



**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRURJİ ANABİLİM DALI**

**NANOPARÇAYA YÜKLENMİŞ
FARNESİLTİOSALİSİLİK ASİT'İN KAFA TRAVMASI
MODELİNDE NÖROPROTEKTİF VE ANTIÖDEM
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Dr. Hakan TETİK

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

ANKARA

2017

TEŞEKKÜR

Nöroşirürji eğitimim boyunca benden tecrübelerini, bilgi birikimini ve cerrahi becerilerini esirgemeyen, bu tezin planlanmasında, uygulanmasında ve sonuçlandırılmasında büyük emeği geçen değerli hocam Prof. Dr. Melike Mut Aşkun'a saygı, sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca bilimsel, mesleki ve sosyal deneyimlerini benimle paylaşan, mükemmel bir çalışma ortamı sağlayan, cerrahi prensip ve mesleki özgüvenimin oluşmasında büyük emeği olan, yanında çalışmaktan onur duyduğum Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Servet İnci ve değerli öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Mustafa Berker, Sayın Prof. Dr. Atilla Akbay, Sayın Doç. Dr. Halil Kamil Öge, Sayın Doç. Dr. Burçak Bilginer, Yard. Doç. Dr. Ahmet İlkyay Işıkay'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, eğitimim boyunca beraber çalıştığım bütün araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışmanın hayata geçirilmesi için gerekli altyapı ve teknik desteği sağlayan Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü öğretim üyelerine, bu çalışmanın uygulanması esnasında benden desteklerini esirgemeyen Nöroşirürji Araştırma Görevlileri Dr. Saeid Marjani, Dr. Görkem Yavaş, Dr. Eray Tekirdaş, Dr. Dicle Karakaya ve teknisyen Mesut Fırat'a, Radyolojik görüntülemelerin elde edilmesi ve değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Radyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Kader Karlı Oğuz'a, Nanoparçaların sentezlenmesi ve FTS yüklemesinde birinci dereceden rol alan ve uygulanmasında yardımları olan Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Sibel Pehlivan teşekkür ederim.

Son olarak ve en önemlisi tüm uzmanlık hayatım boyunca her koşulda yanımda olan, hiçbir desteğini esirgemeyen, yaşadığım tüm zorluklara beraber göğüs gerdiğimiz, hayatımın her anına değer katan, çoğu zaman mesleğim gereği ihmal etmek zorunda kaldığım çok sevgili eşim Selcan Tetik ve biricik oğlumuz Uygur Tetik'e, hayatımın ilk öğretmenleri ve yol göstericileri olan, tüm hayatım boyunca hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, hayattaki en büyük servetin bilim ve eğitim olduğuna inanan değerli babam Ali Tetik ve annem Fatma Tetik'e, uzun eğitim hayatım boyunca

yanlarında olamadığım, dertlerime ve mutluluklarıma ortak olan, ağabeyleri olmaktan gurur duyduğum kardeşlerim Zeynep ve Osman Tetik'e destekleri için sonsuz teşekkürler ediyorum.

Bu tezimi biricik oğlum Uygur Tetik'e ithaf ediyorum.

ÖZET

Tetik H. Nanoparçaya yüklenmiş farnesiltiosalisilik asit'in kafa travması modelinde nöroprotektif ve antiödem etkilerinin incelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroşirürji Anabilim Dalı, Ankara 2017

Giriş ve amaç: Travmatik beyin hasarı genç popülasyonda en sık görülen ölüm ve ciddi morbidite sebebidir. Travma sonrası alınan darbe ile birincil hasar oluşur ve akut dönemde mekanik doku deformasyonu, nekrotik hücre ölümü, vasküler yaralanma, aksonal yaralanma meydana gelir. Birincil hasarın devamı süreçte ikincil hasara neden olacak bir dizi olayı tetkikler. İkincil yaralanma ile reaktif oksijen türevlerinin artması, nörotoksik glutamat gibi transmitterlerin RAS/RAF/ERK/MAPK gibi hücre içi ve hücre dışı mekanizmaların aktivasyonuna bağlı apoptoz, nekroz ve inflamasyon meydana gelmektedir. Bu nedenle günler ve haftalar içerisinde fonksiyonel ve nörokognitif kayıplar oluşmaktadır. İkincil hasarın önlenmesine yönelik daha önce literatürde mevcut olan FTS ile yapılan çalışmalarda FTS'nin nöroproteksiyon üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı deneysel fare travmatik beyin hasarı modelinde bir RAS/MAPK yolu inhibitörü olan Farnesiltiosalisilikasit'in (FTS) birinci saate uygulanması ve ikincil olarak gelişen nörokognitif bozukluk, kontüzyo, beyin ödemi üzerine etkilerinin incelenmesi

Gereç ve Yöntem: Çalışmada toplam 25 adet erkek Swiss albino fare kullanılmış ve ağırlık düşürme modeli ile izofloran anestezisi altında kapalı kafa travması oluşturulmuştur. Travma şiddeti olarak orta şiddette kafa travması seçilmiştir (67 gr, 7.5 cm). Toplam 25 adet fare 5 gruba ayrılmıştır. Gruplardan biri cerrahi sham grubudur. Diğer 4 grup ise travma grubu olarak ayrılmıştır. Kontrol grubuna sadece travma uygulanmıştır. Gruplardan birine travma sonrası FTS, birine HNP'ye yüklenmiş FTS ve sonuncusunda sadece HNP verilmiştir. Sham ve kontrol grubu hariç diğer gruplara belirtilen kimyasallar travmadan bir saat sonra verilmiştir. Tüm grupların 24. Saatte ve 5. Gün sonunda nörolojik değerlendirmeleri mNSS ile yapılmıştır. 5. Gün nörolojik değerlendirme sonrasında Tüm gruplara kranial MRG çekilmiştir. Daha sonra sakrifiye edilerek tüm beyinler TTS ile boyanarak enfarkt alanları incelenmiştir.

Bulgular: 1. Gün ve 5. gün yapılan nörolojik muayeneler sonucunda Δ mNSS skoları karşılaştırıldığında kontrol grubunda Δ mNSS skoru ortalama $1.2 \pm 0,44$, sadece FTS verilen grupta 2,8, FTS + HNP verilen grupta $4,2 \pm 0,44$ ve sadece HNP (taşıyıcı) verilen grupta ise ortalama $0,6 \pm 0,54$ olarak hesaplanmıştır. FTS + HNP verilen gruptaki nörolojik düzelme kontrol grubu ile muakeyese edildiğinde istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,008$). Tek başına FTS verilen grupta ise kontrol grubuna göre nörolojik düzelme istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p=0,056$). HNP + FTS verilen grupta ise nörolojik düzelme sadece FTS verilen gruba göre anlamlı bulunmamıştır ($p=0,095$). MRG'deki kontüzyo volümleri incelendiğinde kontrol grubuna göre FTS+HNP verilen grupta kontüzyo volümünün %70 daha küçük olduğu görülmüştür ve istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,008$), sadece FTS verilen grupta ise kontrol grubuna göre kontüzyo volümü %53 daha küçük bulunmuştur ve istatistiksel olarak anlamlıdır. FTS+HNP grubu ile sadece FTS verilen gruplar karşılaştırıldığında ise FTS'nin nanoparçaya yüklenerek verilmesinin sadece FTS verilmesine göre istatistiksel olarak üstün olmadığı görülmüştür ($p=0,151$). Son olarak sakrifiye edilen hayvanların beyinleri slicing işlemi sonrası TTS ile muamele edilerek incelenmiş olup FTS+HNP verilen grupta kontrol grubuna göre %60 daha küçük enfarkt alanı izlenmiş olup istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,008$), sadece FTS verilen grupta kontrol grubuna göre enfarkt volümü %45 daha küçüktür ve anlamlıdır ($p=0,008$). FTS'nin HNP'ye yüklenerek verilmesinin tek başına FTS verilmesine göre enfarkt alanını küçülttüğü fakat bu küçülmenin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p=0,095$).

Sonuç: Orta şiddette kafa travmasında FTS'nin nanoparçaya yüklenerek verilmesinin nörolojik düzelme, MRG'de radyolojik olarak kontüzyo volümlerinde küçülmeye ve kontüzyoya bağlı enfarkt alanlarının belirgin olarak küçülmesini sağlamıştır. Bu nedenle FTS'nin nanoparçaya yüklenerek verilmesinin kafa travması sonrası ortaya çıkan sekonder hasarının etkin olarak tedavisinde kullanılabilecek yeni bir tedavi yöntemi olarak umut vaat etmektedir.

Anahtar Kelimeler: travmatik beyin hasarı, orta şiddette kafa travması, farnesiltiosalisilik asit, FTS, nanoparça

ABSTRACT

Investigation of neuroprotective and antiedema effects of Farnesylthiosalicylic acid loaded nanoparticle on experimental traumatic brain injury model, Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Neurosurgery, Ankara, 2017.

Introduction & Objectives:

Traumatic brain injury is the most frequently seen cause of death and severe morbidity among young population. Primary injury occurs as a result of post traumatic injury and in acute phase, mechanical tissue disruption, necrotic cell death, vascular injury, and axonal injury take place. The continuation of the primary injury within this period triggers a series of events which cause secondary injury. Accompanying the secondary injury, an increase in the derivatives of oxygen, apoptosis which is caused by the activation of transmitters like neurotoxic glutamate and intra- and extracellular mechanisms such as RAS/RAF/ERK/MAPK, necrosis and inflammation occur. For this reason, within days or weeks, functional and neurocognitive deficits happen. Previous studies in the literature that were carried out with the use of FTS for the prevention of secondary injury showed that FTS has positive effects on neuroprotection. The aim of this study is to apply Farnesylthiosalicylic acid (FTS), a RAS/MAPK inhibitor in experimental mice brain injury model, and investigate its effects on secondarily emergent neurocognitive disorder, contusion and cerebral edema.

Materials & Methods:

In this study, a total number of 25 male Swiss albino mice were used and with weight-drop model and under isoflurane anesthesia a close head injury was generated. As for the trauma volume, a moderate volume trauma was opted (67 gr, 7.5 cm). Those 25 mice in total were divided into 5 groups. One of the groups was sham surgery group. The other groups were designated as trauma groups. The control group was induced trauma only. One of the groups was given FTS after trauma, the other group FTS loaded on HNP and the last group solely HNP. Chemicals that mentioned before were given to the groups excluding the sham and control groups an hour after the trauma.

The neurological assessments of all the groups at the end of the 24th hour and the 5th day were made by mNSS. After the neurological evaluation on the 5th day, all the groups had cranial MRI scan. Later, all the brains having sacrificed were painted with TTS and the infarct areas were examined.

Findings:

When Δ mNSS scores were compared at the end of the medical examinations performed on the 1st and 5th day, Δ mNSS scores were calculated as $1.2 \pm 0,44$ on the average for the control group, 2,8 for FTS applied group, $4,2 \pm 0,44$ for FTS+HNP applied group, and $0,6 \pm 0,54$ for the HNP group (vehicle). Compared to the control group, the neurological improvement in the FTS+HNP applied group had statistical significance ($p=0,008$). The neurological improvement in the FTS applied group did not have statistical significance compared to the control group ($p=0,056$). In comparison with the FTS applied group, the neurological improvement wasn't found to be statistically significant, either ($p=0,095$). When the contusion volumes in MRI were examined, it was seen that the contusion volume in the FTS+HNP applied group was %70 smaller compared to the control group and statistically significant ($p=0,008$), and the contusion volume in the FTS applied group was found to be %53 smaller compared to the control group and have statistical significance. As a result of the comparison between the FTS+HNP group and FTS applied group, it was seen that the application of FTS loaded on nanoparticle didn't have a statistical superiority to the stand alone use of FTS ($p=0,151$). Finally, the brains of the sacrificed animals treated with TTS after slicing process were inspected and compared to the control group, a %60 smaller infarct area was observed in the FTS+HNP applied group, which had statistical significance ($p=0,008$), and in comparison with the control group, the infarct volume in the FTS applied group was %45 smaller and statistically significant ($0,008$). The application of FTS loaded on HNP was seen to have reduced the infarct volume in comparison to the mere application of FTS but the reduction didn't have statistical significance ($p=0,095$).

Conclusion:

For moderate traumatic brain injury, the use of FTS loaded on nanoparticle resulted in neurological improvement, radiological reduction of contusion volumes in MRG and shrinking of infarct areas ensued from contusion. Administration of FTS loaded nanoparticle after traumatic brain injury is a novel approach to effectively reduce secondary brain injury.

Key Words: traumatic brain injury, moderate traumatic brain injury, Farnesylthiosalicylic acid, FTS, nanoparticle

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Travmatik Beyin Hasarı: Epidemiyoloji</i>	3
2.2. <i>Travmatik beyin hasarının türleri ve sınıflamalar</i>	5
2.3. <i>Travmatik beyin hasarı: klinik bulgular, tanı, tedavi ve prognoz</i>	7
2.3.1. Fokal beyin hasarı	7
2.3.1.1. Kontüzyon.....	8
2.3.1.2. Travmatik İntrakraniyal Hematomlar	8
2.3.1.2.1. Epidural hematom	8
2.3.1.2.1. Subdural Hematom.....	9
2.3.1.2.3. İntraserebral hematom:.....	10
2.3.2. Diffüz Beyin Hasarı	11
2.3.2.1. Konküzyon	11
2.3.2.2. Diffüz aksonal hasar.....	11
2.4. <i>Travmatik beyin hasarının mekanizması</i>	12
2.4.1. Primer hasar	13
2.4.2. Sekonder hasar.....	16
2.5. <i>Travmatik beyin hasarının spesifik patofizyolojisi</i>	18
2.5.1. Serebral kan akımı, hipoperfüzyon, hiperperfüzyon	18
2.5.1.1. Hipoperfüzyon fazı (faz 1, gün 0).....	18
2.5.1.2. Hiperperfüzyon fazı (faz 2, gün 1-3)	19
2.5.1.3. Vazospazm fazı (faz 3, gün 4-15)	19
2.5.2 Serebrovasküler otonöregülasyon ve CO ₂ reaktivitesi	20
2.5.3. Serebral vazospazm.....	20
2.5.4 Serebral metabolik fonksiyon bozukluğu	21
2.5.5. Serebral oksijenasyon.....	23
2.5.6. Eksisotoksikite ve oksidatif stres	23

2.5.7. Ödem	24
2.5.8 Enflamasyon	24
2.5.9. Nekroz ve apoptoz.....	25
2.5.10. Post-travmatik intrakraniyal basınç (IKB)	25
2.6. Santral sinir sistemi travmalarında protein kinaz sinyal yolları.....	28
2.6.1 Travma ile aktifleşen protein kinazlar	28
2.6.1.1. Mitogen activated protein kinase (MAPK)	29
2.6.1.2. Protein Kinaz B (PKB, Akt).....	32
2.6.1.3. Glikojen sentaz kinaz-3 (GSK-3)	33
2.6.2. Santral sinir sistemi travması sonrası in-vitro olarak yapılan protein kinaz çalışmaları	34
2.6.3. Travma ile artan ATP salınımı ile meydana gelen protein kinaz aktivasyonu	34
2.6.4. Gelecek tedavi yaklaşımları	35
2.7. RAS inhibitörü farnesiltyosalisilik asit (FTS).....	36
2.7.1. Genel bilgiler	36
2.7.2. TBH ve FTS	39
2.7.3. Hibrit nanopartikül (HNP).....	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
3.1. Deney hayvanları ve barınma koşulları	41
3.2. Deney grupları ve protokol.....	41
3.3. Anestezi ve yaşamsal bulguların takibi:	44
3.4. Kafa travmasının oluşturulması	44
3.5. Hibrit Nanopartiküllerin (HNP) Hazırlanması	45
3.6. Nörolojik değerlendirme.....	46
3.7. Radyolojik değerlendirme	48
3.7 Tetrazolium (TTS) ile değerlendirme	49
3.8. Sakrifikasyon ve beyinlerin çıkarılması, kesitlerin alınması	50
3.9. İstatistik Değerlendirme	50
4. Bulgular	51
4.1. Kafa travmasının şiddeti.....	51
4.2. Nörolojik muayene sonuçları (mNSS)	51

4.3. Radyolojik bulgular.....	54
4.4. Tetrazolium (TTS) ile değerlendirme	56
5. TARTIŞMA.....	58
6. SONUÇ	63
7. KAYNAKLAR.....	64

SİMGELER VE KISALTMALAR

μ	: mikro
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AJDO ₂	: Arteriel-Juguler oksijen farkı
AMPA	: α -amino-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionat
ATP	: Adenozin trifosfat
AVFO ₂	: Arteriovenöz oksijen farkı
BOS	: Beyin omirilik sıvısı
BT	: Bilgisayarlı tomografi
CDC	: “ <i>Centers for Disease Control</i> ”
Ca ²⁺	: Kalsiyum
DAH	: Diffüz aksonal hasar
DB	: Diastolik basınç
DNA	: Deoksiribonükleik asit
g	: Gram
EDH	: Epidural hematoma
ERK	: “ <i>Extracellular signal regulated kinase</i> ”
FTS	: Farnesiltiosalisilik asit
GMP	: Guanozin monofosfat
GDP	: Guanozin di-fosfat
GTP	: Guanozin tri-fosfat

GKS	: Glaskow Koma Skoru
HNP	: Hibrit nanoparça
ICD	: “ <i>International Classification of Disease</i> ”
IKB	: İntrakranial basınç
IMPACT	: “ <i>International Mission for Prognosis and Clinical Trial</i> ”
K ⁺	: Potasyum
KİB	: Kafa içi basıncı
MAPK	: “ <i>Mitogen activated protein kinase</i> ”
mmHg	: Milimetre civa
ml	: mililitre
mm	: milimetre
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
Na ⁺	: Sodyum
NB	: Nabız basıncı
NMDA	: N-metil D-aspartat
NP	: Nanoparça
O ₂	: Oksijen
OAB	: Ortalama arter basıncı
SAK	: Subaraknoid kanama
SaO ₂	: Oksijen saturasyonu
SB	: Sistolik basınç
SDH	: Subdural hematom

SjO ₂	: Juguler venöz bulbus oksijen saturasyonu
SKA	: Serebral kan akımı
SBP	: Serebral perfüzyon basıncı
TBH	: Travmatik beyin hasarı
TTS	: “ <i>Triphenyl tetrazolium chloride</i> ”

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.4.1 Travmatik beyin hasarı primer hasar;	15
Şekil 2.5.10 : İntrakraniyal basınç ve volüm ilişkisi	27
Şekil 2.6.1 Travmaya biyokimyasal yanıt	29
Şekil 2.7.1.1. FTS moleküler yapısı	36
Şekil 2.7.1.2. Travmaya RAS protein yanıtı ve FTS	37
Şekil 2.7.1.3 G-protein reseptör aracılı MAPK/ERK kaskadı	38
Şekil 3.2.1. Ağırlık düşürülen nokta	43
Şekil 3.3.1. Kranyumun ortaya konulması	44
Şekil 3.4.1. Ağırlık düşürme düzeneği	45
Şekil 3.8.1. Sakrifikasyon ve slicing	50
Şekil 4.1.1 Travma sonrası oluşan patolojiler	51
Şekil 4.2.1 mNSS skorlarının gruplara göre dağılımı	52
Şekil 4.3.1 Kontüzyonun MRG'de gösterilmesi	54
Şekil 4.3.2 Kontüzyo volümlerinin gruplara göre dağılımı	55
Şekil 4.4.1. TTS ile boyanmış preparat	56
Şekil 4.4.2. : TTS enfark alanlarının gruplara göre dağılımı	57

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.2.1. Glasgow Koma Skalası	5
Tablo 2.2.2. Fokal ve diffüz yaralanmalar	6
Tablo 2.2.3. Travmatik Beyin Hasarı Sınıflaması	6
Tablo 2.2.4. <i>Rotterdam Skoru</i>	7
Tablo 2.3.1. Subdural Hematom Sınıflaması	10
Tablo 2.3.2. Diffüz Aksonal Hasar Nöropatolojik sınıflaması	12
Tablo 2.4.2. Sekonder beyin hasarından sorumlu olaylar	17
Tablo 3.6.1. Modified neurologic severity score (mNSS)	47

1. GİRİŞ

Travmatik beyin hasarı (TBH) herhangi bir travma sonrasında beynin kafatası içerisinde hareketi, penetran yaralanma, çökme fraktürleri, akselerasyon, deselerasyon travmaları, rotasyonel travmalar gibi farklı mekanizmalarla ortaya çıkan hasardır. Bu yaralanma kafatasına alınan direk travma ile ortaya çıkabileceği gibi travma olmadan da kafatasının ileri ve geri ivmelenmesi ile de ortaya çıkabilir. Amerika Birleşik Devletleri'nin verilerine göre yaklaşık olarak her 15 saniyede 1 travmatik beyin hasarı ortaya çıkmaktadır. Bu yaralanmalar sonrasında 50.000 ölüm, 80.000 kalıcı sakatlık ortaya çıkmakta ve yıllık 77 milyar \$ harcamaya sebep olmaktadır [1]. TBH sıklığı göğüs kanseri, AIDS, Parkinson, Multiple Sclerosis gibi kompleks hastalıkların sıklığından fazladır. TBH, tüm dünyada sakatlığa bağlı fonksiyonel kayıpların birinci nedenidir. [2]

Yaş ve travmanın ciddiyeti vakaların sonuçlarını etkilemektedir. Orta ve ağır şiddette kafa tıvmasının en büyük sebepleri düşmeler (%35) ve motorlu taşıt yaralanmalarıdır (%17) [1]. Aktif askeri personelde ise en sık TBH sebebi patlamaya bağlı yaralanmalardır [3]

Kafa travması sonucu ortaya çıkan beyin hasarında iki farklı mekanizma rol oynar. Bunlardan birincisi kaza esnasında ortaya çıkan primer hasardır. İkincisi ise kazadan sonra dakikalar içerisinde başlayan ve günlerce devam eden sekonder yaralanmadır. Sekonder yaralanma hipoksi, hiperkapni, hipotansiyon, hiperglisemi, kafa içi basıncının artması ve nöbet gibi faktörlerin zaman içinde oluşturduğu hasardır. TBH'a yönelik tedavi sekonder yaralanmaya bağlı ortaya çıkan mekanizmaların engellenmesine yöneliktir ve sekonder yaralanmanın engellenmesi morbidite ve mortaliteyi önemli ölçüde azaltmaktadır [4]

Primer hasarı takiben hücrelerde sekonder hasarın oluşumuna neden olan biyokimyasal yollar aktifleşmektedir [5]. Deneysel hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalar bu hasarların oluşum mekanizmalarını anlamamızda bize yardımcı olmaktadır[6]. Travmadan dakikalar sonra ortaya çıkan aşırı glutamat salınımı farklı glutamat bağımlı reseptörlerin aktifleşmesine ve buna bağlı hasarların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır[7]. Nöroinflamasyon (Sitokin üretilmesi, reaktif

astrositler, mikroglia aktivasyonu ve makrofaj infiltrasyonu) travmatik beyin hasarı sonrası erken dönemde ortaya çıkan bir yanıttır. [8-10]. Nöroinflasyonun engellenmesi TBH sonrası morbidite ve mortalitenin engellenmesinde en önemli tedavi hedeflerinden biridir. NMDA antagonistleri ve antienflamatuar ajanlar hayvan modellerinde travmatik beyin hasarı sonrası nöroinflamasyonun azaltılmasında kullanılmıştır.

Travma sonrası sekonder hasar mekanizmalarının oluşumuna katkıda bulunan ve hücre içi GTP bağımlı bir protein olan RAS, nöroinflamasyonun oluşumundaki kilit basamaklardan biridir. RAS proteini birçok hücre içi büyüme, farklılaşma, yaşam, ölüm, adezyon ve migrasyon gibi mekanizmaların aktifleştirilmesinde rol almaktadır. Travma sonrası bir glutamat reseptörü olan nMDA ile aktifleşen RAS proteini ile hücre ölüm ve yaşam döngüsüne ait mekanizmalar aktifleşmektedir. Klasik RAS sinyal yolağı ile Raf/MEK/ ERK (*extracellular signal regulated kinase*) ve MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) yolakları aktifleştirilmektedir [11]. Bu nedenle RAS tedavide potansiyel hedeflerden biridir.

Literatürde daha önce hayvan deneyleri ile yapılan çalışmalarda bir RAS inhibitörü olan S-trans, trans-farnesylthiosalicylic acid (FTS) ile nöroprotektif etkiler izlenmiştir [12, 13]. Yakın kafa travması hayvan modellerinde FTS ile yapılan çalışmalarda %60 oranında [13] kontrol grubuna kıyasla nörolojik düzelme izlenmiştir.

