



T.C. SAğLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL SAğLIK UYGULAMA VE ARAşTIRMA MERKEZİ

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ KLİNİğİ

RATLARDA OLUşTURULAN DENEYSEL KAFA TRAVMASI
MODELİNDE SHİLAJİT EKSTRESİNİN NÖROPROTEKTİF
ETKİSİNİN ARAşTIRILMASI

Dr. Adil Can KARAOğLU

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL / 2021



T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL SAĞLIK UYGULAMA VE ARAşTIRMA MERKEZİ

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ KLİNİĞİ

RATLARDA OLUşTURULAN DENEYSEL KAFA TRAVMASI
MODELİNDE SHİLAJİT EKSTRESİNİN NÖROPROTEKTİF
ETKİSİNİN ARAşTIRILMASI

Dr. Adil Can KARAOĞLU

Tez Danışmanı: Doç. Dr. İbrahim Burak ATCI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL / 2021

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iv
TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
RESİM LİSTESİ	vii
KISALTMALAR	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kafa Travması	3
2.1.1. Tarihçe	3
2.1.2. Epidemiyoloji.....	4
2.2. Tanı ve Sınıflandırma	5
2.2.1. Kuvvet Şiddetine Göre Sınıflama	6
2.2.1.1 Hafif Kafa Travmaları.....	6
2.2.1.2. Orta Şiddette Kafa Travmaları	6
2.2.1.3. Ağır Kafa Travmaları	6
2.2.2. Bölgeye Göre Sınıflama.....	7
2.2.2.1. Fokal Yaralanmalar	7
a. Kontüzyon.....	7
b. İntrakranial Hematomlar.....	7
b.1. Epidural Hematomlar	7
b.2. Subdural Hematomlar	7
b.3. İntraserebral Hematomlar	8
c. Kafatası Kırıkları	8
c.1. Lineer Kırıklar.....	8
c.2. Çökme Kırıkları	8
c.3. Kaide Kırıkları	8
2.2.2.1. Diffüz Yaralanmalar.....	9
a. Konküzyon.....	9

b. Diffüz Aksonal Hasar	9
2.2.3. Kuvvet Yönelimine Göre Sınıflama	9
2.2.3.1. Bağlantılı Hasarlar.....	10
2.2.3.2. Başın Hareketine Bağlı Hasarlar	10
2.3. Patofizyoloji.....	10
2.3.1 Primer Hasar	11
2.3.2. Sekonder Hasar	11
a. Serebral Kan Akımı	11
b. Serebral Vasküler Direnç	12
c. Serebral Perfüzyon Basıncı.....	12
d. Serebral Otoregülasyon.....	12
2.3.2.1. Sekonder Hasarda Rol Oynayan Temel Mekanizmalar	13
a. Kalsiyum Bağımlı Hücre Hasarı.....	13
b. Enflamasyon	14
c. Oksidatif Hasar	15
d. Apoptozis.....	16
2.4. Shilajit.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Deney Hayvanları	17
3.2. Çalışma Grupları.....	18
3.3. Anestezi Uygulanması	18
3.4. Travma Aleti.....	18
3.5. Ratların Hazırlanması	20
3.6. Kafa Travmasının Oluşturulması.....	21
3.7. Çalışma Gruplarının Oluşturulması ve Çalışmanın Yürütülmesi.....	22
3.8. Değerlendirme Yöntemleri	24
3.8.1. Histolojik İnceleme	24
3.8.1.1. Hematoksilen-Eozin Boyama.....	24
3.8.1.2. Luxol Fast Blue Boyama.....	25
3.8.2. Biyokimyasal İnceleme.....	25
3.8.2.1. Total antioksidan kapasite (TAS) ve total oksidan kapasite (TOS)	25
3.8.2.2. Oksidatif stres indeksinin (OSI) hesaplanması	25
3.8.3. İstatiksel analiz.....	25
4. BULGULAR	27

4.1. Histolojik Bulgular	27
4.2. Biyokimyasal Bulgular	30
4.2.1. Total antioksidan kapasite, total oksidan seviye ve oksidatif stres indeksi bulguları	30
5. TARTIŞMA	32
6. SONUÇ	35
KAYNAKLAR.....	36



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, hekimlik sanatının ve beyin ve sinir cerrahisinin temel ilkelerini öğrendiğim değerli hocalarım ve klinik şeflerim; Prof. Dr. Adem YILMAZ, Doç. Dr. Veysel ANTAR, Op. Dr. Nail DEMİREL, Prof. Dr. Ayhan KOÇAK, Doç. Dr. N. Güzin ÖZDEMİR ve Doç. Dr. Okan Türk'e;

Uzmanlık eğitimim süresince üzerimde büyük emekleri olan Op. Dr. Bilgehan SOLMAZ, Doç. Dr. M. Yavuz SAMANCI, Op. Dr. Mehmet YAMAN, Doç. Dr. Selçuk ÖZDOĞAN, Op. Dr. Hüseyin DEMİR, Op. Dr. C. Kaan YALTIRIK, Op. Dr. Doğa UĞURLAR'a;

Zorlu asistanlık dönemimde hayatın her anını paylaştığım Op. Dr. Görkem BITIRAK, Op. Dr. Salim KATAR, Op. Dr. Tahsin SAYGI, Op. Dr. Ersal KARAKAŞ, Op. Dr. Oğuz BARAN, Op. Dr. Ö. Faruk ŞAHİN, Dr. Özgür BARAN, Dr. M. Akif AMBARCIOĞLU, Dr. Emre EĞİLMEZ, Dr. M. Özgür YILMAZ, Dr. E. Kutlu EKİZ, Dr. Fazail KARİMOV, Dr. M. Teoman KARAKURT, Dr. Nafiye ŞANLIER ve Dr. Nurullah AYDIN'a;

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tezimin her aşamasında emek ve yardımlarını esirgemeyen, destekleyen, katkı sunan, sabır ve anlayışla ilgilenen değerli hocam Doç. Dr. İ. Burak ATÇI'ya, ve tez hazırlık dönemimde bilgilerini, yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Canan HÜRDAĞ'a;

Hayatımın her aşamasında desteklerini hiç esirgemeyen ve sabır gösteren aileme;

Hayatı benimle paylaşan, her zaman yanımda olan sevgili eşim Zeynep DEMİR KARAOĞLU ve biricik oğlumuz Atlas KARAOĞLU'na

Sevgi ve saygılarımla sonsuz teşekkür ederim...

Dr. Adil Can KARAOĞLU

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Glaskow koma skalası	5
Tablo 2. Diffüz Aksonal Hasarın Nöropatolojik Sınıflaması	9
Tablo 3. Red nöronların gruplara göre dağılımı ve grupların median değerleri	27
Tablo 4. Ödemin gruplara göre dağılımı ve grupların median değerleri	28
Tablo 5. TAS, TOS ve OSI değerlerine ait ortalama $\pm$ standart hata değerleri	30



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Travma aleti	20
Şekil 2. Red nöronların istatistiki dağılımı	29
Şekil 3. Ödem şiddetinin istatistiki dağılımı	30
Şekil 4. Deney gruplarından alınan kan örneklerinde TAS, TOS ve OSI değerleri	31



RESİM LİSTESİ

Resim 1. Travma aleti	19
Resim 2. Anestezik ajanlar	21
Resim 3. Travmanın oluşturulması	21
Resim 4. Foramen magnum ve skalp kesisi	22
Resim 5. Ratlara kraniektomi yapılması	23
Resim 6. Akut hasarın olduğunu gösteren Red nöronların varlığı	28
Resim 7. Piramidal nöronların çekirdek ve nissl taneciklerinin kaybı	29



KISALTMALAR

ABD : Amerika Birleşik Devletleri

AMPA : a-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolepropionik asit

ASY : Ateşli silah yaralanmaları

ATP : Adenozin Trifosfat

BT : Bilgisayarlı Tomografi

DAH : Diffüz Aksonal Hasar

DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü

EAA : Eksitatör aminoasit hipotezi

GKS : Glasgow Koma Skalası

KBB : Kan Beyin Bariyeri

KİB : Kafa İçi Basıncı

OAKB : Ortalama Arteriyel Kan Basıncı

OSI : Oksidatif Stres İndeksi

MRG : Manyetik Rezonans Görüntüleme

NMDA : N-metil-D-aspartik asit

ROT : Reaktif Oksijen Türleri

SKA : Serebral Kan Akımı

SPB : Serebral Perfüzyon Basıncı

SSS : Santral Sinir Sistemi

SVD : Serebral Vasküler Direnci

TAS : Total Antioksidan Kapasite

TBH : Travmatik Beyin Hasarı

TOS : Total Oksidan Kapasite

ÖZET

RATLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL KAFA TRAVMASI MODELİNDE SHİLAJİT EKSTRESİNİN NÖROPROTEKTİF ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Adil Can Karaoğlu

Amaç: Bu çalışmada deneysel kafa travmasında shilajit ekstresinin nöroprotektif etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereçler ve yöntem: 33 adet Sprague Dawley türü Albino suşu erkek rattan oluşan üç grup çalışmaya alındı. Gruplar şu şekilde oluşturuldu: Grup 1 (n: 11): Travma uygulanıp, tedavi uygulanmayan grup. Grup 2 (n: 11): Travma uygulanıp, tedavide 0.5 mL/rat serum fizyolojik, intraperitoneal uygulanan grup. Grup 3 (n: 11): Travma uygulanıp, tedavide 150 mg/kg shilajit ekstresi, intraperitoneal uygulanan grup. Kafa travması oluşturulduktan sonra 2 ve 3. gruba bir, yirmidört ve kırk-sekizinci saatlerde belirtilen tedaviler uygulandı. Travma sonrası tüm gruplarda denet hayvanları 72. saatte sakrifiye edildikten sonra beyin dokuları ve kan örnekleri alındı. Beyin dokuları rutin histolojik doku takibi sonrası serebral korteks ve ca1 bölgesinden hazırlanan kesitleri hemotoksilen eozin ve luxol fast blue boyama ile incelendi. Alınan kan örneklerinden rutin işlemlerden sonra total antioksidan kapasitesi, total oksidan kapasitesi ve oksidatif stres indeksi ölçümleri yapıldı.

Bulgular: Sadece travma uygulanan gruptaki ve travma sonrası tedavide serum fizyolojik verilen gruptaki red nöron sayısı ve ödem şiddeti travma sonrası shilajit ekstresi verilen gruba göre hem serebral korteks bölgesinde hem de ca1 bölgesinde anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Travma sonrası shilajit ekstresi verilen gruba göre total antioksidan kapasite sadece travma uygulanan gruptan ve travma sonrası tedavide serum fizyolojik verilen gruptan alınan kan örneklerinde anlamlı olarak artarken, Travmatik beyin hasarı nedeniyle verilen shilajit ekstresi total oksidan kapasite ve oksidatif stres indeksi değerlerini diğer gruplara göre anlamlı olarak azaltmıştır.

Sonuç: Sonuç olarak; akut travmatik beyin hasarının tedavisinde shilajit ekstresinin nöroprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir. Shilajitin insanlarda sekonder beyin hasarının tedavisinde yararlı bir seçenek olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Deneysel kafa travması, shilajit, nöroprotektif etki

ABSTRACT

INVESTIGATION OF NEUROPROTECTIVE EFFECT OF SHILAGITE EXTRACT IN EXPERIMENTAL HEAD TRAUMA MODEL CREATED IN RATS

Dr. Adil Can Karaoglu

Objective: In this study, it was aimed to investigate the neuroprotective effect of shilajit extract in experimental head trauma.

Materials and methods: Three groups of 33 Sprague Dawley Albino strain male rats were included in the study. The groups were formed as follows: Group 1 (n: 11): The group in which trauma was applied but not treated. Group 2 (n: 11): The group that was applied trauma and treated with 0.5 mL / rat saline, intraperitoneally. Group 3 (n: 11): 150 mg / kg shilajit extract was administered intraperitoneally in the treatment of trauma. Following the head trauma, the indicated treatments were applied to the 2nd and 3rd groups at the first, twenty-four and forty-eighth hours. Brain tissues and blood samples were taken after the control animals were sacrificed at the 72nd hour in all groups after trauma. After routine histological follow-up of brain tissues, sections prepared from cerebral cortex and ca1 region were examined with hemotoxylin eosin and luxol fast blue staining. Total antioxidant capacity, total oxidant capacity and oxidative stress index were measured from blood samples taken after routine procedures.

Results: The number of red neurons and the severity of edema were significantly higher in both the cerebral cortex and the ca1 region in the group treated with trauma only and in the group administered saline after trauma compared to the group that received shilajit extract after trauma. The total antioxidant capacity increased significantly in blood samples taken only from the group treated with trauma and saline in post-trauma treatment compared to the group given post-traumatic shilajit extract, while shilajit extract given due to traumatic brain injury significantly decreased the total oxidant capacity and oxidative stress index values compared to the other groups. .

Conclusion: As a result; Shilajit extract has been shown to have a neuroprotective effect in the treatment of acute traumatic brain injury. Our study showed that shilajit may be a useful option in the treatment of secondary brain injury, in humans.

Keywords: Experimental head trauma, shilajitis, neuroprotective effect

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde kafa travması ülkemizde ve tüm dünyada ciddi sağlık sorunlarının arasında en ön sıralarda yer almaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalara göre bir yılı kapsayan süreçte Amerika Birleşik Devletleri' (ABD) nde en az 2,5 milyon insan kafa travması nedeni sağlık kuruluşlarına başvuruda bulunmaktadır (1). Kafa travmaları olay sonrası hastanın bilinç durumu, Glasgow Koma Skalası (GKS) puanı, posttravmatik amnezi süresi, eşlik eden fokal nörolojik bulgulara göre sınıflandırılır. Bu perspektiften bakıldığında hafif kafa travması hastanın GKS puanının 12'ten büyük olması (≥ 13), 30 dakikadan kısa süren bilinç kaybı yaşamış olması, 24 saatten uzun olmayan travma sonrası amnezisi bulunması ve bazen de eşlik edebilecek geri dönüşlü veya kalıcı fokal nörolojik defisitlerinin bulunması olarak tanımlanır (2). Kafa travması nedeni sağlık kuruluşlarına başvuruların çoğunluğunu GKS 13 ile 15 aralığında olan hafif kafa travması vakaları oluşturmaktadır (1).

