu (Li DR ve ark 2009). Amerika'da TBI için yılda milyon tıbbi acil durum araştırması. TBH insidansı, orta ve düşük gelirli ülkelerde daha da yüksektir; genç yetişkinler. Tüm TBH'lerin %80-90'ını oluşturan hafif TBH, uzun süreli yaralanmalardan sorumludur. Kompleksi harekete geçiren TBI geniş bir moleküler ve hücresel yollar, iki ana faza kategorize edilebilir. İlk olarak, bir ilk birincil hasar, hakaret anında meydana gelir. Hasarlar arasında kontüzyon ve laserasyon, beyin şişmesi, diffüz aksonal yaralanma, intrakraniyal kanama ve nekrotik hücre ölümü. Bu birincil hasar biyolojik içeren genişletilmiş bir ikincil faz tarafından takip edilir. Hücre homeostazını eski haline getirmek için başlatılan çok çeşitli moleküler ve hücresel tepkilerle sonuçlanan bu gecikmiş fazda hasarlı doku iyi kontrol edilmez ve bazen gecikmiş hücre ölümü ve ilerleyici nörodejenerasyon neden olur. Bu ikincil zararlar kan-beyin bariyerinin (BBB) bozulmasına, glutamat eksitotoksitesisi, oksidatif hasara ve zamana bağlı olarak birincil mekanik hasar ile ilerleyebilen stres ve nöroinflamasyona neden olur. Nöroinflamasyon, TBH'nin akut (birincil) ve kronik (ikincil) evrelerinde mevcuttur. Proinflamatuvar sitokinlerin aşırı üretimi gerçekleşir. TBH ile çeşitli hareketsiz glial hücreler, reaktif glioz ile hızlı bir şekilde aktive edilir. Astrositik glial hücreleri başlatan ve sürdüren mikrogliya çevreleyen glia ve nöronları etkileyen enflamatuvar mediatörleri serbest bırakır. Lökosit salımı, yukarı regülasyonu ve mediatörlerin salgılanması ile sitokinler, kemokinler ve glial aktivasyon gerçekleşir. Bu

inflatuar mediatörler nötrofiller, lenfositler, makrofajlar gibi periferik bağışıklık hücrelerini toplar. Nöronlar ve glia da beyindeki inflamatuvar mediatörlerden etkilenir (Tchantchou F ve ark 2020, Xiong A ve ark 2021).

Bitkisel tedaviler içerisinde çok çalışılan curcumin'in çeşitli moleküler hedeflerle ilgilenen dikkate değer derecede pleio tropik bir molekül olduğunu göstermektedir. Zerdeçal (*Curcuma longa*) Zingiberaceae familyasının bir üyesi olup, rizomları kurkumin içermektedir. Curcumin, ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından güvenli bir bileşik olarak onaylanmıştır ve birkaç bileşene sahiptir. Antioksidan, anti-enfeksiyon, anti-inflatuar ve anti-tümör özellikleri dahil olmak üzere pleiotropik özellikler içerir. Bununla birlikte, az sayıda çalışma, TBH'de kurkuminin potansiyel nöro korumasını araştırmıştır. Birkaç çalışma, Curcumin için serebral ödemi azaltabileceğini ortaya koymaktadır. Ayrıca Curcumin'in inflamatuvar reaksiyonlar üzerindeki immünomodulator etkileri vardır. İnterferon- γ , TNF- α gibi inflamatuvar sitokinlerin üretimi, IL-1 ve IL-6 ve siklooksijenaz-2 (COX-2) aktivitesi arttırmaktadır. TBH için kurkuminin koruyucu etkilerine dahil olan sinyal yolları TLR4/MyD88/NF- κ B sinyalleridir.

Klinik skorumla literatüre benzer şekilde bulundu. KON ve TBH hasarı önceki çalışmalara benzer şekilde anlamlı bulundu (Li DR ve ark 2009).

PA uygulamaları ile literatüre benzer şekilde doz bağımlı etki saptandı. PA5 etkili oldu (Qubty D ve ark 2022, Erbil G ve ark 2019, Qubty D ve ark 2022, Sarkaki A ve ark 2015, Aslan A ve ark 2020, Barot J ve ark 2021, Yayla M ve ark 2018, Jacob J ve ark 2018). Bu çalışmanın amacı, nar takviyesinin etkilerini değerlendirmektir. Punisik asitçe zengin olan tohum yağının (PSO) sağlıklı sıçanların biyokimyasal parametreleri üzerine etkisi. PSO hayvanlara %1, %2 ve %4 konsantrasyonlarda 40 gün intragastrik olarak verildi. Toplam vücut ağırlık artışlarında, serum biyokimyasal belirteçlerinde veya dokularındaki oksidatif strese etkileri incelenmiştir. Bununla birlikte, TBARS değerleri hastaların beyinlerinde düşmüştür. Bu dokuda önemli miktarda konjuge yağ asidi bulunmadığına bağlanmıştır (Pereira de Melo IL ve ark. 2019, Sarica SC ve ark 2016).

PA benzeri chrysin ile tedavinin, pasif kaçınma görevinde öğrenme ve hafıza güçlüğünü iyileştirdiğini ve TBH sonrası rotarod testindeki motor koordinasyon bozukluğunu iyileştirdiğini gösterdi. Bu faydalı etkilere süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon (GSH) konsantrasyonlarında artış, malondialdehit (MDA) içeriğinde azalma, nöronal kaybı önleme, apoptotik

indekste azalma, ekspresyonda yükselme eşlik etti. Ayrıca anti-apoptotik Bcl-2 proteininin ve serebral korteks ve hipokampus dokularında pro-apoptotik Bax proteininin ekspresyonunu azaltmıştır. Krisinin hem anti-oksidatif hem de anti-apoptotik özelliklerinin (özellikle 100 mg/kg dozunda), bilişsel/motor eksiklikleri iyileştiren ve TBI sonrası nöronal hücre ölümünü önleyen olası mekanizmalar olduğunu düşündürmektedir (Rashno M ve ark 2019, Vonder Haar C ve ark 2016).

PA benzeri Alfa lipoik asit (ALA), sıçanlarda TBH sonrasında beyin hasarına karşı koruyucu etkileri kanıtlanmış güçlü bir antioksidandır. ALA tedavisi, kaspaz-3 ekspresyonunun aşağı regülasyonu ile sonuçlandı, terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı dUTP ucu etiketleme tahlilindeki pozitif hücre sayısını azalttı ve nöronal sağkalımı geliştirdi. Ayrıca, malondialdehit ve glutatyon peroksidaz aktivitesi seviyesi geri yüklenirken, ALA tedavisi ile Bcl-2 ile ilişkili X proteininin mitokondriye translokasyonu ve sitokrom c'nin sitozole salınması azaltıldı. Bu sonuçlar, ALA'nın, TBI'yi takiben mitokondriyi içeren bir mekanizma yoluyla nöral hücreyi apoptoza karşı koruyarak sıçanlarda nörolojik sonucu iyileştirdiğini göstermektedir (Toklu HZ ve ark 2009, Wei W ve ark 2015).

PA benzeri doğal bir flavonoid olan naringenin'in nöroprotektif etkileri sürekli naringenin uygulamasının TBH sonraki 3. günde nörolojik işlev bozukluğunu, serebral ödemi, plazmalemma geçirgenliğini ve nöron hücre kaybını iyileştirdiğini ortaya koydu. Ayrıca Naringenin, TBI'dan sonraki 3. günde ER stres yolunun (p-eIF2 α , ATF4 ve CHOP), oksidatif stresi ve apoptozu TBI kaynaklı aktivasyonunu bastırdı. Özet olarak, naringenin'in, ER stres zayıflaması da dahil olmak üzere pleiotropik etkilerle TBH'nin neden olduğu ikincil beyin hasarını iyileştirebileceğini düşündürmektedir (Deng C ve ark 2021).

PA benzeri dimetoksiflavon olan rhamnazin'in (RMZ) farelerde deneysel olarak indüklenen TBH karşı koruyucu etkisini ödemde önemli bir azalma ve gelişmiş kavrama gücü gösterdi. Ayrıca akış sitometrisi analizi ile gösterildiği gibi nöronal apoptozun inhibisyonu yoluyla nöronal dejenerasyonu önledi. RMZ, Western blot analizinde Bax'ı azaltarak antiapoptotik bir etki gösterdi ve Bcl-2 ekspresyonunu arttırdı. Ayrıca TBI grubuna kıyasla oksidatif stresi ve inflamasyonu inhibe ettiğini gösterdi (Yang B ve ark 2022).

PA benzeri luteolin'in (LUT) sıçanlarda TBH nedenli hafıza bozuklukları, oksidatif stres ve histopatolojik değişiklikler üzerindeki iyileştirici etkileri hipokampal bölgede süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesinde anlamlı artış ve

malondialdehitte (MDA) azalma olmuştur. Hipokampustaki karanlık nöronların sayısı, her üç LUT dozunda da azaldı. Bu çalışmada LUT, nöroprotektif etkiler, öğrenmede iyileşme ve sıçanlarda TBI'nın neden olduğu hafıza bozukluğunda azalma göstermiştir (mosa-al-reza Hajzadeh ve ark 2018).