Bu çalışmada; daha önce kafa travması modellerinde nörolojik düzelmede faydası gösterilmiş bir RAS inhibitörü olan FTS'yi nanopartiküle yükleyerek yine kafa travması hayvan modelinde beyin parankiminde daha yüksek konsantrasyonlara ulaştırılarak FTS ile nörolojik kazanımın artırılması, radyolojik görüntüleme ile antiödem etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Travmatik Beyin Hasarı: Epidemiyoloji

Travmatik beyin hasarı (TBH), doğrudan etki, ani hızlanma veya yavaşlama, delici travma (ateşli silah yaralanması) veya patlama (blast wave) gibi dış kuvvetler sonucunda beyin işlevlerinde bozulma veya beyinde radyolojik olarak travmaya ait bulguların gösterilmesi olarak tanımlanır [14, 15]. Beyin travması olmaksızın yüz ve skalpi ilgilendiren travmaları da kapsadığından -önceleri yaygın olarak kullanılan - *kafa travması* teriminden uzaklaşmıştır. Literatürdeki epidemiyolojik çalışmalara bakıldığında dahil edilme kriterleri açısından travma sonrası amnezi, konfüzyon ve bilgisayarlı tomografide (BT) beyin hasarı bulgularının varlığı veya Glasgow Koma Skorunun (GKS) 8 veya daha düşük olması gibi farklı kriterler kullandığı görülmektedir. Doğru tanımlama ve standardizasyonun sağlanması epidemiyolojik çalışmaların güvenilirliği açısından önem arz etmektedir.

2009 yılı *Centers for Disease Control* (CDC) verilerine göre Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) TBH insidans 686/100.000/yıl, ölüm insidans 16,6/100.000/yıl'dır[1]. Avrupa'da ise 2015 yılı TBH insidansının 262/100.000/yıl, ölüm hızının ise 10,5/100.000/yıl olduğu bildirilmiştir [16] . Ülkeler arasında TBH insidansı açısından ciddi farklılıklar olmakla birlikte oranlar 50 ila 686/100.000/yıl arasında değişmektedir [17]. Bu farklılıklar kullanılan tanımların ve kriterlerin değişkenliğinden ve motorlu taşıt sayısında ve ülkeleler arası farklılıklardan kaynaklanmaktadır.

Hastalarda TBH'nin etkileri hastalar tarafından önemsenmeyecek kadar hafif olabileceği için TBH'ye sessiz epidemi de denmektedir. "Sessiz" terimi aynı zamanda toplumun da TBH'nin gerçek insidansının ve topluma etkilerinin farkında olmadığını da belirtmektedir [17]. 2020 yılı itibarıyla TBH'nin dünya çapında pek çok majör ölüm ve sakatlık nedenini geçeceği öngörülmektedir [18]. TBH'nin global mortalitenin %9'undan sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. TBH, yaralanmaya bağlı ölümlerin ve majör kalıcı sakatlıkların yaklaşık üçte birinden sorumlu tutulmaktadır. Düşük ve orta gelirli ülkelerde de motorlu taşıtların yaygınlaşması neticesinde TBH insidansının belirgin bir şekilde arttığı görülmektedir [19].

Yaş ortalaması çeşitli çalışmalarda 22-49 yaş aralığında bildirilmiştir [20], [21]. TBH en sık okul öncesi (1-4 yaş) ve genç erişkin dönemde (15-24 yaş) görülmekte, 65 yaş üstü dönemde ikinci bir pik yapmaktadır [21], [22], [23].

TBH, genç erişkin erkeklerde daha sık görülmektedir. Literatüre bakıldığında erkek-kadın oranını kabaca 3:1 (aralık: 1,2:1,0 – 4,6:1,0) olarak bildirilmiştir [24-26]. *International Mission for Prognosis and Clinical Trial (IMPACT)* çalışmasında erkek hakimiyetinin ileri yaşlarda (>65 yaş) ve çocukluk çağında gerilediği ve cinsiyetler arası farklılığın kaybolduğu bildirilmiştir [25].

ABD’de yapılan bir çalışmada TBH nedeniyle acil servise başvuru veya hastaneye yatış riski en yüksek olan gruplar <4 yaş çocuklar, 15-19 yaş adolesanlar ve >75 yaş erişkinler olarak belirlenmiştir. Tüm yaş grupları arasında >75 yaş erişkinlerin hastaneye yatış ve ölüm oranlarının en yüksek olduğu bulunmuştur [1]. TBH olgularının %78’i sadece acil servislerde, %19’u hastanede yatırılarak tedavi edilmekte, %3’ü ise fatal seyretmektedir .

Nörotravmanın esas nedenleri taşıt kazaları, düşmeler ve ateşli silah yaralanmalarıdır. Bu yaralanmalar kaza, şiddete maruziyet veya dikkatsizlik gibi toplumsal davranışı yansıtan durumlardır. Düşmeler, özellikle de çocuk ve yaşlılarda TBH’nin en sık nedeni iken genç erişkinlerde en sık TBH nedeni motorlu taşıt kazalarıdır [16, 27]. Hyder ve arkadaşları TBH’lerin %60’ının trafik kazalarına, %20-30’unun düşmelere, %10’unun şiddet maruziyetine ve kalan %10’unun ise iş kazaları ve spor yaralanmalarına bağlı olduğunu tespit etmiştir [28]. IMPACT çalışmasında da benzer bir dağılım tespit edilmiştir; trafik kazaları %53-80, düşmeler %12-30, şiddete maruziyet %1,5-10, kalan %10 ise iş kazaları (%0,5-8), spor kazaları (%0,2-4,5) ve diğer yaralanmalar (%1,5-16) olarak bildirilmiştir. Şiddet maruziyetine ikincil TBH sıklığının son 20 - 25 yılda artarak %7-10 düzeylerine ulaştığı dikkat çekmektedir [29]. Orta ve ağır şiddetteki TBH olguları uzun dönem nörolojik ve fonksiyonel sorunlarla karşılaşmaktadırlar. ABD’de TBH ilişkili uzun dönem sakatlık prevalansının 3,2 – 5,3 milyon kişi veya nüfusun %1-2’si olduğu tahmin edilmektedir [30, 31].

2.2. Travmatik beyin hasarının türleri ve sınıflamalar

Travmatik beyin hasarında sınıflama travmaya neden olan sebeplerden ziyade hastanın nörolojik durumuna ve yaralanmanın anatomik dağılımına göre sınıflandırılır.

Tablo 2.2.1. Glasgow Koma Skalası

Test		Paun
Göz açma (G)	Spontan	4
	Sesli uyarıyla	3
	Ağrıyla	2
	Yanıt yok	1
Motor yanıt (M)	Emirlere uyar	6
	Ağrılı uyararı lokalize eder	5
	Ağrılı uyarana fleksör yanıt	4
	Dekortiko postür (fleksör)	3
	Deserebre postür (ekstansör)	2
	Yanıt yok	1
Verbal yanıt (V)*	Oryente	5
	Konfüze /Dezoryente	4
	Uygunsuz kelime	3
	Anlamsız ses	2
	Yanıt yok	1
En yüksek skor	G+M+V	15

*Entübe hastalar verbal yanıtta "T" alırlar ve en yüksek 11T, en düşük 3T alırlar

Günümüzde hala Glasgow koma skoru (GKS) [32] (Tablo 2.2.1) travmatik yaralanma sonrası klinik durum ve bilinç düzeyinin değerlendirilmesi için en sık kullanılan skaladır.

Tablo 2.2.2. Fokal ve diffüz yaralanmalar

FOKAL YARALANMALAR	DİFFÜZ YARALANMALAR
Kontüzyonlar	Konküzyon
Kırık	Diffüz aksonal hasar (orta/ağır)
<i>Coup</i>	
<i>Contrecoup</i>	
<i>Intermediate</i>	
<i>Gliding</i>	
Herniasyon	
Hematomlar	
-Epidural	
-Subdural	
-İntraserebral	

Tablo 2.2.3. Travmatik Beyin Hasarı Sınıflaması

Klinik Sınıflama	
Klinik Ağırılık	Yapısal Hasar (Marshall BT skorlaması)
GKS 3-8: ağır	<i>Diffüz hasarlanma I:</i> BT'de görünür patoloji yok
GKS 9-13: orta	<i>Diffüz hasarlanma II:</i> Sistemler açık, 5 mm'den daha az orta hat şifti var. Yüksek dansiteli veya heterojen dansiteli lezyon yok
GKS 14-15: hafif	<i>Diffüz hasarlanma III:</i> (şişme) Sistemler kısmen kapanmış, 5 mm'den daha az orta hat şifti var, mikst veya yüksek dansiteli lezyon yok.
	<i>Diffüz hasarlanma IV (şift):</i> Orta hat şifti >5mm, yüksek veya heterojen dansiteli lezyon yok.
	<i>Boşaltılmış kitle lezyonu V:</i> Cerrahi olarak boşaltılmış herhangi bir lezyon
	<i>Boşaltılmamış kitle lezyonu VI:</i> 25 cm ³ 'den daha fazla miktarda lezyon mevcut, cerrahi olarak boşaltılmamış.

TBH sınıflaması için kullanılan çeşitli yaklaşımlar Tablo 2.2.3.'te sunulmuştur

**Tablo 2.2.4. Beyin hasarının BT bulgularına göre sınıflandırılması:
Rotterdam Skoru**

BULGU	SKOR
BAZAL SİSTERNLER	
Normal	0
Komprese	1
Silik	2
ORTA HAT ŞİFTİ	
≤ 5mm	0
>5 mm	1
EPİDURAL KİTLE LEZYONU	
Yok	0
Var	1
İNTRAVENTRİKÜLER KAN VEYA SUBARAKNOİD KANAMA	
Yok	0
Var	1
<i>Sum score</i>	+1
Toplam	1-6

2.3. Travmatik beyin hasarı: klinik bulgular, tanı, tedavi ve prognoz

2.3.1. Fokal beyin hasarı

Fokal beyin yaralanmaları kontüzyon ve intrakranial kanamalar olarak sınıflandırılmaktadır.

2.3.1.1. Kontüzyon

Kontüzyo serebri travma sonrası ortaya çıkan fokal mikrokanamalardır. Ağır kafa travması vakalarının %20-30'unda görülür [33]. Pia-araknoid membran hasarlanması olursa bu duruma laserasyon adı verilir [34]. Yaralanma mental fonksiyonlarda gerilemeye, hatta acil bir durum olan herniasyon tablosuna kadar ilerleyebilir. Bu durumda tedavi artmış kafa içi basıncının azaltılması yönündedir. Kontüzyonlar çoğunlukla girişim gerektirmeyen ve kendiliğinden düzelen yaralanmalardır.

Kafa travması sonrası kontüzyo, *coup* veya *counter-coup* yaralanma olarak ortaya çıkar. Counter-coup yaralanmalarda kontüzyo çarpma tarafının karşısında olur.

Kontüzyon en sık travma tarafında kortikal doku içerisinde, özellikle kafatasının keskin ve çıkıntılı kısımlarının altında meydana gelir. Kontüzyon alanları özellikle frontal ve temporal kaidlerin altında ve orbita tavanı üzerindeki kafatası çıkıntılarında meydana geldikleri için travma sonrası hayatta kalan hastalarda dikkat, hafıza, duygudurum bozukluğu gibi semptomların sık olması kaçınılmazdır [35, 36].

Gliding kontüzyonlar doğrudan temas mekanizmasından ziyade rotasyonel darbeler sonucu görülür ve korteks ile serebral hemisferlerin üst sınırlarına komşu beyaz cevher alanlarını etkileyen hematomlar için kullanılır. *Intermediate* kontüzyonlar korpus kallosum, bazal gangliyonlar, hipotalamus ve beyin sapı gibi derin beyin yapılarını etkileyen lezyonlardır. Herniasyona bağlı kontüzyonlar temporal lobun medial kısımlarının tentoriyal sınırla temas ettiği bölgelerde (örn. unkal herniasyon) veya serebellar tonsillerin foramen magnum ile temas ettiği bölgede (örn. tonsiller herniasyon) ortaya çıkar [37, 38].

2.3.1.2. Travmatik İntrakraniyal Hematomlar

2.3.1.2.1 Epidural hematom

Epidural hematomlar travma sonrası kafatası kemiği ile dura arasında ortaya çıkan kanamalardır. Kanama sonrası beyin dokusuna bası yapması ve herniasyona

sebepe olabilmesinden dolayı mortal seyredebilir. Kafa travmalarının %1-3'ünde epidural hematoma izlenir ve epidural hematomların %15-20'si ölümcül seyreder

Arteriel kaynaklı epidural hematomlar en sık temporoparietal kırıklar ile birlikte görülür. Dura ve kemiğin ayrılması sonrası orta meningeal arter yaralanması ile ortaya çıkar. Venöz kaynaklı epidural hematomlar tüm epidural hematomların ancak %10'unu oluşturur [39].

EDH'ler radyografik durumlarına göre üçe ayrılır: tip I (akut ve hiperakut-ilk gün, pıhtılaşmamış kan içerir), tip II (subakut, 2-4. günler, katı) ve tip III (kronik, 7-20. günler, lüsent görünüm). Sırasıyla %58, %31 ve %11 olguda görülür [40].

İlk kez Jacobson (Jacobson W 1886) tarafından tanımlanmış olan epidural kanama kliniğinde travma sonrası ortaya çıkan bilinç kaybı sonrasında kısa süreli bir düzelme "*lucid interval*" ve ardından tekrar hızlı bir kötüleşme görülür. Bu klinik triad vakaların ancak %4-21'inde izlenmektedir [41]. Epidural hematoma sonrasında ipsilateral okulomotor felci (unkal herniasyona bağlı), kontralateral hemiparezi, deserebrasyon rijiditesi, hipertansiyon, bradikardi, aritmi ve ölüm meydana gelir. Sadece epidural hematoma varlığında cerrahi sonrası nörolojik düzelme mükemmel iken ek olarak subdural hematoma veya parankimal yaralanma varlığında bu oran %44'lere düşmektedir [41]. Epidural hematomlarda hızlı tanı ve erken müdahale hayat kurtarıcıdır.

2.3.1.2.1. Subdural Hematom

Subdural hematomlar sıklıkla travma sonrası Dura mater ile araknoida mater arasında olan kanamalardır. Bu kanamalar bu mesafedeki köprü venlerinin yırtılması ile ortaya çıkar. Kanama beyin parankimine basıya, şifte ve kafa içi basıncının artmasına sebep olur. Akut subdural hematomlar hayati tehlike yaratan kanamalardır. Kronik subdural hematomlar ise iyi yönetildiğinde iyi prognoza sahip kanamalardır.

Subdural hematomlar patolojik olarak 3 alt gruba ayrılır (Tablo 2.3.1). Kanamanın ilk 48 saatlik sürecine akut subdural hematoma denir ve pıhtılaşmış kandan oluşur. 3-14 günler arası subakut dönemdir. Pıhtı ve akışkan kan karışımından oluşur.

14 günden sonraki dönem ise kronik dönem olarak adlandırılır ve sadece akışkan kan ve yıkılmış kan ürünlerinden oluşur.

Tablo 2.3.1. Subdural Hematom Sınıflaması

TİP	GÜN	İÇERİK	BT
Akut	0-2	Pıhtılaşmış kan	Hiperdens
Subakut	2-14	Pıhtılı kan	İzodens
Kronik	>14	Kan	Hipodens

Subdural hematomların %60'ı akut subdural hematomlardır ve bunlarında %60'ı mortal seyreder [41]. Toplumda antikoagülan kullanımının artmasından dolayı özellikle yaşlı popülasyonda ufak travmalalarla bile subdural hematom ortaya çıkabilmektedir ve beyin atrofisine bağlı bası bulguları geç semptom vereceği için bu grupta tanı daha çok kronik dönemde konabilmektedir.

2.3.1.2.3. İntraserebral hematom:

İntraserebral hematomlar travmatik beyin yaralanmalarının yaklaşık %20'sini oluşturduğu gibi anevrizmalar, arterio venöz malformasyonlar, ve beyin tümörlerine bağlı da ortaya çıkabilir. Erişkinlerde çocuklardan daha sık ortaya çıkar ve sıklıkla penetran travmalarla veya çökme fraktürleriyle, akselerasyon/deselerasyon travmalarında görülür [39].

İntraserebral hematomlar sıklıkla travma sonrası, özellikle beynin temporal ve frontal polar bölgelerinde, kontüzyo alanlarında sık görülür. Kronik antikoagülan tedavi alan hastalarda ufak travmalarla dahi intraserebral hematom gelişme riski vardır [19].

2.3.2. Diffüz Beyin Hasarı

TBH sonrası en sık karşılaşılan durum diffüz beyin yaralanmasıdır. Diffüz yaralanmalar hafif konküzyo olabileceği gibi persistan posttravmatik komaya kadar giden ağır bir tablo ile seyredebilir.

2.3.2.1. Konküzyon

Konküzyon, hafif kafa travması olarak da isimlendirilebilir. Travmatik beyin yaralanmasının en sık görülen formudur. Kranial BT’de akut patolojinin olmadığı, geçici bilinç kaybı eşlik eden kafa travması olarak tanımlanır. Kranial MRG’de sitotoksik ödem izlenebilir. Semptomlar fiziksel, emosyonel ve kognitif bozukluklardan oluşabilir ve oldukça fazla değişkenlik gösterebilir. Hasarın mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte travma esnasında aksonlardaki gerilmeye bağlı akson iyon kanalları değişiklikleri suçlanmaktadır [42]. Tedavi daha çok istirahat ve fiziksel aktivitelerden kaçınmak ile sağlanabilir. Semptomlar genellikle 3 hafta içerisinde düzelir fakat daha uzun sürebilir veya komplikasyonlar ortaya çıkabilir [43].

Semptomların çok belirsiz olması ve kolay gözden kaçmasından dolayı asıl sıklığı kesin olarak bilinmemekle birlikte % 0.6 olduğu bildirilmiştir [44].

2.3.2.2. Diffüz aksonal hasar

Kuvvetli rotasyonel akselerasyon veya deselerasyon travmaları ile beyaz cevherdeki aksonal liflerin yaralanması ile ortaya çıkan bir klinik tablodur. Ağır kafa travması sonrası ortaya çıkan ve düzelmeyen bilinç kaybı, persistan vejetatif durumun en sık sebebidir [45]. Ağır diffüz aksonal yaralanma olan vakaların %90’ında bilinç geri dönüşsüz olarak kaybolur [46].

Diffüz aksonal yaralanmalar oluşum mekanizması gereği en sık motorlu araç kazalarından sonra ortaya çıkar. Sarsılmış bebek sendromu ve çocuk istismarı olgularında da görülebilir [47, 48].

Diffüz aksonal yaralanmaya ait lezyonlar tipik olarak beyaz cevherde ortaya çıkarlar ve bu lezyonların büyüklükleri 1-15 mm arasında değişir. Lezyonlar özellikle

serebral hemisfer beyaz cevherinde, corpus callosumda ve beyin sapı kruslarında ortaya çıkar. Lezyonlar bu bölgelerde radyolojik ve patolojik olarak görülebilen punktat hemorajilerdir.

Aksondaki yaralanma sonrası aksonal transport ile taşınan akson içeriği yaralanma olan yere kadar yapılır ve burada akson uçlarının şişmesine bağlı “gerilme topçukları” ortaya çıkar.

Diffüz aksonal yaralanmaya bağlı radyolojik bulgular travmadan sonra saatler ve günler içerisinde ortaya çıkar. Yaralanmaya bağlı mikrohemorajiler akselerasyona en çok duyarlı olan korpus kallosum, üçüncü ventrikül çevresi, serebral pedinküller, internal kapsül gibi lokalizasyonlarda ortaya çıkar. Fonksiyonel iyileşmeyi aksonal hasarın yeri ve ciddiyeti belirler. Diffüz aksonal yaralanma lezyonların yerine göre Adams ve diğerleri tarafından (Tablo 2.3.2.) sınıflandırılmıştır. Bu lezyonlar en iyi kranial MRG ile görüntülenebilir.

Tablo 2.3.2. Diffüz Aksonal Hasar Nöropatolojik sınıflaması

DERECE	LEZYONUN YERİ
I	Serebral hemisferlerin parasagittal beyaz cevherinin aksonal hasarı
II	Grade I'e ek olarak korpus kallosumda fokal lezyon
III	Grade II'ye ek olarak serebral pedinkülde fokal lezyon

2.4. Travmatik beyin hasarının mekanizması

Travmatik beyin hasarının oluşumunda mekanizmalar temel olarak ikiye ayrılabilir. Bunlardan birincisi fokal beyin hasarı künt veya penetran yaralanma sonrası ortaya çıkan kontüzyon, laserasyon veya intrakranial kanamalar olarak sınıflandırılır. İkincisi ise akselerasyon ve deselerasyon kuvvetlerinin sonucunda ortaya çıkan diffüz aksonal yaralanma ve beyin ödemidir. Kafa travması sonrası prognozu temel olarak 2 ayrı mekanizma belirler. Primer hasar kafa travması esnasında

olur ve bu hasar ancak kazayı önleyici önlemlerle veya cerrahi yöntemlerle engellenebilir fakat medikal tedavilerle primer hasar engellenemez. Sekonder hasar ise diğer adıyla gecikmiş nörolojik yanıt veya non-mekanik yaralanma olarak da isimlendirilir ve kaza esnasında başlayan ve geç dönem nörolojik bozulmadan sorumlu olan biyokimyasal hücre yaşam/ölüm sikluslarının tetiklenmesiyle gerçekleşir. Serebral iskemi ve intrakranial hipertansiyon sekonder hasara bağlı ortaya çıkar ve sekonder hasar primer hasarın tersine medikal tedavi ile kontrol altına alınmaya çalışılır.

2.4.1. Primer hasar

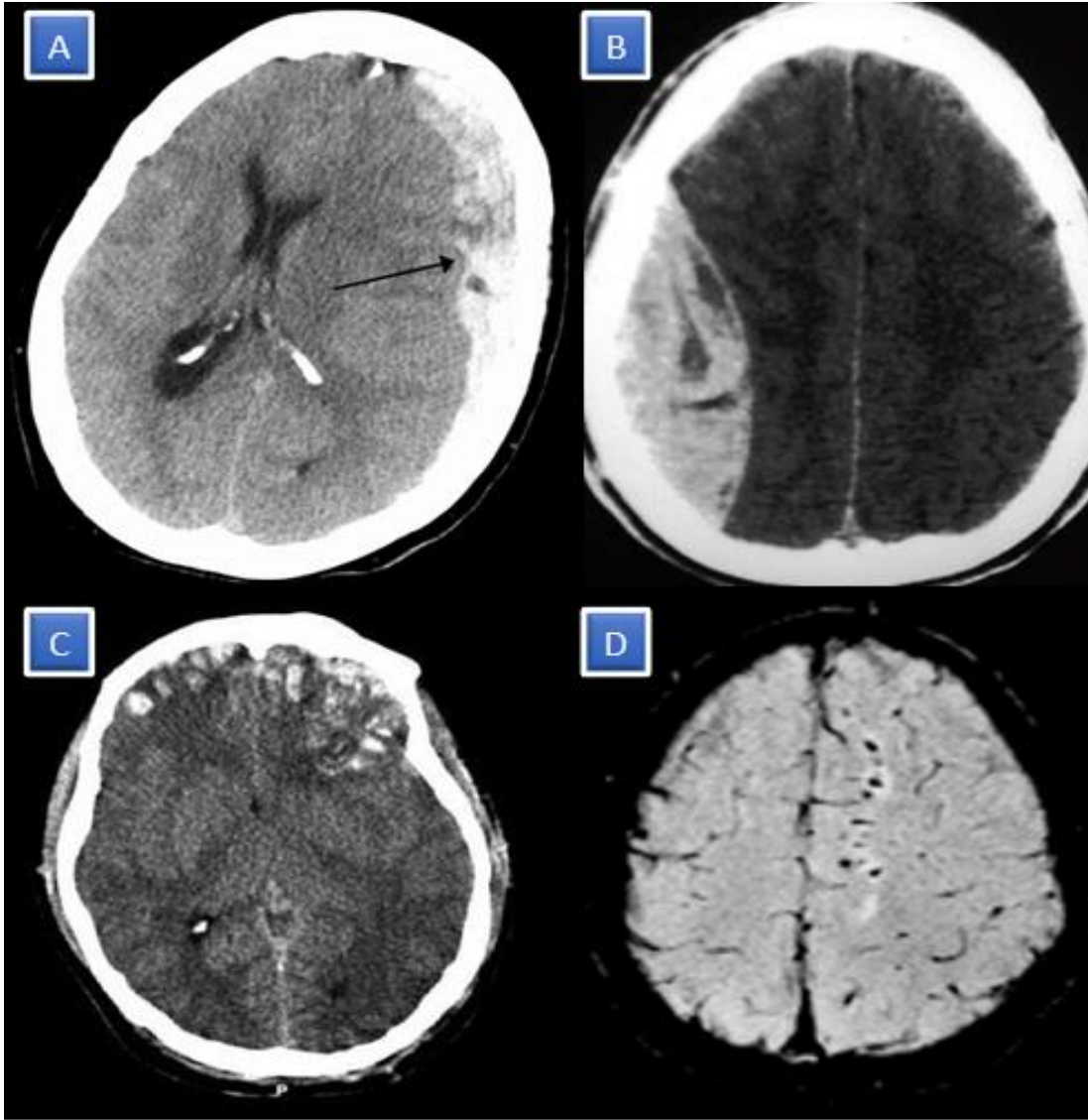
Primer beyin hasarı travma esnasında oluşur. En sık sebep olan mekanizmalar doğrudan etki, ani hızlanma/yavaşlama, delici yaralanma ve patlayıcı yaralanmadır. Bu mekanizmalar heterojen olsa da dış kuvvetlerin etkisiyle kafa içi yaralanmaya neden olmaktadır. Hasar, fokal kontüzyon ve hematomlar ve diffüz aksonal hasar ile serebral ödem ve şişme ile sonuçlanır.