Toplum içerisinde görülme sıklığı hayli fazla olan kafa travmaları doğal olarak nöroşirürji pratiğinde acil vakalarında başında gelmektedir. Kafa travması sonrasında meydana gelen Travmatik Beyin Hasarı (TBH) günümüzün modern tıp dönemindeki gelişmelere rağmen ciddi bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaya devam etmektedir. TBH geliştikten sonra santral sinir sisteminde (SSS) öncelikle primer beyin hasarı ortaya çıkmaktadır. Primer beyin hasarı saçlı deri yaralanmaları, kranium fraktürleri, kontüzyo serebri, parankim laserasyonu, diffüz aksonal hasar ve intrakranial kanamalar gibi oldukça geniş patolojileri içerisinde barındırmaktadır. Fakat travma nedeniyle meydana gelen hasardan sadece primer hasarı suçlu tutmak mümkün olmamaktadır. Sekonder hasar, primer beyin hasarından saatler veya günler sonra ortaya çıkabilen, birçok farklı fizyopatolojik mekanizmaya bağlı olarak gelişen bir durumdur. Sekonder hasarda rol alan mekanizmalar arasında nörotransmitter salınımı, serbest radikal oluşumu, kalsiyum bağımlı hücre hasarı, gen aktivasyonu, mitokondrial disfonksiyon ve enflamasyon yer almaktadır. Bir kısmı önlenebilir olan sekonder hücre hasarlarının prognozu büyük oranda negatif yöne kaydırıldığı gösterilmiştir. Mevcut sebeple sekonder beyin hasarı engellendiğinde mortalite oranlarının ve morbidite oranlarının düşmesi beklenebilir. Sekonder beyin hasarının büyük çoğunluğunu travma nedeni beyinde antioksidan yollar arasında dengelerin kaybolması sonucu ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri nedeniyle oluşan lipid peroksidasyonu neden olmaktadır. Serbest oksijen radikali

engelleyicilerin, iyileştirici özelleikleri ile SSS'de hipoksi veya darbe nedeniyle ortaya çıkan patolojileri pozitif yönde etkilediği tespit edilmiştir (3,4).

Kafa travması sonrasında mevcut otoregölasyon dengelerinin kaybolması nedeniyle normal işleyişi kaybolan beyin dokusunda oluşan serbest oksijen radikallerinin hücreden çıkarılması zorlaşmaktadır. Ayrıca beynin oksidatif stres ajanlarına karşı savunma mekanizması oldukça zayıftır. Travmaya maruz kalan beyin dokusu, çoğunlukla oksidanlar nedeniyle oluşan ikincil hasardan korunabildiği oranda normal fizyolojisine dönebilir (3). Oksidatif ajanları engelleyen mekanizmaların, iyileştirici özellikleri ile SSS'de hipoksi veya darbe nedeniyle ortaya çıkan patolojik nörolojik durumları pozitif olarak etkilediği gösterilmiştir (5).

Gelişmiş ölkelerde, sağlık uzmanları ve farmakolojik kuruluşlar tarafından Shilajit ile ilgili farklı hastalıkların tedavisindeki önemi hakkında çeşitli çalışmalar vardır. Bazıları, Shilajit'in peptik ülser (6,7), kemik ağrıları ve kırıkların (8,9) tedavisinde faydalı etkilerini bildirmiştir. Asya Shilajit (Mumiyo) % 20 mineral, % 15 protein, % 5 lipit, % 5 steroid ve ayrıca bazı karbonhidratlar, alkaloidler ve amino asitler içerir (10,11). Bu maddenin birkaç terapötik etkisi şu şekildedir: hafıza geliştirici, nöroprotektif, antiinflamatuvar ve antioksidan rollerdir (7). Shilajit'in biyolojik etkisi, di-benzo-alfa-pirron, hümik asit ve folik asit içeriklerine atfedilmiştir (12,13). Shilajit için bahsedilen çeşitli yararlı etkilerle ilgili olarak, bu maddenin uygulanmasının kafa travma sonrası yaralanmaların iyileştirilmesinde etkili olabileceğini varsaydık. Bu nedenle, bu çalışmada travmatik beyin hasarını takiben bu maddenin nöroprotektif etkisini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Kafa Travması

Kranyum ve içerisindeki nöral, vasküler yapıların koruyucu kapasitelerini aşarak bu yapılara yönelik olarak uygulanan harici bir mekanik kuvvetin sonucu olarak gelişen geçici veya daimi nörolojik bozulmalara, fonksiyonel yetersizlik durumlarına veya psikolojik durum ve davranış değişikliklerine sebep olan durumlar TBH olarak tanımlanır. Bahsedilen kuvvetler şiddetli künt bir darbe, delici kesici alet yaralanmaları, ateşli silah yaralanmaları (ASY) veya patlamayla oluşan kuvvetler olabilir. Kuvvetin kaynağı, eksen, gücü ve maruziyet süresi, TBH'nın derece ve sonuçlarını belirler. TBH oldukça geniş bir tanım olarak kabul edilmelidir ki, basit bir parankimal kontüzyondan, ağır koma durumlarına, kalıcı ve/veya geçici zihinsel ve/veya fiziksel engellilik durumlarına ve ölüme varan durumlar TBH sonucu görülebilmektedir (14).

2.1.1. Tarihçe

Kafa travmaları hakkında tarihte bilinen en eski yazılı kaynaklar M.Ö. 2800 'lü yıllarda yaşamış olan Mısırlı Imhotep'e ait olduğu bilinmektedir. Thabes kenti çevrelerinde bir mezarda bulunan bu papirüslerde bahsedilen 48 travmanın 15 tanesi kafa travmaları ile ilişkilidir. Imhotep kafa travmalarını 3 gruba ayırmıştır; tedavi edilir, edilebilir, edilemez. Binlerce yıl sonra günümüzde bu gruplandırmanın halen geçerliliğini koruduğu, fakat tedavi edilemez kafa travmaları oranının her geçen gün azalmakta olduğu gözlenmektedir (15).

Fransa ve Avusturya civarlarında arkeolojik kazılar sırasında bulunan ve cilalı taş devrine ait olduğu tahmin edilen kafatası kalıntılarının yaklaşık olarak %10'unda burr hole benzeri bulgular tespit edilmiştir (15). Avrupa kıtasında, Hippocrates (M.Ö. 460-355), Galen (M.S. II.yy) ve Cornecius Celcus (M.S. I.yy) gibi tarihteki büyük hekimlerin zamanlarında çeşitli tedaviler amacıyla burr hole kullanıldığını tarihteki yazılı belgelere dayanarak biliyoruz. İbni Sina (M.S.980-1037) da tedavi amaçlı burr hole önermiştir (16). Kranium çökme fraktürlerinde tarihte papaların hekimi olarak bilinen Guy de Chauliac (M.S. 1300-1386) cerrahi tedavi seçeneği olarak hastalara sunmuştur. Ambroise Paré, M.S. 1510 yılında Fransa kralı II. Henry'nin travmatik supraorbital intraparakimal hemoraji operasyonunu gerçekleştirmiştir. Berengarius Bologna Üniversitesi'nde profesör olarak çalışmış olan Caprri Jacop, M.S. 1518 yılında kafa travmaları hakkında tarihte bilinen ilk kitabı yazmıştır. Bu kitap

sadece nöroşirürji hakkında yazılmış olan tarihte bilinen ilk kitap olma özelliğini taşımaktadır (17).

Anadolu coğrafyasında yapılan arkeolojik kazılarda erken bronz çağına ait olduğu tahmin edilen kalıntılarda İkiztepe-Samsun bölgesinde ve Kültepe bölgesinde yaşamış olan Asurların bronz çağına ait olduğu tahmin edilen kalıntılarında burr hole uyguladıkları ortaya konulmuştur. Arkeolojik çalışmalarla ortaya çıkarılan kafa travmaları ile ilgili tarihteki en etkileyici veri Urartular (M.Ö. 800) zamanına ait Dilkaya bölgesinde keşfedilen kafatasıdır. Kafa travması öyküsü olan, orta meningeal arter ve dallarını içine alan, frontal alandan oksipital alana kadar süregelen lineer fraktürü olan bir hastada, muhtemel bir epidural hematomu drene etmek amaçlı yaklaşık 6x11 cm ebatlarında serbest flep kraniotomi gerçekleştirildiği tespit edilmiştir. Kraniotomi amaçlı onüç adet burr hole açılmış sonrasında bunlar tahminen bir keski ile bir araya getirilerek kemik flep kaldırılmış ve işleminden sonra kemik flep tekrar yerine yerleştirilmiştir (16).

Kafa travmalarının oluşturduğu durumların tedavisinde 19. yüzyıl sonları ve 20. yüzyıl başlarında günümüz nöroşirürji yaklaşımlarının öncüleri olarak kabul edilen Victor Horsley, Harvey Cushing, W.H. Jacobson, Hugh Cairns ve Walter Dandy'nin nöroşirürjiye kattıkları ile önemli ilerlemeler sağlanmıştır. Hounsfield 1970 yıllarında Bilgisayarlı Tomografinin gelişimi ve klinik kullanımı ile kranial patoloji durumlarının varlığının tespit edilmesinde bir devrime imza atmıştır (16). 1974 yılında beyin hasarı araştırmalarında önemli bir merkez olarak kabul edilen Glasgow Nörolojik Bilimler Enstitüsü'nden Profesör Jennent ve kıdemli asistanı Teasdale, Lancet'te koma ve bilinç bozukluğunun değerlendirilmesi hakkında GKS'nı tanımlayan bir makale yayınlarak bu tanıma uyan hastaların takiplerinde sağlanan büyük bir adıma öncülük etmişlerdir (18).

2.1.2. Epidemiyoloji

Kafa travmaları insidansı sosyoekonomik durum, yaş, ırk ve cinsiyete göre farklılıklar göstermektedir. Yetişkinlerde en sık nedeni trafik kazaları oluştururken, çocukluk çağına ise en sık düşme nedenli kafa travması olmaktadır. Kara travması görülme sıklığı açısından en riskli grubu 15-24 yaş arası erkekler oluştururken, sonrasında en riskli grup olarak cinsiyet farketmeksizin 65 yaş üstü grup oluşturmaktadır. Erkek cinsiyet kafa travması geçirme riski açısından kadınlara oranlara 3 kat fazla risk oluşturmaktadır. ASY ile ilişkili kafa travmaları sosyoekonomik düzeyi düşük toplumlarda ve kırsal bölgelerde daha sık görülmektedir (19).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kayıtlarına bakıldığında kafa travması sonrası dünya genelinde her 100.000 kişide 83,7 ölüm oranı tespit edilirken, ülkemizde bu oran 100.00'de 120 olarak bildirilmiştir. ABD'de kafa travması nedeni yıllık hastaneye başvuru sayısı 2 milyonun üzerindedir ve her 100.000 kafa travması başvurusu içerisinde yaklaşık 200 kişide ağır kafa travması görülmektedir (20).

2006 yılında Karasu ve arkadaşlarının ülkemizde yaptığı bir çalışmada, yıl boyunca acil servise kafa travması şikayetiyle başvuruda bulunan 1787 vaka içerisinde servis yatışı yapılarak takip edilen 430 vaka incelenmiştir. Bu çalışmada TBH'nın en sık nedeni %40 oranla yüksekten düşme, ikinci en sık nedende %37 ile trafik kazaları olarak bulunmuştur (21).

2.2. Tanı ve Sınıflandırma

Kafa travmalı olgunun değerlendirilmesi ve takibinde nörolojik muayene en önemli değerlendirme metodudur. Hasta ve/veya yakınlarından ayrıntılı bir anamnez elde edilmeli bu sırada hastanın vital bulguları (ateş, nabız, tansiyon, solunum sayısı) kayıt altına alınmalıdır. Şuur durumu, verbal yanıt, göz bulguları ve motor fonksiyonlar değerlendirilir. Vakanın prognozu hakkında bilgi verebilmesi, serebral fonksiyonların durumunu ve beyin hasarının derecesini pratik anlamda en iyi gösterge olarak kabul edilen 1974 yılında Profesör Jennent ve asistanı Teasdale tarafından öne sürülen GKS, günümüzde tüm dünyada nöroşirurji kliniklerinde temel başvuru kaynağı olarak kabul edilmektedir.

Tablo 1. Glasgow Koma Skalası

Göz Açma (G)	Puan	Motor Yanıt (M)	Puan	Verbal Yanıt (V)	Puan
Spontan	4	Emirlere Uyar	6	Oryante	5
Sözel Uyararla	3	Ağrı İle Lokalize	5	Konfüze	4
Ağrılı Uyararla	2	Ağrı İle Çeker	4	Uygunsuz Yanıt	3
Yanıtsız	1	Fleksör Yanıt	3	Anlaşılmaz Sesler	2
		Ekstansör Yanıt	2	Yanıtsız	1
		Yanıtsız	1		

4 (G) + 6 (M) + 5 (V) = 15 GKS Toplam Puan

Kafa travması hastalarının sınıflandırılmasında en yaygın olarak kullanılan GKS sistemi baz alınarak ;

13,14,15 Puan : Hafif Kafa Travması

9,10,11,12 Puan : Orta Şiddette Kafa Travması

3,4,5,6,7,8 Puan : Ağır Kafa Travması şeklinde belirtilir.

2.2.1. Kuvvet Şiddetine Göre Sınıflama

2.2.1.1 Hafif Kafa Travmaları

Rimel ve arkadaşları 1981 yılında yayınladıkları bir makalede hafif kafa travması terimini literatüre kazandırmışlardır. Yatarak tedavi süresi 48 saatten daha az olan, bilinç durum değişikliği 20 dakikadan az olan ve GKS 13-15 aralığında olan vakaları bu tanımın içerisinde saymışlardır (22). Günümüzde gelişen teknoloji ile birlikte Bilgisayarlı Tomografi (BT) kullanımı da yaygınlaşmış ve hafif kafa travması geçiren hastalara ilgilendiren tanı ve tedavi protokollerinde çeşitli anlaşmazlıklar ortaya çıkmıştır. Fazla vaka sayısı ve bu vakaların içerisinde intrakranial patoloji izlenme sıklığının çok küçük bir oranda olması sebebiyle, hem sosyo ekonomik hem de toplum sağlığı açısından tüm vakalara BT çekilmesi mümkün olamamaktadır. Bahsedilen nedenler dolayısıyla, hafif kafa travması vakalarının hangi kısmına BT tetkiki istenmesi hususunda bir çok çalışma yayınlanmış ve çeşitli algoritmalar önerilmiştir (23).