Biyokimyasal incelemede SOD ve MDA sonuçları literatür ile benzer olup PA doz bağımlı olarak stresi azalttı (Sun D ve ark 2013, Sarıca SC ve ark 2016). Bir çalışmada sıçanlarda pentachlorophenol PCP'nin oluşturduğu oksidatif stres üzerine nar çekirdeği yağının (NÇY) etkilerinin değerlendirilmesi için sırasıyla 0.15 ml/kg ca dozunda NÇY, 40 mg/kg ca dozunda PCP ve 0.15 ml/kg ca dozunda NÇY ile 40 mg/kg ca dozunda PCP 28 gün boyunca gavaj yolu ile mideye uygulandı. Çalışmanın sonunda beyin, karaciğer, böbrek, testis ve dalak dokuları alındı. Doku örneklerinde malondialdehit (MDA) düzeyi ile katalaz (CAT), glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve superoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri ölçüldü. PCP'nin dokularda oksidatif strese yol açtığı; 0.15 ml/kg ca dozda uygulanan NÇY'nin, PCP kaynaklı oksidatif stresin şiddetini azalttığı belirlendi (Sarıca SC ve ark 2016, Arman Fesharaki-Zadeh, Toklu HZ ve ark 2009, Wei W ve ark 2015).

Makroskobik incelemede Ewans mavisi ile yapılanlara benzer hasar görülüp PA ile özellikle damarlanma açısından etkili yarar saptanmıştır (Hackett MJ ve ark 2019, Babae A ve ark 2021).

Mikroskobik incelemede hasarın histolojisi hipokampüste gösterildi. Literatür ile benzerdi. PA yararı saptandı (Deng Y ve ark 2007, Lee C ve ark 2010, Thau-Zuchman O ve ark 2010, Zlotnik A ve ark 2012, Song S ve ark 2014, S. Gennai ve ark 2015, Duransoy YK ve ark 2016, Mete M ve ark 2018, Rahaman P ve ark 2018, Gao X ve ark 2011, Ismail H ve ark 2020).

Histolojik bir çalışmada beyindeki nöroinflamatuvar ve nörovasküler değişiklikler incelenmiştir. TBH'nin nöroinflamatuvar yanıtını inhibe etmek için mast hücre stabilizatörü kromolin uygulanmıştır. Sonuçlar, beyinde perisit işaretleyici trombosit türevli büyüme faktörü reseptörü-beta (PDGFR- β) ve BBB ile ilişkili sıkı bağlantı proteinleri bağlantı adezyon molekülü-A (JAM-A) ve zonula okludens-1 (ZO-1) seviyesinde azalma olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, akut TBH'nin BBB/sıkı bağlantı hasarına neden olduğunu ve kromolin uygulamasının bu akut TBH'nin neden olduğu beyin hasarını ve bunun uzun vadeli sonuçlarını koruyabileceğini düşündürmektedir (Kempuraj D ve ark 2020).

NOS ile ilgili bir çalışmada minimal solunum depresyonu ile sedatif ve analjezik olarak işlev gören oldukça seçici bir α -2-adrenerjik reseptör agonisti olan deksmedetomidinin (DEX) ve reaktif oksijen türlerini (ROS) azaltarak TBH ilişkisi incelenmiştir. DEX tedavisinin sağkalım oranını ve nörolojik skoru önemli ölçüde artırdığını, nöron sağkalımını artırdığını, LC3, Beclin-1 ve NF- κ B proteinlerinin yanı sıra IL-1 β , IL-6 ve TNF- sitokinlerinin ekspresyonunu azalttığını göstermiştir. DEX'in nöroprotektif kapasitesi kısmen ROS/nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 sinyal yolağına bağlı olduğu düşünülmüştür. Birlikte ele alındığında, bu çalışmanın sonuçları, DEX'in farelerde nörolojik sonuçları iyileştirdiğini ve nöral otofaji ve nöroinflamasyona karşı koruma sağlayarak nöronal ölümü azalttığını göstermiştir (Cornelius C ve ark 2013, Feng X ve ark 2021).

VEGF, TBH sonrası beyinde eksprese edilir ve güçlü bir anjiyogenez ve nörojenez aktivatörü olarak hizmet eder. Endojen kök hücrelerin aktivasyonu, TBH dahil olmak üzere çeşitli nörolojik bozukluklarda yeni bir tedavi şekli olarak önerilmiştir. Bu çalışmada, iyileşme ve fonksiyonel sonuç üzerindeki etkileri değerlendirmek için mini-ozmotik pompalar kullanarak TBI'dan sonra 7 gün boyunca farelerin lateral ventriküllerine ekzojen VEGF infüze edilmiştir. VEGF subventriküler bölgede ve perilesion kortekste çoğalan hücre sayısını önemli ölçüde arttırmıştır. Yeni doğan hücrelerin çoğunun astrositlere ve oligodendrogliaya farklılaştığını ve yalnızca birkaç hücrenin nöronlara farklılaştığını göstermiştir. VEGF ile tedavi edilen farelerde fonksiyonel sonuç, TBH sonrası araçla tedavi edilen hayvanlara kıyasla önemli ölçüde daha iyi bulunmuştur (Altar CA ve ark 2008, Thau-Zuchman O ve ark 2010, Quinn JP ve ark 2021).

HIF1 α için hipoksik son koşullandırmanın (HPC), hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 α (HIF-1 α) ve vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) yukarı regülasyonu yoluyla nöroproteksiyona neden olduğu ve bunun fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K), p38 içerdiği saptanmıştır. HIF-1 α inhibitörü 2-metoksiestradiol (2ME2), PI3K inhibitörü LY294002, p38 MAPK inhibitörü SB203580 ve MEK inhibitörü U0126, HPC'den önce veya tGCI'den sonra uygulanmıştır. HPC'nin, tGCI'den sonra CA1'de daha yüksek HIF-1 α ve VEGF ekspresyonunu koruduğunu ve bölünmüş kaspaz-9 seviyelerini azalttığını bulunmuştur. Bu bulgular, HIF-1 α 'nın VEGF yukarı regülasyonu ve bölünmüş kaspaz-9 aşağı regülasyonu yoluyla HPC tarafından tGCI'ye karşı indüklenen nöroproteksiyon uyguladığını ve PI3K, p38

MAPK ve MEK yollarının HIF-1a ve VEGF'nin düzenlenmesinde rol oynadığını öne sürülmüştür (Tingna Zhu ve ark 2014).

HIF1a, aşağı akış genleri ile ilişkili eylemleri nedeniyle iskemik felçten sonra nörolojik semptomların ilerlemesini yeterince kontrol edebilir. Bir çalışmada, HIF-1a'nın endotelin-1 enjeksiyonundan sonra beyin hasarını azaltmadaki rolü değerlendirilmiştir. Farelerde fokal serebral iske mi, endotelin-1 mikroyenjeksiyonu ile indüklenmiş Hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 aktivatörü, dimetiloksalilglisin (DMOG) ve HIF-1a inhibitörü, akriflavin (ACF), serebral iske mi sırasında hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 aktivitesini değerlendirmek için kullanılmıştır. DMOG grubunda iNOS, TNF- α ve NF- κ B seviyelerinde düşüşle birlikte hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 ve IL-10 seviyelerinde gözle görülür bir artış göstermiştir. HIF-1a için iskemik inmede potansiyel bir terapötik hedef olabileceği düşünülmüştür (Amin N ve ark 2021).

HIF1a için seçici olarak tümör hücrelerinin apoptozunu indükleyebilir. Tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Sıçanlarda TBH'den sonra TRAIL ve ölüm reseptörü 5'in (DR5) ekspresyonunu ve hücre lokalizasyonunu incelemek için Western blot ve immüno floresans kullanılmıştır. TRAIL kaynaklı nöronal ölümü ve nöral eksiklikleri bloke etmek için çözünür DR5 (sDR5) uygulanmıştır. HIF-1a inhibitörü 2ME ve agonist DMOG, HIF-1a'nın TRAIL kaynaklı nöronal ölümdaki rolü incelenmiştir. HIF-1a'nın TRAIL kaynaklı nöronal ölümdaki in vitro rolünü araştırmak için HIF-1a siRNA kullanılmıştır. Mikroglia yerleşimli TRAIL ve nöron yerleşimli DR5'in ifadeleri, TBH sonrası önemli ölçüde yukarı regüle edilmiştir. sDR5, TRAIL'in neden olduğu nöronal apoptozu ve nörolojik eksiklikleri önemli ölçüde azaltmıştır. 2ME nöronal apoptozu, lezyon alanını ve beyin ödemi azaltmış ve TBH'den sonra TRAIL kaynaklı apoptozu inhibe eden TRAIL tuzak reseptörü 1'in (DcR1) artan ekspresyonu yoluyla nörolojik işlevi iyileştirmiştir. HIF-1a, TBH takiben DcR1 ekspresyonunu düzenleyerek TRAIL kaynaklı nöronal apoptoza aracılık ettiği düşünülmüştür (Fang Y ve ark 2020).

HIF-1 α için kontrollü kortikal yaralanma (CCI) modelini kullanarak AQP4 ve HIF-1a'nın TBH sonrası beyin ödemi oluşumu, nöronal hasar ve nörolojik fonksiyonel eksiklikler üzerindeki rollerini araştırılmıştır. Artan AQP4 protein seviyesinin, TBH sonrası beyin ödeminin ciddiyeti ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Kontrol grubundakiyle karşılaştırıldığında, hem AQP4'ün nötralize

AQP4 antikoru ile blokajı hem de HIF-la'nın 2-ME2 ile TBI sonrası 30-60 dakika içinde tek seferlik tedavi için inhibisyonu, TBH sonrası 1. günde beyin ödemi önemli ölçüde iyileştirmiş ve TBH sonrası 21. günde hipokampal nöron kaybı ve uzamsal öğrenme ve hafıza eksikliklerini belirgin şekilde azaltmıştır (Xiong A ve ark 2022).