- Diffüz aksonal hasar; beyaz cevher yollarında çoklu küçük lezyonlar şeklinde görülür. Ağır diffüz aksonal hasar durumunda hastalar tipik olarak kafa içi basınç artmaksızın koma durumunda olur ve çoğunlukla prognoz kötü seyredir. Bu durumda hemisferlerdeki gri madde sınırını da etkiler ve daha ciddi durumlarda korpus kallosum ve/veya orta beyin de etkilenir (Şekil 2.4.1.).
- Fokal serebral kontüzyonlar en sık karşılaşılan lezyonlardır. Kontüzyonlar, özellikle akselerasyon/deselerasyon mekanizmasıyla oluşan kafa kaidesi kırıklarının doğrudan etkisine maruz kalan bazal frontal ve temporal bölgelerde sık görülür. Serebral kontüzyon alanlarının birleşmesi veya intraparenkimal damarların yırtılmasına bağlı intraparenkimal hematomlar oluşabilir (Şekil 2.4.1.).
- Ekstra-aksiyal hematomlar genellikle yüzeysel serebral katmanları ilgilendirir; epidural, subdural ve subaraknoid kanama.
- Erişkinlerde tipik olarak orta meningeal arter yırtılmasına bağlı epidural hematom (EDH) hemen her zaman kafatası kırığıyla ilişkilidir. Çoğunlukla

lentiküler (bikonveks) şekilli olup altta yatan beyin parenkiminde hasara neden olmaz. Bu nedenle bu hastalar daha iyi prognozlu olurlar (Şekil 2.4.1.).

- Subdural hematomlar (SDH), serebral kortikal yüzeylerden geçen dural venöz sinüslere açılan köprü venlerin yırtılması neticesinde ortaya çıkar. Bu kanamalar yarım ay şekilli olup genellikle alttaki beyin parenkimi hasarıyla birlikte görülürler (Şekil 2.4.1.)
- Subaraknoid kanama (SAK) ise küçük pial damarların yırtılması sonucu oluşur ve genellikle silviyan fissür ile interpedinküler sistemlerde görülür. Ventrikül içi kanama veya yüzeyel intraserebral kanama da ayrıca subaraknoid aralığa uzanabilir.
- Ventrikül içi kanamanın subependimal venlerin yırtılması veya komşu intraparenkimal veya subaraknoidal kanamanın uzanması nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmektedir [49, 50].

Ağır TBH'li hastaların yaklaşık olarak üçte birinde kanamanın büyümesi, kötü nörolojik sonuç ve ölüm riskini artıran koagülopati gelişir [51]. Bu durum hastanın kullanmakta olduğu antikoagülan veya antiplatelet ajanlardan kaynaklanabileceği gibi doku faktörü ve fosfolipidlerin sistemik dolaşıma katılması sonucunda ortaya çıkan uygunsuz pıhtılaşma ve tüketim koagülopatisi nedeniyle de ortaya çıkabilir.



Şekil 2.4.1 Travmatik beyin hasarı primer hasar;

A) Sol frontal akut subdural hematom, (siyah ok), kranial tomografi, bası nedeniyle soldan sağa subfalksiyan herniasyona sebep olmuş. B) Sağ frontoparietal yerleşimli akut epidural hematom, kranial tomografi C) Bilateral frontal bazal kontüzyon alanları, kranial tomografi. D) Sol frontal lob yerleşimli diffüz aksonal yaralanmaya ait kranial MRG görüntüsü SWI sekansı.

2.4.2. Sekonder hasar

Sekonder hasar travmanın indirekt sonuçlarından biridir. Travmayı takiben başlayan birtakım biyokimyasal kaskadların aktifleşmesi sonucu oluşur. Primer hasardan saatler ve günler sonra ortaya çıkar. Sekonder hasar travmatik beyin hasarında morbidite ve mortaliteden önemli ölçüde sorumludur. Ağır TBH sonrası vakaların büyük çoğunluğu travmadan günler veya haftalar sonra ölümler. Bu ölümlerin sebebi sekonder mekanizmalar sonucunda ortaya çıkan hasardır [52].

Sekonder hasar hücresele düzeyde ortaya çıkan moleküler hasarlarla ilişkilidir [53]. Bunlar;

- Glutamat ve aspartat nörotransmitterleri aracılı nMDA (*N*-methyl-*D*-aspartate) reseptör aktivasyonu, hücre membran voltaj değişiklikleri ve nörotoksisite
- Mitokondriyel disfonksiyon,
- Elektrolit dengesizliği
- Vazospazm
- Apoptoz/nekroz

Bunların yol açtığı nöronal hücre ölümü, serebral ödem ve artmış kafa içi basıncı beyin hasarını derinleştirebilir. Bu kaskadlar akut iskemik inme kaskadlarıyla büyük ölçüde benzerlik göstermektedir.

TBH sonrası öncelikle doğrudan doku hasarı, beyin kan akımında ve metabolizmasında bozulma görülür. İskemiye andıran bu tablo sonucunda anaerobik glikolizin devreye girmesiyle birlikte dokuda laktat birikir, hücre zarı geçirgenliği bozulur ve ödem meydana gelir. Anaerobik metabolizma neticesinde mevcut ATP depoları tüketilir ve enerji bağımlı iyon pompaları çalışamaz. Patofizyolojik kaskadın ikinci aşaması ise eksitatuvar nörotransmitterlerde (ör. glutamat, aspartat) aşırı salınım, *N*-metil *D*-aspartat (NMDA), α -amino-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionat (AMPA) reseptörlerinin ve voltaj bağımlı kalsiyum ve sodyum kanallarının aktivasyonu sonucu ortaya çıkan terminal membran depolarizasyonu ile karakterizedir. Artan hücre içi kalsiyum ve sodyum akışıyla birlikte hücre içi

katabolik süreç tetiklenir. Kalsiyum, lipid peroksidaz, proteaz ve fosfolipazları aktive eder ve serbest yağ asitleri ile hücre içi serbest oksijen radikali artışı görülür. Buna ek olarak kaspazların (interlökin 1 beta dönüştürücü enzim ICE benzeri proteinler), translokazların ve endonükleazların aktivasyonu hücre membranında ve nükleosomal DNA’larda DNA fragmantasyonu ve DNA tamir mekanizmalarında bozulmalar gibi ilerleyici yapısal değişikliklere neden olur. Tüm bunların neticesinde damar ve hücre yapılarında bozulmayla birlikte nekrotik veya programlanmış hücre ölümü (apoptoz) ortaya çıkar [53].

Travma sonrası ortaya çıkan hipotansiyon, hipoksi, ateş, nöbetler ve hiperglisemi bu yollar üzerinden sekonder beyin hasarına katkıda bulunmaktadır.

Tablo 2.4.2. Sekonder beyin hasarından sorumlu olaylar

Sistemik	İntrakraniyal
Hipoksemi	Hematom (ekstradural, subdural, intraparenkimal)
Arteriyel hipotansiyon	Beyin ödemi
Hiperkapni	İntrakraniyal hipertansiyon
Şiddetli hipokapni	Serebral vazospasm
Ateş	İntrakraniyel enfeksiyon
Hiponatremi	Epilepsi / nöbet
Anemi	Serebral iskemi
Dissemine intravasküler koagülopati	Hematomun genişlemesi, yeni hematomlar

2.5. Travmatik beyin hasarının spesifik patofizyolojisi

2.5.1. Serebral kan akımı, hipoperfüzyon, hiperperfüzyon

Çeşitli gözlemsel çalışmalar TBH'dan sonra herhangi bir zamanda oluşan sistemik hipotansiyon ile kötü prognoz arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır. Hipotansiyon ataklarının sayısı ve süresi mortalite ile yakından ilişkilidir.

TBH'ı hemen takip eden dönemden başlayarak geç safhaları kapsayacak bir zaman diliminde serebral kan akımı değerlendirmeleri yapılmış ve birçok araştırmacı fokal yada global serebral iskeminin meydana geldiğini göstermişlerdir.

Travmatik beyin yaralanmasında geriye dönülmez doku harabiyetinin oluşumunda serebral kan akımının kritik seviyesi 15 ml / 100 g. iken iskemik inmeli hastalarda bu değer 5-8.5 ml /100 g'dır [54]. TBH'lı hastalarda travmanın erken döneminde serebral hiperperfüzyon (55 ml/ 100g. / dakika) ortaya çıkabilir. Benzer şekilde hiperemia posttravmatik iskemiye takip edebilir [55]. Metabolik gereksinimleri karşılamaksızın vazodilatasyona bağlı olarak artan serebral kan akımı serebral kan hacmini arttırır ve buda kafa içi basıncın artmasına neden olur.

Serebral kan akımı travmatik beyin hasarını takip eden günlerde belirgin değişiklik gösterir. TBH'a yanıt hastadan hastaya farklılık gösterebilir fakat temel olarak tanımlanmış 3 farklı hemodinamik dönem bulunmaktadır [56].

2.5.1.1. Hipoperfüzyon fazı (faz 1, gün 0)

TBH sonrası ilk 24 saat içerisinde olan hipoperfüzyon ile karakterizedir. Her ne kadar serebral kan akımında azalma meydana gelse de transkraniyel dopplerde orta serebral arterde kan akım hızı, arteriovenöz oksijen farkı (AVFO₂) veya arterio- juguler oksijen farkı normaldir. Bu hipoperfüzyon fazında oksijenin serebral metabolik hızı normalin yaklaşık %50'sine iner. Azalan kan akımından patolojik mikrosirkülatuar direncin sorumlu olduğu ileri sürülmektedir. AVFO₂'nin normal

olması bu fazda serebral kan akımı ile serebral metabolizma hızının dengede olduğunu göstermektedir [56].

2.5.1.2. Hiperperfüzyon fazı (faz 2, gün 1-3)

24. saatten sonra (1-3 gün) serebral kan akımı artar. Bu durum AVFO₂ 'de düşüş ile birlikte ve juguler bulbus oksijen saturasyonunda artma görülür. Motor skorda düşüş başlar. Bu fazda rölatif kan akımı gereksinime bağlı olarak hem rölatif hiperemia hemde serebral kan akımı değerinin üzerinde olduğu için hem de kesin hiperemia vardır. Orta serebral arter kan akım hızı artar. Hiperemia ilgili fizyopatolojik mekanizma bilinmemektedir. Olası açıklamalar artan serebral glikoz metabolizması ve laktik asid, adenopsin, nöropeptid gibi vazodilatör metabolitlerin meydana gelmesi sebebiyle serebral mikrovasküler dirençte düşme meydana gelir. Hipereminin kendisi belirgin intrakranial basınç artışına sebep olur. Hiperemik fazda sistemik vazopressörler dikkatli kullanılmalıdır. Terapötik serebral perfüzyon basıncının düşürülmesi gerekebilir çünkü bozulmuş otoregülasyonla seyreden sistemik hipertansiyon ve yüksek serebral perfüzyon basıncı serebral kan akımını daha da arttırabilir. Böylelikle hipereminin artmasına ve intrakranial basıncın yükselmesine sebep olabilir. Hiperemik fazın tedavisi esnasında takip edilmesi gereken potansiyel monitörlmeler SjO₂, serebral mikrodializ, transkranyal doppler veya serebral kan akımının direk ölçülmesi olabilir.

2.5.1.3. Vazospazm fazı (faz 3, gün 4-15)

Travmatik beyin yaralanması, subaraknoid kanamanın indüklediği vazospazm gibi, büyük serebral damarlarda spazma yol açabilir. Orta serebral arterde kan akımı hızı daha da artar. Serebral kan akımı giderek azalır. İlginç bir şekilde vazospazm fazında AVFO₂ düşük seyrederek ve bu nedenle SjO₂'de yüksek seyrederek. Vazospazm serebral iskeminin artmasına daha da katkıda bulunur. Travmatik beyin yaralanmalı hastaların üçtebirinde görülür ve kötü prognozla ilişkilidir. Vazospazma neden olan mekanizmalar arasında azalmış potasyum kanal aktivitesine bağlı kronik vasküler düz kas depolarizasyonu [57], nitrik oksitte azalmaya bağlı artmış endotelin salgısı [58],

vasküler düz kasta siklik GMP azalması [59], prostaglandinle indüklenen vazokonstriksiyon ve serbest radikal oluşumu yer alır.

2.5.2 Serebrovasküler otoregülasyon ve CO₂ reaktivitesi

Normal koşullar altında otoregülatuvar mekanizmalar Serebral kan akımının serebral perfüzyon basıncının 50-150 mmHg arasında seyretmesi halinde sabit kalacağı bilinmektedir. yaralanmış bir beyinde serebral kan akımı ve serebral perfüzyon basıncı arasındaki ilişki 2 yolla değişmektedir. İlkinde otoregülasyon eğrisi sağa kayma gösterir ki bu durumda serebral perfüzyon basıncı > 50 mmHg olması durumunda normal serebral kan akımı temin edilmiş olur. İkinci olarak beyin yaralanmasında normal otoregülatuvar mekanizmalar öylesine bozulabilir ki serebral perfüzyon basıncı direkt olarak serebral kan akımı ile doğru orantılı olur. Sonuç olarak normalden daha yüksek serebral perfüzyon basıncı serebral kan akımının temini için gereklidir. Serebral perfüzyon basıncındaki herhangi bir artış Serebral kan akımı ve serebral kan hacminde bir artışa yol açar.

Serebrovasküler otoregülasyon ve CO₂ reaktivitesi serebral perfüzyon basıncının ve intrakranial basıncın dengelenmesinde önemli mekanizmalardır. Bu düzenleyici mekanizmaların bozulması halinde sekonder hasar artar. Travmatik beyin yaralanması sonrası serebral kan akımı otoregülasyonu (örneğin serebral perfüzyon basıncını arttırmak ve azaltmak için serebrovasküler yapılarda daralma veya genişleme sağlamak) pek çok hastada bozulmuştur yada hiç yoktur [60]. Hatalı serebral kan akımı otoregülasyonu travmadan hemen sonra da ortaya çıkabilir veya zaman içinde de gelişebilir. Varlığı travmanın şiddetinden bağımsızdır. Otoregülatuvar vazokonstriksiyon, vazodilatasyona kıyasla tedaviye daha dirençli olduğu için düşük serebral perfüzyon basıncına bağlı hasarlar daha sık görülür. Şiddetli beyin travmalı ve kötü prognozlu hastalarda CO₂ reaktivitesi travma sonrası erken dönemde bozulur. Aksine CO₂ reaktivitesi hiperemik durumlarda çoğu kez artmıştır ki bu durum intrakranial basınç tedavisinde alternatif oluşturur [61].

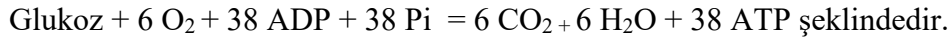
2.5.3. Serebral vazospazm

Serebral vazospazm travmanın bir sonucu olup morbidite ve mortaliteyi önemli ölçüde etkilemektedir. Vakaların 1/3'ünde görülür ve şiddetli parankimal harabiyete

sebeplerdir. Posttravmatik vazospazm subaraknoid kanamaya sekonder gelişen vazospazmdan farklıdır. Post-travmatik vazospazm 2-15. günler arasında olur, hemodinamik semptomlar veren vazospazm bu vakaların ancak %50'sinde görülür [62]. Serebral vazospazm mekanizmaları içerisinde azalan potasyum kanal reaktivitesine bağlı vasküler düz kasların kronik depolarizasyonu, nitrik oksit sentezinin azalmasına bağlı endotelin salınması, vasküler düz kaslarda cGMP tükenmesi, prostaglandinlere bağlı vazokonstriksiyonun tetiklenmesine bağlı serbest radikal oluşumu bulunmaktadır [63].

2.5.4 Serebral metabolik fonksiyon bozukluğu

Kan beyin bariyerini kolayca geçebilen tek organik besleyici olan glikoz beyin kullanabildiği en önemli enerji kaynağıdır. Uzun açlık gibi glikoz metabolizmasının bozulduğu durumlarda beyin keton cisimlerini de enerji kaynağı olarak kullanabilir. Beyin total vücut glukozunun %25'ini kullanır. Bu oranda en büyük pay nöronlara aittir. ATP olarak oluşturulan bu enerji oksidatif fosforilasyon olarak bilinir ve aşağıdaki formülle ifade edilir:



Bu formül beyindeki birçok fizyolojik ve fizyopatolojik olayları açıklayabilen formüldür. Bu reaksiyonların gerçekleşmesi için glikoz, oksijen ve serebral perfüzyon basıncının dengede olması gerekmektedir.

Normal olarak 100 ml kanda 70-100 mg olan glikozun bu seviyenin altına düşmesiyle hipoglisemi olur ve bu durumda hastalarda konfüzyon durumu ortaya çıkar. Kan şekeri 40 mgr/dl altında düştüğünde koma kaçınılmazdır. Hipoglisemi esnasında endojen karbonhidratlar ve aminoasitler kullanılır. 5-15 dakika süren hipoglisemik koma sonucunda dokularda glikojen, glikoz ve diğer pekçok karbonhidrat ara maddesi tüketilir. Komanın uzaması halinde hipoksi ve iskemi sonucu beyinde geri dönüşsüz hasar meydana gelebilir.

Beyinde hemen hemen bütünüyle aerobik metabolizma hakimdir. 70 kg ağırlığında bir insanın dakikada O_2 gereksinimi 250 ml'dir. Beynin kullandığı O_2

miktarı ise 3.3 ml//100 gr/dakika'dır. 70 kg'lık bir insanda yaklaşık vücut ağırlığının %2'sini oluşturan beynin tüm O₂ tüketiminde %20'lik bir paya sahiptir.

Beyin dokusu içerisinde iskemiye en duyarlı hücreler nöronlardır. 1 mol glikozdan 38 ATP üretilebilmesi için oksidatif fosforilasyon mutlaka gereklidir. Beyin dokusu içerisinde oksijen ve enerji depolanamadığı için bu substratlara gereksinim süreklidir. Arteriyel kandaki oksijen düzeyinin düşmesi veya serebral kan akımının azalması gibi durumlarda oksidatif metabolizma yerine beyinde anaerobik glikoliz ortaya çıkar. Bu durumda ;



Formülü geçerli olur. Normal koşullarda oksidatif reaksiyonlar mitokondri içerisinde kreps siklüsü ile gerçekleşir. Oksijenasyonun bozulduğu durumlarda bu reaksiyonlar durur. Sonuçta aerobik glikoliz ile elde edilen ATP'nin ancak %5'i sağlanabilir. Anaerobik glikoliz esnasında ortaya çıkan laktat nedeniyle fizyolojik pH bozulur ve asidoza bağlı vazodilatasyon meydana gelir. Bu mekanizma ile serebral kan akımı arttırılmaya çalışılır. Her ne kadar başlangıçta faydalı gibi görünsede uzun dönemde bu mekanizma beynin aleyhine çalışmaya başlar.

Şiddetli kafa travması sonrası katekolamin düzeylerinin artmasından dolayı erken dönemde hiperglisemi ortaya çıkar. Özellikle pediatrik yaş grubunda hiperglisemi kötü prognoz ile ilişkilidir.

Travmatik beyin yaralanması sonrası beyinde oksidatif metabolizma sekteye uğrar. Metabolik yetersizliğin derecesi primer travmanın şiddeti ile doğru orantılı olup prognoz daha düşük metabolik hızla seyredenlerde minör yada hiçbir bozukluk olmayanlara göre daha kötüdür.

Primer travmadan hemen sonra serebral metabolizmanın bozulmasına bağlı oksidatif reaksiyonların azalması, intramitokondrial Ca²⁺ miktarında bağlı mitokondrial disfonksiyona yol açar [64].

2.5.5. Serebral oksijenasyon

Travmatik beyin yaralanması gözlemsel çalışmaların pek çoğunda erken dönemde ortaya çıkan hipoksi ($\text{SaO}_2 < 90\%$ veya $< 7.9 \text{ kPa (60 mmHg)}$) ile kötü prognoz arasındaki ilişki saptanmıştır [62]. Bu ilişki hipotansiyondaki kadar kuvvetli bir ilişki değildir ve çocuklarda daha az öneme sahiptir. Travmatik beyin yaralanması sonrası serebral perfüzyonun ve dolayısıyla oksijenasyonun bozulması durumunda sonuç beyin dokusu hipoksidir ve bu durum uzun sürerse kaçınılmaz sonuç geri dönüşümsüz enfarktustur. TBH'li hastalarda beyin dokusu oksijen basıncı (PtO_2) kritik düzeyi 15-10 mmHg olup daha altındaki değerlerde nöral doku enfarktüsü oluşur [65]. Ancak ardışık sekonder beyin hasarı ile seyreden beyin oksijen yoksunluğu normal SPB veya normal IKB mevcudiyetinde de olabilmektedir. Kritik beyin oksijenasyonu temel alınan bireysel tedaviler sonucu TBH sonrası daha iyi prognoz elde edildiği gösterilmiştir [66].

2.5.6. Eksisotoksisite ve oksidatif stres

TBH sonrası hem primer hem de sekonder olaylarla bir eksitator nörotransmitter olan Glutamat salınımı olur. [67]. Ekstrasellüler aşırı glutamat mevcudiyeti nöron ve astrositleri etkilemekte ve Ca^{2+} , Na^+ , ve K^+ ardışık akışları sonucu inotropik ve metabotropik glutamat reseptörlerinde aşırı stimülasyona yol açmaktadır. Bu reaksiyonlar kan beyin bariyeri dahil birçok ultrasitrikürel yapıların yıkımı ile gitse de bu iyonik dengesizlik Na/K-ATPaz enzimi ile giderilmeye çalışılır. Bu enzim ATP bağımlı bir enzim olmasından dolayı katabolik durumlarda çalışması sekteye uğrayacaktır. TBH sonrası ortaya çıkan oksidatif stres nedeniyle ortaya serbest oksijen radikalleri, süperoksitler, nitrik oksit, peroksinitrit gibi metabolitler çıkar. Eksisotoksisite ve endojen antioksidan sistemin bozulması nedeniyle reaktif oksijen türlerinin aşırı yapımı selüler ve vasküler yapılarda peroksidasyonu, protein oksidasyonunu, DNA yıkımını indükler ve mitokondrial elektron transport zincirini inhibe eder. Her ne kadar bu mekanizmalar ani hücre ölümüne katkıda bulunursa da ayrıca enflamatuar süreçler ve erken yada geç apoptotik programlar da oksidatif stres tarafından indüklenir.

2.5.7. Ödem

TBH sonrası sıklıkla ödem oluşur.

Vazojenik ödem mekanik veya kendi kendini tahrip eden veya kan beyin bariyerinin hayati yapısal elemanı olan endotel hücre tabakasının fonksiyonel yıkımı ile meydana gelir. Serebral vasküler endotel duvarının fonksiyon kaybı intravasküler alandan ekstraselüler (interstisyel) kompartmana kontrol edilemeyen iyon ve protein transferine yol açar.

Sitotoksik beyin ödeminde ise vasküler endotel duvarının bütünlüğünde bozulma olmaksızın nöronlarda, astrositlerde, mikroglialarda intraselüler su birikimi ortaya çıkar. Bu patoloji iyonlar için artan hücre zarı geçirgenliği, enerji iflası nedeniyle iyonik pompa arızası ve osmotik olarak aktif çözümlerin hücrel olarak geri emilimleri sonucu meydana gelir [63].

TBH'li hastalarda her ne kadar sitotoksik ödem vazojenik ödemden daha fazla görülse de her iki durumda da IKB artması ve sekonder iskemik olaylara neden olmaktadır [68].