2.2.1.2. Orta Şiddette Kafa Travmaları

İlk muayene sırasında GKS 9-13 aralığındaki vakalar orta şiddette kafa travması olarak sınıflandırılır. Vaka koma durumunda olmamakla birlikte gözünü açmakta, emirleri uygulamakta, kelimeleri seçmede yetersizdir. Bu vaka grubunda kranium kırıkları, intraparakimial kontüzyonlar, epidural ve subdural hematomlar gibi ciddi patolojiler görülebilir. Takipleri sırasında intrakranial basınç artışı gibi ciddi komplikasyonlar için risk altındadırlar. Bu grupta beklenen yaşam süresi prognozu iyi olmakla beraber, sekel nörolojik bozukluklar sık olarak görülmektedir (24,25).

2.2.1.3. Ağır Kafa Travmaları

GKS 8 ve altında olan vakalar bu gruba dahil edilir ve koma durumunda kabul edilirler. Kritik yaralanmalı vakalar olarak tanımlanabilen GKS 3 veya 4 olan vakalar en kötü prognoza

sahip olanlardır. Ağır kafa travması sonrası sekonder yaralanmanın etkilerini azaltmak için erken müdahale oldukça önemlidir. İlk muayene ve gerekli acil tetkikler sonrası koma durumunda kabul edilen bu vakalar zaman kaybetmeden yoğun bakım ünitesine alınmalıdırlar. Kitle etkisine neden olmuş hemorajiler ve dekompresyon gereken vakalarda erken cerrahi mutlak öncelik olmalıdır. Tüm müdahalelerin altında yatan en önemli amaç sekonder hasarın etkilerinden olabildiğince kaçınmaktır. Serebral perfüzyonun devamı için intrakranial hipertansiyon ve hipoksiden kaçınılmalıdır. Günümüzde ağır kafa travması geçiren tüm vakalara entübasyon ile birlikte intrakranial basınç takibi yapılması önerilmektedir (24,25).

2.2.2. Bölgeye Göre Sınıflama

2.2.2.1. Fokal Yaralanmalar

a. Kontüzyon

Travmadan sonraki dönemde parankimde oluşan fokal mikrohemorajilerdir (26). Laserasyon ise buna ek olarak araknoid membran ve pia yaralanmasının da olduğu durumlara verilen addır (27).

b. İntrakranial Hematomlar

b.1. Epidural Hematomlar

Kafa travması nedeniyle dura mater ve kranium aralığında oluşan hemorajilerdir. Tüm kafa travmalarında %1-3 oranında epidural hematomlar görülürken, bu kanamaların %15-20 oranında mortalite insidansı bulunmaktadır. Epidural hematoma sonrası mortalitenin en önemli sebebi kanamanın oluşturduğu kitle etkisi ve herniasyondur. Epidural hematomların oluşumuna en sık orta meningeal arter hasarı neden olurken venöz nedenli epidural kanamalar tüm epidural hematomların sadece 10'da 1'lik kısmını oluşturur (28).

b.2. Subdural Hematomlar

Kafa travması nedeniyle araknoid membran ve dura mater aralığında oluşan hemorajilerdir. Bu aralıkta bulunan asıcı venlerin yaralanması nedeniyle oluşur. Hematom oluşturduğu kitle etkisi nedeniyle şift etkisine ve kafa içi basınç artışına yol açar. Subdural hematomları patofizyolojik olarak 3 grup altında incelenir. Bunlar; travma sonrası 48 saat içerisinde ki döneme akut subdural hematomlar olarak adlandırılırken, son derece yüksek morbidite ve mortalite riski olan kanamalardır. 48 saat sonrası 14. güne kadar olan dönemdeki kanamalar subakut subdural hematomlar olarak isimlendirilir ve hematomun akut ve kronik

dönemlerinin bir arada bulunduğu dönemdir. Kronik subdural hematomlarsa travma sonrası 14. günden sonraki dönemi kapsar ve bu dönemde hematomun yıkılmış kan ürünlerinden oluşan kronik dönemde olduğu gözlemlenir. Kronik subdural hematomlar, akut subdural hematomlara göre daha iyi prognoza sahip kanamalardır. Tüm subdural içerisinde akut subdural hematomlar %60'lık bir kısmı oluşturur ve tüm akut subdural hematomlarında %60'lık bir kısmı mortalite ile sonuçlanır (29).

b.3. İntraserebral Hematomlar

Bu kanamaların 5'te 1'i kafa travması sonrası oluşurken, geri kalan büyük kısmının altında yatan nedenlerse hipertansiyon, anevrizma rüptürleri, arterio venöz malformasyonlar ve tümörlerdir. Yetişkin çağlarda daha çok gözlenen bu kanamalar en çok çökme kırıkları ve delici yaralanmalarda izlenir (28).

c. Kafatası Kırıkları

c.1. Lineer Kırıklar

Travma esnasında vektörel güçler nedeniyle lineer fraktürler oluşur. Kranium fraktürlerinin %80'i lineer fraktürlerden oluşur. Çarpmanın primer etki alanında veya komşuluğunda gelişen bu fraktürler epidural hematomlara neden olabilmeleri açısından önemlilik arz ederler (30). Ağır kafa travması ve lineer fraktür birlikteliği %62 olarak tespit edilmiştir. Bu fraktürlerin uzun dönem komplikasyonlarından en önemlisi ise leptomeningeal kistlere neden olabilmeleridir (31).

c.2. Çökme Kırıkları

Travma nedenli kalvarium iç tabulasının diploenin kalınlığından daha fazla iç kısma doğru yer değiştirmesiyle oluşan kırıklardır. Her 10 kafa travmasının 1 tanesinde görülür. Parankime fazla kompresyon yoksa, dura ve saçlı deri sağlam ise basit çökme fraktörü olarak adlandırılırlar. Saçlı deride açık yaralanma varsa, dura hasarı varsa açık çökme fraktörü olarak isimlendirilirler (31).

c.3. Kaide Kırıkları

Kalvarium çatısında meydana gelen bir kırığın uzaması nedeniyle oluşan kırıklardır. Mastoid hava kanallarını ve perinazal sinüsleri içerisine alan bu fraktürlerde dura hasarı meydana gelmişse rinore, otore, menenjit ve abse gelişimi açısından artmış risk söz konusudur. Fraktür hattı petröz piramidi yatay olarak keserse yatay kırık, uzun eksene paralel seyrederse uzunlamasına kırık olarak isimlendirilir. 7. ve 8. kranial sinir hasarı en sık yatay kırıklarda izlenirken, bu hastalarda hemotimpanyum gelişme sıklığıda artmıştır. Optik

kanalı içine alan kırıklarda optik sinir hasarı, klivusta izlenen kırıklarda 6. kranial sinir hasarı ve az bir kısmında trigeminal ganglion hasarı izlenebilir (31).

2.2.2.1. Diffüz Yaralanmalar

a. Konküzyon

TBH'nın en yaygın görülen grubudur. Görüntüleme tetkiklerinde akut hasarın görülmediği, kalıcı olmayan fiziksel, kognitif ve emosyonel bozuklukların görüldüğü hafif kafa travmasıdır (32).

b. Diffüz Aksonal Hasar

Beyaz cevherde bulunan aksonal liflerin, akselerasyon ve deselerasyon travmaları nedeniyle hasarlanması sonucu ortaya çıkan patolojilerdir. Şiddetli kafa travmalarından sonra izlenen ve geri dönüşü olmayan şuur kaybının en önemli nedenidir. Hasarın tipik olarak beyaz cevherde izlendiği bu durumlarda serebral hemisfer, korpus kallosum ve beyin sapı krusları lezyonun en sık izlendiği anatomik bölgelerdir. Diffüz aksonal hasara (DAH) ait radyolojik deliller (punktat hemorajiler) travma sonrası erken dönemde görülemeyip, günler içerisinde görünür hale gelirler. Prognoz aksonal yaralanmanın anatomik lokalizasyonu ve boyutlarına bağlıdır. Diffüz aksonal hasarın tanımlanmasında geç dönemde çekilen kranial manyetik rezonans görüntüleme (MRG) en iyi yöntemdir (33,34).

Tablo 2 : Diffüz Aksonal Hasarın Nöropatolojik Sınıflaması

DERECE	LEZYONUN YERİ
Grade I	Serebral hemisferlerin parasagittal beyaz cevherinin aksonal hasarı
Grade II	Grade 1 + korpus kallosumda fokal lezyon
Grade III	Grade 2 + serebral pedinkülde fokal lezyon

2.2.3. Kuvvet Yönelimine Göre Sınıflama

Maruz kalınan kuvvet sonucu oluşan etki dinamik ve statik etki olmak üzere ikiye ayrılır. 200 milisaniyeden daha uzun sürede meydana gelen etkiler statik etkiler olarak adlandırılır. Kraniumda veya kafa kaidesinde oluşan kırıklar çoğunlukla statik etki nedenlidir. 50 milisaniyeden daha az sürede oluşan etkilerse dinamik etkileri oluşturur ve dinamik etkilerde itme ve çarpma olmak üzere iki alt tipe ayrılır. Hareketsiz haldeki başın hareket haline

geçmesi veya hareket halindeki başın travmadan önce ani olarak durması nedeniyle ortaya çıkan etkiler itici etkiyi oluşturur. Dinamik etkinin en yaygın görülen alt tipi ise çarpma etkisi olup, çoğunlukla birbirleriyle ilişkili hareket halinde olmayan güçleri birleşimi nedeniyle meydana gelir. TBH nedeniyle kemikler, vasküler yapılar ve parankim başlıca etkilenen dokular olup, her doku travmaya karşı tolerans derecelerine göre farklı şekilde etkilenirler (35,36).

2.2.3.1. Bağlantılı Hasarlar

Harekete bağlı olmadan kontakt kuvvetler nedeniyle oluşan hasarlardır. Kontakt kuvvetler iki tip hasara neden olurlar; travma bölgesi komşuluğunda oluşan lokal hasarlanmalar (kranium fraktürlerinin büyük çoğunluğu, epidural hematomlar, coup kontüzyonlar), travma bölgesinden uzakta oluşan hasarlanmalar (counter coup kontüzyonlar). Kontakt kuvvetlerin neden olduğu hasar her türlü fokal etkili olup, yaygın beyin hasarına neden olmazlar (35,36).

2.2.3.2. Başın Hareketine Bağlı Hasarlar

Yaygın olarak kullanımı akselerasyon ve deselerasyon hasarları şeklindedir. Başın sagittal ekseninde hareketi arkadan öne doğru olduğunda oluşan hasarlar akselerasyon hasarı, önden arkaya doğru olduğunda oluşan hasarlar deselerasyon hasarı olarak adlandırılırlar. Bu hareket sırasında subdural köprü venlerinde gerginlik ve hasar oluşur. Bu hareketin oluşturduğu primer etki subdural hematoma ve counter coup lezyonların oluşmasına neden olur. Hareketin neden olduğu sekonder hasarlar ise diffüz aksonal yaralanma, parankimde konküzyon ve derin peteşiyal hemorajilerdir. Hasarın derecesi maruz kalınan gücün büyüklüğüne, yönelimine ve süresine bağlı olarak değişir. Akselerasyon hasarları 3 alt grupta toplanır. Translasyonel akselerasyon beyin ağırlık merkezinin düz bir ekseninde hareketiyle meydana gelirken, rotasyonel akselerasyon ağırlık merkezinin rotasyonu nedeniyle oluşan hasarlardır. Translasyonel ve rotasyonel akselerasyonların bir arada görülmesi sonucuyla da anguler akselerasyon hasarı meydana gelir ve akselerasyon hasarlanmaları içerisinde en ağır kliniği oluşturan hasarlanmadır (35,36).

2.3. Patofizyoloji

Kafa travması sonucunda oluşan kuvvet nedeniyle, ilk anda oluşan doku ve nöron hasarına bağlı olarak nöronal iletimin engellenmesi primer hasar olarak adlandırılır. Primer hasar veya birincil zedelenme sırasında maruz kalınan kuvvetin mekanik etkisi yüzünden hücrelerde fiziksel yaralanma meydana gelir. Birincil zedelenme sonrasında zamanla oluşan çeşitli patofizyolojik mekanizmalar nedeniyle oluşan nöron ve vasküler hasara ise sekonder hasar

veya ikincil zedelenme adı verilir. Travmaya maruziyet sonrası oluşan primer hasarı önlemenin bir yolu bulunmaz ancak sekonder hasarı oluşturan patofizyolojik mekanizmaları kırmak mümkün olup bu sayede kafa travmasına maruz kalan hastanın prognozunda iyileşme sağlanabilir (37). Morbidite ve mortalite oranlarını iyileştirmek amacıyla son zamanlarda ikincil hasarın meydana geliş yollarının aydınlatılması ve önlenmesi amacıyla literatürde bir çok çalışma yayınlanmıştır.

2.3.1 Primer Hasar

Kafa travması meydana geldiği anda, maruz kalınan kuvvetin direkt etkileri nedeniyle ortaya çıkan hasardır. Primer hasarın etkileri fokal ve diffüz hasarlar olarak iki ayrı şekilde incelenmektedir. Kontüzyon, intrakranial hematomlar ve kafatası kırıkları fokal etki nedenli oluşurken, diffüz etki nedenli konküzyon ve diffüz aksonal hasar meydana gelmektedir (20).