HIF1a ve VEGF ilişkisini inceleyen bir çalışmada hipoksik grup, kan laktat düzeylerini önemli ölçüde artırdı ve pO₂'yi düşürdü ($p < 0.0001$). MRG'de travma sonrası hipoksi, daha geniş lezyon alanları ile sonuçlandı ($p = 0,0173$) ve NeuN boyama, daha fazla nöronal kayıp gösterdi ($p=0,0253$). HIF-la ve VEGF ekspresyonu, normoksik hayvanlarda önemli ölçüde arttı, ancak hipoksik hayvanlarda görülmedi ($p < 0.05$). Travmadan 1 gün sonra hipoksik grupta serum S100B düzeylerinin daha yüksek olma eğilimi görüldü ($p=0.0868$). Sitotoksik ve vasküler ödem, IgG ekstrasvazasyonu, nötrofiller ve makrofaj agregasyonu, mikroglia proliferasyonu veya C5b-9 ekspresyonu açısından gruplar arasında fark gözlenmedi. Normoksik grupta, HIF-la ve VEGF ekspresyonunun yüksek olduğu bulundu. TBH sonrası hipoksinin patofizyolojisini daha iyi tanımlamak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmüştür (Zhu T ve ark 2014, Thelin EP ve ark 2016).

NeuN ile ilgili farelerde kontrollü kortikal etkilerden sonra uyarıcı sinaptik sinyallemede yer alan önemli bir yapı iskelesi proteini olan postsinaptik yoğunluk proteini-95'in (PSD-95) ifadesindeki zamansal ve mekansal değişikliklerin karakterize edildiği bir çalışmada açık alan aktivite testi ve yeni nesne tanıma testi ile değerlendirilen nörolojik yaralanma, PSD-95 ifadesindeki değişikliklerle karşılaştırılmıştır. Yaralanma sonrası 7. günden itibaren ipsilateral hipokampusta PSD-95 ekspresyonunda anlamlı bir azalma gözlenmiştir. PSD-95 kaybı, nörona özgü bir belirteç olan NeuN (nöronal çekirdekler) için immünoreaktivitede eş zamanlı bir azalmaya karşılık gelmiştir. Hipokampal PSD-95'in gecikmiş kaybı, doğrudan davranışsal kusurların başlangıcı ile ilişkili olduğu ve kafa travmasını takiben davranışsal anormalliklerde PSD-95'in olası bir nedensel rolü bulunduğu düşünülmüştür (Qiu J ve ark 2004, Wakade C ve ark 2010).

NeUN için sıçanlarda periferik organlardaki nöron (-benzeri) hücrelerin hücre belirteçleri ile saptanması amaçlanmıştır. Yetişkin erkek Sprague-Dawley sıçanlarına anestezi uygulandı. Beyin, kalp, akciğer, karaciğer, böbrek, mide, duodenum ve ileum gibi organları alındı. Bu organlardaki mRNA ve protein ekstrakte edildi. RNA dizilemesi (RNA-Seq) gerçekleştirildi ve nöronal soma için "spesifik" bir belirteç

olan NeuN, Western blotlama ile test edildi. NeuN ve yedi nöronal olmayan hücre hattı, immünofloresan (IF) veya immünohistokimya (IHC) ile analiz edildi. Eno2, NeuN (Rbfox3), kolin asetiltransferaz (Chat) gibi nöronal belirteçlerin yanı sıra tirozin hidroksilaz (Th) ve nöronal-glial belirteçler, örneğin glial fibril asidik protein (GFAP), S100b, 2', 3' -siklik nükleotit 3'-fosfodiesteraz (Cnp) ve diğer ilgili belirteçler, mRNA düzeyinde tüm organlarda pozitif olarak ifade edildi. NeuN, Western blot ile ayrıca analiz edildi. IF ve IHC tahlilleri, NeuN-pozitif hücrelerin, beyindekinden (nükleer NeuN-pozitif hücreler) ve bir NeuN-negatif dokudan farklı modellere sahip olmasına rağmen, tüm periferik dokulara (esas olarak peri-nükleer NeuN-pozitif hücreler) dağıldığını gösterdi. Özellikle NeuN ve Myl3'ün miyokard hücrelerinin sitoplazmasında birlikte ifade edilmesi, NeuN'nin nöronal farklılaşma dışında başka işlevlere de sahip olabileceğini düşündürür. Ayrıca protein yedi nöronal olmayan hücre hattında pozitif olarak ifade edildi. Bulgularımız, NeuN-pozitif hücrelerin geniş çapta var olduğunu ve dağılım paterni tanımlanmadan NeuN'nin nöronlar için özgüllüğünün sınırlı olabileceğini öne sürdü (Yu Y ve ark 2020).

SONUÇ

Bu çalışmada TBH için PA uygulamasının t ropatik etkisi incelendi ve özellikle PA5 dozunun anlamlı bir yarar sağladığı anlaşıldı.

- Oksidatif stres belirteçleri olan Malondialdehit (MDA) seviyesi PA tedavisi ile azalırken süperoksit dismutaz (SOD) arttı.

- HE sonuçlarda hasar ve PA yararı gösterildi.

- NOS TBH örneklerine kıyasla PA tedavisi ile anlamlı olarak azaldı.

- Damarlanma için VEGF TBH grubuna göre PA ile anlamlı arttı.

- Hipoksi için bakılan HIF-1  dağılımı TBH grubuna göre PA ile anlamlı azaldı.

- Olgun nöron nükleus için bakılan NeUN TBH grubuna göre PA ile anlamlı arttı.

- İHK sonuçları western blot ile doğrulandı.

- PA ile tedavi edilen grupta EEG'nin delta gücü kontrol grubu değerlerine benzer bulundu.

- TBH sonrası PA uygulamasının histolojik, immunohistokimyasal, biyokimyasal, western blot ve EEG ile gösterilen yararlı etkisinin klinik anlamı olabileceğini gösterdi.

TBH için PA hasta yaşam kalitesini artıracadığı d ş n ld 

KAYNAKLAR

Altar CA, Vawter MP, Ginsberg SD. Target identification for CNS diseases by transcriptional profiling. *Neuropsychopharmacology*. 2009 Jan;34(1):18-54. doi: 10.1038/npp.2008.172. Epub 2008 Oct 15. PMID: 18923405; PMCID: PMC2675576.

Amin N, Chen S, Ren Q, Tan X, Botchway BOA, Hu Z, Chen F, Ye S, Du X, Chen Z, Fang M. Hypoxia Inducible Factor-1 α Attenuates Ischemic Brain Damage by Modulating Inflammatory Response and Glial Activity. *Cells*. 2021 Jun 1;10(6):1359. doi: 10.3390/cells10061359. PMID: 34205911; PMCID: PMC8229365.

Aruna P, Venkataramanamma D, Singh AK, Singh RP. Health Benefits of Punicic Acid: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2016 Jan;15(1):16-27.

Aslan A, Gok O, Beyaz S, Arslan E, Erman O, Ağca CA. The preventive effect of ellagic acid on brain damage in rats via regulating of Nrf-2, NF-kB and apoptotic pathway. *J Food Biochem*. 2020 Jun;44(6):e13217. doi: 10.1111/jfbc.13217. Epub 2020 Apr 6. PMID: 32250487.

Babae A, Vaghefi SHE, Dehghani Soltani S, Asadi Shekaari M, Shahrokhi N, Basiri M. Hippocampal Astrocyte Response to Melatonin Following Neural Damage Induction in Rats. *Basic Clin Neurosci*. 2021 Mar-Apr;12(2):177-186. doi: 10.32598/bcn.12.2.986.1. Epub 2021 Mar 1. PMID: 34925714; PMCID: PMC8672670

Barot J, Saxena B. Therapeutic effects of eugenol in a rat model of traumatic brain injury: A behavioral, biochemical, and histological study. *J Tradit Complement Med*. 2021 Jan 8;11(4):318-327. doi: 10.1016/j.jtcme.2021.01.003. PMID: 34195026; PMCID: PMC8240337.

Blumenthal I. Shaken baby syndrome. *Postgrad Med J* 2002; 78: 732-735

Bontke CF, Boake C: Principles of Brain Injury Rehabilitation. In Braddom RL, editör. Physical Medicine and Rehabilitation. Philadelphia: WB Saunders; 1996; p. 1027-1051

Boussetta T, Raad H, Lett'eron P, Gougerot-Pocidal MA, Marie JC, FathiD, El-Benna J. 2009. Punicic acid: a conjugated linolenic acid inhibitsTNF α -induced neutrophil hyperactivation and protects from experimental colon inflammation in rats. PLoS One 4(7):e6458

Calder PC. 2013. Long chain fatty acids and gene expression in inflammation and immunity. Curr Opin Clin Nut Met Care 16:425–33.

Cornelius C, Crupi R, Calabrese V, Graziano A, Milone P, Pennisi G, Radak Z, Calabrese EJ, Cuzzocrea S. Traumatic brain injury: oxidative stress and neuroprotection. Antioxid Redox Signal. 2013 Sep 10;19(8):836-53. doi: 10.1089/ars.2012.4981. Epub 2013 May 10. PMID: 23547621.

de Melo ILP, de Oliveira e Silva AM, de Carvalho EB, Yoshime LT, JAG S, Mancini-Filho J. Incorporation and effects of punicic acid on muscle and adipose tissues of rats. Lipids Health Dis. 2016;15:1

Deng C, Yi R, Fei M, Li T, Han Y, Wang H. Naringenin attenuates endoplasmic reticulum stress, reduces apoptosis, and improves functional recovery in experimental traumatic brain injury. Brain Res. 2021 Oct 15;1769:147591. doi: 10.1016/j.brainres.2021.147591. Epub 2021 Jul 26. PMID: 34324877.

Deng Y, Thompson BM, Gao X, Hall ED. Temporal relationship of peroxynitrite-induced oxidative damage, calpain-mediated cytoskeletal degradation and neurodegeneration after traumatic brain injury. Exp Neurol. 2007 May;205(1):154-65. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.01.023. Epub 2007 Feb 3. PMID: 17349624; PMCID: PMC1950332.

Dikmen SS, Machamer JE, Powell JM, Temkin NR. Outcome 3 to 5 years after moderate to severe traumatic brain injury. Arch Phys Med Rehabil 2003; 84: 1449-1457.