2.5.8 Enflamasyon

TBH, iskemik reperfüzyon yaralanmasına benzer şekilde bir dizi karmaşık immünolojik ve enflamatuvar doku yanıtlarını tetikler. Primer ve sekonder olaylar proenflamatuvar sitokinler, prostaglandinler, serbest radikaller ve komplemanlar olmak üzere hücrel medyatörlerin salınmasını aktive eder. Bu süreçler kemokinler ve adezyon moleküllerini indükler ve sırasıyla immün ve glial hücreleri, paralel ve sinerjistik bir tarzda mobilize eder [69]. Aktive olmuş polimorfnükleer lökositler adezyon molekülleri aracılığıyla yayıldıkça hem defektif hem de sağlam endotelial hücre tabakalarına yapışırlar. Bu hücreler makrofajlar ve T hücreleri ile birlikte yaralanmış dokuyu infiltre ederler. Lökositlerin doku infiltrasyonu, P-selektin, interselüler adezyon molekülleri (ICAM-1) ve vasküler adezyon molekülleri (VCAM-1) gibi hücrel adezyon moleküllerinin “upregülasyonu” ile artar. Saatler, günler ve haftalar içerisinde astrositler, skar dokusu oluşturmak üzere mikroflamanları ve nötrofinleri sentezlerler. Travmayı takip eden saatler içerisinde Tümör nekroze

edici faktör (TNF), interlökin-1- β (IL1- β), interlökin-6 (IL-6) gibi proenflamatuvar enzimler “upregüle” edilir. Doku harabiyetinin ilerlemesi direk olarak nörotoksik medyatörler veya indirekt olarak nitrik oksit ve sitokinlerin salınımına bağlıdır. Prostaglandin ve lökotrienler gibi vazokonstriktörlerin salınımı, lökosit ve trombosit adezyonu sonucu kan beyin bariyerinin bozulmasına ve buna bağlı ödeme sebep olur. Bütün bu patolojik süreçler sonucunda sekonder beyin hasarı ortaya çıkar [53].

2.5.9. Nekroz ve apoptoz

TBH sonrası programlanmış hücre ölümü (apoptoz) ve/veya nekroz ile hücre ölümü meydana gelir [62]. Nekroz, eksitatör nörotransmitterlerin aşırı salınımı, metabolik yetersizlikle birlikte şiddetli mekanik veya iskemik doku harabiyetine yanıt olarak oluşur. Takiben fosfolipazlar, proteazlar ve lipid peroksidazlar ile hücre zarı otolize uğrar. Geriye kalan hücre artığı “*antijen*” olarak bilinir ki arkasında skar dokusu bırakarak enflamatuvar işlemlerle uzaklaştırılır. Aksine, apoptoza giden astositik hücreler travmayı hemen takip eden dönemde , yeterli ATP yapımının sağlandığı, fizyolojik membran potansiyelleri olan bir ortamda morfolojik olarak sağlamdırlar. Primer travmayı takip eden saatler ve hatta günler içerisinde apoptoz belirgin hale gelir. Programlanmış hücre ölümü Fosfatidilserin’in translokasyonu, nükleer zarların lizisi, kromatin kondansasyonu ve DNA parçalanması ile seyredir. Benzeri şekilde yoğunlaşmış intraselüler materyaller (apoptotik cisimler) büzülen, küçülen hücreden eksitotik mekanizmalarla uzaklaştırılırlar. Apoptozun doğası genellikle enerji desteği ve doğal olarak meydana gelen pro- ve antiapoptotik proteinler arasındaki dengesizliği gerektirir. Bir intrasellüler serin proteaz ailesi olan *Kaspaz*’ların ardışık aktivasyonu ve etkisizleştirilmesi programlanmış hücre ölümünün en önemli medyatörleri olarak bilinmektedir [70].

2.5.10. Post-travmatik intrakraniyal basınç (IKB)

Artan kafa içi basıncı primer travmaya bağlı olabileceği gibi sekonder hasar sonrasında da meydana gelebilir. Yatar pozisyonda normal sağlıklı bir erişkinde İKB 7-15 mmHg aralığındadır. Ortalama 10 mmHg civarındadır ve ender olarak 10 mmHg’yi geçer. Ayakta durur vaziyetteki bir insanda intrakranial basınç negatiftir.

Serebral perfüzyon basıncı (SPB);

$$\boxed{SPB = OAB - IKB}$$

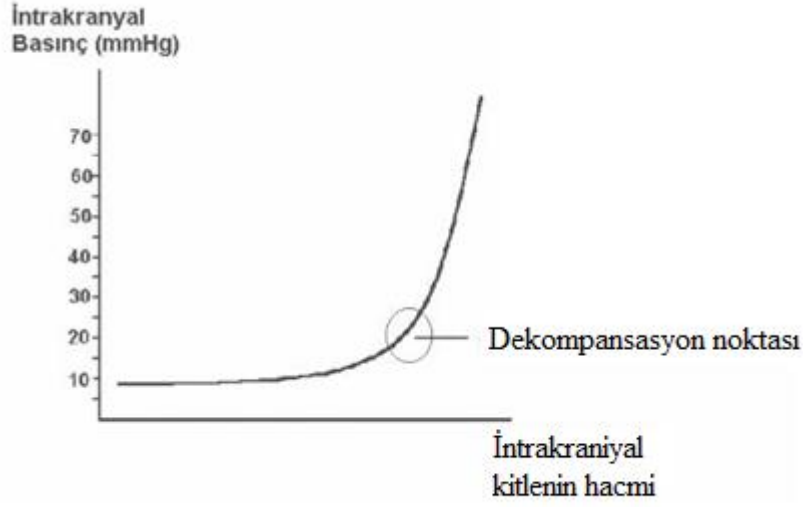
OAB (ortalama arter basıncı), *IKB* (intrakraniyal basınç), *DB* (Diyastolik basınç), *NB* (Nabız basıncı), *SB* (Sistolik basınç). [$NB = SB - DB$], [$OAB = DB + \frac{NB}{3}$]

Yukarıdaki formüle göre kafa içi basıncı artışı sonrası serebral perfüzyon basıncı azalır ve serebral iskemi ortaya çıkar. Kafa içi basınç artışı serebral iskemiyle beraber herniasyonlara da sebep olur. Beyin dokusunun elastik yapısı ve kafatasının rijit yapısından dolayı beyin belirli bir seviyeye kadar kafa içi oluşumlardaki hacim değişikliklerini belirli bir seviyeye kadar tolere edebilir. *Monro-Kellie doktrini* olarak bilinen bu kavram kafatasının elastik olmayan yapısı nedeniyle intrakraniyal basıncın sabit olduğunu belirtir.

$$V_{intrakraniyal} (sabit) = V_{beyin} + V_{BOS} + V_{KAN}$$

Erişkinde intrakraniyal volüm yaklaşık 1500 ml olup beyin bu hacmin %85-90'ını, intravasküler serebral kan miktarı %10'unu ve serebrospinal sıvı ise <%3'ünü oluşturur. Kafa travması sonrası ortaya çıkan beyin ödemi rölatif olarak beyin hacmini arttıracığından sabit kafa içi hacim teorisine göre intrakraniyal bir yada daha fazla kompartmanda hacmin azalması tarzında çalışan bazı kompensatuar düzenekler devreye girmezse kafa içi basıncı artar. Bu ise “*hacimdeki değişikliklere bağlı basınç değişiklikleri*” olarak tanımlanan intrakraniyal kompiyans kavramı ile yakinen ilgilidir. “*Kompiyans=Volum değişikliği / basınç değişikliği*” olarak formüle edilir. Düşük intrakraniyal basınç durumunda intrakraniyal kompartmana hızlı bir şekilde küçük volümlerde sıvı eklendiğinde kafa içi basıncında küçük değişikliklere yol açarken, daha yüksek basınçlarda aynı miktarda sıvı eklenmesi kafa içi basıncında belirgin artmaya sebep olur.

Şekil 2.5.10 : İntrakraniyal basınç ve volüm ilişkisi



Serebral kompliyansın tersi olan ve serebral elastans olarak bilinen durum basınç/hacim değişikliği (mmHg/ml) olarak bilinir. 0-2 mmHg/ml normal, ancak 3 mmHg/ml üzeri anormaldir. Kafa içi basınç artışı tedavisinde hiperventilasyon ve hipokapninin kafa içi basıncı etkili bir şekilde düşürdüğü gösterilmiştir. Ancak PaCO₂'deki değişiklikler basınç hacim ilişkilerini değiştirmez.

Beyin çok sınırlı bir kompliyansa sahip olup diffüz beyin ödemi yada hematoma gibi kitle lezyonlarına bağlı hacim artışlarını tolere edemez. Kafa travmasının rasyonel tedavisi Monro-Kellie doktrini ve hangi spesifik yaklaşımın intrakraniyal kompliyansı nasıl etkileyeceğini temel alır. Total intrakraniyal hacmin herhangi bir komponentindeki bir azalma IKB'nin azalmasına sebep olur. IKB artması kafa travmalarının istenmeyen bir sonuçlarından birisidir.

Tüm bu içerik sıkıştırılmaz yapılar olup kraniyal boşluk dolduğunda basınç dramatik olarak yükselir. Bu durum serebral kan akımında azalmaya, ve sonuç olarak serebral perfüzyon basıncında azalmaya sebep olur ki bu durum uzun sürerse serebral enfarkt kaçınılmazdır.

IKB artışı durumunda hangi noktada tedavinin başlatılması hususunda kesin doğrular olmamakla birlikte 20 mmHg'yi aşan durumlarda tedaviye başlanması görüşü hakimdir. Yeterli serebral perfüzyonun korunması daha önemli bir noktadır.

Hipotansif bir hastada intrakraniyal basınçta hafif bir artış SBP’de ciddi bir azalmaya yol açacağından çoğu kez zarar verici olabilir. Yüksek intrakraniyal basınç durumlarında ortalama arter basıncını yüksek tutmak beyni iskemiye karşı koruyucu olacaktır.

Erişkinlerde yapılan gözlemsel çalışmalardan elde edilen verilere göre İKB artışının 20-25 mmHg civarında seyretmesi travmatik beyin yaralanmasında daha kötü bir prognozla sonuçlanmaktadır. Veriler çocuklarda daha sınırlı sayıda olup yüksek İKB durumunda önerilen eşik değerler infantlarda <15 mmHg, küçük çocuklarda <18 mmHg ve daha büyük çocuklarda <20 mmHg’dir.

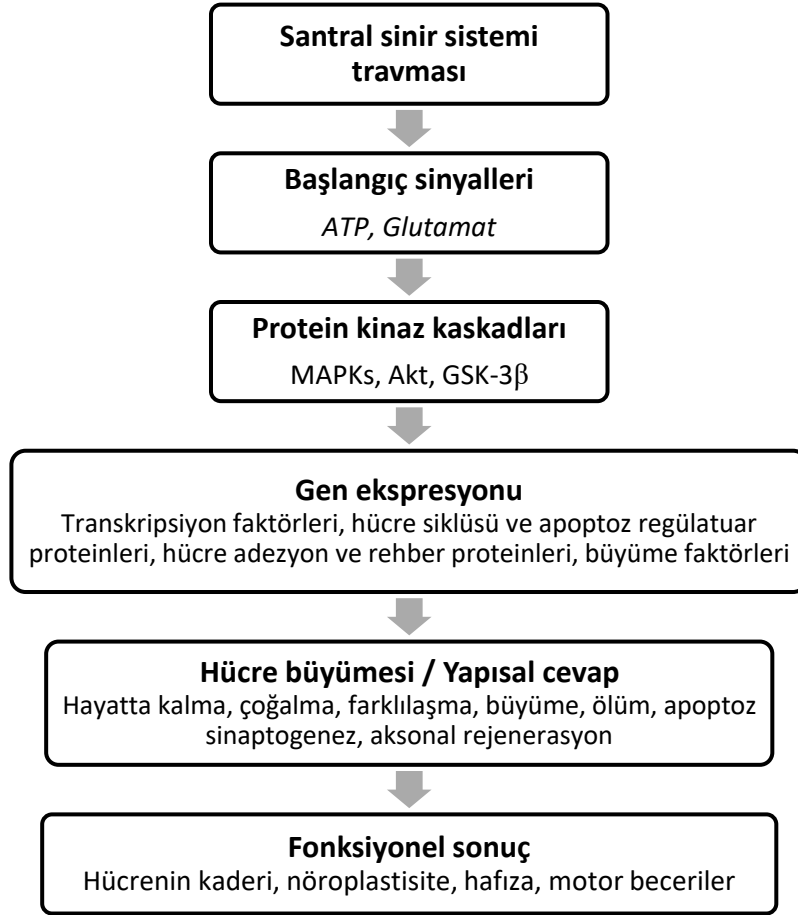
2.6. Santral sinir sistemi travmalarında protein kinaz sinyal yolları

Travma sonrasında birtakım ekstraselluler biyokimyasal mekanizmalar ile intraselüler reaksiyonlar meydana gelir ve uyaran sinyale göre hücrede yaşam, ölüm, çoğalma, farklılaşma, apoptoz gibi birçok farklı hücresel olay meydana gelir. Protein kinaz kaskadları bu haberleşmenin temelinde bulunurlar. Ekstraselluler uyaranlarla aktifleşen protein kinaz reseptörleri birtakım hücre içi reaksiyonları ve gen transkripsiyonunu aktifleştirerek hücre ölüm veya yaşam için gerekli proteinlerin üretilmesini sağlarlar. Bu protein kinaz ailesi içerisinde *mitogen-activated protein kinases (MAPKs)*, *protein kinase-B* (Akt olarak da isimlendirilir), *glycogen syntase kinase (GSK)* gibi proteinler bulunur. Bu sinyal yollarının normal fizyolojisi anlaşıldıkça özellikle travma gibi birçok patolojik durumda bu proteinlerin davranışları daha kolay anlaşılabilir ve bunun sonucunda bu yollara yapılacak spesifik tedaviler ile beyin ve spinal kord yaralanmaları sonrası ortaya çıkan sekonder hasarın önüne geçilebilir.

2.6.1 Travma ile aktifleşen protein kinazlar

Yapılan son çalışmalarda MAPKs, Akt, GSK gibi en az 3 ayrı kinaz santral sinir sistemi travmasına yanıt vermektedir (Şekil 2.6.1). Bu protein kinazlar hücrenin kaderini belirlemede, hücre onarımına veya ölümüne karar vermede rol alırlar.

Şekil 2.6.1 Travmaya biyokimyasal yanıt



2.6.1.1. Mitogen activated protein kinase (MAPK)

3 temel MAPKs ailesi vardır. Bunlar “*extracellular signal regulated protein kinase* (ERK)”, “*c-Jun N-terminal kinase*” (JNK, ayrıca stres ile aktive olan protein kinaz –SAPK- olarak da bilinir.), ve “*p38*”dir. Her bir kinaz ailesinin farklı izoformları mevcuttur. ERK-1 ve ERK-2, JNK’nın 3 ayrı izoformu, p38’in 4 ayrı izoformu bulunmaktadır. Aktive MAPK transkripsiyon faktörlerini, membran proteinlerini, sitozolik proteinleri ve diğer proteinleri fosforile eder. ERK-1 ve ERK-2 hücresel proliferasyon ve diferansiyasyon ile ilişkili G-protein ve tirozin kinaz ile proteinleri ile aktifleştirilirler. ERK1 ve ERK2 ayrıca nöronal sağkalımda rol oynayan

proteinlerdir [71]. JNK ve p58 ise sitokinler ve ultraviyole ışık, ısı, hidrojen peroksit, protein sentez inhibitörleri ile aktiveleştirilirler ki bu MAPK'lar hücre büyümesinin durdurulması, apoptoz ve inflamatuvar yanıt ile ilişkilidir. MAPK proteinlerinin görevi yukarıda anlatılanlardan daha kompleks olabilmektedir. Örneğin JNK ve p38 kinaz proteinlerinin hücre proliferasyonunu stimüle ettiği durumlarda bile ERK1 ve 2 hücre ölümü ile ilişkili olabilir. MAPK proteinlerinin subselüler lokalizasyonları, ve mevcut sinyallerin süresi, yoğunluğu fonksiyonel sonuçları değiştirebilmektedir.

In-vivo ve in-vitro çalışmalarda santral sinir sistemi travması sonrası MAPK proteinlerinin mekanik etkilerle aktiveleştiği gösterilmiştir. ERK proteinlerinin travma sonrası hemen aktiveleştiği bilinirken p38 aktivasyonu değişkenlik gösterebilmektedir. Rat travma modellerinde travma sonrası ERK fosforilasyonunun korteks ve hipokampus bölgelerinde ilk 10 dakika içerisinde arttığı gösterilmiştir [72]. ERK aktivasyonu temel olarak nöronlarda (başlangıçta aksonlarda daha sonra somada) artmaktadır. Travmanın başlangıcında ERK inhibitörleri uygulanan ratlarda motor ve fonksiyonel becerilerin daha iyi olması ERK proteinlerinin nöronal fonksiyon ve nöroplastisite üzerine etkili olduğunu göstermiştir. Benzer travma modellerinde fare beyni nöronlarında fosforile ERK ve p38 düzeylerinin arttığı fakat JNK düzeylerinin değişmediği gösterilmiştir [73]. ERK aktivasyonu engellendiğinde travma sonrası ortaya çıkan doku kaybı azalmakta bunun da ERK aktivasyonunun zararlı etkilerinden olduğu görüşünü desteklediği bilinmektedir. Fakat ERK aktivasyonunun engellenmesinin belirgin bir motor kazanım sağlamadığı görülmüştür. ERK proteinlerinin tersine p38 inhibisyonunun travmaya ait lezyonlarda azalmayı sağlamadığı görülmüştür. Travmatik beyin yaralanmasının başlangıç safhalarında ERK aktivasyonu sonrası bu kinazların aktive ettiği matriks metalloproteinaz-9'lar ekstraselüler matriksin yıkımına neden olmaktadır [74]. TBH'nın ileriki aşamalarında ise bu metalloproteinazların aktivasyonu ile nöronal remodeling sağlanmasında faydalı olduğu bilinmektedir.

Sıvı perküsyon yöntemi ile oluşturulan kafa travması modellerinde MAPK aktivasyonları farklılık göstermektedir [75, 76]. Hipokampüsteki nöron ve astrositlerde ERK ve JNK fosforilasyonunun arttığı fakat p38'in etkilenmediği görülmüştür. TBH sonrası erken dönemde nöronlarda, geç dönemde ise astrositlerde

ERK aktivasyonu izlenmiştir. Sıvı perküsyon travmasında kortekste de hipokampüse benzer olarak ERK ve JNK aktivasyonu görülürken p38 aktivasyonu izlenmemiştir. Travmanın erken döneminde, kortikal yaralanmanın maksimum olduğu lezyon bölgesinin merkezinde nöronal olmayan hücrelerde ve lezyon çevresinde ise beyaz cevher içerisinde ve talamusta ERK aktivasyonu maksimum düzeydedir. Bunun tersine JNK ise travmanın çevresindeki dokuda nöronal olmayan hücrelerde ve aksonlarda aktive olmaktadır. TBH sonrası nöroplastisite üzerine yapılan çalışmalarda ERK fosforilasyonun travmadan 7 gün sonra oksipital ve pariyetal kortekste arttığı gösterilmiştir [77].

Bir ERK aktivatörü olan Ras proteinin kafa travması sonrası fare beyninde arttığı izlenmiştir. Ras inhibisyonunun ERK aktivasyonunu azalttığı görülmüş olup aynı sonuçların bir NMDA reseptör antagonisti olan MK-801 ile elde edilmiştir [13]. Her iki inhibitörün de lezyon boyutlarını küçülttüğü, nörolojik defisitleri azalttığı görülmüştür ki sonuç olarak nöronal ERK inhibisyonunun nöroprotektif etkilerinin olduğu sonucuna varılmıştır. TBH sonrası ortaya çıkan caspase-3 aktivasyonu ile aktifleşen apoptozun ve DNA parçalanmasının serbest radikal oluşumunun engellenmesi ve bu radikallerin uzaklaştırılması veya ERK inhibisyonu ile önüne geçilebilmektedir [78]. Travma sonrası ilk 10 dakika ile 24 saat arasında rat nöronlarında ERK fosforilasyonu artmaktadır. Travmanın ileriki dönemlerinde fosforile olmuş ERK nedeni ile hücre ölümü meydana gelmektedir. U0126 ile ERK aktivasyonunun engellendiği durumlarda travmadan 2 hafta sonra kortikal lezyonların ve kortikal atrofinin azaldığı gösterilmiştir.

MAPK'lar spinal kord travması sonrasında da aktifleşmektedirler. Ratlarda spinal kord kompresyonu sonrası apoptotik nöronlar içerisinde fosforile p38 ve JNK bulunmuştur [79]. Spinal kord kompresyon modelinde p38'in SB203580 ile inhibisyonu, myelin dejenerasyonunda azalma, apoptozda azalma, alt ve üst ekstremitelerde motor fonksiyonlarda düzelme sağlanmıştır [80].

In-vivo TBH çalışmaları sonrası artan ERK aktivasyonunun faydalı mı zararlı mı olduğu sorusunun kesin bir cevabı yoktur. Santral sinir sisteminin kompleks yapısına bakıldığı zaman bu sorunun basit ve tek bir cevabı olmayacağı sonucu aşikardır. Travma sonrası yanıtların farklı olması travmanın şiddetine, lokal ve diffüz

olup olmamasına, hasarlanan yapıların hücre tipine mevcut kinazların miktarı ve aktif olan kinazlarının farklılığına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Travmanın erken dönemlerinde aktive olan ERK ile ilkel nöronal yapıların ve ağların oluşması ile sonuçlanırsa zararlı sonuçlar ortaya çıkabilirken, geç dönemde ortaya çıkan ERK aktivasyonu ile nöroplastisitenin arttığı ve buna bağlı olarak iyi fonksiyonel sonuçlar alınabildiği görülmüştür. Fonksiyonel düzelmede ERK aktivasyonunun faydalı ve zararlı taraflarının keşfedilebilmesi için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.6.1.2. Protein Kinaz B (PKB, Akt)

Akt diğer adıyla Protein kinaz B hücre yaşam, metabolizma ve hücre siklüsü kontrollerinde yer alan önemli bir mediatördür. Bir serin/treonin kinaz olan Akt, Protein kinaz A (PKA), Protein kinaz G (PKG), Protein kinaz C (PKC) protein ailesi olan AGC kinaz ailesinin bir parçasıdır. Bu protein kinazlar cAMP, kalsiyum ve fosfolipidler gibi daha küçük ikincil mesajcılar ile regüle edilirler. Akt stimülasyonu kompleks bir süreç olup *fosfoinositid 3-kinaz* (PI3K)'ın Akt yi hücre membranına dahil etmesi ve sonrasında Thr208'in *phosphoinositid-dependent kinase-1* ile (PDK1) ile Ser473'ün bilinmeyen bir kinaz ile fosforilasyonu sonrası Akt aktivasyonu gerçekleşir. PI3K/Akt kompleksi pro-apoptotik proteinler olan Bad, IkappaB kinaz beta proteinlerini, FOXO protein ailesinden olan transkripsiyon faktörlerini ve Yes-associated proteinleri fosforile ederek inaktive eder ve hücre sağ kalımını destekler. Aktive Akt ayrıca apoptozu indükleyen JNK kinazlarında inhibe eder. Aktive Akt kompleksi JNK katlanma proteinlerine (JIP1) bağlanarak nöronları kainit aracılı eksitotoksisteden korur. AKT aynı zamanda GABA-A reseptörlerinin fosforilasyonu ile bunları regüle eder ki bunlar Huntington hastalığı, spinoserebellar ataksi, amyotrophic lateral skleroz (ALS) gibi nörodejenratif hastalıkların fizyopatolojisinde rol oynar. Aktive Akt'nin bir ALS modeli olan superoxide dismutase-1 eksikliği olan farelerin spinal kordlarında yapılan çalışmalarda motor hücre fonksiyonlarının korunmasında ve sağkalımlarını uzatmada etkili olduğu gösterilmiştir [81].

In-vivo koşullarda, immatur ratlarda yapılan kontrollü travma modellerinde Akt substratları olan glukoz transport proteinlerinde ve *forkhead* transkripsiyon faktörlerinde fosforilasyon artışı travmadan 24 saat sonra jel elektroforezi ile

gösterilmiştir [82]. Erişkin farede yapılan kontrollü travmalarda da kortikal lezyonda Akt fosforilasyonu izlenmiştir [83]. Fosfo-Akt temel olarak nöronlarla birlikte bulunur. Bir apoptoz markeri olan *TUNEL-staining* proteini fosfo-Akt pozitif olan nöronlarda izlenmemektedir. Bunların sonucunda Akt fosforilasyonunun TBH sonrası apoptozu engellediği sonucuna varılmıştır. Sinir transeksiyon çalışmalarında da Akt'nin nöronların korunmasında aksonal rejenerasyonda koruyucu rolü olduğu bilinmektedir [84]. Optik sinir transeksiyonu sonrası gecikmiş ganglion hücre ölümü ile Akt fosforilasyonu ilişkilendirilmiştir [85]. Spinal motor nöronlarda siyatik aksotomi sonrası Akt aktivasyonu izlenmiştir. Tüm bunlar göstermektedir ki PI3K/Akt sinyal yolları hücre sağkalımı ve tamir süreçlerinde rol almaktadır.