2.3.2. Sekonder Hasar

Primer hasar sonrasında zaman içerisinde meydana gelen patolojik olaylar olup, etkileri bölgesel ve sistemik olarak incelenebilir. Bölgesel etkileri intrakranial bulgulardan oluşup bunlar, kafa içi basınç artışı, parankimal ödem ve nörolojik defisitlerdir. Hipotansiyon, hipoksi, hiperkapni, hipertermi ve elektrolit bozuklukları ise sekonder beyin hasarının sistemik etkileri olarak sayılabilir. Primer beyin hasarını önlemek için tedavi şansı mümkün olamamakla birlikte sekonder beyin hasarının bölgesel ve sistemik etkilerini azaltmak veya engellemek mümkün olmaktadır. Bu amaçla son zamanlarda sekonder beyin hasarının etkilerini azaltmak için deneysel ve klinik araştırmalara yoğunluk verilmiş olup, sekonder hasarın gelişiminde etkili mekanizmaların metabolik bozuklukları aydınlatılmaya çalışılmıştır. Sekonder beyin hasarının gelişiminde etkili olduğu bilinen patofizyolojik mekanizmalar, kalsiyum bağımlı hücresel zedelenme, nörotransmitter deşarjı, reaktif oksijen radikalleri, selektif gen aktivasyonu, mitokondri disfonksiyonu ve enflamatuvar cevaptan oluşur. İkincil hasarın bölgesel etkileri serebral kan akımı ve metabolizma değişiklikleri, intrakranial hipertansiyon, parankimal ödem ve beyin omurilik sıvısı (BOS) üzerinedir (20).

a. Serebral Kan Akımı

1 dakikada 100 gram beyin dokusunda dolaşan kan miktarıdır. Serebral kan akımı (SKA), mililitre (ml) olarak kullanılır. Mikst kortikal akım için ortalama SKA 50 ml/100gr/dk, gri cevher için ortalama SKA 80 ml/100gr/dk, beyaz cevher için ortalama SKA ise 20 ml/100gr/dk olarak belirlenmiştir. Ortalama SKA'nın 10 ml/100gr/dk'nın altına indiği durumlarda nöronal hasarın geri dönüşümü olmamaktadır. Ortalama SKA'nın 18

ml/100gr/dk'nın altına indiği durumlarda sinapslar arasındaki elektriksel iletim bozulurken, hücre membranındaki iyon pompaları çalışmayı sürdürürler. Bu nedenle hücre içi kalsiyum ve sodyum düzeyleri yükselirken, hücre içi potasyum düzeyi düşer ve hücresel ölüm meydana gelir. Ortalama SKA'nın 10 ml/100gr/dk ile 18 ml/100gr/dk arasında olduğu durumlarda erken reperfüzyon sağlanırsa kalıcı nöronal hasar gelişmeden iyileşme sağlanabilir ve bu durum iskemik penumbra dönemi olarak adlandırılır (38).

b. Serebral Vasküler Direnç

Serebral arterlerden venlere doğru kan akışına direnç gösteren güç olarak tanımlanır. Bu direnç çoğunlukla kanın akışkanlığına ve çeşitli vasküler değişkenlere bağlıdır. İntrakranial metabolizma artışı, kanın ph derecesinin düşmesi, PO₂ düzeyinin 50 mm/Hg'nin altına düşmesi, PCO₂ düzeyinin artması serebral vasküler direnci (SVD) azaltırken serebral vazodilatasyonla SKA'yı artırırlar. İntrakranial metabolizma azalması, kanın ph derecesinin artması, PCO₂ düzeyinin azalması ise serebral vazokonstriksiyonla SKA'yı azaltırlar (39).

c. Serebral Perfüzyon Basıncı

Ortalama arteryel kan basıncı (OAKB) ile kafa içi basınç (KİB) arasındaki fark serebral perfüzyon basıncı (SPB) olarak adlandırılır. Kafa travması sonrası akut dönemde serebral perfüzyonun zarar görmemesi için SPB'nin 70 mmHg üzerinde olması gerekmektedir. 40 mmHg'nin altındaki durumlarda iskemik hasar başlar ve serebral otoregülasyon mekanizmaları bozulup geri dönüşümsüz hasar gelişir (40).

Serebral Kan Akımı Hesaplama Formülü

$$SKA = SPB / SVD$$

Serebral Perfüzyon Basıncı Hesaplama Formülü

$$SPB = OAKB - KİB$$

d. Serebral Otoregülasyon

SKA'nın sistemik arteryel basınç değişikliklerine karşı beyin dokusunun ihtiyaçları doğrultusunda düzenlenmesidir. Serebral iskemi ikincil hasarın tedavi edilebilir nedenlerinden bir tanesidir. Kafa travması nedeniyle kaybedilen vakaların büyük çoğunluğunda parankimde iskemik hasar görülmüştür. Artmış kafa içi basıncı, sistemik hipotansiyon ve beyin ödemi travma sonrası gelişen serebral iskemik hasarın gelişiminden sorumlu en önemli unsurlardır (38).

Travmadan sonraki dönemde artmış KİB, SKA'nı düşürür ve beyin dokusunun fonksiyonlarını devam ettirmesi için gereken kan akım miktarının sağlanmasını engeller. Artmış KİB nedeniyle aort ve karotis üzerinden gelen kan volümü düşünce, baroreseptörler (aortik ark ve karotis sinüste) uyarılarak bulbusa impulsalar iletilir. Bulbustaki vazomotor reflekse ulaşan uyarı sonucu beyin dokusuna iletilen kan volümünde artış sağlanır. Sistemik arteriyel basıncın artmasıyla SKA da artar ve beyin dokusunda perfüzyonun devamı sağlanır. Bu regülasyon mekanizmasına “Cushing refleksi yanıtı” adı verilir, klinikte ani sistemik arteriyel basınç artışı olarak gözlemlenir (41).

KİB travmadan sonraki dönemde prognozu etkileyen temel unsurlardan biridir. KİB yetişkinlerde 0-20 mmHg'dir. Yetişkinlerde KİB'nın 20 mmHg'nın 5 dakikadan daha fazla üzerinde kalması patolojik bir durum olarak kabul görür. KİB artınca beyinde öncelikle kan volümü sonrasında da BOS volümü düşer. Travmadan sonraki dönemde tedavide ki temel amaç KİB düşürmek olmalıdır. KİB artışı klinikte karşımıza bradikardi, hipertansiyon ve solunum anomalileri olarak çıkar ve bu klinik “cushing triadı” olarak isimlendirilir (41).

2.3.2.1. Sekonder Hasarda Rol Oynayan Temel Mekanizmalar

a. Kalsiyum Bağımlı Hücre Hasarı

Travma dahil olmak üzere bir çok parankimal hasarda beyin dokusundaki nörotransmitterlerin kontrolsüz salınımı ile hücresel hasarlanmanın başlaması ve yüksek oranlarda kalsiyumun hücre içerisine geçerek hücrenin ölümüne yol açması durumuna eksitatör aminoasit hipotezi (EAA) adı verilir (42). EAA'ler içerisinde en fazla yoğunlaşılan başlıca nörotransmitterler aspartat ve glutamattır. Her iki nörotransmitter de aminoasit yapıda olup, olağan durumlarda eksitatör iletimden sorumludurlar ancak biyokimyasal dengenin bozulduğu durumlarda nörotoksisitenin temel nedeni olurlar.

Primer hasar sırasında nöronlarda yaygın depolarizasyon ve glikoliz oluşur, buna bağlı hücre dışı alanda glutamat piki yaşanır. Sekonder hasarlanma sırasında görülen hipoksik iskemi nedeniyle hücrede adenosin trifosfat (ATP) üretimi durma noktasına yaklaşır ve ATP bağımlı çalışan hücre zarındaki Na/K pompasının görevini devam ettirmesi imkansız hale gelir. Bunun sonucunda hücre dışı alanda sodyum seviyesi düşer, Na/Glutamat kotransportu terse işlemeye başlar ve hücre dışı alanda glutamat seviyesi yükselir. Hücre zarı geçirgenliğinin ve fosfolipaz etkinliğinin yükselmesi nedeniyle hücre dışı aralığa glutamat transportu gerçekleşirken, hücre içi sodyum düzeyinin yükselmesiyle sodyum hücre membranındaki reseptörlere tutunarak kalsiyum kanallarının açılmasını sağlar ve intrasellüler

alandaki kalsiyumun yükselmesine sebep olur. Hücre içerisine kalsiyumla beraber su girişi de gerçekleşir. Kalsiyum dengesinin bozulması sekonder hasarın gelişiminde oldukça önemli bir yer tutmaktadır. İntrasellüler alanda kalsiyum düzeyinin yükselmesi erken mitokondriyal şişmeye neden olur ve aksonlar arası bağlantının kesilmesine neden olan aksonal hasarı başlatan sebeptir (43). Mitokondriyal işlevlerin yitirilmesi nedeniyle hücre zarındaki ATP bağımlı iyon kanalları hasarlanır ve kalsiyum aracılı ekzositoz, nöronların depolarizasyonu ile glutamatın hücre dışı alana salınımına sebep olur (44). Glutamat reseptörleri kimyasal agonistlerine afinitelerine göre AMPA (a-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolepropionik asit) veya NMDA (N-metil-D-aspartik asit) reseptörleri olmak üzere ikiye ayrılır. Travma sonrası AMPA reseptör agonistlerine karşı iletim yanıtında artış görülür ve güçlü hipereksitabiliteyle birlikte intrasellüler alanda kalsiyum yüksekliğine neden olur. AMPA reseptörlerine duyarlılık arttığında sinaptik glutamat piki nedeniyle görülen nörotoksisite hipereksitabiliteye neden olarak epileptik yanıtı veya kalsiyuma bağlı hücre şişmesi nedeniyle hücre hasar ve hücre ölümüne sebebiyet verebilir (45).

b. Enflamasyon

30 yıl öncesine kadar SSS dışı uyaranlara karşı cevapsız olduğu ve immünolojik yönden ayrıcalıklı olduğu düşünülmekteydi (46). Ancak yapılan çeşitli çalışmalar göstermiştir ki, travmadan sonra kan beyin bariyerinden (KBB) immün özellikli hücrelerin bilhassa lökositlerin infiltrasyonu gerçekleşmektedir (47). KBB'nin immünolojik yönden geçirimsizliğinin bozulması, günümüzde travma sonrası sekonder hasarı oluşturan mekanizmaların başlamasında kolaylaştırıcı bir unsur olarak kabul edilmekte ve devam eden hücre hasarlanmayla birlikte nöroinflamasyon olarak tanımlanmaktadır (48). SSS'nin majör hücrelerini oluşturan astrositler ve mikroglialar, düşük düzeylerde klas 1 ve klas 2 majör histokompatibilite kompleksleri eksprese etmeleriyle birlikte sitokinler, kemokinler ve bunların reseptörlerini de sentezleyebilirler (46). TBH güncel çalışmalarda SSS'nin nöroinflamatuvar hastalıkları arasında değerlendirilmektedir. Beyin dokusundaki inflamasyonun öncü göstergeleri; aktif mikroglia hücreleri, nötrofil hücreleri ve ödem varlığıdır. Mikroglialar beyin dokusundaki immün reaktif denetleyici hücrelerdir, patojenlerin yakalanması ve doku tamiri görevlerini üstlenirler (49). Mikroglialar travma sonrası erken dönemde periferik makrofajlardan morfolojik ve immünolojik yöntemlerle farklılığı saptanamaz şekilde dönüşür (50). Sitokinlerin yalnızca hücre hasarına sebep olmadığı, bununla birlikte nöroprotektif ve nörotrofik etkileriyle sinir onarımı ve normal SSS görevlerinin devamı için zorunlu olundukları kabul edilmektedir (46). TBH sonrası, zarar gören bölgeyi

patojenlerden korumak ve hasarlı hücrelerin tamiri için kompleman aktivasyonuna eşlik eden nötrofil, monosit ve lenfositlerin hasar görmüş KBB' den beyin parankimine infiltrasyonu ile bu immun hücrelerden prostoglandin, serbest radikaller, proinflamatuvar sitokinler ve diğer enflamatuvar mediatörlerin sekresyonu sonucu kemokin ve hücre adezyon moleküllerinin sayısı artar ve endojen enflamatuvar cevap uyarılır ve immun hücrelerle birlikte mikrogliaların beyin parankimine geçişi ile neticelenir, ancak bu cevabın ekstrasöral hücrelerin hasarlanmasına da sebebiyet verdiği izlenmiştir (51,52,53).

Deneyisel modellemelerde, fokal yaralanmalarda bağışıklık sisteminin serebral yanıtı gösterilmişse de, travmadan sonraki ilk yirmi-dört saatte nötrofil göçü ve 3 ile 5. günler arasında makrofajla ile güölendirilen inflamatuvar yanıtın ortaya çıkması özünde beyin kontüzyonuna bağılı olarak gelişir (54). Ancak deney modellemelerinde DAH'da, sistemik dolaşımdan akut nötrofil yanıtı gerçekleşmeden astrosit ve mikrogliaların immünaktivasyonu ve periferik makrofajların göçü tespit edilmiştir. (55).

Birçok farklı bağışıklık hücresi ve diğer hücrelerden meydana gelen sistemik ve intratekal oluşturulan sitokinler, kan hücrelerinin katkıları, beyin kan bariyeri geçirgenliğinin artması ve SSS'deki kalıcı hücrelerin aktive olmaya devam etmesi ile nöroinflamasyonun oluşmasına neden olurlar. Bahsi geçen mediatörler sadece nöroinflamatuvar cevabın yaygınlaşmasından sorumlu olmayıp bununla birlikte nöroinflamasyonun varlığının bir kanıtıdır (56).

c. Oksidatif Hasar

Travma sonrası dönemde oluşan sekonder hasarın büyük bir kısmı oksidatif hasar nedenlidir. Beyin dokusu aşağıda detaylandırılan nedenlerden dolayı oksidatif hasara daha açık bir durumdadır.

- 1) Parankimi meydana getiren hücrelerin, hücre zarları lipid oranı açısından diğer organları oluşturan hücrelerin membranlarından daha yüksektir.
- 2) Nöron hücrelerinin membran/sitoplazma oranları diğer hücrelere göre daha yüksektir.
- 3) Oksidatif metabolik aktivite son derece artmıştır.
- 4) Oksidatif stresin etkilerini engelleyici antioksidan enzimlerin aktiviteleri minimaldir.
- 5) Özelleşmiş nörokimyasal reaksiyonlarla endojen olarak fazla miktarda reaktif oksijen türleri (ROT) üretilmektedir.

6) Periferal hasara uğramaya daha elverişli olan uzamış akson morfolojisi ile uyum gösteren sadece nöronlara ait özellikleri vardır.