Dixon CE, Kochanek PM, Yan HQ et al. One-year study of spatial memory performance, brain morphology, and cholinergic markers after moderate controlled cortical impact in rats. *J Neurotrauma*. 1999;. Feb;16(2):109-22.

Duransoy YK, Tuglu MI, Selcuki M. Effects of lacosamide "a novel antiepileptic drug" in the early stages of chicken embryo development. *Childs Nerv Syst*. 2016 Sep;32(9):1715-9. doi: 10.1007/s00381-016-3181-4. Epub 2016 Jul 29. PMID: 27473858.

Engel J Jr. The progression of electrophysiologic abnormalities during epileptogenesis after experimental traumatic brain injury. *Epilepsia*. 2016 Oct;57(10):1558-1567. doi: 10.1111/epi.13486. Epub 2016 Aug 6. PMID: 27495360; PMCID: PMC5207033.

Erbil G, Sacik U, Yilmaz F, Kisaoglu H, Erbayraktar Z, Pekcetin C, Ozogul C. The effect of ferulic acid on experimental traumatic brain damage in rats. *Bratisl Lek Listy*. 2019;120(5):372-379. doi: 10.4149/BLL_2019_061. PMID: 31113201.

Fang Y, Lu J, Wang X, Wu H, Mei S, Zheng J, Xu S, Lenahan C, Chen S, Zhang J, Hong Y. HIF-1 α Mediates TRAIL-Induced Neuronal Apoptosis via Regulating DcR1 Expression Following Traumatic Brain Injury. *Front Cell Neurosci*. 2020 Aug 3;14:192. doi: 10.3389/fncel.2020.00192. PMID: 32848609; PMCID: PMC7416670

Fang Y, Lu J, Wang X, Wu H, Mei S, Zheng J, Xu S, Lenahan C, Chen S, Zhang J, Hong Y. HIF-1 α Mediates TRAIL-Induced Neuronal Apoptosis via Regulating DcR1 Expression Following Traumatic Brain Injury. *Front Cell Neurosci*. 2020 Aug 3;14:192. doi: 10.3389/fncel.2020.00192. PMID: 32848609; PMCID: PMC7416670.

Feng X, Ma W, Zhu J, Jiao W, Wang Y. Dexmedetomidine alleviates early brain injury following traumatic brain injury by inhibiting autophagy and neuroinflammation through the ROS/Nrf2 signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2021 Sep;24(3):661. doi: 10.3892/mmr.2021.12300. Epub 2021 Jul 19. PMID: 34278508; PMCID: PMC8335733.

Fesharaki-Zadeh A. Oxidative Stress in Traumatic Brain Injury. *Int J Mol Sci*. 2022 Oct 27;23(21):13000. doi: 10.3390/ijms232113000. PMID: 36361792; PMCID: PMC9657447.

French A, Ng E, Preet K, Franks A, Kwan I, Phillips HW, Kim DY, Yang I. Systematic Review of Serum Biomarkers in Traumatic Brain Injury. *Cureus*. 2021 Aug 10;13(8):e17056. doi: 10.7759/cureus.17056. PMID: 34522534; PMCID: PMC8428323.

Frid K, Har-Even M, Rubovitch V, Gabizon R, Pick CG. Nano-PSO Administration Attenuates Cognitive and Neuronal Deficits Resulting from Traumatic Brain Injury. *Molecules*. 2022 Apr 23;27(9):2725. doi: 10.3390/molecules27092725. PMID: 35566074; PMCID: PMC9105273.

Gao X, Deng P, Xu ZC, Chen J. Moderate traumatic brain injury causes acute dendritic and synaptic degeneration in the hippocampal dentate gyrus. *PLoS One*. 2011;6(9):e24566. doi: 10.1371/journal.pone.0024566. Epub 2011 Sep 13. PMID: 21931758; PMCID: PMC3172233.

Gennarelli TA, Meaney DF. Mechanism of primary head injury. In: Wilkins RH, Rengachary SS, (eds). *Neurosurgery*. USA: Mc Graw Hill, 1996: 2611-21.

Ghazi Daradkeh Effect of pomegranate juice on traumatic brain injury patients December 2017 *International Journal of Growth and Development* 1(1):26 DOI:10.25081/ijgd.2017.v1i1.27

Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae*. 2015 Apr-Jun;7(2):42-7. PMID: 26085943; PMCID: PMC4463411.

Hackett MJ, El Falougy H, Kubikova E, Benuska Hollings A, Caine S, Bewer BE, Alaverdashvili M, Takechi R, Mamo JCL, Jones MWM, de Jonge MD, Paterson PG, Pickering IJ, George GN. Elemental characterisation of the pyramidal neuron layer within the rat and mouse hippocampus. *Metallomics*. 2019 Jan 23;11(1):151-165. doi: 10.1039/c8mt00230d. PMID: 30398510.J.

Haneef, Z., Levin, H. S., Frost, J. D. & Mizrahi, E. M. (2013). Electroencephalography and quantitative electroencephalography in mild traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, 30(8), 653–656. <https://doi.org/10.1089/neu.2012.2585>

Hakiminia B, Alikiaii B, Khorvash F, Mousavi S. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction following traumatic brain injury: From mechanistic view to targeted therapeutic opportunities. *Fundam Clin Pharmacol*. 2022 Aug;36(4):612-662. doi: 10.1111/fcp.12767. Epub 2022 Feb 24. PMID: 35118714

Holic R, Xu Y, Caldo KMP, Singer SD, Field CJ, Weselake RJ, Chen G. Bioactivity and biotechnological production of puniceic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018 Apr;102(8):3537-3549.

Huang H, Xin M, Wu X, Liu J, Zhang W, Yang K, Zhang J. The efficacy of tranexamic acid treatment with different time and doses for traumatic brain injury: a systematic review and meta-analysis. *Thromb J*. 2022 Dec 19;20(1):79. doi: 10.1186/s12959-022-00440-9. PMID: 36529753; PMCID: PMC9762012.

Ianof, J. N. & Anghinah, R. (2017). Traumatic brain injury: An EEG point of view. *Dementia & Neuropsychologia*, 11(1), 3–5. <https://doi.org/10.1590/1980-57642016dn11-010002>

Ismail H, Shakkour Z, Tabet M, Abdelhady S, Kobaisi A, Abedi R, Nasrallah L, Pintus G, Al-Dhaheri Y, Mondello S, El-Khoury R, Eid AH, Kobeissy F, Salameh J. Traumatic Brain Injury: Oxidative Stress and Novel Anti-Oxidants Such as Mitoquinone and Edaravone. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Oct 1;9(10):943. doi: 10.3390/antiox9100943. PMID: 33019512; PMCID: PMC7601591.

Jacob J, Amalraj A, Divya C, Janadri S, Manjunatha PM, Gopi S. Oral toxicity study of sports nutritional powder in Wistar rats: A 90 day repeated dose study. *Toxicol Rep*. 2018 Apr 7;5:497-503. doi: 10.1016/j.toxrep.2018.04.001. PMID: 29854621; PMCID: PMC5977539.

Kahriman A, Bouley J, Smith TW, Bosco DA, Woerman AL, Henninger N. Mouse closed head traumatic brain injury replicates the histological tau pathology

pattern of human disease: characterization of a novel model and systematic review of the literature. *Acta Neuropathol Commun.* 2021 Jun 29;9(1):118. doi: 10.1186/s40478-021-01220-8. PMID: 34187585; PMCID: PMC8243463.

Kempuraj D, Ahmed ME, Selvakumar GP, Thangavel R, Raikwar SP, Zaheer SA, Iyer SS, Govindarajan R, Nattanmai Chandrasekaran P, Burton C, James D, Zaheer A. Acute Traumatic Brain Injury-Induced Neuroinflammatory Response and Neurovascular Disorders in the Brain. *Neurotox Res.* 2021 Apr;39(2):359-368. doi: 10.1007/s12640-020-00288-9. Epub 2020 Sep 21. PMID: 32955722; PMCID: PMC7502806.

Khan M, Khan H, Singh I, Singh AK. Hypoxia inducible factor-1 alpha stabilization for regenerative therapy in traumatic brain injury. *Neural Regen Res.* 2017 May;1 20172(5):696-701. doi: 10.4103/1673-5374.206632. PMID: 28616019; PMCID: PMC5461600.

Kiernan, J. A., & Barr M L 2013 Barr's the human nervous system: an anatomical viewpoint. Lippincott Williams & Wilkins.

Koch PF, Cottone C, Adam CD, Ulyanova AV, Russo RJ, Weber MT, Arena JD, Johnson VE, Wolf JA. Traumatic Brain Injury Preserves Firing Rates But Disrupts Laminar Oscillatory Coupling and Neuronal Entrainment in Hippocampal CA1. *eNeuro.* 2020 Sep 2;7(5): ENEURO.0495-19.2020. doi: 10.1523/ENEURO.0495-19.2020. PMID: 32737188; PMCID: PMC7477953.

Langlois JA, Rutland-Brown W, Thomas KE. Traumatic Brain Injury in the United States: Emergency Department Visits, Hospitalizations, and Deaths. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention, Nation Center for Injury Prevention and Control; 2004 Available from: <http://www.cdc.gov/node.do/id/0900f3ec8000dbdc/aspectId/A0400020>

Lee C, Agoston DV. Vascular endothelial growth factor is involved in mediating increased de novo hippocampal neurogenesis in response to traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2010 Mar;27(3):541-53. doi: 10.1089/neu.2009.0905. PMID: 20001687

Li DR, Ishikawa T, Zhao D, Michiue T, Quan L, Zhu BL, Maeda H. Histopathological changes of the hippocampus neurons in brain injury. *Histol Histopathol*. 2009 Sep;24(9):1113-20. doi: 10.14670/HH-24.1113. PMID: 19609858.