2.6.1.3. Glikojen sentaz kinaz-3 (GSK-3)

GSK-3 proteini insüline yanıt olarak ortaya çıkan glikojen metabolizmasında gösterilmiş olmasına rağmen son çalışmalarda nöronal yaşam, ölüm, proliferasyon ve diferansiyasyon olaylarında da rol aldığı gösterilmiştir [86, 87]. GSK-3 tüm hücre tiplerinde görülebilmemesine rağmen GSK-3 β izoformunda serin-9'un fosforillenmesi ile bu kinaz inaktive olur. Ser-9 fosforilasyonu ile oluşan pseudosubstrat bu enzimin substratlarının fosforillenmesini engeller. G-protein çiftleri ve bazı tirozin kinazlar ile aktive olan Akt, PKC, PKA, P70 s 6 kinaz gibi protein kinazlar Ser-9 fosforilasyonunu katalizlerler. GSK-3 birçok sinyal yolağı tarafından inhibe edilebilir. Glikojen sentaz'a ek olarak GSK-3'ün ; tau, β -katenin, eukaryotik initiation factor (eIF)-2B, cyclin D1, heat-shock factor-1, CREB, c-Jun, c-Myc ve nuclear factor of activated T cells (NFATc) gibi substratlarında bulunmaktadır. Bu proteinler birçok farklı temel hücrel reaksiyonda rol aldığı için GSK-3 temel bir hücrel regülatör fonksiyonu görür.

GSK-3'ün santral sinir sistemi travmaları ile ilişkisi daha az bilinmektedir. 17 günlük ratlarda 1. ve 3. Gün yapılan kontrollü orta şiddette kafa travmasında hipokampal kesitlerde *phospho-ser9-GSK3 β* düzeylerinde azalma olduğu görülmüştür [5]. Erişkin ratlarda 7. Servikal spinal kord seviyesinden yapılan hemiseksiyon sonrası GSK regülatörü lityum klorid ile *phospho-ser9-GSK3 β* düzeyleri arttırılmıştır ki bunun sonucunda ön ve arka ekstremitte fonksiyonlarında düzelme izlenmiştir.

2.6.2. Santral sinir sistemi travması sonrası in-vitro olarak yapılan protein kinaz çalışmaları

Santral sinir sisteminin kompleks yapısından dolayı bazı biyokimyasal olayları hücresel düzeyde in-vivo olarak çalışmak oldukça güçtür. Bu nedenle bazı in-vitro modeller geliştirilmiştir [88]. Nöronal hücre kültürlerinde kültür üzerine uygulanan yaralama, çizme gibi mekanik travmalar sonrasında in-vivo ortamdakine TBH benzeri astrosit proliferasyonu gibi yanıtları alınmıştır [89]. Bu modelde ayrıca in-vivo ortamdakine benzer ERK aktivasyonu yanıtları alınmıştır ki bu yanıtlar erken dönemde yaralanmış alanda olurken geç dönemde tüm astrosit tabakasında meydana gelmektedir [90]. In-vitro ortamda yapılan travma sonrasında astrositlerde matrix metalloproteinase-9 salgısı da artar. Astrositlerde görüldüğü haldenöronlarda görülmeyen bu yanıt ERK ve p38 aktivasyonu ile meydana gelmektedir [73].

Ellis ve arkadaşları tarafından oluşturulan bir diğer in-vitro travma modelinde ise TBH'da meydana gelen gerilme kuvvetleri sonucu oluşan hasarı modellemek amaçlanmıştır. Bu modelde hücre kültürü silastik bir membran üzerinde oluşturulmaktadır. Bu membranın özelliği üzerine kuvvet uygulandığında çok hızlı bir şekilde deforme olması ve daha sonra tekrar eski haline gelmesidir [91]. Bu travma modeliyle normal insanda görülen rotasyonel akselerasyon-deselerasyon esnasında oluşan travma modellenebilmektedir. Bu model ile oluşturulan travmalar sonrasında in-vivo ortamdakine benzer geçici kalsiyum artışları [92], fosfolipaz aktivasyonu [93] [94]), serbest radikal formasyonu [95] ve intraselluler ATP azalması [96] gibi yanıtlar elde edilebilmiştir. Uygulanan gerilim kuvvetinin şiddetine bağlı olarak da farklı oranlarda ERK aktivasyonu izlenmiştir [97]. Ayrıca gerilim kuvvetleri Ser473 fosforliasyonu ile Akt aktivasyonunda meydana getirmektedir. Travma sonrası Ser9 fosforliasyonu ile meydana gelen GSK-3 β inhibisyonu da izlenmiştir [98].

2.6.3. Travma ile artan ATP salınımı ile meydana gelen protein kinaz aktivasyonu

Yapılan son çalışmalarda kinazların aktifleşmesinde rol oynayan temel faktörlerden birinin ekstraselluler ortamda artan ATP olduğu gösterilmiştir. Membran bütünlüğünün bozulduğu durumlarda hızlı bir şekilde ortamdaki ATP ortamda artar

[99]. ATP p2-nükleotid reseptörleri aracılığı ile sürekli olarak ERK, Akt, GSK-3 β sinyallerini tetkikler [100-103]. Bu çalışmalar ışığında hücre kültürlerinde gerilim ile oluşturulan travma sonrası ortama eklenen bir difosfohidrolaz ile ortamdaki mevcut ATP AMP'ye indirgenmiş olup bunun sonucunda ortamdaki ERK düzeyinin %75 azaldığı gösterilebilmiştir [97]. Diğer bir yaklaşımda ise gerilim kuvveti ile oluşturulan travma sonrasında bir p2-nükleotid antagonisti uygulanması sonrası ortamdaki ERK ve Akt düzeyleri sırasıyla %75 ve %95 oranında azalmıştır.

ATP dışında bilinen bir diğer aktivatör ise ortamdaki glutamat aracılı eksisotoksistedir. İonotropik ve metabotropik glutamat reseptör blokajı ile aktifleşen ERK aktivasyonunu astrositlerde %10 oranında azaltmaktadır [104]. Buna bağlı olarak glutamat aracılı eksisotoksistenin astrositlerden ziyade nöronlarda meydana geldiği düşünülebilir.

2.6.4. Gelecek tedavi yaklaşımları

Bu bilgiler ışığında birçok ilginç soru ortaya atılabilir. Örneğin travma sonrasında oksidatif stres, metabolizma, inflamasyon, hücresel sinyallerde yapısal değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Travma sonrasında bunlara sebep olan genler acaba bu protein kinazlar ile regüle ediliyor olabilir mi? Bu genler ayrıca hücre yaşam ölüm siklüsünü, astrogliazis, nörodejenerasyon, aksonal rejenerasyon gibi olayları nasıl kontrol etmektedir?

Bu soruları bir kenara bırakacak olursak biliyoruzki hücresel sinyal yollarındaki değişikliklerin kanser, inflamasyon ve diyabet gibi bir çok hastalığa sebep olduğu biliniyor. Protein kinaz kaskadlarının daha detaylı keşfi ile bu sinyal yollarında yer alan daha küçük moleküler yapıların bulunması ve bunlara göre daha spesifik tedavi yöntemlerinin bulunması olasıdır [105, 106]. Örneğin *Gleevac*® isimli bir Abl kinaz inhibitörü günümüzde *kronik myeloid lösemi* tedavisinde kullanılmaktadır. Hali hazırda günümüzde yüksek selektif MAPK inhibitörleri deneme aşamasındadır [105]. U0126 ve PD 098059 potansiyel ve selektif olarak MEK aktivasyonunu engeller. SB 203580 ve SB 202109 MAPK aktivasyonu etkilemezken p38'i inhibe eder Wortmannin Akt sinyalizasyonunu bozarak PI3K'ı inhibe eder.

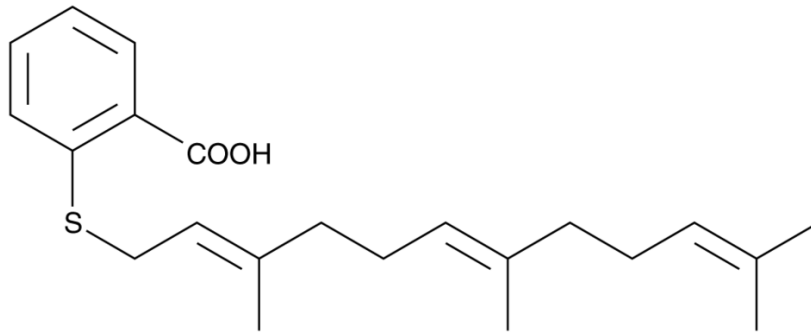
Wortmannin ayrıca ortamdaki konsantrasyonuna bağılı olarak Myosin light chain kinaz inhibisyonu da yapar.

2.7. RAS inhibitörü farnesiltiyosalisilik asit (FTS)

2.7.1. Genel bilgiler

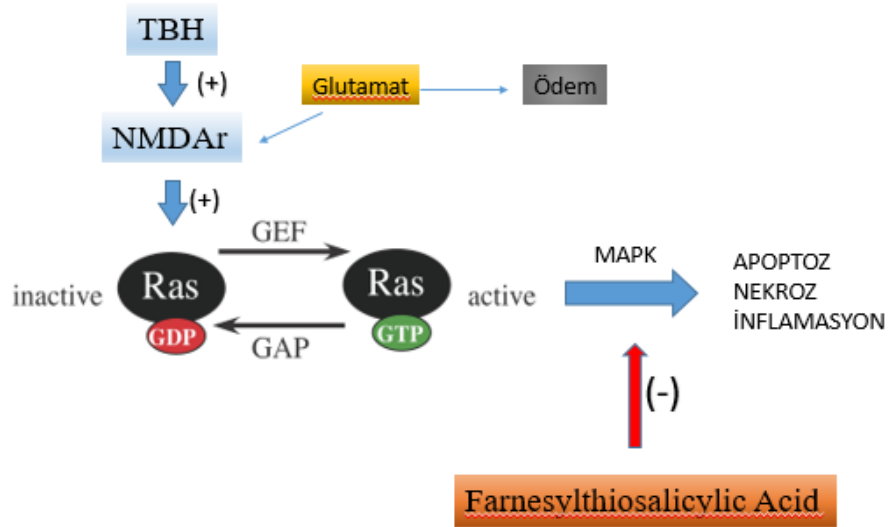
Farnesiltiyosalisilik asit (FTS, salisirab) $C_{22}H_{30}O_2S$ formülüne sahip 358.5 Kda olan bir moleküldür. Formal adı “2-[[*(2E,6E)*-3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-yl]thio]-benzoic acid”tir.

Şekil 2.7.1.1. FTS moleküler yapısı



Farnesiltiyosalisilik asit hücre içi Ras aracılı sinyalleri Ras'ın hücre membranından ayrılmasını engelleyerek bloke eder. İnaktif olan Ras hücre membranında GDP ile bulunur. GDP fosforilasyonu ile aktifleşen RAS-GTP kompleksi hücre içi substratlarına bağlanarak apoptoz, nekroz, inflamatuvar yanıtlara sebep olur.

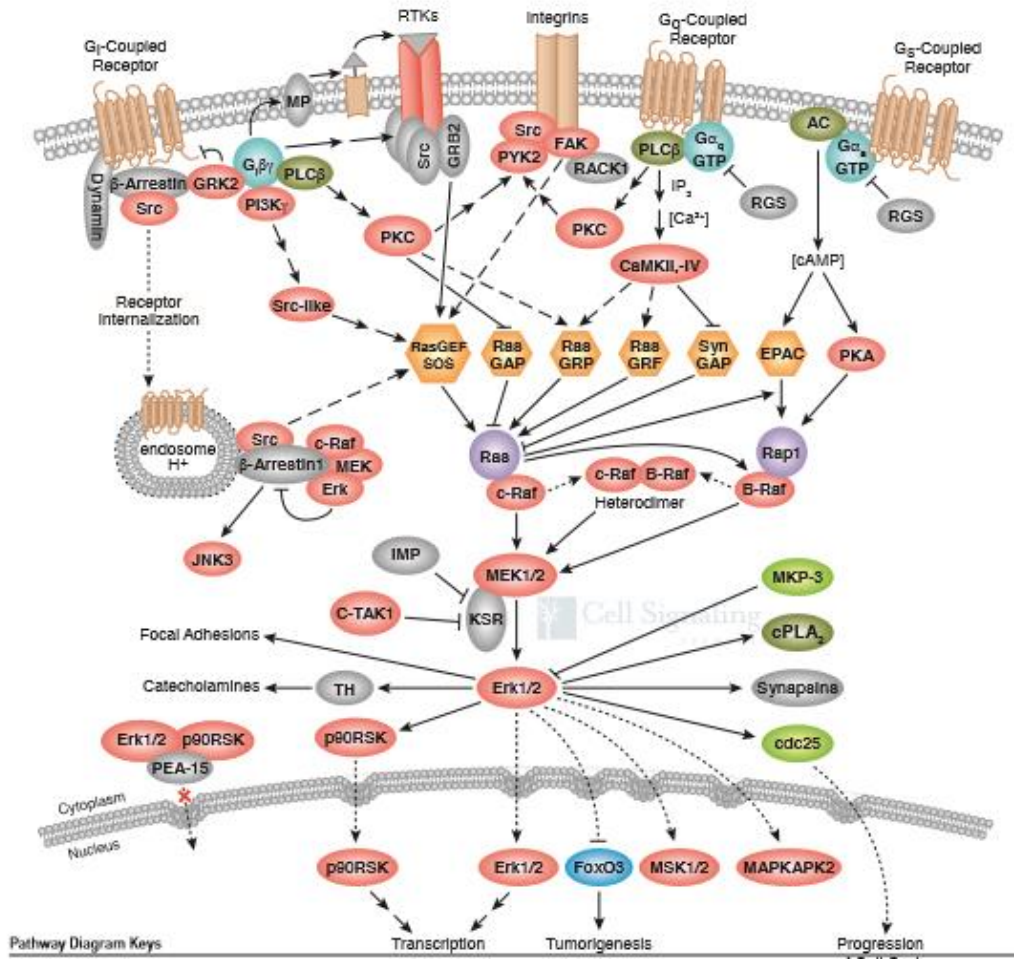
Şekil 2.7.1.2. Travmaya RAS protein yanıtı ve FTS



Travmatik beyin hasarı sonrası primer yaralanma meydana geldikten sonra glutamat aracılı eksisotoksisite ve sekonder yaralanmaya sebep olacak kaskadlar aktifleşir. TBH sonrası glutamat NMDA reseptörlerini tutunur ve bunun sonucunda post sinaptik membranda transmembran proteinleri ile hücre içi membrana bağlı bulunan ve GDP ile inaktif formunda olan RAS proteini *Guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) ile fosforile edilerek aktifleştirilir. RAS-GTP kompleksi aktif formdadır ve aktifleştikten sonra hücre içi substratları olan Erk/MAPKs ve diğer birçok protein ile bağlanarak apoptoz, nekroz, hücre yaşam ölüm siklusu ile ilişkili birçok reaksiyonun başlamasına sebep olur. Aktif RAS-GTP kompleksi ise normal koşullarda *GTPase activating proteins* (GAPs) ile defosforile edilerek inaktif formuna döner. Aktif RAS-GTP kompleksi travmatik beyin hasarı sonrası ortaya çıkan sekonder beyin hasarında anahtar rol oynatan bir protein kompleksidir.

FTS aktif RAS-GTP kompleksine bağlanıp bu proteini selektif olarak inhibe eder. Daha önce hayvan TBH modellerinde uygulanan FTS'nin kontüzyo volümünde %50 oranına küçülmeye ve %60 oranında fonksiyonel iyileşme sağladığı gösterilmiştir [13].

Şekil 2.7.1.3 G-protein reseptör aracılı MAPK/ERK kaskadlarında rol alan proteinler



Şekil “Cell Signaling Technology, Inc. (www.cellsignal.com)” izni alınarak kullanılmıştır

FTS sadece RAS-GTP kompleksine yani aktif RAS kompleksine bağlanmasından dolayı aktivite bağımlı bir inhibitördür ve bu yüzden hayvanlarda toksisite ve advers etkisi bulunmamaktadır [12].

2.7.2. TBH ve FTS

Daha önce yapılan çalışmalarda FTS'nin sistemik olarak uygulanmasından sonra çıkarılan hayvan beyin homojenatlarında FTS'nin yaklaşık 20-30 dakika içerisinde beyinde maksimum konsantrasyona çıktığı ve yaklaşık olarak 2 saat boyunca yüksek düzeyde kaldığı izlenmiştir [13]. Kafa travması hayvan modellerinde yapılan incelemerde kontüzyon olan tarafta; olmayan tarafa ve sham grubuna göre fosfo_erk ve RAS düzeylerinin travmadan yaklaşık 10 dakika sonra arttığı ve 2 saat boyunca yüksek olduğu görülmüştür [13].

Jansen ve arkadaşlarının yaptığı hayvan çalışmalarında 5 mg/kg dozunda uygulanan FTS'nin yan etki yaratmadan tümör supresyonu göstermesi nedeniyle Shohami ve arkadaşlarının kafa travması hayvan modelinde bu dozda sistemik olarak uygulanan FTS'nin normal şartlarda travmadan sonra 2 saat süreyle yüksek kalan RAS-GTP miktarında anlamlı düzeyde azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir [13]. Travmanın 24. saatinden sonra (RAS-GTP düzeylerinin neredeyse normale dönmesinden sonra) uygulanan FTS'nin faydası gösterilememiştir.

Travma sonrası oluşan kontüzyo volümleri yaklaşık olarak 3-7 gün arasında stabil boyutlara ulaşmaktadır. Bunlar daha sonra doku kaybı ve kavitasyon ile sonuçlanmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda Sistemik olarak uygulanan FTS'nin kontrol grubuna göre kontüzyo volümlerinde anlamlı küçülme sağladığı ayrıca 1. hafta sonunda nörolojik düzelmenin kontrol grubuna göre %60 oranında daha iyi olduğu görülmüştür [13].

Tüm bu bilgilerin ışığında erken dönemde uygulanacak olan FTS'nin uzun dönemde nöroprotektif etkileri bulunmakta, nörolojik iyileşmeyi hızlandırmaktadır.

2.7.3. Hibrit nanopartikül (HNP)

Nanopartiküller, ilaç moleküllerinin limitleyici karakteristik özelliklerini maskeleyerek ve stabilitesini arttırarak membran bariyerlerini aşmasını sağlar. Nanopartiküller aracılığı ile verilen ilaçlar ortamda daha uzun süre kalıp daha kontrollü ilaç salınımı sağlayabilirler. FTS tek başına kan beyin bariyerini etkin konsantrasyonda geçememektedir [107]. Çalışmamızda FTS'yi HNP'ye yükleyerek kontüzyo volümü içerisinde daha uzun etkili salınım sağlanması amaçlanmıştır. Daha uzun ve kontrollü salınım ile ilaçların tek başına verildiği zaman ortaya çıkan yan etkiler azaltılabilir ayrıca ilacın daha düşük dozlarında daha büyük etkinlik sağlanabilir.

Tez çalışmamızda lipid-polimer hibrit nanopartikülleri hazırlanmıştır. Lipid-polimer hibrit nanopartikülleri ilaç taşıyıcı sistem olarak pek çok hastalığın tedavisinde ümit vaad eden sonuçlar vermektedir. Bu sistemler hidrofobik polimerik çekirdek ve lipid tabakası ile ayrılan bir hidrofilik polimerik kabuktan meydana gelmektedir. Lipid-polimer hibrit nanopartikülleri lipozomlar vrnanopartiküllerin avantajlarını (lipozomların biyolojik membranlar ile etkileşme, nanopartiküllerin stabilite avantajları) bir araya getiren ilaç taşıyıcı sistemleridir. Ayrıca suda az çözünen ilaçların yüksek derecede enkapsülasyonu, uzun süreli ilaç salınımı, mükemmel serum stabilite ve değişik hücrelere hedeflendirilmeleri gibi avantajları da bulunmaktadır [108].

Çalışmamızda HNP polimer ağırlığının %5'i kadar FTS yüklemesi yapılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda %5'den fazla yapılan yüklemelerde anlamlı fark sağlanamamıştır. Hibrit nanopartiküllerin hazırlanmasında çekirdek (nispeten hidrofobik polimer) olarak FDA onaylı, toksik olmayan, biyogeçimli ve biyoparçalanır olan sentetik bir polimer olması nedeniyle PLGA seçilmiştir. DOTAP içeren HNP formülasyonu ile invitro ortamda FTS salınımı 150 saat kadar sürmektedir. Bu uzun etkinlik süresi nedeniyle DOTAP içeren HNP polimeri tercih edilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney hayvanları ve barınma koşulları

Bu araştırma, Hacettepe Üniversitesi Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü Beyin Araştırmaları Laboratuvarları'nda yürütülmüştür. Çalışmada, ağırlığı 25 - 35 gram arasında olan toplam 25 adet erişkin Swiss Albino erkek fare kullanılmıştır. Standart barınak koşullarında, polikarbon kafeslerde, 12 saat aydınlık – 12 saat karanlık döngüsü döngü 08:00'de başlamaktadır), 22±1°C sıcaklık, % 30-55 nem oranı ve su ile yiyeceğe sınırsız erişim (*ad libitum*) sağlanmıştır. Fareler üzerinde uygulanan tüm deney paradigmaları, ulusal ve uluslararası hayvan deneyleri mevzuatına ve kılavuzlarına uygun olup; **Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu** tarafından **29.08.2016** tarih ve **2016/40-1** karar numarası ile onaylanmıştır.

3.2. Deney grupları ve protokol

Çalışmada toplam 25 adet fare kullanılmıştır. 5 ayrı grup ve her grupta 5 fare (n=5) olacak şekilde gruplandırma yapılmıştır. Hayvanlara 7.5 cm yükseklikten 67 gr olacak olacak şekilde serbest ağırlık düşürerek yakın kafa travması modeli uygulanmıştır. Bu travma modelinde mevcut ağırlık ve yükseklik ile orta şiddette kafa travması elde edilmiştir. Hafif şiddette (67 gr ağırlık, 5 cm yükseklik) yeterli kontüzyon elde edilme olasılığı düşük olup ağır kafa travmasında (67 gr ağırlık, 10 cm yükseklik) mortalite oranının yüksek olmasından dolayı orta şiddette kafa travması modeli tercih edilmiştir. 5 hayvan sham grubu, 5 hayvan kontrol grubu geriye kalan 15 hayvan ise deney grupları olarak sınıflandırılmıştır. Hayvanların gruplara göre dağılımları şu şekildedir:

Grup 1: Sham grubu (5 hayvan): Bu gruptaki hayvanlara induksiyonda %5, idamede %2'lik izofloran anestezisi uygulanmıştır. İzofloran anestezisi altında farenin skalpine orta hat insizyonu yapılarak kranium, sagittal sütür ve sağ parietal kemik ekspoz edilmiştir. Ardından insizyon 6.0 prolen dikiş ile sütüre edilerek hayvanın ayılması beklenmiş, ardından kafesine alınmıştır.

Grup 2: Kontrol grubu (5 hayvan): Bu gruptaki hayvanlara indüksiyonda %5, idamede %2'lik izofloran anestezisi uygulanmıştır. İzofloran anestezisi altında farenin skalpine orta hat insizyonu yapılarak kranium, sagittal sütür ve sağ frontal kemik ekspozé edilmiştir. Hayvan ağırlık düşürme (travma) düzeneğine yerleştirilerek 7.5 cm yükseklikten 67 gr ağırlığında silindirik ağırlık sağ parietal kemik üzerine düşürölüp travmadan hemen sonra ağırlık kaldırılmıştır. Sedasyon altında 6.0 prolen ile skalp insizyonları kapatılıp ayılmaları beklenmiş, ayılan hayvanlar kafeslerine alınmıştır.

Grup 3: Travma sonrası intravenöz FTS uygulanması (5 hayvan): Bu gruptaki hayvanlara indüksiyonda %5, idamede %2'lik izofloran anestezisi uygulanmıştır. İzofloran anestezisi altında farenin skalpine orta hat insizyonu yapılarak kranium, sagittal sütür ve sağ frontal kemik ekspozé edilmiştir. Hayvan ağırlık düşürme (travma) düzeneğine yerleştirilerek 7.5 cm yükseklikten 67 gr ağırlığında silindirik ağırlık sağ parietal kemik üzerine düşürölüp travmadan hemen sonra ağırlık kaldırılmıştır. Sedasyon altında 6.0 prolen ile skalp insizyonları kapatılıp ayılmaları beklenmiş, ayılan hayvanlar kafeslerine alınmıştır. Travmanın uygulanmasından sonra 1. saatte bu gruptaki hayvanlar kafeslerinden alınarak kuyruk veninden FTS verilmiş ve tekrar kafeslerine konulmuşlardır.