Mevcut tüm bu özellikleri sayesinde oksidan hasara diğer doku ve organlardan daha fazla açık olan beyin dokusunun korunma gereksinimi diğer dokulardan daha yüksektir (57). Serbest oksijen radikalleri TBH'dan sonra radikal zararın oluşumu ve artmasında belirli bir derecede öneme sahiptir. Beyin yüksek lipid oranı ve fazla etkili oksidatif metabolizmasıyla beraber, oksidatif radikallerle bağlantılı hücresel yıkım için mantıklı bir hedeftir. Oksijen serbest moleküllerin üretimine ilişkin çeşitli yollar bulunmaktadır. Bunlar araşidonik asit metabolizması, mitokondriden kalsiyum nedenli çıkış, katekolaminin oto-oksidasyonu, ekstrasvaze hemoglobin bozukluğu ve ksantin oksidaz aktivasyonudur. Oksijen radikallerini yan ürün olarak üreten araşidonik asit yolu, travmatik hasarı takip eden serbest radikallerin tahminen en etkin kaynağıdır. (58). Hücre zarları oksidasyona duyarlı ve doymamış yağ asitlerince zengin olan fosfolipidleri içerirler. Serbest radikaller, oksijen varlığında doymamış yağ asitlerinin çift bağlarını kırarak zincirleme bir reaksiyon meydana getirirler. Yeni oluşmuş kimyasal radikaller tükenene kadar bu reaksiyon devam eder. Hücre membran stabilizasyonu bozulur, permeabilite etkilenir, membran potansiyeli oluşturabilme yeteneği zarar görür. Hücre içinde aşırı kalsiyum birikir ve hücre ölümü olur (59).

d.Apoptozis

TBH sonrası iskemi ve hücre ölümünün yaklaşık olarak yarısından ve her halükarda da bu olayı başlatan intrasellüler ve ekstrasellüler sinyallerden apoptozis sorumlu tutulabilir. Memeli hücrelerinde temel olarak iki apoptozis yolu tanımlanmıştır;

- 1) Fas/TNF-R reseptör yolak
- 2) Mitokondriyal yolak

Mitokondri iç zarından sitozole salınan sitokrom c, mitokondriye bağlı apoptozis yolağını başlatır. Sitozolde sitokrom c, apoptozis aktive edici faktör-1, kaspaz-9 ve deoksiadenozintrifosfata bağlanır ve peşpeşe oluşan; kaspaz-3 aktivasyonuna, daha sonra (poliADP-riboz) polimeraz gibi substratından ayrılmasına, endonükleazların aktivasyonuna ve son olarak DNA'nın parçalanmasına neden olur. Mevcut nedenle mitokondriden sitokrom c salınımına yol açan yolakların ortaya çıkarılması TBH'da apoptozisin rolünün ortaya çıkarılmasında gereklidir (60).

2.4. Shilajit

Shilajit, esas olarak Himalayalarda bulunan ve mikroorganizmaların etkisiyle bazı bitkilerin kademeli olarak parçalanmasıyla oluşan doğal bir maddedir. Hindistan'ın kuzeyinde salajit, shilajatu, mimie veya mummiyo olarak da bilinen Shilajit, özellikle Hindistan ve Nepal arasındaki Himalaya dağlarında, yüksek dağ kayalarından bir sızıntı veya siyahımsı-kahverengi bir tozdur, ancak Rusya'da da bulunmuştur (61).

Araştırmacılar, fulvik asit açısından çok zengin bir fitokompleks olarak eşsiz bileşimini göz önünde bulundurarak, Shilajit'in *Euphorbia royleana* ve *Trifolium repens* gibi türlerden bitki materyalinin ayrıştırılmasıyla üretildiğini varsaymaktadır. Bu ayrışma yüzyıllar boyunca gerçekleşiyor gibi görünüyor ve bu temelde shilajit, doğanın bin yıllık bir ürünü olarak kabul ediliyor. Bununla birlikte, daha ileri çalışmalar, *Barbula*, *Fissidens*, *Minium* ve *Thuidium* gibi küfler ve *Asterella*, *Dumortiera*, *Marchantia*, *Pellia*, *Plagiochasma* ve *Stephenrencia*-*Anthoceros* gibi diğer bazı bitki organizmalarının shilajit oluşturabileceğini tespit etmiştir (61).

Shilajit, esas olarak toplam nutrasötik bileşiğin yaklaşık %60 ila %80'ini oluşturan fulvik asit dahil olmak üzere hümitik maddelerden ve çoğunlukla selenyum içeren bazı oligoelementlerden oluşur. Hümitik maddeler, birçok mikroorganizmanın etkisinin sonucu olarak başta bitkisel maddeler olmak üzere organik maddelerin bozunmanın sonucudur. Bileşenler, farklı pH seviyelerinde suda çözünürlüklerine göre hümin, hümitik asit ve fulvik asitlere ayrışırlar. Hüminler, herhangi bir pH koşulu altında suda çözünmezler. Hümitik asit alkali koşullar altında suda çözünür ve 5–10 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. Fulvik asit, farklı pH koşulları altında suda çözünür ve düşük moleküler ağırlığı nedeniyle (yaklaşık 2 kDa), bağırsak yolunda iyi emilir ve vücuttan saatler içinde atılır. Şilajite atfedilebilen iyileştirici özelliklerin çoğunlukla, fulvik asidin güçlü antioksidan etkisi ve tamamlayıcı aktivatör olarak muhtemelen sistemik etkilere sahip olması nedeni olduğu düşünülmektedir (61)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Her biri sekiz – oniki haftalık, ortalama ağırlıkları 280 - 320 gram olan, iç besleme ile yetiştirilen, 33 adet Sprague Dawley türü Albino suşu erkek rat Bezm-i Alem Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarından (BAÜ DHAL) elde edildi. Ratlar çalışma boyunca oda sıcaklığında (20 ± 2 °C) ve 12'şer saatlik aydınlık ve karanlık ortamda beslenip,

standart pelet sıçan yemi ile beslenecek, suya rahatça erişebilmeleri sağlandı. Çalışma için Bezm-i Alem Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı alındı.

3.2. Çalışma Grupları

Sıçanlar rastgele seçilerek, her biri 11 (onbir) rat içeren üç grup oluşturuldu.

Grup I (n: 11): Travma uygulanıp, tedavi uygulanmayan grup.

Grup II (n: 11): Travma uygulanıp, tedavide 0.5 mL/rat serum fizyolojik, intraperitoneal uygulanan grup.

Grup III (n: 11): Travma uygulanıp, tedavide 150 mg/kg shilajit ekstresi, intraperitoneal uygulanan grup.

3.3. Anestezi Uygulanması

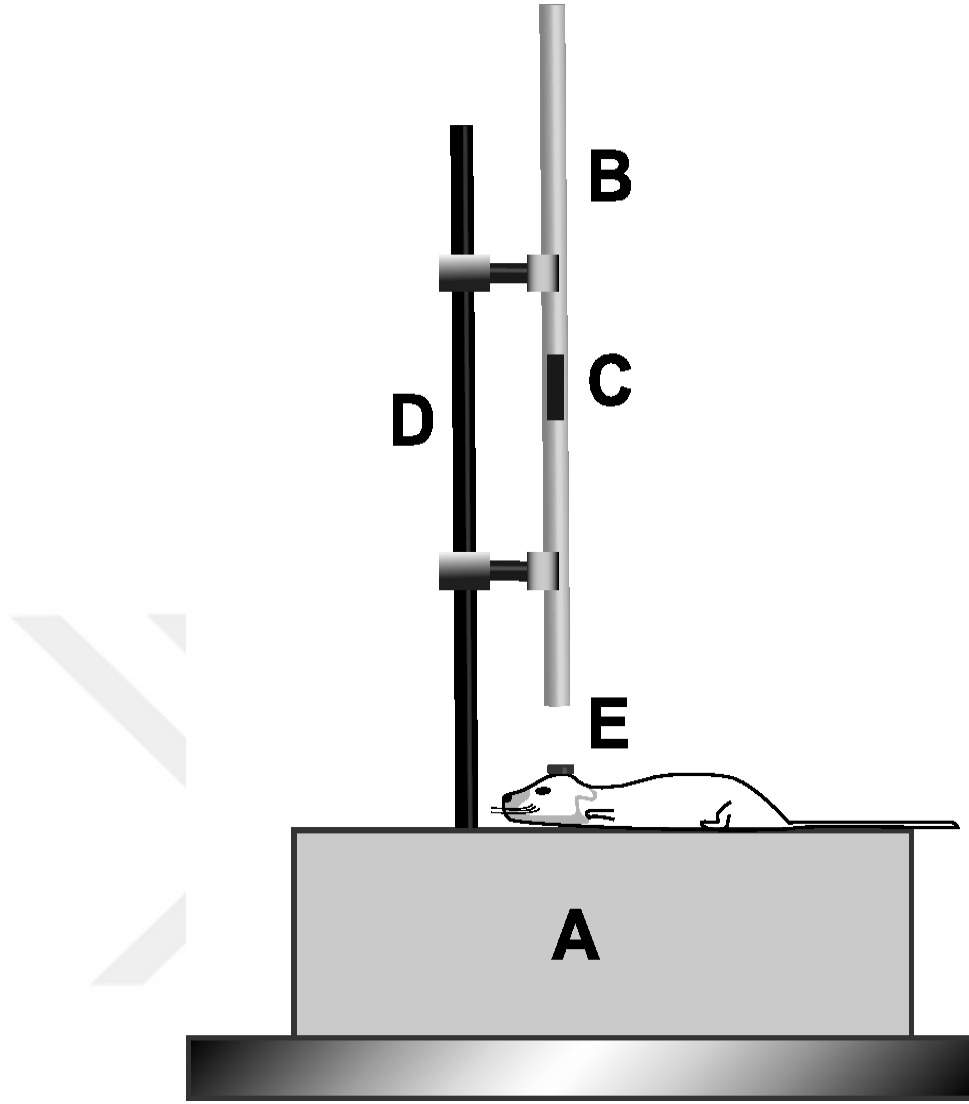
Anestezi için Xysilazine HCL (Rompun®-Bayer İlaç San. Türkiye) 5-10 mg/kg intraperitoneal ve Ketamin 50 mg/kg (Keta-Control®-Doğa İlaç San. Türkiye) intraperitoneal kullanıldı. İşlemin 30 dakikayı aştığı durumlarda ketamin enjeksiyonu 5 mg/kg intraperitoneal olarak tekrarlanması planlandı fakat çalışma sırasında bu uygulamaya gerek olmadı.

3.4. Travma Aleti

Deney esnasında ratlarda ağır kafa travması yapılırken Marmarou ve arkadaşlarının 1994 senesinde geliştirdiği deneysel travma modeli kullanılmıştır. Travma aletinin ana mantığı metalden yapılmış 250 gramlık kütlenin yer çekiminin etkisi ile silindirik boru içerisinden minimum sürtünmeyle ratların kafatasına düşürülmesi şeklindedir. Travma aleti 1 m boyunda, iç çapı 18 mm, dış çapı 20 mm olan akrilik bir boru, bu boruya ait vertikal bir sabitleyici, ratların yerleştirildiği 20x20x40 cm ebatlarında ahşap muhafaza ile korunmuş köpük madde, 20 mm yüksekliğinde, 14 mm çapında ve 250 gram ağırlığında paslanmaz çelikten metal silindir. (Resim 1) , (Şekil 1)



Resim 1: Travma aleti



Şekil 1: Travma aleti

A : Deney hayvanının sabitlenebildiği köpük zeminli düzenek masası

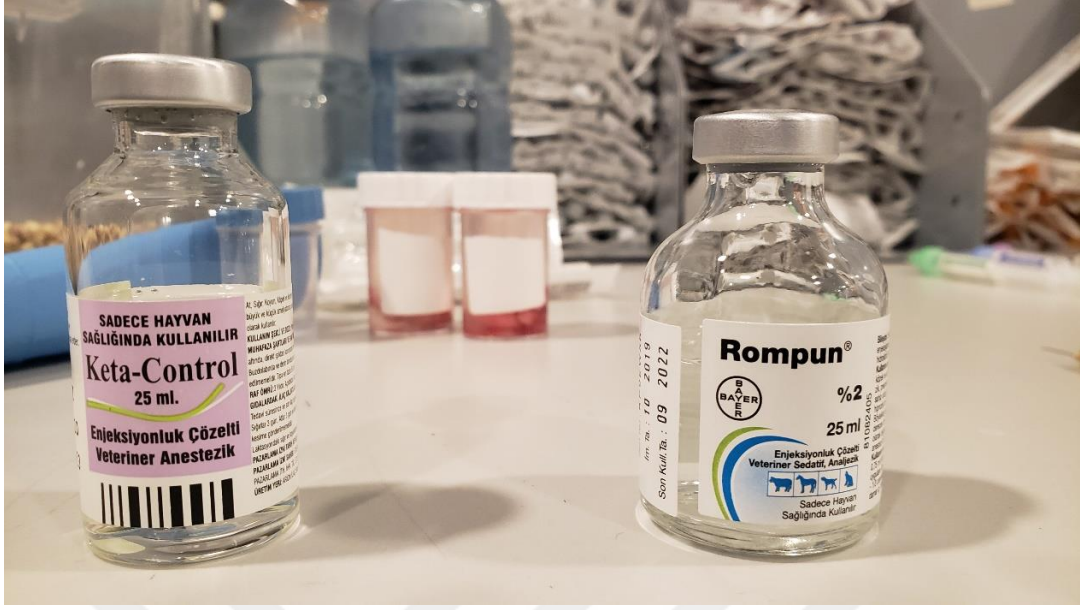
B : 1 metre uzunluğunda ağırlığın içerisine rahatça girebileceği genişlikte iki ucu açık tüp

C : 250 gram ağırlık

D : Destek yapısı

3.5.Ratların Hazırlanması

Ratlara Xysilazine HCL (Rompun®-Bayer İlaç San. Türkiye) 5-10 mg/kg intraperitoneal ve Ketamin 50 mg/kg (Keta-Control®-Doğa İlaç San. Türkiye) intraperitoneal uygulanılarak anestezi sağlandı (Resim 2). Anestezinin derinleşmesi için ratlar bir süre daha kafeslerinde gözlemlendi. Daha sonra kafeslerinden alınan ratlar hassas terazi ile tek tek tartıldı.