Liu Y, McAfee SS, Guley NM, Del Mar N, Bu W, Heldt SA, Honig MG, Moore BM 2nd, Reiner A, Heck DH. Abnormalities in Dynamic Brain Activity Caused by Mild Traumatic Brain Injury Are Partially Rescued by the Cannabinoid Type-2 Receptor Inverse Agonist SMM-189. *eNeuro*. 2017 Aug 18;4(4):ENEURO.0387-16.2017. doi: 10.1523/ENEURO.0387-16.2017. PMID: 28828401; PMCID: PMC5562300.

Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J. Neurosurg* 1994;80(2): 291–300.

McGinn M J and Povlishock J T 2016 Pathophysiology of Traumatic Brain Injury *Neurosurg. Clin. N. Am.* 27 397–407 Online: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nec.2016.06.002>

McIntosh TK, Noble L, Andrews B, Faden AI. Traumatic brain injury in the rat: characterization of a midline fluid-percussion model. *Cent Nerv Syst Trauma*. 1987; 4:119–134

Mete M, Alpay S, Aydemir I, Unsal UU, Collu F, Özel HF, Duransoy YK, Kutlu N, Tuglu Mİ. Therapeutic effects of Lacosamide in a rat model of traumatic brain injury: A histological, biochemical and electroencephalography monitoring study. *Injury*. 2021 Apr;52(4):713-723. doi: 10.1016/j.injury.2021.02.055. Epub 2021 Mar 3. PMID: 33714548.

Mete M, Aydemir I, Unsal UU, Collu F, Vatandas G, Gurcu B, Duransoy YK, Taneli F, Tuglu MI, Selcuki M. Neuroprotective Effects of Oleocanthal, a Compound in Virgin Olive Oil, in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *Turk Neurosurg*. 2018;28(6):858-865. doi: 10.5137/1019-5149.JTN.21417-17.2. PMID: 29204981.

Mete M, Unsal UU, Aydemir I, Sönmez PK, Tuglu MI. Punicic Acid Inhibits Glioblastoma Migration and Proliferation via the PI3K/AKT1/mTOR Signaling Pathway. *Anticancer Agents Med Chem.* 2019;19(9):1120-1131.

Meythaler JM, Peduzzi JD, Eleftheriou E, Novack TA. Current concepts: diffuse axonal injury—associated traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil* 2001; 82: 1461-1471.

Moncada S, Higgs A: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329:2002-20 1

Moncado S. The L-arginine: Nitric oxide pathway. *Acta Physiology Scand* 145(3): 201-27, 1992.

Mukherjee C, Bhattacharyya S, Ghosh S, Bhattacharyya DK. 2002. Dietary effects of punicic acid on the composition and peroxidation of rat plasma lipid. *J Oleosci* 51:513–22

Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase. *Journal Leukoc. Biol* 54 (2): 171-8, 1993.

Pearn M L, Niesman I R, Egawa J, Sawada A, Almenar-Queralt A, Shah S B, Duckworth J L and Head B P 2017 Pathophysiology Associated with Traumatic Brain Injury: Current Treatments and Potential Novel Therapeutics *Cell. Mol. Neurobiol.* 37 571–85

Pereira de Melo IL, de Oliveira E Silva AM, Yoshime LT, Gasparotto Sattler JA, Teixeira de Carvalho EB, Mancini-Filho J. Punicic acid was metabolised and incorporated in the form of conjugated linoleic acid in different rat tissues. *Int J Food Sci Nutr.* 2019 Jun;70(4):421-431. doi: 10.1080/09637486.2018.1519528. Epub 2018 Oct 17. PMID: 30326753.

Perucca P, Smith G, Santana-Gomez C, Bragin A, Staba R. Electrophysiological biomarkers of epileptogenicity after traumatic brain injury. *Neurobiol Dis.* 2019 Mar; 123:69-74. doi: 10.1016/j.nbd.2018.06.002. Epub 2018 Jun 5. PMID: 29883622; PMCID: PMC6281777.

Picton T W and Mazaheri A 2006 Electroencephalography (EEG) *Encycl. Cogn. Sci.*

Qiu J, Takagi Y, Harada J, Rodrigues N, Moskowitz MA, Scadden DT, Cheng T. Regenerative response in ischemic brain restricted by p21cip1/waf1. *J Exp Med.* 2004 Apr 5;199(7):937-45. doi: 10.1084/jem.20031385. PMID: 15067031; PMCID: PMC2211886.

Quinn JP, Kandigian SE, Trombetta BA, Arnold SE, Carlyle BC. VGF as a biomarker and therapeutic target in neurodegenerative and psychiatric diseases. *Brain Commun.* 2021 Oct 27;3(4): fcab261. doi: 10.1093/braincomms/fcab261. PMID: 34778762; PMCID: PMC8578498.

Raghupathi R, Graham DI, McIntosh TK. Apoptosis after traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2000 Oct;17(10):927-38. doi: 10.1089/neu.2000.17.927. PMID: 11063058.

Rahaman P, Del Bigio MR. Histology of Brain Trauma and Hypoxia-Ischemia. *Acad Forensic Pathol.* 2018 Sep;8(3):539-554. doi: 10.1177/1925362118797728. Epub 2018 Aug 31. PMID: 31240058; PMCID: PMC6490582.

Rashno M, Sarkaki A, Farbood Y, Rashno M, Khorsandi L, Naseri MKG, Dianat M. Therapeutic effects of chrysin in a rat model of traumatic brain injury: A behavioral, biochemical, and histological study. *Life Sci.* 2019 Jul 1;228:285-294. doi: 10.1016/j.lfs.2019.05.007. Epub 2019 May 4. PMID: 31063733.

S. Gennai, A. Monsel, Q. Hao, J. Liu, V. Gudapati, E. L. Barbier, J. W. Lee, Cell-Based therapy for traumatic brain injury, *BJA: British Journal of Anaesthesia*, Volume 115, Issue 2, August 2015, Pages 203–212, <https://doi.org/10.1093/bja/aev229>

Saha SS, Ghosh M. 2009. Comparative study of antioxidant activity of a-eleostearic acid and punicic acid against oxidative stress generated by sodium arsenite. *Food Chem Toxicol.* 47:2551–2556.

Salehi A, Zhang JH, Obenaus A. Response of the cerebral vasculature following traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017 Jul;37(7):2320-2339. doi: 10.1177/0271678X17701460. Epub 2017 Apr 5. PMID: 28378621; PMCID: PMC5531360.

Sandel ME, Bell KR, Michaud LJ. Brain Injury Rehabilitation. 1. Traumatic Brain Injury: prevention, pathophysiology and outcome prediction. *Arch Phys Med Rehabil* 1998; 79: 3-9

Sarkaki A, Farbood Y, Gharib-Naseri MK, Badavi M, Mansouri MT, Haghparsat A, Mirshekar MA. Gallic acid improved behavior, brain electrophysiology, and inflammation in a rat model of traumatic brain injury. *Can J Physiol Pharmacol.* 2015 Aug;93(8):687-94. doi: 10.1139/cjpp-2014-0546. Epub 2015 Jul 29. PMID: 26222320.

Shabbir MA, Khan MR, Saeed M, Pasha I, Khalil AA, Siraj N. Punicic acid: A striking health substance to combat metabolic syndromes in humans. *Lipids Health Dis.* 2017 May 30;16(1):99.

Shen Q, Hiebert JB, Hartwell J, Thimmesch AR, Pierce JD. Systematic Review of Traumatic Brain Injury and the Impact of Antioxidant Therapy on Clinical Outcomes. *Worldviews Evid Based Nurs.* 2016 Oct;13(5):380-389. doi: 10.1111/wvn.12167. Epub 2016 May 31. PMID: 27243770.

Shenag M, Kassem H, Peng C, Schafer S, Ding JY, Fredrickson V, Guthikonda M, Kreipke CW, Rafols JA, Ding Y. Neuronal damage and functional deficits are ameliorated by inhibition of aquaporin and HIF1 α after traumatic brain injury (TBI). *J Neurol Sci.* 2012 Dec 15;323(1-2):134-40. doi: 10.1016/j.jns.2012.08.036. Epub 2012 Oct 3. PMID: 23040263.

Shore PM, Jackson EK, Wisniewski SR, Clark RS, Adelson PD, Kochanek PM. Vascular endothelial growth factor is increased in cerebrospinal fluid after traumatic brain injury in infants and children. *Neurosurgery.* 2004 Mar;54(3):605-11; discussion 611-2. doi: 10.1227/01.neu.0000108642.88724.db. PMID: 15028134.

Shultz SR, Cardamone L, Liu YR, Hogan RE, Maccotta L, Wright DK, Zheng P, Koe A, Gregoire MC, Williams JP, Hicks RJ, Jones NC, Myers DE, O'Brien TJ, Bouillere V. Can structural or functional changes following traumatic brain injury in the rat predict epileptic outcome? *Epilepsia*. 2013 Jul;54(7):1240-50. doi: 10.1111/epi.12223. Epub 2013 May 29. PMID: 23718645; PMCID: PMC4032369.

Shultz, Sandy R. et al. 2017. "The Potential for Animal Models to Provide Insight into Mild Traumatic Brain Injury: Translational Challenges and Strategies." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 76: 396–414. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.09.014>.

Song S, Park JT, Na JY, Park MS, Lee JK, Lee MC, Kim HS. Early expressions of hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor increase the neuronal plasticity of activated endogenous neural stem cells after focal cerebral ischemia. *Neural Regen Res*. 2014 May 1;9(9):912-8. doi: 10.4103/1673-5374.133136. PMID: 25206911; PMCID: PMC4146222.

Sun D, McGinn M, Hankins JE, Mays KM, Rolfe A, Colello RJ. Aging- and injury-related differential apoptotic response in the dentate gyrus of the hippocampus in rats following brain trauma. *Front Aging Neurosci*. 2013 Dec 18;5:95. doi: 10.3389/fnagi.2013.00095. PMID: 24385964; PMCID: PMC3866524.