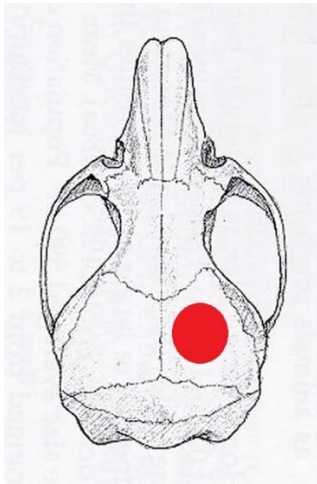
Grup 4: Travma sonrası intravenöz nanoparça (taşıyıcı) uygulanması (5 hayvan): Bu gruptaki hayvanlara indüksiyonda %5, idamede %2'lik izofloran anestezisi uygulanmıştır. İzofloran anestezisi altında farenin skalpine orta hat insizyonu yapılarak kranium, sagittal sütür ve sağ frontal kemik ekspozé edilmiştir. Hayvan ağırlık düşürme (travma) düzeneğine yerleştirilerek 7.5 cm yükseklikten 67 gr ağırlığında silindirik ağırlık sağ parietal kemik üzerine düşürölüp travmadan hemen sonra ağırlık kaldırılmıştır. Sedasyon altında 6.0 prolen ile skalp insizyonları kapatılıp ayılmaları beklenmiş, ayılan hayvanlar kafeslerine alınmıştır. Travmanın uygulanmasından sonra 1. saatte bu gruptaki

hayvanlar kafeslerinden alınarak kuyruk veninden nanoparça verilmiş ve tekrar kafeslerine konulmuşlardır.

Grup 5: Travma sonrası intravenöz nanoparçaya yüklenmiş FTS uygulanması (5 hayvan): Bu gruptaki hayvanlara indüksiyonda %5, idamede %2'lik izofloran anestezisi uygulanmıştır. İzofloran anestezisi altında farenin skalpine orta hat insizyonu yapılarak kranium, sagittal sütür ve sağ frontal kemik ekspoze edilmiştir. Hayvan ağırlık düşürme (travma) düzeneğine yerleştirilerek 7.5 cm yükseklikten 67 gr ağırlığında silindirik ağırlık sağ parietal kemik üzerine düşürülüp travmadan hemen sonra ağırlık kaldırılmıştır. Sedasyon altında 6.0 prolen ile skalp insizyonları kapatılıp ayılmaları beklenmiş, ayılan hayvanlar kafeslerine alınmıştır. Travmanın uygulanmasından sonra 1. saatte bu gruptaki hayvanlar kafeslerinden alınarak kuyruk veninden nanoparçaya yüklenmiş FTS verilmiş ve tekrar kafeslerine konulmuşlardır.

Her bir gruptaki hayvanlara uygulanan işlemler aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Şekil 3.2.1. serbest ağırlıklar şekilde sağ parietal kemik üzerinde kırmızı olarak işaretlenen alana düşürülmüştür.



3.3. Anestezi ve yaşamsal bulguların takibi:

Deney başlangıcında ağırlık ölçümünü takiben, genel anestezi induksiyonu %5'lik izofloran inhalasyonu ile gerçekleştirilmiş ve idame %2'lik izofloran ile (tüm işlemler süresince) sağlanmıştır. Arka ayak sıkıştırma yöntemi ile anestezi derinliği kontrol edildikten sonra fareler yüz üstü pozisyonda ağırlık düşürme düzeneğine yerleştirilmiştir. Hayvana yüz maskesi ile deney süresince oksijen desteği ve izofloran anestezisi uygulanmıştır. Deney esnasında sürekli olarak kalp atım sayısı ve kan oksijen satürasyonu pulse oksimetre ile (V3304 Digital Table-Top Pulse Oximeter, SurgiVet, Amerika Birleşik Devletleri) monitörize edilmiştir. Tüm işlemler boyunca ortalama 2 L/dk oksijen desteği sağlanmış ve fare kendiliğinden solunumu devam eder vaziyette takip edilmiştir. Oksijen satürasyonu deney süresince %92'nin üzerinde tutulmuştur. Rektal sıcaklık probu ve homeotermik battaniye yardımı ile (Harvard Apparatus Limited, İngiltere) vücut sıcaklığı $37.0\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 'de tutulmuştur.

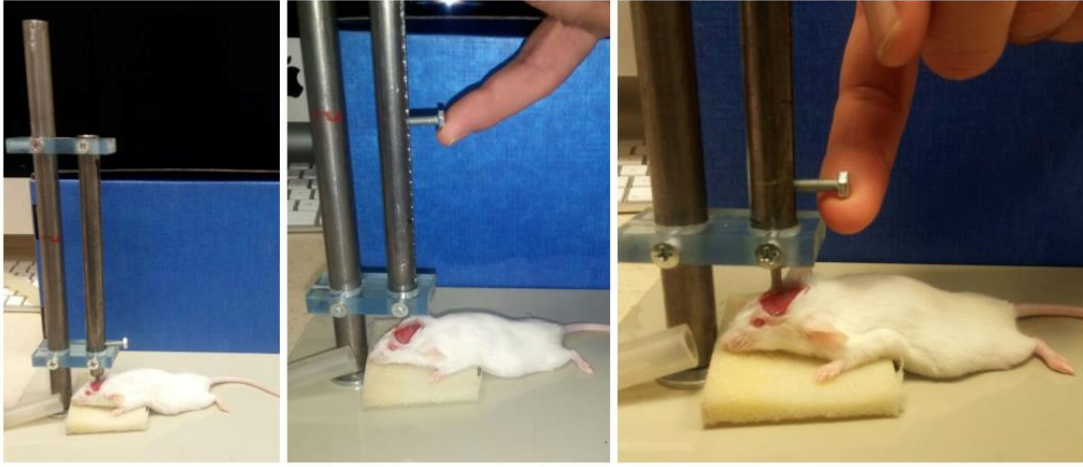
Şekil 3.3.1. Kraniyumun ortaya konulması



3.4. Kafa travmasının oluşturulması

Anestezi altında fare kafatası üzerindeki deri orta hat insizyonu ile açılarak kranium bütünüyle ortaya konmuştur (her iki frontal ve parietal kemikler, oksipital kemik görünecek şekilde). Kranium ekspozisyonu sağlandıktan sonra hayvanlar

travma düzeneğine alınmıştır. Şekil 3.4.1’de görülen ağırlık düşürme düzeneğinin altına hayvan, sağ parietal kemik tam olarak silindirik ağırlığın teması yüzeyine denk gelecek şekilde yerleştirilmiş ve izofloran ve O₂ desteği altında silindir biçimindeki 67 gram’lık çelik ağırlık 7.5 cm yükseklikten düşürülmüştür. Travmanın hemen sonrasında ağırlık kaldırılmış ve hayvanın ayılması beklenmiştir. Ayılma esnasında O₂ desteğine devam edilmiştir.



Şekil 3.4.1. Ağırlık düşürme düzeneği ile kafa travmasının oluşturulması. Silindirik tüp içerisine vertikal olarak yerleştirilmiş 6 mm çaplı (temas eden ucu 3 mm çaplı, 1 cm uzunluğunda; ana gövde ile birleşik), 10 cm uzunluğunda 67 gram ağırlığında metal ağırlık, üzerindeki horizontal kol yardımıyla istenilen yükseklikten düşürülebilmektedir.

3.5. Hibrit Nanopartiküllerin (HNP) Hazırlanması

HNP emülsiyon sonikasyon metodu ile hazırlanmıştır. Kısaca, organik fazın bir serisinin elde edilmesi için, Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA- 50:50) asetonitrilde çözülmüş (2.5 µg/mL) ve polimer oranının %5' i (a/a) kadar farnesil tiyosalisilik asit (FTA) organik faza ilave edilmiştir. Su fazını elde etmek için 1 mg/mL konsantrasyonda Lesitin, DSPE-PEG ve DOTAP ayrı ayrı %4 (h/h) etanolde çözülmüş ve deiyonize su ile karıştırılmıştır. Organik faz sulu faza damlalar halinde ilave edilmiş (organik faz:sulu faz oranı, 1:10)ve ağzı kapalı bir vial içinde Branson B 220 Smith Kline (USA) ultrasonik banyo kullanılarak (42 kHz, 100 W) 5 dakika sonikasyon

uygulanmıştır. Sonuç olarak, HNP filtreli santrifüj tüpleri (Millipore, 10 kDa) ile santrifüj edilmiş ve 3 kez PBS (pH 7.4) ile yıkanmıştır. Oluşan HNP'ler (polimer miktarının 30%' u (a/a) kadar PEG içeren) taze hazırlanmıştır.

3.6. Nörolojik değerlendirme

Daha önce yapılan hayvan kafa travması modellerinde RAS-GTP kompleksinin ve buna bağlı olarak fosfo-ERK düzeylerinin 30 dakikada yükselmeye başladığı beyinde yaklaşık olarak 2 saat süreyle maksimum düzeyde kaldığı ve 24. Saatten sonra normal düzeylere indiği gösterilmiştir [13]. Bu nedenle hayvalara nörolojik değerlendirmeler travmadan sonra 24. saatte ve 5. günde sakrifikasyon öncesinde yapılmıştır.

Hayvanların nörolojik değerlendirmeleri Beni-Atani ve arkadaşlarının tanımladığı Tablo 3.5.1'de gösterilen “*modified neurologic severity score (mNSS)*” ile yapılmıştır. Bu skorlama hayvanların fonksiyonel durumlarını değerlendirmek için kullanılmaktadır. 0 puan hiç nörolojik kaybı olmayan, 18 puan ise ağır nörolojik disfonksiyonun olduğu ve hiçbir görevi gerçekleştiremeyen hayvanları ifade etmektedir. İlk muayene travmadan sonra 24. Saate yapılmış olup hayvanların nörolojik durumları kayıt altına alınmıştır. 2. Nörolojik değerlendirme ise travmadan sonra 5. Günde yapılmıştır. Nörolojik muayeneler “çalışmaya kör” bir gözlemci tarafından yapılmıştır. 24. Saat ve 5. Gün sonunda yapılan muayeneler ile ilk muayeneler arasındaki puan farkı $\Delta mNSS$ olarak kaydedilmiştir. Aradaki farkın büyüklüğü fonksiyonel düzelmelerin derecesi ile doğru orantılıdır. Bu puanlar FTS'nin fonksiyonel düzelmeye üzerine etkisinin gösterilmesi için kullanılmıştır.

Tablo 3.6.1. Modified neurologic severity score (mNSS)

<i>Test</i>	<i>Puan</i>
<i>Kuyruğundan tutularak kaldırılma</i>	
Ön ekstremitede fleksiyon yok	1
Arka ekstremitede fleksiyon yok	1
30 saniye içerisinde kafanın vertikal düzlemden 10 derece ve daha fazla kaldırılması yok	1
<i>TOPLAM</i>	3
<i>Farenin yere konulması (sadece bir tanesi seçilir)</i>	
Normal yürüme	0
Düz yürüyememe	1
Paretik taraf boyunca halkasal hareket	2
Paretik tarafa düşme	3
<i>Duyu testleri</i>	
Görsel ve taktil uyarana yanıt yok	1
Propriyosepsiyon yanıtı yok	1
<i>TOPLAM</i>	2
<i>Silindir denge testi (sadece bir tanesi seçilir)</i>	
Sabit postürle dengeli duruş var	0
Silindire tutunma	1
Silindire tutunma ve 1 ekstremitenin düşmesi	2

Silindire tutunma ve 2 ekstremitenin düşmesi	3
Dengede durmaya çalışma fakat düşme (>40 sn)	4
Dengede durmaya çalışma fakat düşme (>20 sn)	5
Düşme, denge veya tutunma çabası yok	6
<i>Refleks kaybı ve anormal hareketler</i>	
Pinna refleksi (eksternal auditor meatusa dokunulduğunda başın sallanması) yok	1
Kornea refleksi yok	1
İrkilme refleksi (ellerin çırpılmasıyla ortaya çıkan sese tepki) yok	1
Nöbet, myoklonus, myodistoni var	1
Toplam	4
Toplam	18

Herbir refleksin yokluğu veya belirtilen görevi yerine getirememesi pozitif puan olarak eklenir. 1-6 puan hafif, 7-12 orta şiddette, 13-18 ağır şiddette kafa travması olarak sınıflandırılır.

3.7. Radyolojik değerlendirme

5.günün sonunda hayvanlar Bilkent Üniversitesi Ulusal Manyetik Rezonans Araştırma Merkezi (UMRAM)'ne götürülerek magnetik rezonans görüntülemeleri yapılmıştır. *Philips Ingenia 1.5 S™* ile T2 ağırlıklı aksiyel görüntülemeler elde edilmiştir. MRG çekimi esnasında hayvanlara Ketamin/xylasin ile sedasyon sağlanmıştır. Görüntülemeler “çalışmaya kör nöroradyolog” tarafından rastgele denek seçilerek yapılmıştır. Radyolojik olarak T2 kesitlerde kontüzyon/penumbra alanları volumetrik olarak hesaplanmıştır. Kontüzyon etrafındaki penumbra alanı T2 sekansa artmış intensite göstermekte olup ödem alanı ile korelasyon gösterir [109]. Volumetrik

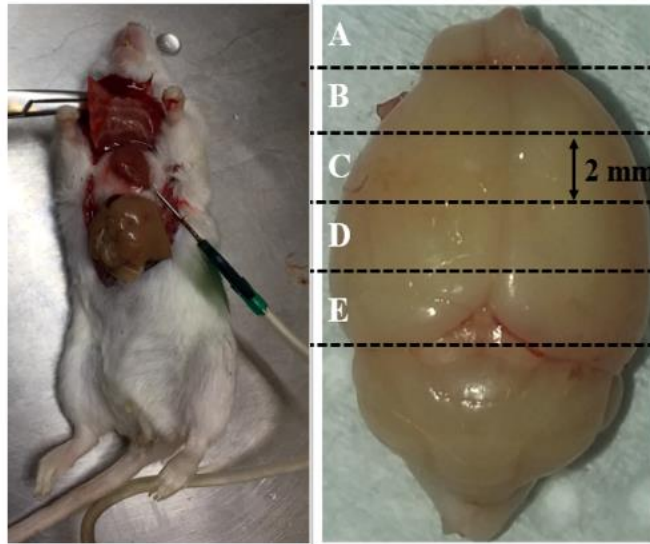
hesaplama $\frac{AxBxC}{2}$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Bu formülde A aksiyel kesitlerde kontüzyonun en geniş olduğu yerdeki genişliği, B ise A'ya dik olarak çizilen uzunluğu, C ise kesit sayısını ifade eder. Kesit sayısı eğer aksiyel kesitlerde kontüzyo genişliği en geniş kesittekinin %75 ve üzerinde ise kesit sayısı 1, %25-75 arası ise 0.5, %25'ten düşük ise 0 olarak hesaplanır. Bu hesaplama yöntemi bilgisayarlı planimetrik metod ile kıyaslandığında yüksek oranda güvenilir bir metoddur [110, 111].

3.7 Tetrazolium (TTS) ile değerlendirme

Kimyasal adı 2,3,5, *triphenyl, 2H-tetrazolium chloride (TTC)* olan terazolium tuzu mitokondriyal enzimlere bağlanarak oksidatif reaksiyonları gerçekleştiren hücrelerde reaksiyon verir. Kafa travması sonrası kontüzyon oluşan dokularda daha sonra enfarkt meydana gelir. TTS uygulanan beyin parankiminde enfarkt alanlarında TTS ile boyanma gerçekleşmez. % 0,05 olarak hazırlanmış TTS boyası enfarkttta uğramış parankim ile sağlam parankim arasında optimum demarkasyon hattı oluşturabilecek konsantrasyondur [112]. % 0,05 konsantrasyonda hazırlanmış TTS çözeltisi +4 °C ortamda ve ışık almayacak şekilde her beyin için ayrı ayrı hazırlanmış kutulara konulmuştur. Sakrifikasyon sonrası çıkarılan fare beyinleri “slicing” işlemi sonrası kesitler toplam 20 dakika TTS içerisinde tutulup daha sonra ölçüm için solüsyondan çıkarılmıştır. Kesitler ışık mikroskobu altına alınarak referans ölçüm cetveli ile fotoğraflanıp dijital ortama aktarılmıştır. Dijital resimlerde enfarkttın en geniş olduğu kesitlerde ölçümler mm² cinsinden ölçümler yapılmıştır. Ölçümler “*NIS Elements Advanced Research, NIKON instruments, EUROPE B.V.*” yazılımı kullanılarak planimetrik olarak hesaplanmıştır.

3.8. Sakrifikasyon ve beyinlerin çıkarılması, kesitlerin alınması

5. gün nörolojik ve MRG ile değerlendirmeleri yapılan hayvanlar sakrifiye edildi. Bunun için yüksek doz kloralhidrat anestezisi altındaki hayvanlara torakotomi yapılarak kalp ortaya konulduktan sonra sol ventrikülden hayvanın karaciğeri beyazlaşmaya kadar heparinli solüsyon verildi. Hemen ardından dekapitasyon yapılarak beyinler çıkarıldı ve slicing yapıldı (Şekil 3.8.1) ve kesitler TTS solüsyonlarına konuldu ve 20 dakika uygulama sonrası kesitler çıkarılarak ışık mikroskobu altında resimler alındı ve *NIS- Elements Advanced Research (Nikon instruments , EUROPE)* yazılımı ile yüzey ölçümleri yapıldı.



Şekil 3.8.1. Torakotomi, kardiyak perfüzyon ve beyin koronal düzlemde kesitlerinin alınması (slicing)

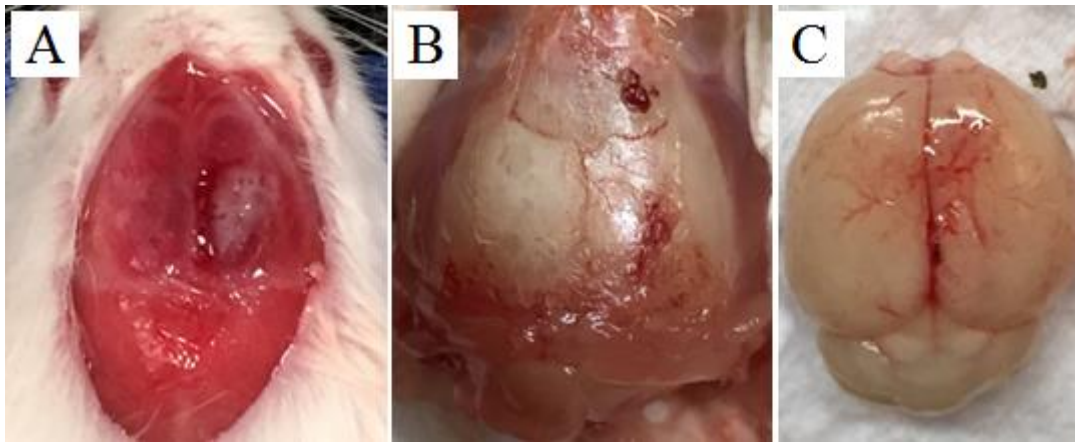
3.9. İstatistik Değerlendirme

Çalışmada elde edilen verilerin değerlendirilmesi için *SPSS for Windows 23 IBM inc. (USA)* programı kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma olarak sunulmuştur. İki den fazla sayıda bağımsız grubun ortalamalarının karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi, iki bağımsız grubun ortalamalarının karşılaştırılmasında ise Mann Whitney U testi kullanıldı, $P < 0,05$ anlamlı kabul edildi.

4. Bulgular

4.1. Kafa travmasının şiddeti

Yapılan çalışmada 2 hayvanda kafatası kırığı meydana gelmiştir. Mortalite izlenmemiştir. Travma sonrası hayvanlarda oksijen desteği altında komplikasyon gelişmemiştir ve stabil seyretmişlerdir.



Şekil 4.1.1:

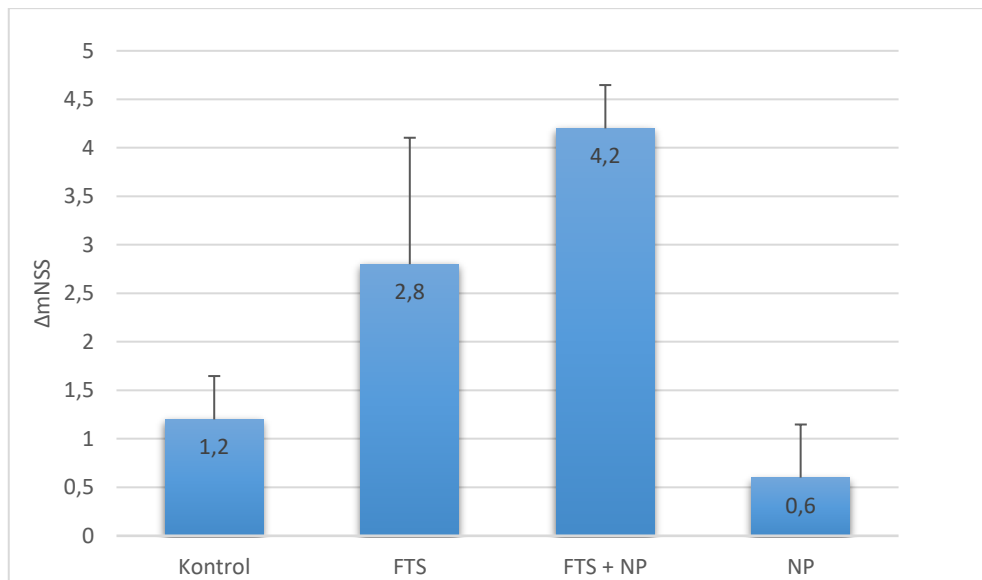
Şekilde oluşturulan kafa travması sonrası kafa tası kırıkları (A-B) görülmektedir. Ayrıca travmaya bağlı izlenmiş subaraknoid kanama da (C) şekilde görülmektedir.

4.2. Nörolojik muayene sonuçları (mNSS)

Deneklerin nörolojik değerlendirmeleri kafa travması oluşturulduktan sonra 1. günde ve 5. Günde yapılmıştır. Yapılan nörolojik değerlendirmeler sonucunda sham grubunda herhangi bir nörolojik kayıp izlenmemiştir. Kontrol grubunda yapılan değerlendirmede mNSS skorları 24. Saatte ortalama olarak 8,6 (en düşük 7, en büyük 11, standart deviasyon 1,51, n=5) olarak hesaplanmıştır. 5. Gün yapılan muayenede ise 7,4 (en düşük 6, en yüksek 9, standart sapma 1,14, n=5) olarak hesaplanmıştır. Farnesiltiosalisik (FTS) alan grupta 24. Saat mNSS skoru ortalama 7,2 (en düşük 6, en

yüksek 8, standart sapma 0,83, n=5), 5. gün mNSS skoru ortalama 4.2 (en düşük 3, en yüksek 5, standart sapma 0,83, n=5) olarak bulunmuştur. Nanoparçaya (NP) yüklenmiş Farnesiltiosalisilikasit alan grupta (FTS + NP) 24. Saat mNSS skoru ortalama 7.6 (en düşük 7, en yüksek 8, standart sapma 0,54, n=5), 5 gün yapılan değerlendirme sonrası mNSS skoru ortalama 3.4 (en düşük 2, en yüksek 4, standart sapma 0,89, n=5) olarak hesaplanmıştır. Sadece Nanoparça (taşıyıcı) verilen grupta 24. Saat mNSS skoru ortalama 8,8 (en düşük 7, en yüksek 10, standart sapma 1,09, n=5), 5 gün sonunda yapılan değerlendirme sonucunda mNSS skoru ortalama 8,2 (en düşük 6, en yüksek 9, standart sapma 1,3, n=5) olarak hesaplanmıştır.

1. Gün sonunda yapılan ve 5. Gün sonunda yapılan nörolojik değerlendirme puanları arasındaki farklar deneklerin bu 5 gün içerisindeki nörolojik olarak düzelmelerini yansıtmaktadır. Bu fark Δ mNSS olarak hesaplanmıştır. Gruplar arasındaki nörolojik düzelmeye düzeylerinin karşılaştırılabilmesi için Δ mNSS skorları karşılaştırılmıştır. Yüksek Δ mNSS skorları daha iyi nörolojik düzelmeyi gösterir. Δ mNSS skorlarının karşılaştırılması sonucunda kontrol grubunda ortalama Δ mNSS $1,2 \pm 0,44$, sadece FTS alan grupta $2,8 \pm 1,3$, FTS+NP alan grupta ortalama $4,2 \pm 0,44$, sadece NP (taşıyıcı) alan grupta ise ortalama $0,6 \pm 0,54$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.2.1.)



Şekil 4.2.1. : Sırasıyla kontrol, FTS alan grup, FTS + NP alan grup ve sadece NP (taşıyıcı) alan grupların Δ mNSS puanları verilmiştir. Yüksek Δ mNSS puanı daha iyi nörolojik düzelmeyi göstermektedir.

Gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda ;

Kontrol grubu ile sadece FTS alan grup karşılaştırıldığında 24. Saat sonunda yapılan muayene sonucunda FTS alan grupta kontrol grubuna göre ortalama olarak %19.4'lük bir iyileşme izlenmiştir. Mevcut muayeneler 5. Günde yapıldığında sadece FTS alan grupta kontrol grubuna göre iyileşme oranı %43 daha iyidir. İstatistiksel olarak mevcut iyileşme düzeylerinin karşılaştırılabilmesi için Δ mNSS skorları karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak Kontrol grubunda Δ mNSS puanı ortalama olarak 1,2 iken , FTS alan grupta Δ mNSS puanı 2.8 olarak hesaplanmıştır. Sekonder hasarın oluşmuş olduğu bu 5. Günün sonunda FTS alan grupta kontrol grubuna göre %43'lük iyileşme istatistiksel olarak anlamlılığa yakındır ($p=0,056$, Mann-Whitney U, 2-sided, non-parametric, $n=10$).