Resim 2: Anestezik ajanlar

3.6.Kafa Travmasının Oluşturulması

Ratlar travmaya hazır olduklarında yüzükoyun pozisyonda köpük yatağın üzerine yerleştirildi ve travma esnasında kaymamaları için ekstremitelerinden flasterlerle sabitlendi. 1 metre yükseklikten 250 gram ağırlığın bırakılmasıyla ağır kafa travması (AKT) oluşturuldu. Rat ilk çarpmanın hemen ardından tekrar çarpmayı önlemek için köpük yatak ile birlikte tüpün alt ucundan uzaklaştırıldı. (Resim 3)



Resim 3: Travmanın oluşturulması

3.7. Çalışma Gruplarının Oluşturulması ve Çalışmanın Yürütülmesi

33 deney hayvanı eşit sayıda ve rastgele seçilerek 3 gruba ayrıldı:

Grup I (n: 11): Travma uygulanıp, tedavi uygulanmayan grup. Ratlara anestezi uygulandı ve anestezi etkisinin derinleşmesi için 5-10 dk kadar beklendi. Daha sonra yukarıda belirtildiği şekilde travma uygulandı. Ratlar kafeslerinde 72 saat takip edildi. 1 adet deney hayvanı 24. saat sonunda kafesinde ölü olarak bulundu ve çalışma dışı bırakıldı. Yetmiş-ikinci saat sonunda tekrar uygun dozda anestezi uygulandı daha sonra ratların sternumu makas yardımıyla açıldı ve kalp ortaya koyuldu. Sağ atriuma küçük bir insizyon yapılarak bir taraftan kan boşaltılırken diğer taraftan sol ventrikülden SF perfüzyonu yapılmaya başlandı. Kanın tamamı boşaltıldıktan sonra yine sol ventrikülden formaldehit infüzyonu yapılarak tüm beyin dokusu fikse edildi. Solunumları duran ve pupil refleksleri alınamayan ratlar ex kabul edildi. Kafa servikal vertebradan kesilerek ayrıldı. Foramen magnumdan her iki temporal bölgeye doğru skalp kesildi (Resim 4). Aynı hattan kemikler kaldırıldı, beyin dokusu serbestleştirildi (Resim 5). Daha sonra beyin dokuları zedelenmeden çıkarıldı formaldehit içine alındı, yirmi-dört saat formaldehitte fiksasyon sağlandıktan sonra dokular yüzde 30'luk etil alkol solüsyonuna alındı.



Resim 4 : Foramen magnum ve skalp kesisi



Resim 5: Ratlara kraniektomi yapılması

Grup II (n: 11): Travma uygulanıp, tedavide 0.5 mL/rat serum fizyolojik, intraperitoneal uygulanan grup. Ratlara anestezi uygulandı ve anestezi etkisinin derinleşmesi için 5-10 dk kadar beklendi. Daha sonra yukarıda belirtildiği şekilde travma uygulandı. Kafeslerine alınan ratlara travmanın birinci saatinde, yirmi-dördüncü saatinde ve kırk-sekinci saatinde intraperitoneal yolla 0.5 mL/rat serum fizyolojik uygulandı. Ratlar kafeslerinde travma sonrası yetmiş-ikinci saatine kadar takip edildi. Yetmiş-ikinci saatte tekrar uygun dozda anestezi uygulandı daha sonra ratların beyinleri yukarıda belirtilen işlemler sırasıyla uygulanılarak zedelenmeden çıkarıldı ve formaldehit içine alındı, yirmi-dört saat formaldehitte fiksasyon sağlandıktan sonra dokular yüzde 30'luk etil alkol solüsyonuna alındı.

Grup III (n: 11): Travma uygulanıp, tedavide 150 mg/kg shilajit ekstresi, intraperitoneal uygulanan grup. Ratlara anestezi uygulandı ve anestezi etkisinin derinleşmesi için 5-10 dk kadar beklendi. Daha sonra yukarıda belirtildiği şekilde travma uygulandı. Kafeslerine alınan ratlara travmanın birinci saatinde, yirmi-dördüncü saatinde ve kırk-sekinci saatinde intraperitoneal yolla 150 mg/kg shilajit uygulandı. Ratlar kafeslerinde travma sonrası yetmiş-ikinci saatine kadar takip edildi. Yetmiş-ikinci saatte tekrar uygun dozda anestezi uygulandı daha sonra ratların beyinleri yukarıda belirtilen işlemler sırasıyla uygulanılarak zedelenmeden çıkarıldı ve formaldehit içine alındı, yirmi-dört saat formaldehitte fiksasyon sağlandıktan sonra dokular yüzde 30'luk etil alkol solüsyonuna alındı.

Grup C (n=1): Travma uygulanmadan, başka bir eğitim çalışması için dekapitize edilen aynı yaş, aynı cins ve aynı ağırlıktaki bir adet rat beyni kullanılmıştır.

3.8. Değerlendirme Yöntemleri

3.8.1. Histolojik İnceleme

Bütün çalışma gruplarındaki ratlar travmadan yetmiş-iki saat sonra yüksek doz ketamin anestezisi uygulandı. Daha sonra sternum açılarak sağ atriumdan kan boşaltılırken sol ventrikülden SF perfüzyonu yapılarak, kanın tamamı boşaltıldıktan sonra yine sol ventrikülden formaldehit infüzyonu yapılarak tüm dokular fikse edildi. Daha sonra beyin dokuları zedelenmeden çıkartıldı.

Histolojik inceleme için alınan beyin dokuları nötral tamponlu formalin solüsyonu içerisinde fikse edildikten sonra %70'ten başlanarak %100'e kadar yükselen alkol serilerinde dehidrate edilip ksilende şeffaflaştırıldı. Bir gece 60 °C'lik etüvde parafinde bekletilen dokular oda ısısında parafin bloklar haline getirildi.

Parafin bloklardan 3-4 µm kalınlığında kesitler alınarak bu kesitlere genel doku morfolojisinin incelenmesi için hematoksilen-eozin, temel nöron yapısını tanımlamak için Luxol fast blue boyamaları yapıldı.

3.8.1.1. Hematoksilen-Eozin Boyama

Parafin bloklardan lamlara 3-4 µm kalınlığında kesitler alınarak ksilen içerisinde 1 saat deparafinize edildi. Deparafizasyon sonrası %100'den başlayarak %70'e inen alkol serilerinde rehidratasyonu gerçekleştirildikten sonra kesitler distile suya alındı. Bu aşamanın ardından kesitler, H&E (Bio-Optica) boyandı.

Boyama sonrası lamalar, 45 dakika akar su altında tutularak kesitlere mordanlama yapıldı. Ardından lamalar %1'lik asit alkol damlatılan 3 dakika tutulup distile sudan geçirildi. Yükselen alkol serilerinden geçirilip (%70, %96, %100) dehidrate edilen lamalar ksilene alındı ve 10 dakika sonra kapatma medyumumu ile kapatıldı. Preparatlar, kapatma işleminden sonra morfolojik değerlendirme için ışık mikroskopunda (Olympus BX53) X200, X400 büyütmelemlerde incelendi ve fotoğraflandı.

3.8.1.2. Luxol Fast Blue Boyama

Kesitler, ksilen ile deparafinize edildikten sonra sırasıyla %100, %96, %90 ve %70 oranında inen alkol serilerinden geçirilip distile su ile yıkandı. Luxol fast blue solüsyonu damlatılan kesitler, +37°C’de bir gece inkübe edildi. Daha sonra, 95° etil alkol içerisinde bekletilerek kristalize yapıların erimesi sağlandı. Ardından distile su ile yıkanan kesitlere lityum karbonat damlatıldı ve 30 saniye bekletildi. Kesitler bu işlemin ardından 70° etil alkole alındı ve renksiz bir arka plan oluşana kadar bekletilip distile su ile iki kez yıkandı. Daha sonra, kesitlere krezil viyole solüsyonu damlatılıp 20 dakika bekletildi. Son olarak, 95° etil alkolde Nissl cisimcikleri pembeleşinceye kadar bekletildi ve 100° etil alkolde dehidre edilerek entellan ile kapatıldı. (Bio-Optica Luxol Fast Blue, Histological Staining Kit, Kod:04-200812)

3.8.2. Biyokimyasal İnceleme

3.8.2.1. Total antioksidan kapasite (TAS) ve total oksidan kapasite (TOS)

Çalışmamızda kullanılan biyokimyasal parametrelerin Bioassay Technology Laboratory firmasının “Rat Total Antioxidant Status ELISA Kit” ve “Rat Total Oxidant Status ELISA Kit” kitleriyle çalışılması yapıldı. Bütün çalışma gruplarındaki ratlardan, travmadan yetmiş-iki saat sonra sakrifikasyon sırasında kalpten kan örnekleri çözücü içermeyen bir tüpe alınarak, 5 gün içerisinde çalışılmak üzere 2-8°C sıcaklıkta muhafaza edildi. Çalışma günü öncelikle kit ve numune doğal olarak 20-30 dakika oda sıcaklığına bırakıldı. Serumun oda sıcaklığında 20-30 dakika pıhtılaşmasına izin verildikten sonra. 2000-3000 RPM’de 20 dakika santrifüj cihazına yerleştirilecek ve ardından kitlerin çalışma talimatlarına uygun olarak analizler tamamlandı.

3.8.2.2. Oksidatif stres indeksinin (OSI) hesaplanması

$$\text{Oksidatif stres indeksi (OSI)} = \frac{\text{TOS } (\mu\text{mol.H}_2\text{O}_2.\text{ekivalent/L})}{\text{TAS } (\mu\text{mol.Trolox.ekivalent/L})} \times 100$$

3.8.3. İstatiksel analiz

Araştırmalar sonucunda elde edilen veriler GraphPAD Prism (5.0 for PC) (GraphPAD Software Inc.) programı kullanılarak analiz edildi. Deneysel çalışmamız neticesinde elde edilen veriler, ortalama±standart hata olarak hesaplandı. Grupların dağılımının normal dağılıma uygunluğunun test edilmesini takiben, histopatolojik veriler normal dağılmadığı için Oneway Anova-Kruskal-Wallis testi yapıldı. Veriler median (%25-%75) olarak verildi. P<0.05 anlamlı

kabul edildi. Biyokimyasal verilerin istatistiksel analizi Oneway Anova-Kruskal-Wallis testi sonrasında Tukey çoklu karşılaştırmalar testi ile yapıldı. $P<0.05$ anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Histolojik Bulgular

Kontrol grubuna ait H&E ile boyanmış serebral korteks ışık mikroskobu ile incelendiğinde neokorteksin (III.- V. zonlar). ve hipokampusün CA1 bölgelerinde bulunan büyük nöronların (piramidal) sitoplazmalarında, nükleus ve belirgin görülebilen nükleolus gözlemlendi

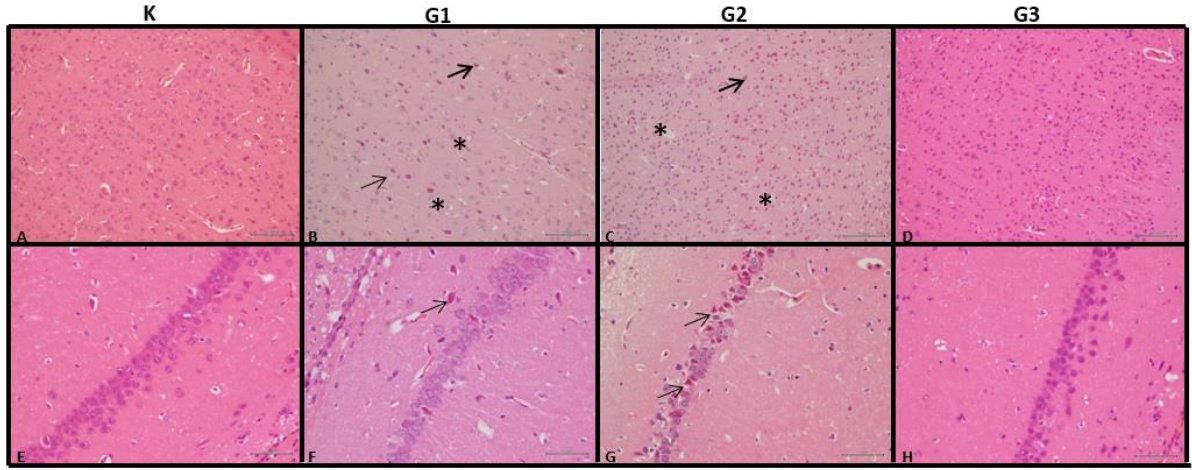
(Fotomikrograf 1.A-E). Deney ve plasebo gruplarının bu bölgelerinde yerleşim gösteren nöron yapıları incelendiğinde 12-48 saat sonra karşılaşılan iskemik hasarı gösteren red nöronlar gözlemlendi. Piknotik nükleusu, nükleus kaybı ve sitoplazmaları eozinofilik karaktere sahip bu red nöronlar özellikle G1 ve G2 gruplarında dikkat çekiçiydi **(Fotomikrograf 1. G1 B-F; G2C-G oklar ile gösterildi)** deney ve plasebo gruplarında kontrol grubuna göre red nöronun ve ödemin anlamlı derecede $p<0.001$ arttığı belirlendi. Tedavi grubu olan G3 doku kesitlerinin serebral korteks ve CA1 bölgeleri ile deney grubundaki bu bölgeler karşılaştırıldığında piramidal nöron yapılarının normal ve ödem miktarının anlamlı derecede azaldığı $p<0.001$ istatistiksel olarak tespit edildi **Fotomikrograf 1 G3 D-H).** (Tablo 3) (Resim 6) (Şekil 2)

Tablo 3: Red nöronların gruplara göre dağılımı ve grupların median değerleri

	G1	G2	G3	C	P
Red neuron	8 (7-9)	6 (5-8)	2 (2-3)	1 (1-1)	G3-G1 **, $P=0.0013$ C-G1 ***, $P<0.0001$ C-G2 ***, $P<0.0001$