Tchantchou F, Goodfellow M, Li F, Ramsue L, Miller C, Puche A, Fiskum G. Hyperhomocysteinemia-Induced Oxidative Stress Exacerbates Cortical Traumatic Brain Injury Outcomes in Rats. *Cell Mol Neurobiol*. 2021 Apr;41(3):487-503. doi: 10.1007/s10571-020-00866-7. Epub 2020 May 13. PMID: 32405706.

Thatcher R W, Biver C, Gomez J F, North D, Curtin R, Walker R A and Salazar A 2001 Estimation of the EEG power spectrum using MRI T2 relaxation time in traumatic brain injury *Clin. Neurophysiol*. 112 1729–45

Thau-Zuchman O, Shohami E, Alexandrovich AG, Leker RR. Vascular endothelial growth factor increases neurogenesis after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010 May;30(5):1008-16. doi: 10.1038/jcbfm.2009.271. Epub 2010 Jan 13. PMID: 20068579; PMCID: PMC2949187.

Thelin EP, Frostell A, Mulder J, Mitsios N, Damberg P, Aski SN, Risling M, Svensson M, Morganti-Kossmann MC, Bellander BM. Lesion Size Is Exacerbated in Hypoxic Rats Whereas Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha and Vascular Endothelial Growth Factor Increase in Injured Normoxic Rats: A Prospective Cohort Study of Secondary Hypoxia in Focal Traumatic Brain Injury. *Front Neurol*. 2016 Mar 7;7:23. doi: 10.3389/fneur.2016.00023. PMID: 27014178; PMCID: PMC4780037.

Thijs R D, Surges R, O'Brien T J and Sander J W 2019 Epilepsy in adults *Lancet* 393 689–701 Online: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32596-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32596-0)

Tingna Zhu, MD, Lixuan Zhan, PhD, MD, Donghai Liang, MS, Jiaoyue Hu, MD, Zhiwei Lu, MD, Xinyong Zhu, MD, Weiwen Sun, MD, Liu Liu, MD, En Xu, MD, Hypoxia-Inducible Factor 1 α Mediates Neuroprotection of Hypoxic Postconditioning Against Global Cerebral Ischemia, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, Volume 73, Issue 10, October 2014, Pages 975–986,

Toklu HZ, Hakan T, Biber N, Solakoğlu S, Oğünç AV, Sener G. The protective effect of alpha lipoic acid against traumatic brain injury in rats. *Free Radic Res*. 2009 Jul;43(7):658-67. doi: 10.1080/10715760902988843. PMID: 19468925.

Ucar T, Tanrioer G, Gurer I, Onal MZ, Kazan S Modified experimental mild traumatic brain injury model. *J Trauma*. 2006 Mar;60(3):558-65.

Unnisa A, Greig NH, Kamal MA. Inhibition of Caspase 3 and Caspase 9 Mediated Apoptosis: A Multimodal Therapeutic Target in Traumatic Brain Injury. *Curr Neuropharmacol*. 2022 Mar 27. doi: 10.2174/1570159X20666220327222921. Epub ahead of print. PMID: 35339178.

Unnisa A, Greig NH, Kamal MA. Inhibition of Caspase 3 and Caspase 9 Mediated Apoptosis: A Multimodal Therapeutic Target in Traumatic Brain Injury. *Curr Neuropharmacol*. 2022 Mar 27. doi: 10.2174/1570159X20666220327222921. Epub ahead of print. PMID: 35339178.

Vonder Haar C, Peterson TC, Martens KM, Hoane MR. Vitamins and nutrients as primary treatments in experimental brain injury: Clinical implications for nutraceutical therapies. *Brain Res*. 2016 Jun 1;1640(Pt A):114-129. doi:

10.1016/j.brainres.2015.12.030. Epub 2015 Dec 23. PMID: 26723564; PMCID: PMC4870112.

Wakade C, Sukumari-Ramesh S, Laird MD, Dhandapani KM, Vender JR. Delayed reduction in hippocampal postsynaptic density protein-95 expression temporally correlates with cognitive dysfunction following controlled cortical impact in mice. *J Neurosurg.* 2010 Dec;113(6):1195-201. doi: 10.3171/2010.3.JNS091212. Epub 2010 Apr 16. PMID: 20397893; PMCID: PMC3155981.

Wei W, Wang H, Wu Y, Ding K, Li T, Cong Z, Xu J, Zhou M, Huang L, Ding H, Wu H. Alpha lipoic acid inhibits neural apoptosis via a mitochondrial pathway in rats following traumatic brain injury. *Neurochem Int.* 2015 Aug;87:85-91. doi: 10.1016/j.neuint.2015.06.003. Epub 2015 Jun 6. PMID: 26055972.

Werner C and Engelhard K 2007 Pathophysiology of traumatic brain injury *Br. J. Anaesth.* 99 4–9

Xiong A, Li J, Xiong R, Xia Y, Jiang X, Cao F, Lu H, Xu J, Shan F. Inhibition of HIF-1 α -AQP4 axis ameliorates brain edema and neurological functional deficits in a rat controlled cortical injury (CCI) model. *Sci Rep.* 2022 Feb 17;12(1):2701. doi: 10.1038/s41598-022-06773-9. PMID: 35177771; PMCID: PMC8854620.

Xiong A, Xiong R, Yu J, Liu Y, Liu K, Jin G, Xu J, Yan J. Aquaporin-4 is a potential drug target for traumatic brain injury via aggravating the severity of brain edema. *Burns Trauma.* 2021 Mar 15;9:tkaa050. doi: 10.1093/burnst/tkaa050. PMID: 33748293; PMCID: PMC7957347.

Yang B, Zhang R, Sa Q, Du Y. Rhamnazin Ameliorates Traumatic Brain Injury in Mice via Reduction in Apoptosis, Oxidative Stress, and Inflammation. *Neuroimmunomodulation.* 2022;29(1):28-35. doi: 10.1159/000516927. Epub 2021 Jul 15. PMID: 34265765.

Yayla M, Cetin D, Adali Y, Kilicle PA, Toktay E. Potential therapeutic effect of pomegranate seed oil on ovarian ischemia/reperfusion injury in rats. *Iran J Basic*

Med Sci. 2018 Dec;21(12):1262-1268. doi: 10.22038/ijbms.2018.30149.7268. PMID: 30627370; PMCID: PMC6312678.

Yu Y, Wu M, Zhang N, Yin H, Shu B, Duan W. A pilot study on searching for peri-nuclear NeuN-positive cells. PeerJ. 2020 Jan 7;8:e8254. doi: 10.7717/peerj.8254. PMID: 31938576; PMCID: PMC6953339.

Yusuf İZCİ1 , Yahya Cem ERBAŞ2 Türk Nöroşir Derg 2015, Cilt: 25, Sayı: 3, 287-295)

Zeynep SOYER SARICA ve ark Antioxidant Effects of Pomegranate Seed Oil Against Pentachlorophenol Toxicity in Rat Tissues. DOI: 10.32707/ercivet.477307

Zhu T, Zhan L, Liang D, Hu J, Lu Z, Zhu X, Sun W, Liu L, Xu E. Hypoxia-inducible factor 1 α mediates neuroprotection of hypoxic postconditioning against global cerebral ischemia. J Neuropathol Exp Neurol. 2014 Oct;73(10):975-86. doi: 10.1097/NEN.0000000000000118. PMID: 25192050.

Zlotnik A, Sinelnikov I, Gruenbaum BF, Gruenbaum SE, Dubilet M, Dubilet E, Leibowitz A, Ohayon S, Regev A, Boyko M, Shapira Y, Teichberg VI. Effect of glutamate and blood glutamate scavengers oxaloacetate and pyruvate on neurological outcome and pathohistology of the hippocampus after traumatic brain injury in rats. Anesthesiology. 2012 Jan;116(1):73-83. doi: 10.1097/ALN.0b013e31823d7731. PMID: 22129535.

Evrak Tarih ve Sayısı: 23.01.2023-472990



T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

Sayı : E-74547675-302.99-472990
Konu : Mesut METE'nin Tez savunma sınavı hk.

23.01.2023

SBE HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

Enstitümüz 19.01.2023 tarih ve 2/21 sayılı yönetim kurulu toplantısında Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Mesut METE'nin 16.01.2023 tarihinde gerçekleştirilen **“Punicic Asit Uygulamasının Sıçanlarda AKUT Travmatik Beyin Hasarı Sonrasında Nönoprotektif Etkisini Araştırması”** başlıklı tez savunma sınavının kabul edilmesine **OY BİRLİĞİ** ile karar verildi.