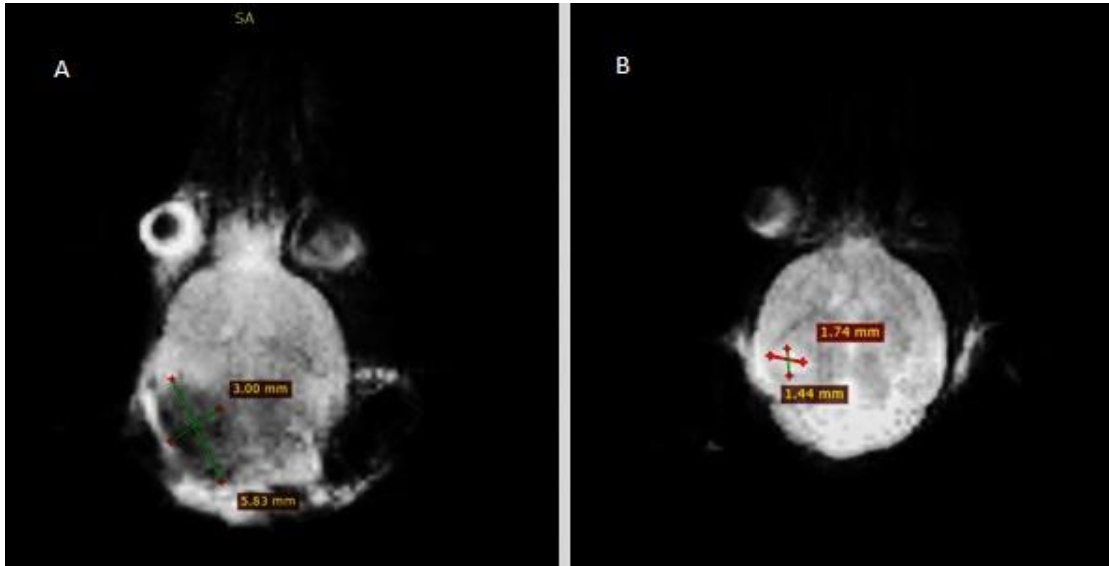
Nanoparçaya yüklenmiş olan farnesiltiosalisik asit (FTS_NP) ile kontrol grubu karşılaştırıldığında 5. Günün sonunda yapılan mNSS puanları kontrol grubu için ortalama 7,4 , FTS_NP grubu için 3,4'tür. 5. Günün sonunda FTS_NP alan grupta kontrol grubuna göre iyileşme oranı %54 daha iyi olarak hesaplanmıştır. Δ mNSS skorları karşılaştırıldığında kontrol grubunda Δ mNSS puanı 1,2 iken FTS_NP alan grupta bu değer 4,2'dir. Yapılan istatistiksel karşılaştırma sonucunda nörolojik düzelmenin FTS_NP alan grupta kontrol grubuna göre %54 daha iyi olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p=0,008$, Mann-Whitney U test, 2-sided, non-parametric, $n=10$). Sadece FTS alan grupla FTS_NP alan gruplar karşılaştırıldığında sadece FTS alan grupta Δ mNSS skoru 2,8 iken Nanoparçaya yüklenmiş FTS alan grupta Δ mNSS değeri 4,2'dir. FTS'nin nanoparçaya yüklenerek verilmesinin etkin olarak nörolojik düzelmede faydalı olduğu, sadece FTS verilen gruba göre daha iyi nörolojik düzelme görülmüş olup bunun istatistiksel olarak anlamlı çıkmamasının sebebi ($p=0,095$, Mann-Whitney U test, 2-sided, non-parametric, $n=10$) denek sayısının az olması ve deney süresinin kısa olması ile açıklanabilir. Kontrol grubu ile sadece nanoparça verilen grup karşılaştırıldığında kontrol grubunda Δ mNSS 1,2 iken, nanoparça verilen grupta Δ mNSS 0,6'dır. Yapılan istatistiksel karşılaştırmada nanoparçanın tek başına verilmesinin nörolojik düzelme üzerine etkisi olmadığı ve anlamlı fark yaratmadığı görülmüştür ($p= 0,222$, Mann-Whitney U test, 2-sided, non-parametric, $n=10$). FTS verilen grupla sadece nanoparça verilen grup

karşılaştırılmış ve FTS'nin sadece nanoparçaya göre istatistiksel olarak anlamlı bir nörolojik kazanım sağladığı gösterilmiştir ($p=0,016$, Mann-Whitney U test, 2-sided, non-parametric, $n=10$) FTS'yi nanoparçaya yüklerek vermenin istatistiksel olarak sadece nanoparça vermeye göre nörolojik olarak anlamlı iyileşme sağladığı gösterilmiştir ($p=0,008$, Mann-Whitney U test, 2-sided, non-parametric, $n=10$)

Sham grubunda nörolojik muayene mNSS üzerinden değerlendirildiğinde nörolojik kayıp izlenmemiştir.

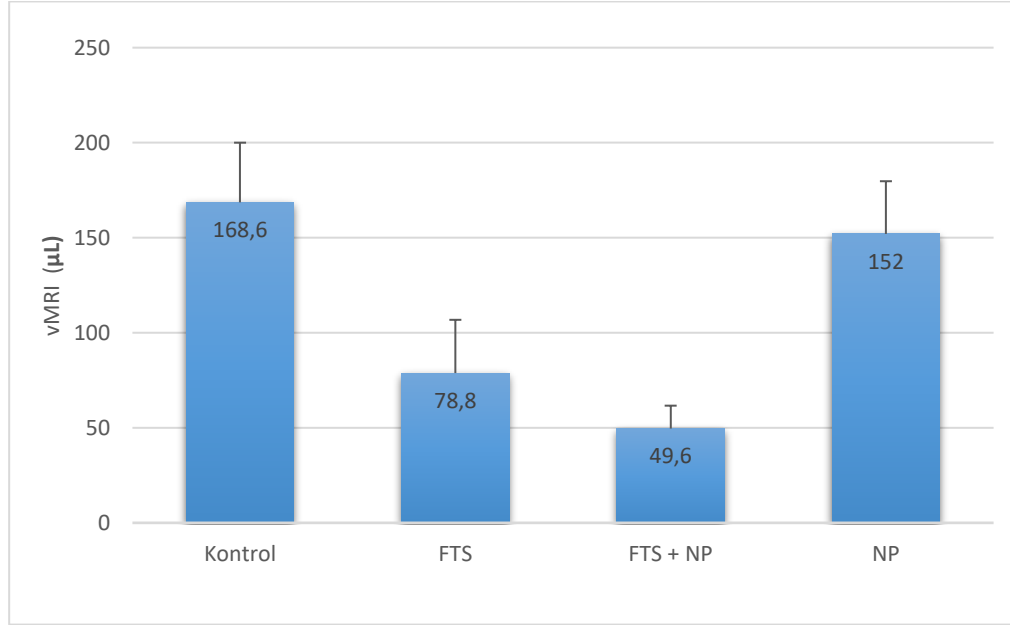
4.3. Radyolojik bulgular

Radyolojik değerlendirmeye ilgili detaylar materyal ve metod kısmında anlatılmıştır. 5. gün yapılan radyolojik görüntüleme sonucunda alınan görüntülerden elde edilen volumetrik değerler istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.3.1. A: T2 ağırlıklı aksiyel MRG görüntülemeye kontrol grubuna ait en geniş aksiyel çapa sahip kontüzyo alanı görünmektedir. B: FTS + Nanoparça almış gruba ait yine sağ parietalde lezyon görünmektedir.

Kontrol grubunda oluşturulan kontüzyolarda ortalama kontüzyo volümü $168 \mu\text{L} \pm 31,4$ ($n=5$) olarak bulunmuştur. FTS grubunda volüm ortalama $78 \mu\text{L} \pm 28$ ($n=5$), FTS + NP grubunda ortalama $49 \mu\text{L} \pm 12$ ($n=5$), sadece NP verilmiş olan grupta ise ortalama $152 \mu\text{L} \pm 27$ ($n=5$) olarak bulunmuştur.

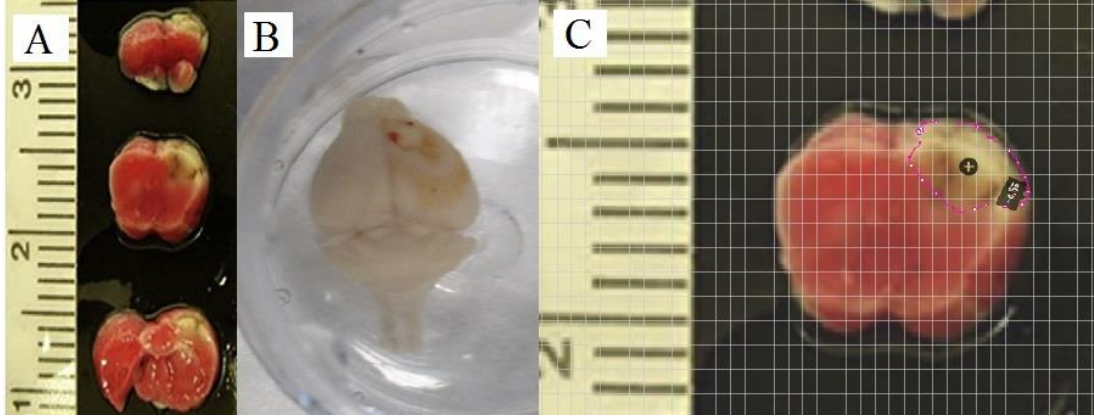


Şekil 4.3.2. : MRI kontüzyo volümlerinin ortalama değerlerinin gruplara göre dağılımı.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında FTS verilen grupta kontüzyo volümünün kontrol grubuna göre %53 daha küçük olduğu görüldü. FTS verilmesinin belirgin olarak kontüzyo volümlerinin küçülmesini sağladığı görülmüş olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,008$; Mann-Whitney U test, non-parametric 2-sided, $n=10$). Kontrol grubu ile Nanoparçaya yüklenmiş FTS verilen grup karşılaştırıldığında kontüzyo volümünün ortalama volümler baz alındığında %70 küçüldüğü görülmüş olup istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,008$). Kontrol grubu ile sadece nanoparça verilen grup karşılaştırıldığında %10 oranında olan küçülme istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,548$). FTS'nin nanoparçaya yüklenerek verilmesinin sadece FTS verilmesine göre lezyon boyutlarında istatistiksel olarak anlamlı küçülmeye sebep olmadığı görülmüştür ($p=0,151$). FTS verilmesinin sadece Nanoparça verilmesi üzerine etkisi istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,008$).

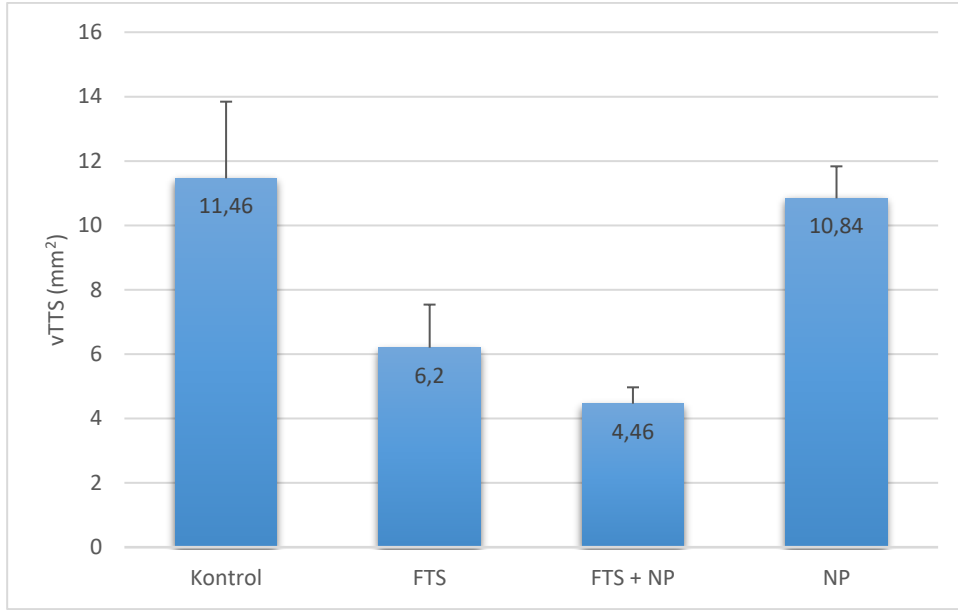
4.4. Tetrazolium (TTS) ile değerlendirme

Tetrazolium ile boyama sonrası hazırlanan preparatların ışık mikroskopu altında dijital görüntüleri elde edilmiştir. Elde edilen görüntülerde kontüzyo alanları bilgisayar ortamında planimetrik değerlendirme ile hesaplanmıştır.



Şekil 4.4.1. : A: TTS ile boyanmış ve daha sonra slicing yapılmış fare beyni. B: Aynı farenin makroskopik olarak slicing yapılmadan ve TTS ile muamele edilmeden önceki hali. Aynı preparatta subaraknoid kanamanında olduğu görülmekte. C: TTS ile muamele edilmiş ve ışık mikroskopu altında görüntüleri alınmış preparatın dijital ortamda planimetrik ölçümünü gösteren resim.

TTS ile muamele sonrası görünür hale gelen enfarkt alanları karşılaştırılmıştır. Sham grubunda TTS ile muamele sonrası enfarkt izlenmemiştir. Kontrol grubunda ortalama enfarkt alanı $11,46 \text{ mm}^2 \pm 2,3$ iken FTS alan grupta bu alan $6,2 \text{ mm}^2 \pm 1,33$, Nanoparçaya yüklenmiş FTS verilen grupta $4,46 \text{ mm}^2 \pm 0,5$, sadece Nanoparça verilen grupta $10,84 \text{ mm}^2 \pm 0,99$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.4.2. : 4 grubun ortalama TTS enfarkt alanlarının grafiksel olarak gösterilmesi.

Gruplar arasında yapılan ikili istatistiksel değerlendirmede Kontrol grubuna göre FTS verilen grupta enfarkt alanının ortalama olarak %45 daha küçük olduğu görüldüğü görülmüştür. Mevcut sonuç istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,008$, Mann-Whitney U test, 2 sided, non parametric, $n=10$). Nanoparçaya yüklenmiş FTS verilen grupta ise enfarkt volumunun %60 daha küçük olduğu hesaplanmış olup istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p=0,008$). FTS grubuna göre, nanoparçaya yüklenerek verilen FTS'nin daha etkin olduğu ve enfarkt alanını %15 daha fazla azalttığı saptanmıştır. Ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada ağırlık düşürme yöntemiyle farelerde orta şiddette kapalı kafa travması meydana getirilmiştir. Travmaya bağlı meydana gelen nörolojik kayıplar; nörolojik muayene, radyolojik (MRG) ve TTS boyası ile incelenmiştir. FTS ve nanoparçaya yüklenmiş FTS'nin nörolojik kazanım, radyolojik düzelme ve kontüzyo volümleri üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışmanın ana bulguları ayrı ayrı her değişken kendi içerisinde değerlendirilerek birkaç başlıkta ele alınacaktır.

Kafa travmaları sonrası (özellikle orta ve ağır şiddette kafa travmaları) sonrasında oluşan primer hasarı takiben dakiakalar, saatler içerisinde başlayan ve günler hatta haftalar süren sekonder hasara bağlı kalıcı morbidite veya mortalite ortaya çıkabilmektedir. Primer hasarın olay anında olmasından dolayı temel olarak kazanın önlenmesi dışında koruyucu yöntem bulunmamaktadır. Sekonder hasar ise bir dizi nöroinflamatuvar yanıtların ortaya çıkması ile meydana gelen ve çoğu zaman kalıcı olan nörolojik kayıpların meydana gelmesine neden olur. Yaptığımız çalışmada oluşturulan kafa travması sonrasında ortaya çıkan kayıplar mNSS skorları ile değerlendirilmiştir. Uygulanan FTS ve diğer kimyasallara yanıt hayvanların 1 hafta sonraki nörolojik durumları incelenerek mNSS skorları arasındaki farklar kolaylıkla karşılaştırılabilmiştir. Aynı şekilde radyolojik incelemeler ve TTS ile yapılan kontüzyo/enfarkt volümlerinin değerlendirilebilmesi ile mevcut FTS ve hibrit nanoparçaya (HNP) yüklenerek verilen FTS'nin bu volümler üzerine etkisi sayısal değerler elde edilerek karşılaştırılabilmiştir.

Kafa travmaları sonrası özellikle geç dönemde ortaya çıkan nörolojik kayıpların sebebi sekonder hasar olarak gösterilmiş olup son yıllarda özellikle bu sekonder hasara neden olan nöroinflamatuvar yanıtların mekanizmalarının anlaşılması ve hedefe yönelik tedavilerin planlanabilmesi için oldukça fazla sayıda çalışma yapılmaktadır. Travma sonrası sekonder hasarı azalttığı daha önce gösterilmiş olan FTS'nin [13] hem nanoparçaya yüklenerek hemde tek başına nöroinflamatuvar yanıtları azalttığına dair sayısal veriler elde edilmesi amaçlanmıştır. Mevcut çalışma hem radyolojik, hem nörolojik hemde TTS ile enfarkt volümlerinin incelenmesi ve karşılaştırılması açısından literatürde tektir.

FTS bahsedildiği gibi bir hücre transmembran proteinine bağlı olan ve GDP'ye bağlı halde inaktif olan RAS-GDP'nin aktif olan RAS-GTP formuna bağlanarak hücre içi substratları ile etkileşimini engelleyerek inflamatuvar yanıtı azaltmaktadır. Son çalışmalar RAS aracılığı ile aktive olan MAPK'ın inflamatuvar yanıtlara sebep olduğunu göstermiştir [73, 75, 90].

Çalışmamızda daha önce nöroprotektif etkileri gösterilmiş olan FTS'nin bu etkisinin hibrit nanoparçaya (HNP) yüklenerek arttırılabilir olup olmadığının gösterilmesi amaçlanmıştır. Fareye kuyruk veninden verilmiş FTS'nin 24. Saatte etkisi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %19,4 daha iyi iken 5. Gün sonunda bakıldığında %43 daha iyi olduğu görülmüştür. FTS'nin erken dönemde anlamlı fark yaratmaması fakat bu etkinin kümülatif olarak ilerleyen günlerde ortaya çıkması sekonder hasarın doğası gereğindedir. RAS-GTP aktivasyonunun daha önce yapılan çalışmalarda 24. Saatten sonra normale döndüğü gösterilmiştir [13]. Bu nedenle sekonder hasarın ilk 24 saat içerisinde tetiklenmesinden dolayı FTS'nin ilk 24 saat içerisinde belirgin düzelme sağlayamaması bununla açıklanabilir. FTS'nin tek başına verilmesi sonrası 5. Gün sonunda %43 oranında nörolojik kazanım elde edilmiştir. FTS'nin HNP'ye yüklenerek verilmesi sonrasında 5. gün yapılan değerlendirme sonrasında Δ mNSS skoru ortalama olarak $4,2 \pm 0,44$ olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu ile mukayese edildiğinde yaklaşık olarak %54 daha iyi bir nörolojik düzelme olduğu gösterilebilmiştir. Bu düzelme istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.008$). FTS'nin HNP'ye yüklenerek verilmesi ile tek başına FTS verilmesi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görülmüştür ($p=0.095$). FTS'nin tek başına verilmesinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığa yakın fark yaratmış olmasından dolayı ($p=0,056$) FTS'nin HNP'ye yüklenerek verilmesinin sadece FTS verilmesine göre daha anlamlı kazanım sağlayacağı düşünülebilir. FTS'nin etkinliğinin günler içerisinde daha iyi ortaya çıktığı anlaşılmış olup bu çalışmada yapılmamış olan 5. gün sonrasında yapılacak ek nörolojik muayeneler ile kontrol grubuna göre Δ mNSS skorlarının daha iyi olması beklenebilir. Bunun sonucunda HNP + FTS verilen grubun istatistiksel olarak daha anlamlı sonuçlar verebileceği düşünülebilir. Bu nedenle mevcut çalışma baz alınarak daha uzun süreli yapılacak bir çalışma ile bu etkilerin anlamlılığı daha iyi anlaşılabilir. HNP'nin tek başına verilmiş olması kontrol grubu ile mukayese edildiğinde anlamlı fark yaratmamıştır ($p=0,222$). FTS verilen grupla

sadece HNP verilen gruplar karşılaştırıldığında FTS verilen grubun sonuçları HNP'ye göre anlamlı olarak daha iyidir ($p=0,016$), aynı sonuç HNP+FTS grubu ile sadece HNP verilen grup karşılaştırıldığında da geçerlidir ($p=0,008$). Sonuç olarak tek başına HNP'nin $\Delta mNSS$ puanları üzerine etkide bulunmadığı gösterilmiştir.

Travma sonrası ortaya çıkan kontüzyo nedeniyle nörolojik kayıplar ortaya çıkmaktadır. Kontüzyo volümünün büyüklüğü ile oluşan serebral hasar ve enfarkt kaçınılmaz olarak nörolojik bozulmanın temelini oluşturur. Travma anında belirgin olarak görülemeyebilen kontüzyo sekonder hasarın tetiklenmesi sonrası saatler içerisinde büyür. Travmadan ortalama olarak 6 saat sonra belirginleşen kontüzyo yaklaşık olarak 5-7 gün sonunda stabil boyutlara ulaşır ve haftalar içerisinde gerileyerek yerini litik veya gliotik kaviteye bırakır. Sekonder hasarın azaltılmasının sonuç olarak kontüzyo volümünün daha küçük olmasını dolayısıyla serebral parankim kaybının daha az olmasını sağlaması beklenir. Çalışmamızda radyolojik olarak yapılan değerlendirmeler sonucunda kontrol grubunda ortalama kontüzyo volümü $168 \mu L \pm 31,4$ ($n=5$) olarak hesaplanmıştır. Bu değer sadece FTS grubu ile karşılaştırıldığında FTS alan grupta kontüzyo volümünün %53 daha küçük olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p=0,008$). Bu oran daha önce literatürde Shohami ve arkadaşlarının yapmış olduğu benzer çalışmadaki oranlarla yakın benzerlik göstermektedir. Kontrol grubu ile mukayese edildiğinde HNP+FTS grubunda bu oranın daha da iyi olduğu, kontüzyo volümünün %70 daha küçük olduğu görülmüştür ($p=0,008$). Sadece HNP verilmesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark yaratmamıştır ($p=0,548$). Tüm bunların sonucunda HNP+FTS kompleksinin kontüzyo volümü üzerine oldukça etkili olduğunu göstermektedir. FTS grubu ile HNP+FTS grubu karşılaştırıldığında ise HNP+FTS kompleksi tek başına FTS verilmesine göre anlamlı fark yaratmamıştır ($p=0,151$).

Çalışmanın güçlü yanları kısa sürede tekrarlanabilir olması, hızlı sonuç alınabilmesi ve hibrit nanopartiküle yüklenen FTS'nin istatistiksel olarak anlamlı olmasında kontüzyonel beyin dokusuna geçişinin sadece FTS'ye göre daha iyi olduğu gösterebilmiş olmasıdır. Sekonder hasarın günler içerisinde oluşması ve nörolojik düzelmenin haftalar hatta aylar sürmesi uzun dönem sonuçları incelenemediği için çalışma bu aşamada zayıf kalmıştır. Ayrıca denek sayısının artırılması grupların kendi

içinde daha homojen sonuçların elde edilmesini sağlayacağı için çalışmadaki denek sayısının artırılması daha iyi sonuçlar elde edilmesini sağlayabilir.

Bu çalışmada kafa travması daha önce benzer çalışmalarda uygulanan anestezi (izofloran, indüksiyon 5 lt/dk, idame 2 lt/dk), işlem esnasında oksijen desteği (2 lt/dk) ve puls-oksometre ile O₂ takibi yapılması (>92 %) , vücut sıcaklığının sabit tutulması (37.0±0.2°C) gibi yöntemler sayesinde serbest ağırlık düşürme modelinde standardizasyon sağlanmıştır.

Kontüzyo sonrası ortaya çıkan enfarkt alanlarının değerlendirilmesi bu çalışmada TTS ile yapılmıştır. Planimetrik olarak yapılan ölçümler sonrasında enfarkt volümleri karşılaştırılmıştır. İnfarkt alanı kontüzyo alanı ile doğru orantılıdır. İnfarkt ise parankim kaybına neden olarak fonksiyonel kayıplara sebep olur. Çalışmamızda TTS ile muamele edilmiş preparatlardaki enfarkt volümleri değerlendirildiğinde kontrol grubunda bu değerlerin ortalama olarak 11,46 mm² ±2,38 (n=5) olduğu görüldü. Bu değer sadece FTS verilmiş grupta 6,2 mm² ±1,33 (n=5) iken FTS+HNP verilen grupta 4,46 mm² ±0,5 (n=5) olarak hesaplanmıştır. Gruplar karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre FTS nin enfarkt alanı üzerine belirgin olarak küçülme sağladığı görülmüştür. Kontrol grubuna göre %45 olan bu oran istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,008, n=10). Aynı etki FTS'nin nanoparçaya yüklenerek verilmesi ile artmaktadır. FTS+HNP kompleksi ile sağlanan etki kontrol grubuna göre %60 daha iyidir (p=0,008, n=10). Her ne kadar FTS+HNP verilen grupta enfarkt volümleri belirgin olarak daha iyi görünse de tek başına FTS verilmesine göre anlamlı bulunamamıştır (p=0,095).