** $p<0.01$

*** $p<0.001$



Resim 6 : Akut hasarın olduğunu gösteren Red nöronların varlığı (siyah oklar), ödem (*) ile gösterilmiştir. A-B-C-D: serebral korteks X20; E-F-G-H: Ca1 bölgesi X40

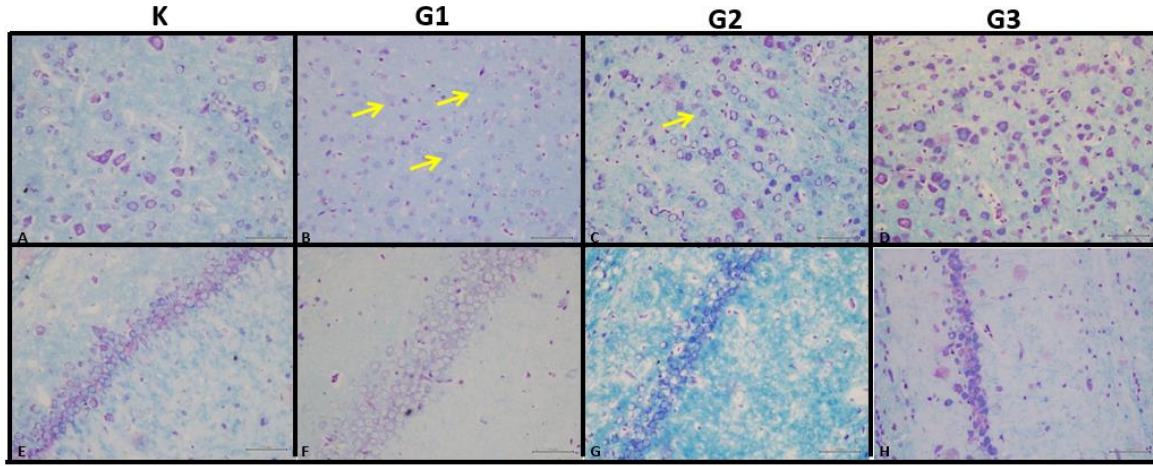
Buna ilaveten piramidal nöronların perikaryonlarında protein yapımından sorumlu olan Nissl cisimciklerini ışık mikroskobu altında incelemek için tüm gruplara uygulanan Luxol fast blue boyaması incelendi. Kontrol grubu ile deney grubunun (G1) serebral korteksin (III.- V. zonlar) ve CA1 bölgeleri karşılaştırıldığında kontrol grubundaki piramidal nöronlarının menekşe renginde boyanan sitoplazmalarının deney grubundaki hücrelerinin sitoplazmaları ise daha soluk renkte (sarı oklar) olduğu gözlemlendi (**Fotomikrograf 2.K A-E; G1B-F**). Benzer şekilde plasebo grubu (G2), kontrol grubu ile kıyaslandığında motor nöronların nissl cisimciklerinin azaldığı, tedavi grubunda (G3) ise kontrole yakın bir boyanmanın olduğu gözlemlendi (**Fotomikrograf 2.G2 C-G; G3 D-H**). (Tablo 4) (Resim 6) (Şekil 3)

Tablo 4: Ödemin gruplara göre dağılımı ve grupların median değerleri

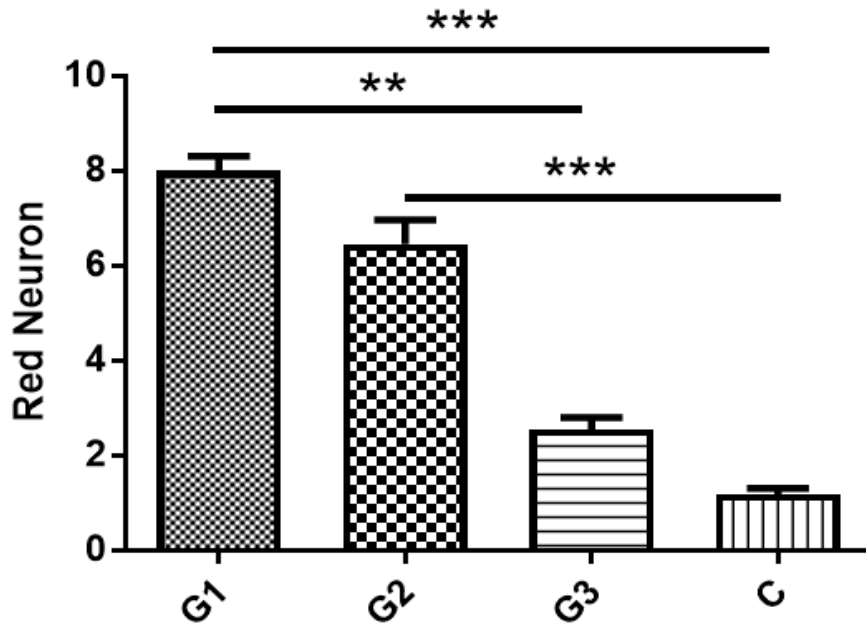
	G1	G2	G3	C	P
Ödem	6 (6-7)	6 (5-7)	2 (1-2)	1 (1-2)	G3-G1 **, P=0.0019 C-G1 ***, P<0.0001 G3-G2 **,P=0.0024 C-G2 ***, P<0.0001

** p<0.01

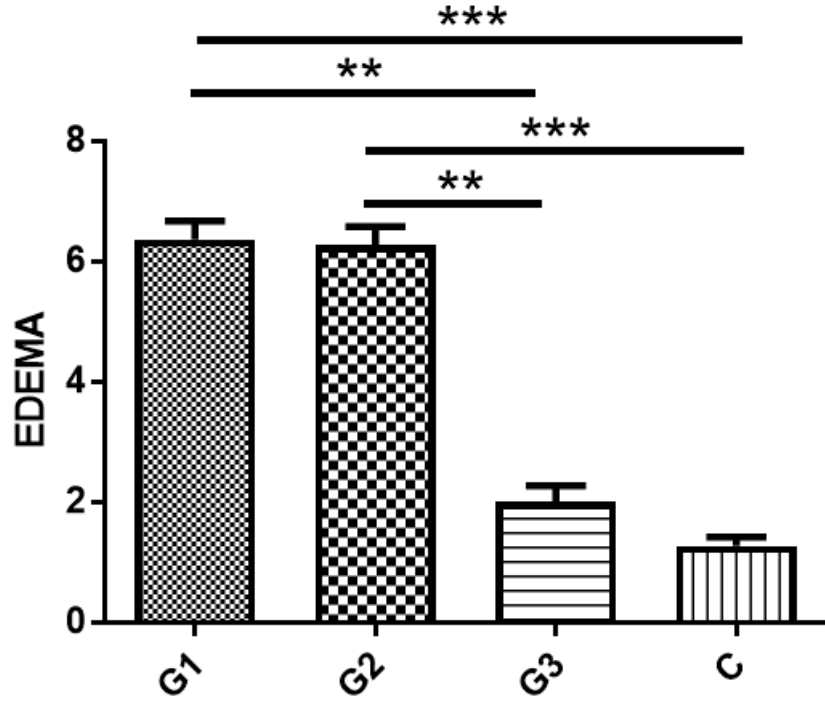
*** p<0.001



Resim 7 : Piramidal nöronların çekirdek ve nissl taneciklerinin kaybı (sarı oklar) ile gösterilmiştir. A-B-C-D: serebral korteksX40 , E-F-G-H: Ca1 bölgesi, X40.



Şekil 2: Red nöronların istatistiki dağılımı



Şekil 3: Ödem şiddetinin istatistiki dağılımı

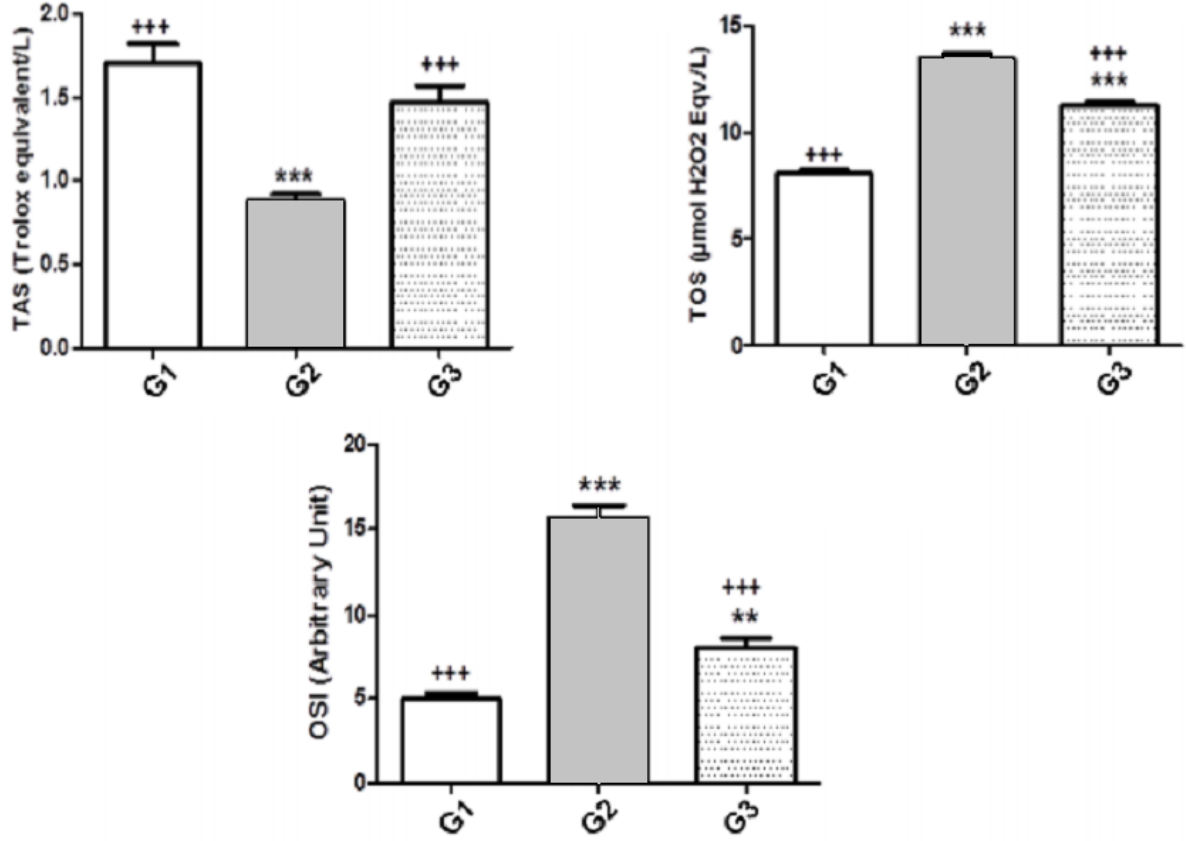
4.2. Biyokimyasal Bulgular

4.2.1. Total antioksidan kapasite, total oksidan seviye ve oksidatif stres indeksi bulguları

Çalışmamızda, deney gruplarından alınan kan örneklerinde TAS, TOS ve OSI değerleri incelendiğinde, travma grubunda kontrol grubuna göre TAS değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı ($p < 0.001$), TOS ve OSI değerlerinin ise anlamlı derecede arttığı görülmüştür ($p < 0.001$). TAS, TOS ve OSI değerlerine ait ortalama $\pm$ standart hata değerleri aşağıdaki tabloda verilmiştir. (Tablo 5) (Şekil 4)

Tablo 5: TAS, TOS ve OSI değerlerine ait ortalama $\pm$ standart hata değerleri

DEĞİŞKENLER	Grup 1	Grup 2	Grup 3
TAS (Trolox equivalent/L)	1,68 $\pm$ 0,14	0,85 $\pm$ 0,03	1,51 $\pm$ 0,07
TOS (μ mol H ₂ O ₂ Eqv./L)	8,11 $\pm$ 0,19	13,51 $\pm$ 0,27	11,43 $\pm$ 0,19
OSI (Arbitrary Unit)	4,89 $\pm$ 0,36	15,68 $\pm$ 0,79	8,13 $\pm$ 0,71



Şekil 4: Deney gruplarından alınan kan örneklerinde TAS, TOS ve OSI değerleri. TBH nedeniyle TAS değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalırken, travma grubuna verilen şilajit, bu azalan değeri anlamlı olarak arttırmıştır. TBH nedeniyle TOS, OSI değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken, travma grubuna verilen şilajit, bu artışı anlamlı olarak azaltmıştır. ** p<0.01, *** p<0.001 kontrol grubuna göre, +++*** p<0.001 travma grubuna göre anlamlılık değeri

5. TARTIŞMA

Travmanın sonrasında sekonder hasar sonucu ortaya çıkan biyokimyasal tepkimeler ve hücrelerde meydana gelen ölümü sınırlamak veya engelleyebilmek için pekçok etken madde son yıllarda çalışılarak literatüre girmiştir..Travmanın etkilerini kabul edilebilir düzeye indirgeyen pekçok hayvan çalışmasındaki bu başarılı sonuçlar günlük pratikte insan kullanımına sunulduğunda aynı pozitif etkiyle karşılaşılammamaktadır. Bunun pekçok nedeni mevcuttur. Deney hayvan çalışmalarındaki projenin kurgulanması, metodu ve verilen etken madde dozajını insanlardaki kafa travmasına modellemek mümkün olmamaktadır. Deneysel çalışmalarda standardize edilmiş kafa travması fiziksel şiddetinde aynı kilo ve aynı cins hayvanlarda oluşan primer yaralanma ve sekonder travmatik değişiklikler birbirlerine benzer iken insanlarda standart bir kafa travması ve en önemlisi de aynı biyokimyasal hücresel ve fiziksel özellikler içermeyen insanlarda standart travma etkileri görülmemektedir.