Gereğini ve bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Ömer TETİK
Enstitü Müdürü

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Doğrulama Kodu :BSDZ4HE0U9 Pin Kodu :63162 Belge Takip Adresi : <https://turkiye.gov.tr/ebd?eK=4049&eD=BSDZ4HE0U9&eS=472990>
Adres: Tıp Fakültesi Dekanlığı Zemin Kat Uncubozköy Kampüsü Manisa Bilgi için: Ahmet Öyken
Telefon: (0 236) 2360989 Faks: (0 236) 2382158 Unvanı: Bilgisayar İşletmeni
e-Posta: saglik.evrak@cbu.edu.tr Elektronik Ağ: saglikbe.cbu.edu.tr
Kep Adresi: celalbayeruniversitesi@hs01.kep.tr Telefon No: 2362011273



Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

T.C.
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

KARAR TARİH / NO	11/ 01 / 2022 / 77.637.435 / 217				
ARAŞTIRMANIN ADI	Punicic Asit Uygulamasının Sıçanlarda Akut Travmatik Beyin Hasarı Sonrasında Nöroprotektif Etkisinin Araştırılması				
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Doç.Dr.Erdoğan KOCAMAZ - Histoloji ve Embriyoloji AD.				
ARAŞTIRMA EKİBİ	Doç. Dr. Mesut METE,- Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU , - Ar. Gör. Şüheda ALPAY,- Öğr.Gör.Hasan Fehmi ÖZEL,- Prof.Dr.Beyhan GÜRCÜ,- Prof.Dr.Necip KUTLU,- Ar.Gör. Fatih ÇÖLLÜ,-Op.Dr. Ülkün Ünlü Ünsal,- Doç. Dr. Yusuf Kurtuluş				
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	UZMANLIK TEZİ ☐ YÜKSEK LİSANS-DOKTORA TEZİ ☒ AKADEMİK AMAÇLI ☐ Eğitim ☐				
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	16/ 12 / 2021 / Tarih ve 209112 sayılı; dilekçe				
KARAR BİLGİLERİ	Sorumlu araştırmacı değişikliği ile ilgili vermiş olduğunuz dilekçe incelenmiş, bilimsel ve etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.				
Unvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile ilişkili Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye	Unvanı /Adı /Soyadı	Araştırma ile ilişkili Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye
Prof. Dr. Ercüment ÖLMEZ	☐	☐	Prof. Dr. Gökhan TEMELTAŞ	☐	☐
Prof. Dr. İsmet TOPÇU Anestezi ve Reanimasyon AD	☐	☐	Prof. Dr. Özge YILMAZ Çocuk Hastalıkları AD.	☐	☒
Prof. Dr. Ertuğrul TATLISUMAK Anatomi AD	☐	☐	Dr. Öğr. Üyesi Fulya OCAK BÜYÜKAKINCI – Veteriner Hekim	☐	☒
Prof. Dr. Kıvanç GÜNHAN (DEHAM MD)	☐	☒	Salme ÖZKARA Sivil Toplum Üyesi	☐	☐
Levent ÖDEMiŞ Sivil Üye	☐	☐			
Etik Kurulumuzun kararı yukarıda belirtilmiştir. Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname kısmında be' olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve , rica ederim. Ercüment ÖLMEZ Başkan					

Tarih :15.02.2023

ÖZGEÇMİŞ

KİMLİK BİLGİLERİ

Adı Soyadı	MESUT METE
------------	------------

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Bölüm / Program	Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	TIP FAKÜLTESİ	ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ	2003
Yüksek Lisans	BEYİN ve SİNİR CERRAHİSİ	İZMİR EĞİTİM ARAŞTIRMA HASTANESİ	2010
Doktora	HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ	MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ	2023

İŞ TECRÜBESİ

İşyeri	Görev, Ünvan	Çalışma Tarihleri
İZMİR EĞİTİM ARAŞTIRMA HASTANESİ	Araş.Görevlisi (Doktor)	2004-2010
NEVŞEHİR DEVLET HASTANESİ	Uzman Doktor	2010-2012
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ	Öğr.Görevlisi	2012-2015
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ	Yard.Doç-Dr. Öğr.Üyesi	2015-2018
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ	Doç.Dr.	2018-

TEZ VE / VEYA VARSA YAYINLAR

Uzmanlık Tez: Deneysel Subaraknoid Kanamada Edaravone'un Serebral Vazospazm Üzerine Etkisinin Morfometrik Analizi. Tez Danışmanı: Prof.Dr. İsmail Oran. 2010/İZMİR

A-Uluslararası dergilerde yayınlanan makaleler

A1- Mete M, Unsal UU, Aydemir I, Sönmez PK, Tuglu MI. Punicic Acid Inhibits Glioblastoma Migration and Proliferation via the PI3K/AKT1/mTOR Signaling Pathway. Anticancer Agents Med Chem. 2019;19(9):1120-1131. (SCI-E)

A2- Mete M, Aydemir I, Unsal UU, Collu F, Vatandas G, Gurcu B, Duransoy YK, Taneli F, Tuglu MI, Selcuki M. Neuroprotective Effects of Oleocanthal, a Compound in Virgin Olive Oil, in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. Turk Neurosurg. 2018;28(6):858-865. (SCI-E)

A3- Mete M, Gurcu B, Collu F, Unsal UU, Duransoy YK, Tuglu MI, Selcuki M. Effects of

lacosamide "a novel antiepileptic drug" in the early stages of chicken embryo development. Childs Nerv Syst. 2016 Sep;32(9):1715-9. **(SCI-E)**

A4- Mete M, Umur AS, Duransoy YK, Barutcuoglu M, Umur N, Gurgun SG, Selçuki M. Congenital Dermal Sinus Tract of the Spine: Experience of 16 Patients. J Child Neurol. 2014; 29(10) 1277-1282. **(SCI)**

A5- Mete M, Aydemir I, Ünlü Ünsal Ü, Duransoy YK, Tuğlu İM, Selçuki M. Neuroprotective effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and conditioned medium in mechanically injured neuroblastoma cells. Turk J Med Sci. 2016 Dec 20;46(6):1900-1907. **(SCI-E)**

A6- Mete M, Aydemir I, Tuğlu Mİ, Selçuki M. Neurotoxic effects of local anesthetics on the mouse neuroblastoma NB2a cell line. Biotechnic & Histochemistry 2014. DOI: 10.3109/10520295.2014.979439. **(SCI-E)**

A7-Mete M, Özer FD, Duransoy YK, Kocaman Ü, Oran İ, Demirtaş E, Selçuki M. Ederavone Leads To Increased Internal Luminal Vascular Circumference Following Subarachnoid Hemorrhage in An Animal Model of Vasospasm. Journal of Neurological Sciences [Turkish] 2012; 29:(4) 33; 722-731. **(SCI-E)**

A8- Selçuki M, Mete M, Selçuki D. Are Herniated Cerebellar Tonsils the Main Culprit of Chiari Malformation Type I Symptoms? The Brainstem Compression Hypothesis seems to be Re-Elucidated and Revised. Turk Neurosurg. 2018;28(1):67-71. **(SCI-E)**

A9- Duransoy YK, Mete M, Zileli M, Selçuki M. A new guide tube for odontoid screw fixation for unstable odontoid fractures: report of 6 case series. Turk Neurosurg. 2013;23(5):639-644. **(SCI-E)**

A10- Selçuki M, Mete M, Barutçuoğlu M, Duransoy YK, Umur AŞ, Selçuki D. Tethered Cord Syndrome in Adults: Experience of 56 patients. Turkish Neurosurgery. 2015;25(6):922-9. **(SCI-E)**

A11- Barutcuoglu M, Selçuki M, Selçuki D, Umur S, Mete M, Gurgun SG, Umur N. Childs Nerv Syst. Cutting filum terminale is very important in split cord malformation cases to achieve total release. Childs Nerv Syst. 2015 Mar;31(3):425-32. **(SCI-E)**

A12- Barutçuoğlu M, Selçuki M, Umur AS, Mete M, Gurgun SG, Selçuki D. Scoliosis may be the first symptom of the tethered spinal cord. Indian J Orthop. 2016 Jan-Feb;50(1):80-6. **(SCI-E)**

A13- Duransoy YK, Şimşek T, Öztürk F, Mete M, Tuğlu Mİ, Selçuki M. The Effects of Fibroblast Growth Factor-2 Blocking on Development of Chick Cervical Vertebra and Relationship with Oxidative Stress and Apoptosis. Journal of Neurological Sciences [Turkish] 2014; 31:(1) 39; 188-196. **(SCI-E)**

A14- Kocaman Ü, Özer FD, Oran İ, Mete M, Atıcı İB, Turhan T, Demirtaş E. The Role of

- Thrombocyte Activation on Early Brain Injury in Experimental Subarachnoid Hemorrhage Model. Journal of Neurological Sciences [Turkish] 2012; 29:(4); 33; 714-721. **(SCI-E)**
- A15-**Atıcı İB, Özer FD, **Mete M**, Çamlar M, Kocaman Ü, Akçay E, Erşahin Y, Öner Ö, Küpelioglu A. Comparison of The Histopathologic Outcome of Three Different Allograft Used For The Repair of Spinal Dural Defect in Rats. Journal of Neurological Sciences [Turkish] 2013; 30:(2); 36; 347-355. **(SCI-E)**
- A16-** Ünsal ÜÜ, **Mete M**, Aydemir I, Duransoy YK, Umur AŞ, Tuglu MI. Inhibiting effect of oleocanthal on neuroblastoma cancer cell proliferation in culture. Biotech Histochem. 2020 Apr;95(3):233-241. **(SCI-E)**
- A17-** Tuglu MI, Aydemir I, Kılıçaslan PS, Buran T, **Mete M**. The Effects of Medicinal Plants on Cancer Cell Lines and Efficacy of Experimental Animal Model. International Journal of Secondary Metabolite, 49-59.
- A18-** Mete M, Duransoy YK, Çınar C, Ovalı G, Temiz P, Selçuki M. Giant occipital aneurysmal bone cyst caused to hydrocephalus in a child. Childs Nerv Syst. 2017 Nov;33(11):1871-1873. **(SCI-E)**
- A19-** **Mete M**, Unsal UU, Duransoy YK, Barutcuoglu M, Selçuki M. Report of an unusual upper cervical spine injury: traumatic atlantoaxial rotatory subluxation with vertical odontoid fracture in a child. Neurol India. 2013 Mar-Apr;61(2):197-199. **(SCI-E)**
- A20-** **Mete M**, Gürsoy G, Umur AŞ, Selçuki M. Split Cord Malformation type II associated with double lipoma at the same level: Report of a rare case. Journal of Neurological Sciences [Turkish] **31:(4)**;42; 827-829, 2014. **(SCI-E)**
- A21-**Ganiüşmen O, Özer FD, **Mete M**, Özdemir N, Bayol Ü. Slow progression and benign course of a primary malign melanoma of a lumbar nerve root. Clin Neurol Neurosurg. 2012 Feb;114(2):166-168. **(SCI)**
- A22-** Duransoy YK, **Mete M**, Akçay E, Selçuki M. Differences in individual susceptibility affect the development of trigeminal neuralgia. Neural Regen Res. 2013;8(14):1337-1342. **(SCI-E)**
- A23-** Yaldiz C, Duransoy YK, **Mete M**, Ünsal ÜÜ, Selçuki M. Extremely Rare Cause of Ventriculo-Peritoneal (V-P) Shunt Dysfunction: Spontaneous Peritoneal Catheter Knotting. Journal of Neurological Sciences [Turkish], 2014, 31:(2); 40; 413-417. **(SCI-E)**
- A24-** **Mete M**, Umur AS, Duransoy YK, Selçuki M. Primary Intraorbital Hydatid Cyst in a Child. Neurosurgery Quarterly. 2014; DOI: 10.1097/WNQ.0000000000000071.
- A25-** **Mete M**, Şimşek T, Umur AS, Selçuki M, Umur N, Gorgen SG. Unusual Presentation of Congenital Dermal Sinus: Tethered Cord With Paramedian Cutaneous Ostia. Neurosurgery Quarterly. 2013; DOI: 10.1097/WNQ.0000000000000033.
- A26-** Duransoy YK, **Mete M**, Zengel B, Selçukı M. Missing screw as a rare complication

of anterior cervical instrumentation. Case Rep Orthop. 2013;2013:593905. doi: 10.1155/2013/593905.