Kontüzyon çevresinde haftalar boyunca sebat eden iskemi varlığı daha önceki çalışmalarda da gösterilmiştir [113]. Ayrıca erken dönem de nöroinflamasyonun engellenmesinin etkilerinin uzun dönemde ortaya çıktığı anlaşılmış olup, bu nedenle incelemenin sadece 5. gün değil daha uzun dönemde yapılması enfarkt alanlarındaki küçülmenin istatistiksel olarak daha anlamlı çıkmasını sağlayabilir.

Deney sonucunda 1. ve 5. günler arasındaki nörolojik muayene farklarına bakıldığında 5. günden sonra yapılacak periyodik muayenelerde nörolojik muayene farklarının daha anlamlı çıkması beklenebilir. Bu nedenle daha uzun bir periyotta

yapılacak benzer bir çalışmada FTS'nin HNP'ye yüklerek verilmesinin sadece FTS verilmesine göre istatistiksel fark yaratması beklenebilir. Bu farkın gösterilebilmesi için daha uzun dönem periyodik muayenelerin ve radyolojik görüntüleme için yapılacak ve daha çok hayvanın kullanılacağı benzer protokole uyularak farklı kafa travması şiddetlerinde (hafif, orta, ağır) yapılacak bir çalışma da planlanmaktadır.

Yapılan çalışmada FTS'nin HNP'ye yüklenerek verilmesi sonucunda ortaya çıkan fonksiyonel ve radyolojik kazanımlar kafa travması vakalarında sekonder hasarı azaltmaya yönelik ucuz, etkin bir tedavi modalitesi oluşturulmasında umut vaat eden bir yöntem olarak öne çıkmaktadır.

6. SONUÇ

Bu çalışmada Swiss albino farelerde ağırlık düşürme metoduyla oluşturulan travmatik beyin hasarı modelinde Nanoparçaya (HNP) yüklenmiş FTS'nin nöroprotektif etkülerinin izlenmesi amaçlanmıştır. Orta şiddette kafa travması oluşturulan bu çalışmada ;

- 1) FTS'nin travma ile aktive olan ERK/MAPKs yollarını etkin bir şekilde inhibe ettiği ve kafa travmalarında faydalı olduğu gösterilmiştir. ,
- 2) Oluşmuş kafa travmalarında MRG, fonksiyonel durum, TTS ile oluşturulan enfarkt volümlerinin korele olduğu görülmüş olup bundan sonra yapılabilecek benzer çalışmalarda hayvan sakrifikasyonu yapılmadan MRG ile kontüzyo izlemi yapılabileceği gösterilmiştir,
- 3) FTS + HNP kompleksinin kafa travmasında nörolojik düzelme sağladığı görülmüştür (p=0,008).
- 4) FTS + HNP kompleksinin radyolojik olarak kontüzyo volümünü belirgin olarak küçülttüğü (p=0,008) görülmüştür.
- 5) FTS + HNP kompleksi enfarkt alanlarının belirgin olarak küçülmesini sağlamıştır (p=0,008)
- 6) FTS+HNP kompleksi nörolojik fonksiyonların düzelmesinde (%54), radyolojik kontüzyo volümünün azalmasında (%70), TTS ile belirlenen enfarkt alanının azalmasında (%60) net fayda sağlamaktadır,
- 7) FTS tek başına istatistiksel olarak anlamlılığa yakın fonksiyonel nörolojik düzelme (p=0,056), istatistiksel olarak anlamı radyolojik kontüzyo volümününün küçülmesini (p=0,008), makroskopik enfarkt volümlerinin küçülmesini sağlamıştır (p=0,008)
- 8) Standardize edilmiş koşullarda serbest ağırlık düşürme halen hayvan kafa travması modellerinde geçerli bir yöntem olduğu gösterilmiştir.

FTS'nin HNP'ye yüklenerek verilmesinin, fonksiyonel ve radyolojik düzelmede net fayda sağladığı bu nedenle ERK/MAPKs yolağının etkin bir inhibitörü olduğu gösterilmiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Faul, M. ve Coronado, V., *Epidemiology of traumatic brain injury*. Handb Clin Neurol, 2015. **127**: p. 3-13.
2. Ghajar, J., *Traumatic brain injury*. Lancet, 2000. **356**(9233): p. 923-9.
3. Elder, G.A. ve Cristian, A., *Blast-related mild traumatic brain injury: mechanisms of injury and impact on clinical care*. Mt Sinai J Med, 2009. **76**(2): p. 111-8.
4. Baethmann, A., *Special aspects of severe head injury: recent developments*. Curr Opin Anaesthesiol, 1998. **11**(2): p. 193-200.
5. Kochanek, P.M., *Biochemical, cellular, and molecular mechanisms in the evolution of secondary damage after severe traumatic brain injury in infants and children: Lessons learned from the bedside*. Pediatr Crit Care Med, 2000. **1**(1): p. 4-19.
6. Laurer, H.L. ve McIntosh, T.K., *Experimental models of brain trauma*. Curr Opin Neurol, 1999. **12**(6): p. 715-21.
7. Faden, A.I., *The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury*. Science, 1989. **244**(4906): p. 798-800.
8. Feuerstein, G.Z., Wang, X. ve Barone, F.C., *The role of cytokines in the neuropathology of stroke and neurotrauma*. Neuroimmunomodulation, 1998. **5**(3-4): p. 143-59.
9. Shohami, E., *Closed head injury in the rat induces whole body oxidative stress: overall reducing antioxidant profile*. J Neurotrauma, 1999. **16**(5): p. 365-76.
10. Morganti-Kossmann, M.C., *Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword*. Curr Opin Crit Care, 2002. **8**(2): p. 101-5.

11. Shields, J.M., *Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'*. Trends Cell Biol, 2000. **10**(4): p. 147-54.
12. Kloog, Y., Cox, A.D. ve Sinensky, M., *Concepts in Ras-directed therapy*. Expert Opin Investig Drugs, 1999. **8**(12): p. 2121-2140.
13. Shohami, E., *The Ras inhibitor S-trans, trans-farnesylthiosalicylic acid exerts long-lasting neuroprotection in a mouse closed head injury model*. J Cereb Blood Flow Metab, 2003. **23**(6): p. 728-38.
14. Maas, A.I., Stocchetti, N. ve Bullock, R., *Moderate and severe traumatic brain injury in adults*. Lancet Neurol, 2008. **7**(8): p. 728-41.
15. Menon, D.K., *Position statement: definition of traumatic brain injury*. Arch Phys Med Rehabil, 2010. **91**(11): p. 1637-40.
16. Peeters, W., *Epidemiology of traumatic brain injury in Europe*. Acta Neurochir (Wien), 2015. **157**(10): p. 1683-96.
17. Roozenbeek, B., Maas, A.I. ve Menon, D.K., *Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury*. Nat Rev Neurol, 2013. **9**(4): p. 231-6.
18. Lopez, A.D. ve Murray, C.C., *The global burden of disease, 1990-2020*. Nat Med, 1998. **4**(11): p. 1241-3.
19. Hartings, J.A., *Spreading depolarisations and outcome after traumatic brain injury: a prospective observational study*. Lancet Neurol, 2011. **10**(12): p. 1058-64.
20. Styrke, J., *Traumatic brain injuries in a well-defined population: epidemiological aspects and severity*. J Neurotrauma, 2007. **24**(9): p. 1425-36.
21. Rutland-Brown, W., *Incidence of traumatic brain injury in the United States, 2003*. J Head Trauma Rehabil, 2006. **21**(6): p. 544-8.

22. Koskinen, S. ve Alaranta, H., *Traumatic brain injury in Finland 1991-2005: a nationwide register study of hospitalized and fatal TBI*. Brain Inj, 2008. **22**(3): p. 205-14.
23. Puljula, J., *Mortality from traumatic brain injury after reduction of alcohol prices: a population-based study from northern Finland*. Scand J Public Health, 2013. **41**(5): p. 524-30.
24. Mauritz, W., *Epidemiology, treatment and outcome of patients after severe traumatic brain injury in European regions with different economic status*. Eur J Public Health, 2008. **18**(6): p. 575-80.
25. Mushkudiani, N.A., *Prognostic value of demographic characteristics in traumatic brain injury: results from the IMPACT study*. J Neurotrauma, 2007. **24**(2): p. 259-69.
26. Numminen, H.J., *The incidence of traumatic brain injury in an adult population--how to classify mild cases?* Eur J Neurol, 2011. **18**(3): p. 460-4.
27. Langlois, J.A., Rutland-Brown, W. ve Wald, M.M., *The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview*. J Head Trauma Rehabil, 2006. **21**(5): p. 375-8.
28. Hyder, A.A., *The impact of traumatic brain injuries: a global perspective*. NeuroRehabilitation, 2007. **22**(5): p. 341-53.
29. Butcher, I., *Prognostic value of cause of injury in traumatic brain injury: results from the IMPACT study*. J Neurotrauma, 2007. **24**(2): p. 281-6.
30. Thurman, D.J., *Traumatic brain injury in the United States: A public health perspective*. J Head Trauma Rehabil, 1999. **14**(6): p. 602-15.
31. Summers, C.R., Ivins, B. ve Schwab, K.A., *Traumatic brain injury in the United States: an epidemiologic overview*. Mt Sinai J Med, 2009. **76**(2): p. 105-10.

32. Teasdale, G. ve Jennett, B., *Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale*. Lancet, 1974. **2**(7872): p. 81-4.
33. Khoshyomn, S., *Survival after severe penetrating non-missile brainstem injury: case report*. J Trauma, 2004. **56**(5): p. 1131-4.
34. Muszynski, C.A., *Risk of pediatric head injury after motor vehicle accidents*. J Neurosurg, 2005. **102**(4 Suppl): p. 374-9.
35. Graham, D.I., *Recent advances in neurotrauma*. J Neuropathol Exp Neurol, 2000. **59**(8): p. 641-51.
36. Bigler, E.D., *Dementia, quantitative neuroimaging, and apolipoprotein E genotype*. AJNR Am J Neuroradiol, 2000. **21**(10): p. 1857-68.
37. Teasdale, G., *Intensive care of severely head injured patients. National research is needed*. BMJ, 1996. **313**(7052): p. 296; author reply 297.
38. Graham, D.I., *Altered beta-APP metabolism after head injury and its relationship to the aetiology of Alzheimer's disease*. Acta Neurochir Suppl, 1996. **66**: p. 96-102.
39. Warburton, A.L. ve Shepherd, J.P., *Development, utilisation, and importance of accident and emergency department derived assault data in violence management*. Emerg Med J, 2004. **21**(4): p. 473-7.
40. Zimmerman, R.A. ve Bilaniuk, L.T., *Computed tomographic staging of traumatic epidural bleeding*. Radiology, 1982. **144**(4): p. 809-12.
41. Haselsberger, K., Pucher, R. ve Auer, L.M., *Prognosis after acute subdural or epidural haemorrhage*. Acta Neurochir (Wien), 1988. **90**(3-4): p. 111-6.
42. Shaw, N.A., *The neurophysiology of concussion*. Prog Neurobiol, 2002. **67**(4): p. 281-344.
43. Anderson, T.R. ve Aviles, A.M., *Diverse faces of domestic violence*. ABNF J, 2006. **17**(4): p. 129-32.

44. Cassidy, J.D., *Incidence, risk factors and prevention of mild traumatic brain injury: results of the WHO Collaborating Centre Task Force on Mild Traumatic Brain Injury*. J Rehabil Med, 2004(43 Suppl): p. 28-60.
45. Wasserman, J.K., Zhu, X. ve Schlichter, L.C., *Evolution of the inflammatory response in the brain following intracerebral hemorrhage and effects of delayed minocycline treatment*. Brain Res, 2007. **1180**: p. 140-54.
46. Wasserman, J.K., Yang, H. ve Schlichter, L.C., *Glial responses, neuron death and lesion resolution after intracerebral hemorrhage in young vs. aged rats*. Eur J Neurosci, 2008. **28**(7): p. 1316-28.
47. Hardman, J.M. ve Manoukian, A., *Pathology of head trauma*. Neuroimaging Clin N Am, 2002. **12**(2): p. 175-87, vii.
48. Smith, D.H., Meaney, D.F. ve Shull, W.H., *Diffuse axonal injury in head trauma*. J Head Trauma Rehabil, 2003. **18**(4): p. 307-16.
49. Maas, A.I., *Prognosis and clinical trial design in traumatic brain injury: the IMPACT study*. J Neurotrauma, 2007. **24**(2): p. 232-8.
50. Levin, H.S., *Intracranial hypertension in relation to memory functioning during the first year after severe head injury*. Neurosurgery, 1991. **28**(2): p. 196-9; discussion 200.
51. Murray, G.D., *Multivariable prognostic analysis in traumatic brain injury: results from the IMPACT study*. J Neurotrauma, 2007. **24**(2): p. 329-37.
52. Sauaia, A., *Epidemiology of trauma deaths: a reassessment*. J Trauma, 1995. **38**(2): p. 185-93.
53. Werner, C. ve Engelhard, K., *Pathophysiology of traumatic brain injury*. Br J Anaesth, 2007. **99**(1): p. 4-9.

54. Cunningham, A.S., *Physiological thresholds for irreversible tissue damage in contusional regions following traumatic brain injury*. *Brain*, 2005. **128**(Pt 8): p. 1931-42.
55. Kelly, D.F., *Hyperemia following traumatic brain injury: relationship to intracranial hypertension and outcome*. *J Neurosurg*, 1996. **85**(5): p. 762-71.
56. Martin, N.A., *Characterization of cerebral hemodynamic phases following severe head trauma: hypoperfusion, hyperemia, and vasospasm*. *J Neurosurg*, 1997. **87**(1): p. 9-19.
57. Sobey, C.G., *Cerebrovascular dysfunction after subarachnoid haemorrhage: novel mechanisms and directions for therapy*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2001. **28**(11): p. 926-9.
58. Zuccarello, M., *Endothelin B receptor antagonists attenuate subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm*. *Stroke*, 1998. **29**(9): p. 1924-9.
59. Todo, H., *Impairment in biochemical level of arterial dilative capability of a cyclic nucleotides-dependent pathway by induced vasospasm in the canine basilar artery*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1998. **18**(7): p. 808-17.
60. Hlatky, R., *Dynamic autoregulatory response after severe head injury*. *J Neurosurg*, 2002. **97**(5): p. 1054-61.
61. Lee, J.H., *Carbon dioxide reactivity, pressure autoregulation, and metabolic suppression reactivity after head injury: a transcranial Doppler study*. *J Neurosurg*, 2001. **95**(2): p. 222-32.
62. Chesnut, R.M., *The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury*. *J Trauma*, 1993. **34**(2): p. 216-22.
63. Udomphorn, Y., Armstead, W.M. ve Vavilala, M.S., *Cerebral blood flow and autoregulation after pediatric traumatic brain injury*. *Pediatr Neurol*, 2008. **38**(4): p. 225-34.

64. Verweij, B.H., *Impaired cerebral mitochondrial function after traumatic brain injury in humans*. J Neurosurg, 2000. **93**(5): p. 815-20.
65. Rose, J.C., Neill, T.A. ve Hemphill, J.C., 3rd, *Continuous monitoring of the microcirculation in neurocritical care: an update on brain tissue oxygenation*. Curr Opin Crit Care, 2006. **12**(2): p. 97-102.
66. Stiefel, M.F., *Reduced mortality rate in patients with severe traumatic brain injury treated with brain tissue oxygen monitoring*. J Neurosurg, 2005. **103**(5): p. 805-11.
67. Bullock, R., *Introducing NMDA antagonists into clinical practice: why head injury trials?* Br J Clin Pharmacol, 1992. **34**(5): p. 396-401.
68. Marmarou, A., *Predominance of cellular edema in traumatic brain swelling in patients with severe head injuries*. J Neurosurg, 2006. **104**(5): p. 720-30.
69. Lucas, S.M., Rothwell, N.J. ve Gibson, R.M., *The role of inflammation in CNS injury and disease*. Br J Pharmacol, 2006. **147 Suppl 1**: p. S232-40.
70. Eldadah, B.A. ve Faden, A.I., *Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury*. J Neurotrauma, 2000. **17**(10): p. 811-29.
71. Hetman, M. ve Gozdz, A., *Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival*. Eur J Biochem, 2004. **271**(11): p. 2050-5.
72. Dash, P.K., Mach, S.A. ve Moore, A.N., *The role of extracellular signal-regulated kinase in cognitive and motor deficits following experimental traumatic brain injury*. Neuroscience, 2002. **114**(3): p. 755-67.
73. Mori, T., *Mitogen-activated protein kinase inhibition in traumatic brain injury: in vitro and in vivo effects*. J Cereb Blood Flow Metab, 2002. **22**(4): p. 444-52.

74. Mori, T., *Downregulation of matrix metalloproteinase-9 and attenuation of edema via inhibition of ERK mitogen activated protein kinase in traumatic brain injury.* J Neurotrauma, 2002. **19**(11): p. 1411-9.
75. Otani, N., *Differential activation of mitogen-activated protein kinase pathways after traumatic brain injury in the rat hippocampus.* J Cereb Blood Flow Metab, 2002. **22**(3): p. 327-34.
76. Otani, N., *Temporal and spatial profile of phosphorylated mitogen-activated protein kinase pathways after lateral fluid percussion injury in the cortex of the rat brain.* J Neurotrauma, 2002. **19**(12): p. 1587-96.
77. Griesbach, G.S., *Voluntary exercise following traumatic brain injury: brain-derived neurotrophic factor upregulation and recovery of function.* Neuroscience, 2004. **125**(1): p. 129-39.
78. Clausen, F., *Oxygen free radical-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase mediates apoptosis-like cell death after traumatic brain injury.* J Neurotrauma, 2004. **21**(9): p. 1168-82.
79. Nakahara, S., *Induction of apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) after spinal cord injury in rats: possible involvement of ASK1-JNK and -p38 pathways in neuronal apoptosis.* J Neuropathol Exp Neurol, 1999. **58**(5): p. 442-50.
80. Horiuchi, H., *Continuous intrathecal infusion of SB203580, a selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, reduces the damage of hind-limb function after thoracic spinal cord injury in rat.* Neurosci Res, 2003. **47**(2): p. 209-17.
81. Kaspar, B.K., *Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model.* Science, 2003. **301**(5634): p. 839-42.
82. Jenkins, L.W., *Conventional and functional proteomics using large format two-dimensional gel electrophoresis 24 hours after controlled cortical impact in postnatal day 17 rats.* J Neurotrauma, 2002. **19**(6): p. 715-40.

83. Noshita, N., *Akt phosphorylation and neuronal survival after traumatic brain injury in mice*. *Neurobiol Dis*, 2002. **9**(3): p. 294-304.
84. Namikawa, K., *Akt/protein kinase B prevents injury-induced motoneuron death and accelerates axonal regeneration*. *J Neurosci*, 2000. **20**(8): p. 2875-86.
85. Cheung, Z.H., *Regulation of caspase activation in axotomized retinal ganglion cells*. *Mol Cell Neurosci*, 2004. **25**(3): p. 383-93.
86. Jope, R.S. ve Bijur, G.N., *Mood stabilizers, glycogen synthase kinase-3beta and cell survival*. *Mol Psychiatry*, 2002. **7 Suppl 1**: p. S35-45.
87. Doble, B.W. ve Woodgett, J.R., *GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 7): p. 1175-86.
88. Morrison, B., 3rd, *In vitro central nervous system models of mechanically induced trauma: a review*. *J Neurotrauma*, 1998. **15**(11): p. 911-28.
89. Hou, Y.J., *Astrogliosis in culture. IV. Effects of basic fibroblast growth factor*. *J Neurosci Res*, 1995. **40**(3): p. 359-70.
90. Mandell, J.W. ve Gocan, N.C., *A green fluorescent protein kinase substrate allowing detection and localization of intracellular ERK/MAP kinase activity*. *Anal Biochem*, 2001. **293**(2): p. 264-8.
91. Ellis, E.F., *A new model for rapid stretch-induced injury of cells in culture: characterization of the model using astrocytes*. *J Neurotrauma*, 1995. **12**(3): p. 325-39.
92. Rzigalinski, B.A., *Intracellular free calcium dynamics in stretch-injured astrocytes*. *J Neurochem*, 1998. **70**(6): p. 2377-85.
93. Lamb, R.G., *Alterations in phosphatidylcholine metabolism of stretch-injured cultured rat astrocytes*. *J Neurochem*, 1997. **68**(5): p. 1904-10.

94. Floyd, C.L., *Traumatic injury of cultured astrocytes alters inositol (1,4,5)-trisphosphate-mediated signaling*. *Glia*, 2001. **33**(1): p. 12-23.
95. McKinney, J.S., *Stretch-induced injury of cultured neuronal, glial, and endothelial cells. Effect of polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase*. *Stroke*, 1996. **27**(5): p. 934-40.
96. Ahmed, S.M., *Stretch-induced injury alters mitochondrial membrane potential and cellular ATP in cultured astrocytes and neurons*. *J Neurochem*, 2000. **74**(5): p. 1951-60.
97. Neary, J.T., *Activation of extracellular signal-regulated kinase by stretch-induced injury in astrocytes involves extracellular ATP and P2 purinergic receptors*. *J Neurosci*, 2003. **23**(6): p. 2348-56.
98. Neary, J.T., Kang, Y. ve Shi, Y.F., *Signaling from nucleotide receptors to protein kinase cascades in astrocytes*. *Neurochem Res*, 2004. **29**(11): p. 2037-42.
99. Ostrom, R.S., *Localization of adenylyl cyclase isoforms and G protein-coupled receptors in vascular smooth muscle cells: expression in caveolin-rich and noncaveolin domains*. *Mol Pharmacol*, 2002. **62**(5): p. 983-92.
100. Neary, J.T., *Extracellular ATP induces stellation and increases glial fibrillary acidic protein content and DNA synthesis in primary astrocyte cultures*. *Acta Neuropathol*, 1994. **87**(1): p. 8-13.
101. Neary, J.T., *Trophic signaling pathways activated by purinergic receptors in rat and human astroglia*. *Prog Brain Res*, 1999. **120**: p. 323-32.
102. Jacques-Silva, M.C., *ERK, PKC and PI3K/Akt pathways mediate extracellular ATP and adenosine-induced proliferation of U138-MG human glioma cell line*. *Oncology*, 2004. **67**(5-6): p. 450-9.
103. Jacques-Silva, M.C., *P2X7 receptors stimulate AKT phosphorylation in astrocytes*. *Br J Pharmacol*, 2004. **141**(7): p. 1106-17.

104. Neary, J.T., *Traumatic injury activates protein kinase B/Akt in cultured astrocytes: role of extracellular ATP and P2 purinergic receptors*. J Neurotrauma, 2005. **22**(4): p. 491-500.
105. Davies, S.P., *Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors*. Biochem J, 2000. **351**(Pt 1): p. 95-105.
106. Noble, M.E., Endicott, J.A. ve Johnson, L.N., *Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure*. Science, 2004. **303**(5665): p. 1800-5.
107. Goldberg, L., *New derivatives of farnesylthiosalicylic acid (salirasib) for cancer treatment: farnesylthiosalicylamide inhibits tumor growth in nude mice models*. J Med Chem, 2009. **52**(1): p. 197-205.
108. Salvador-Morales, C., *Immunocompatibility properties of lipid-polymer hybrid nanoparticles with heterogeneous surface functional groups*. Biomaterials, 2009. **30**(12): p. 2231-40.
109. Schuhmann, M.U., *Determination of contusion and oedema volume by MRI corresponds to changes of brain water content following controlled cortical impact injury*. Acta Neurochir Suppl, 2002. **81**: p. 213-5.
110. Broderick, J.P., *Volume of intracerebral hemorrhage. A powerful and easy-to-use predictor of 30-day mortality*. Stroke, 1993. **24**(7): p. 987-93.
111. Broderick, J.P., *Ultra-early evaluation of intracerebral hemorrhage*. J Neurosurg, 1990. **72**(2): p. 195-9.
112. Joshi, C.N., Jain, S.K. ve Murthy, P.S., *An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts*. Brain Res Brain Res Protoc, 2004. **13**(1): p. 11-7.
113. Bullock, R., *Prevention of post-traumatic excitotoxic brain damage with NMDA antagonist drugs: a new strategy for the nineties*. Acta Neurochir Suppl (Wien), 1992. **55**: p. 49-55.