A27- Duransoy YK, **Mete M**, Selçuki M, İşısağ A. Isolated solitary intramedullary spinal cord metastasis presenting as the first manifestation of small-cell lung cancer: report of a rare case. Case Rep Neurol Med. 2012;2012:617280. doi: 10.1155/2012/617280.

A28- Duransoy YK, **Mete M**, Barutçuoğlu M, Unsal UÜ, Selçuki M. Intracranial hydatid cyst is a rare cause of midbrain herniation: A case report and literature review. J Pediatr Neurosci. 2013 Sep;8(3):224-227

A29- Yaldiz C, Duransoy YK, **Mete M**, Şimşek T, İşısağ A, Selçuki M. Dermoid Cyst Rupture Presenting as Subarachnoid Hemorrhage: Report of a Rare Case. Neurosurgery Quarterly. 2014; DOI: 10.1097/WNQ.0000000000000086.

A30- Barutçuoğlu M, Umur AS, Özdemir S, **Mete M**, Selçuki M. Double Split Cord Malformations in a Child: Types I and II at 2 Different Levels in the Same Route: Report of a Rare Case. Neurosurgery Quarterly. 2014; DOI: 10.1097/WNQ.0000000000000107.

A31- Duransoy YK, **Mete M**, Unlu UU, Barutcuoglu M, Selcuki M. Synchondrotic Fracture of Odontoid Treated by Cervical Collar after Complication of Anterior Screw Fixation: A Case Report and Review of Literature. World Spinal Column Journal 2013; 4: 25-31.

A32- **Mete M**, Selcuki M. Constipation as a Rare Cause of Ventriculoperitoneal Shunt Dysfunction: A Case Report J Pediatr Neurol 2020; 18(01): 049-052 (**ESCI**)

A33- **Mete M**, Alpay S, Aydemir I, Unsal UU, Collu F, Özel HF, Duransoy YK, Kutlu N, Tuglu Mİ. Therapeutic effects of Lacosamide in a rat model of traumatic brain injury: A histological, biochemical and electroencephalography monitoring study. Injury. 2021 Apr;52(4):713-723. (**SCI-E**)

A34- Ünsal ÜÜ, **Mete M**, Aydemir I, Duransoy YK, Umur AŞ, Tuglu MI. Inhibiting effect of oleocanthal on neuroblastoma cancer cell proliferation in culture. Biotech Histochem. 2020 Apr;95(3):233-241. (**SCI-E**)

A35- Duransoy YK, **Mete M**, Ünlü Ünsal Ü, Aydın M, Zileli M. Anterior odontoid screw fixation using Acutrak screw: Report of 19 patients. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg. 2021 Jul;27(4):472-477 (**SCI-E**)

B-Ulusal dergilerde yayınlanan makaleler

B1- **Mete M**, Vural K, Cezayirli E, Varol T, Tuglu Mİ. The role of nitric oxide in the regulation of pain after nociceptive stimuli in rat spinal cord. Cukurova Medical Journal, 43(3), Doi: DOI: 10.17826/cumj.349477 (**ESCI**)

B2- **Mete M**, Aydemir I, Ünsal ÜÜ, Özbilgin MK, Tuglu Mİ, Gürcü Beyhan (2017).

Effects of alcohol during secondary neurulation in chickembryos. İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hastanesi Dergisi, 7(3), 227-235. (ESCI)

B3-Mete M, Duransoy YK, Karabük Ö, Özer FD, Selçuki M. How necessary is computed tomography in pediatric minor head trauma? J. Exp. Clin. Med., 2011; 28:107-110.

B4- Mete M, Savran M, Duransoy YK, Selçuki M. Diffusion Weighted MRI May be a Life Saving Tool in Cerebral Fat Embolism: Report of a Case. Turk J Anesth Reanim 2012; 40(5): 294-296.

B5-Mete M, Savran M, Özer FD, Duransoy YK. Spontaneous resolution of a herniated fragment cervical disc. J. Exp. Clin. Med., 2011; 28:124-126.

B6-Mete M, Karabıyık Ö, Özçelik EU, Savran M, Özer FD. Fahr's disease; two case report. J. Exp. Clin. Med. 2013; 30: S87-S90.

B7- Mete M, Umur AŞ, Selçuki M (2016). Omurga ve Omuriliğın Embriyolojik Gelişimi. Türkiye Klinikleri Nöroşirürji Özel Dergisi, 6(2), 4-8.

B8- Selçuki M, Mete M (2016). Pediatrik Yaş Grubunda Vestibüler Schwannomalar. Türk Nöroşirürji Dergisi, 101-104.,

B9- Duransoy YK, **Mete M**, Selçuki M. Cerebral cystic echinococcosis in the light of our experience. Türkiye Parazitoloj Derg. 2013;37(4):277-281.

B10- Mete M, Ovalı G, İşisağ A. Small-Cell Glioblastoma in the Craniovertebral Junction Mimics Meningioma. Türkiye Klinikleri J Med Sci. 2018;38(4):378-81

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu

Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Başkanlığı'na

Tez Adı PUNİCİC ASİT UYGULAMASININ SIÇANLARDA AKUT TRAVMATİK BEYİN HASARI SONRASINDA NÖROPROTEKTİF ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Tezime ilişkin 05/01/2023 tarihinde yapılan Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezin benzerlik oranı % 22'dir.

Belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

05.01.2023
Tarih ve İmza

Adı Soyadı :MESUT METE
Öğrenci No : 131348008
Anabilim Dalı :HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ
Programı : HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR
(Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ)

Açıklamalar

- 1-Tez Çalışması Orijinallik Raporu (TCOR), TURNITIN İntihal Tespit Programı kullanımı için kişisel hesap alma hakkı bulunan tez danışmanları, Enstitülerde görevlendirilen personeller, Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı'nda görevlendirilen kütüphaneciler tarafından alınır.
- 2-Sayfa sayısı 400'den az olan tezler için tez savunmasından önce ve başarılı olması durumunda düzeltmelerden sonra olmak üzere 2 kez TCOR alınır.(400 sayfadan fazla olan tezler 400 ve katları şeklinde bölünerek Turnitin veri tabanına yüklenmesi gerekmektedir. Bu gibi durumlarda benzerlik oranının hesaplanmasına ilişkin detaylı forma, kütüphane web sayfasında bulunan Turnitin kullanım kılavuzlarının altından erişilebilir.)
- 3-TCOR, tezin yalnızca Kapak Sayfası, Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan kısmının tek bir dosya olarak intihal tespit programına yüklenmesi ile alınır.
- Programa yüklemeye yapılırken Dosya Başlığı (document title) olarak tez başlığının tamamı, Yazar Adı (author's first name) olarak öğrencinin adı, Yazar Soyadı (author's last name) olarak öğrencinin soyadı bilgisi yazılır.
- 4- TURNITIN İntihal tespit programına yüklenen dosyanın sürecekleştirilmesinde, ilgili programdaki filtreleme seçenekleri aşağıdaki şekilde ayarlanır: - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 5 words)
- 5-İsteğe bağlı ayarlar kısmından; "Ödevleri suraya gönder?" seçeneği mutlaka DEPD YOK şeklinde işaretlenmesi gerekmektedir; aksi durumda aynı tezin ikinci kez yüklenmesi durumunda benzerlik %100 çıkacaktır ve depodan tezi silmek çok uzun süre gerektirecektir.
- 6- Raporlama işlemi tamamlandıktan sonra, kaydedilmiş olan ekranın görüntüsünü sağ üst köşesinde yüzdelik sayı olarak belirtilen "benzerlik oranı", raporlamaya tabi tutulmuş olan dosyanın "toplam sayfa sayısı" ve raporlama işleminin yapıldığı "tarih" bilgisi, "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu" formuna işlenir.
- 7- Benzerlik oranında tüm sorumluluk öğrenciye aittir.
- 8-Tez savunma sınavı sonrasında başarılı bulunan öğrenci, tez savunma sınavı tarihi sonrasında tezde yapılmış muhtemel değişiklikleri içeren dosya kullanılarak alınmış ikinci bir intihal raporundaki bilgiler kullanılarak hazırlanmış ve tez danışmanı tarafından onaylanarak imzalanmış ikinci bir "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu"nu Enstitüye teslim etmekle yükümlüdür.
- 9-Turnitin Hakkında Bilgiler: <http://kutuphane.cbu.edu.tr/turnitin.9370.tr.html>