Deneysel kafa travma modelini standardize hale getirmiş ve diffüz beyin hasarı oluşturduğu için çalışmamızda Marmarau ve ark.'larının tanımladığı, kafa kemiklerinde hasar oluşturmada diffüz beyin hasarı yaratan kapalı travma modeli uygulanmıştır. Bu modelin kullanılmasındaki bir diğer önemli etmen ise insanlarda oluşan diffüz kafa travmasının en çok motorlu araç kazaları sonucu görülmesi ve bu yöntemin araç kazalarında olan kapalı travmaya benzemesidir. Kurgulanan kafa travması çalışmamızda belirli yükseklikten standardize edilmiş belirli ağırlık düşürülmüş olup deney hayvanında travmatik hasar oluşturulmuş ve ardından apoptoza bağlı hücresel ölüm ve nekrotik ölüm gözlemlenmiştir. Bu yöntemin kafatası açılarak dura üzerine konulan metal plakasına ağırlık düşürülerek yapılan modelden en önemli avantajı deney hayvanlarına özellikle beyin sapı hasarını engellemesi ve sonuçta hayvanın deney süresince hayatta kalma oranını yükseltmesidir. Çalışmamızda da bu model kullanılarak nöroprotektif etkinliği olduğunu düşündüğümüz şilajit maddesi verilmiştir. Literatür tarandığında pekçok antioksidan özelliğe sahip maddeler ile kapalı kafa travması modeli oluşturularak sekonder hasara karşı sağladığı pozitif etkiler araştırılmıştır.

Şilajit, esas olarak toplam nutrasötik bileşiğin yaklaşık %60 ila %80'ini oluşturan fulvik asit dahil olmak üzere hümitik maddelerden ve çoğunlukla selenyum içeren bazı oligoelementlerden oluşur. Şilajite atfedilebilen iyileştirici özelliklerin çoğunlukla, fulvik asidin güçlü antioksidan etkisi ve tamamlayıcı aktivatör olarak muhtemelen sistemik etkilere sahip olması nedeni olduğu düşünülmektedir (61).

Literatürde shilajitin antioksidan özelliğini gösteren pekçok çalışma mevcuttur.

2010 yılında Kumar ve ark . 225 adet 1 günlük civciv üzerine yaptığı çalışmada her grup 15 adet civcivden oluşacak şekilde ayrılmıştır. grup 1 de bazal diyet, grup 2 de bitkisel ağırlıklı diyet, grup 3 shilajit ağırlıklı diyet, grup 4 de selenyum ve e vitamini ağırlıklı diyetler verilmiştir. Geriye kalan civcivler kurşun ile temas ettirilerek oksidatif stress oluşturulmuş ardından oluşturulan gruplara ise sırası ile bazal diyet, bitkisel diyet, shilajit ve e vitamini selenyum kompleksi verilmiş ve civcivler 4-6 hafta gözlemlenmiştir. Takip sonunda Glutasyon peroksidaz, redüktaz ve katalaz için kanlar alınmıştır. Oksidatif hasarı gösteren parametrelerde shilajit alan grupta istatistiki olarak anlamlı şekilde düzelme tespit edilmiş ve yazar shilajitin özellikle güçlü bir antioksidan etkinliğe sahip olduğunu yayınlamıştır (62).

Ghasemkhani ve ark. 2021 yılında yayınladığı çalışmada ise aspirin ile gastrik ülser oluşturulmuş ratlarda omeprazol, serum fizyolojik ve shilajit kompleksini içeren bir çalışma yapmışlardır. Shilajitin dokudaki lökosit infiltrasyonunu azalttığı oksidatif stres parametrelerini düzelttiği hipotezi ile kurgulanmıştır. Sonuçta shilajitin oksidatif stress faktörlerini azaltarak dokularda protektif efekt gösterdiği saptanmıştır (63).

Kafa travmasında shilajit etkinliğini gösteren literatürde bir adet çalışma mevcuttur.

Khaksari ve ark. yaptığı çalışmada randomize olarak ratlar 5 gruba ayrılmış ve 2 gruba 150 ve 250 mgr/kg/rat dozlarda shilajit zerk edilip 1, 24, 48, 72. saatlerde doz tekrarlanmıştır. Hayvanların gözlem süresinde intrakranial basınç ölçümü, motor hareketler açısından kayıt altına alınmıştır, sonrasında dekapitasyon işlemi gerçekleşmiş ve beyinler histokimyasal analize alınmıştır. Beyin ödemi, kan beyin bariyeri geçirgenliği de evans blue boyası ile takibe alınmış sonuçlar istatistiki olarak değerlendirilmiştir. Sonuçta Shilajit 150 ve 250 mgr/kg verilen her iki rat grubunda kontrol grubu, sham grubu ve hipertonic salin verilen grup ile karşılaştırıldığında shilajit verilen gruplar istatistiki olarak anlamlı şekilde beyin ödemi azaltmıştır. Shilajit 150 ve 250 mgr/kg verilen her iki rat grubunda kontrol grubu, sham grubu ve hipertonic salin verilen grup ile karşılaştırıldığında shilajit verilen gruplar istatistiki olarak anlamlı şekilde beyin kan beyin bariyerinin geçirgenliğini tamir ettiği gözlenmiştir. Bununla beraber shilajit verilen grubun nörolojik takiplerinin diğer gruplara göre olumlu olduğu ve intrakranial basıncın shilajitle birlikte azaldığı tespit edilmiştir. Shilajit alan her iki grup birbiri ile karşılaştırıldığında ise doz arttırımı ile birlikte pozitif etkilerin arttığı tespit edilmiş 250 mgr/kg alan rat grubunun, 150 mgr/kg alan gruba göre istatistiki olarak anlamlı şekilde beyin ödemi azalttığı ve kan beyin bariyerine pozitif etki yaptığı gözlenmiştir (64).

Bizim çalışmamızda kafa travması sonrası akut hasar değerlendirmesi için red nörolara bakılmıştır. G3-G1 için p değeri 0.0013 olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Grup C ile grup 1 karşılaştırıldığında p değeri 0.0001 olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir. Grup C ile grup 2 karşılaştırıldığında p değeri 0.0001 olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir. Sonuç olarak shilajit alan grupta hemotiksilen eozin boyamada red nöronlar azalmış olduğu gözlenmiştir.

Bununla birlikte kan beyin bariyeri bozulması sonucu ortaya çıkan beyin ödemi gruplar arasında kıyaslandığında G3-G1 için p değeri 0.0019 olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Grup C ile grup 1 karşılaştırıldığında p değeri 0.0001 olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir. Grup C ile grup 2 karşılaştırıldığında p değeri 0.0001 olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir. Grup 3 ile grup 2 karşılaştırıldığında p değeri 0.0024 olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir yine shilajit alan grubun diğer şam ve kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. Sonuçta shilajitin beyin ödemi azaltıcı etkisi olduğu ortaya konulmuştur.

Bununla beraber hayvanlardan alınan kanın biyokimyasal analizinde travma sonucu oluşan oksidatif stress düzeyini gösteren parametrelerde ise yine shilajit alan grup istatistiki olarak anlamlı düzelmeye yol açtığı tespit edilmiştir. Bu durum shilajitin antiinflamatuvar antiödem etkisi olduğunu ve güçlü nöroprotektif etkisi olduğunu göstermektedir.

6. SONUÇ

Çalışmamızda deneysel diffüz kapalı kafa travmasında oluşan diffüz hasarın sınırlandırılması amacı ile shilajitin nöroprotektif etkinliği araştırılmıştır. Yapılan histopatolojik ve biyokimyasal analizler sonucunda shilajit alan grup diğer gruplarla kıyaslandığında red nöron gelişimi, beyin ödemi ve travmasının şiddetini gösteren biyokimyasal parametrelerde istatistiki olarak anlamlı fark bulunmuş ve olumlu etkisi tespit edilmiştir.

Shilajitin kafa travmasında nöroprotektif etkinliğini araştırmak için bundan sonra planlanacak çalışmalar için farklı doz ve sürelerde kullanılması denenebilir. Bununla birlikte diffüz kafa travmasında travmanın sekonder etkileri üzerinde shilajitin olumlu etki göstererek tedavide kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Wickwire EM, Schnyer DM, Germain A, Williams SG, Lettieri CJ, McKeon AB, et al. Sleep, Sleep Disorders, and Circadian Health following Mild Traumatic Brain Injury in Adults: Review and Research Agenda. *J Neurotrauma*. 2018;35(22):2615-31.
2. Pervez M, Kitagawa RS, Chang TR. Definition of traumatic brain injury, neurosurgery, trauma orthopedics, neuroimaging, psychology, and psychiatry in mild traumatic brain injury. *Neuroimaging Clinics*. 2018;28(1):1-13.
3. Jenneth B, Galbraith S. Head injuries: Pathology and natural history of head injury. An introduction to neurosurgery (4th ed). William Heinemann, London 1983, pp. 214- 33.
4. Wilson JX, Gelb AW. Free radicals, antioxidants, and neurologic injury: possible relationship to cerebral protection by anesthetics. *J Neurosurg Anesthesiol* 2002; 14:66- 79.
5. Huh PW, Belayev L, Zhao W, et al. Neuroprotection by LY341122, a novel inhibitor of lipid peroxidation, against focal ischemic brain damage in rats. *Eur J Pharmacol* 2000;389:79-88.
6. Shibnath Ghosal SKS, Yatendra Kumar, Radheyshyam Srivastava, Raj K. Goel, Radharaman Dey, Salil K. Bhattacharya. Anti-ulcerogenic activity of fulvic acids and 4'-methoxy-6-carbomethoxybiphenyl isolated from shilajit. *Phytotherapy Research* 1988;2(4):187-91.
7. Goel RK, Banerjee RS, Acharya SB. Antiulcerogenic and antiinflammatory studies with shilajit. *J Ethnopharmacol* 1990; 29:95-103.
8. ASH S. [Effect of "Mumie" on Bone Regeneration and Blood Alkaline Phosphatase in Experimental Fractures of the Tubular Bones]. *Ortop Travmatol Protez*. 1965 May;26:24-7.
9. Kel'ginbaev NS, Sorokina VA, Stefanidu AG, Ismailova VN. [Treatment of long tubular bone fractures with Mumie Assil preparations in experiments and clinical conditions]. *Eksp Khir Anesteziol* 1973; 18:31-35.
10. Mohd. Aamir Mirza MNA, Mohd. Faiyazuddin,, Danish Mahmood RBaGM. Shilajit: An Ancient Panacea. *Int J Curr Pharmaceut Rev Res* 2010; 1:2-11.
11. AssegidGaredewa MF, Erik Schmolza, Ingolf Lamprecht. Thermal analysis of mumio, the legendary folkremedy from the Himalaya region. *Thermochimica Acta*. 2004; 417(2):301-9.
12. Agarwal SP, Khanna R, Karmarkar R, Anwer MK, Khar RK. Shilajit: A Review. *Phytother Res* 2007; 21:401-405.

13. Effect of Shilajit on rat brain monoamines. *Phytother Res* 1992; 6:163-164.
14. Park E, Bell JD, Baker AJ. Traumatic brain injury: can the consequences be stopped? *Canadian Medical Association Journal*. 2008;178(9):1163-70.
15. Gökalp, H.Z., Nöroşürji Ders Kitabı. 1998, Ankara: Mars Matbaası.
16. Erbenği A. History and development of neurosurgery in Anatolia (part one). *Turk Neurosurg*. 1993;3:1-5.
17. Paşaoğlu A. Erişkinde Kafa Travmaları. *Temel Nöroşürji*.1:316-23.
18. Teasdale G, Maas A, Lecky F, Manley G, Stocchetti N, Murray G. The Glasgow Coma Scale at 40 years: standing the test of time. *Lancet Neurol*. 2014; 13: 844-854.
19. Jennett B. Epidemiology of head injury. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1996;60(4):362-9.
20. Maas AI, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *The Lancet Neurology*. 2008;7(8):728-41.
21. Karasu A, Sabancı PA, Cansever T, Hepgöl KT, İmer M, Dolaş İ, et al. [Epidemiological study in head injury patients]. *Ulusal travma ve acil cerrahi dergisi= Turkish journal of trauma & emergency surgery: TJTES*. 2009;15(2):159-63.
22. Rimel RW, Giordani B, Barth JT, Boll TJ, Jane JA. Disability caused by minor head injury. *Neurosurgery*. 1981;9:221-228.
23. Ibanez J, Arıkan F, Pedraza S, Sanchez E, Poca MA, Rodriguez D. Reliability of clinical guidelines in the detection of patients at risk following mild head injury: results of a prospective study. *J Neurosurg*. 2004;100:825- 834
24. Textbook of Neurological Surgery. Batjer HH, Loftus CM (eds). Volume 3, X. Cranial and Cerebral Trauma Section. 2003;2795- 2803.
25. Liau LM, Bergsneider M, Becker DP. Volume 3, Chapter 67, Pathology and Pathophysiology of Head Injury. *Neurological Surgery Youmans* 1998.

26. Khoshyomn, S., et al., Survival after severe penetrating non-missile brainstem injury: case report. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 2004. 56(5): p. 1131-1134.
27. Muszynski, C.A., et al., Risk of pediatric head injury after motor vehicle accidents. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics*, 2005. 102(4): p. 374-379.
28. Warburton, A. and J.P. Shepherd, Development, utilisation, and importance of accident and emergency department derived assault data in violence management. *Emergency Medicine Journal*, 2004. 21(4): p. 473-477.
29. Haselsberger, K., R. Pucher, and L. Auer, Prognosis after acute subdural or epidural haemorrhage. *Acta neurochirurgica*, 1988. 90(3-4): p. 111-116.
30. Teasdale, G.M. and D.I. Graham, Craniocerebral trauma: protection and retrieval of the neuronal population after injury. *Neurosurgery*, 1998. 43(4): p. 723-737.
31. R.K. Narayan, J.E.W., J.T. Povlishock, Neurotrauma. *Neuropathology of head injury*, ed. D.I. Graham. 1996: McGraw Hill Companies.
32. Shaw, N.A., The neurophysiology of concussion. *Progress in neurobiology*, 2002. 67(4): p. 281-344.
33. Wasserman, J.K., X. Zhu, and L.C. Schlichter, Evolution of the inflammatory response in the brain following intracerebral hemorrhage and effects of delayed minocycline treatment. *Brain research*, 2007. 1180: p. 140-154.
34. Wasserman, J.K., H. Yang, and L.C. Schlichter, Glial responses, neuron death and lesion resolution after intracerebral hemorrhage in young vs. aged rats. *European Journal of Neuroscience*, 2008. 28(7): p. 1316-1328.
35. Gennarelli, T.A., Mechanism of primary head injury. *Neurosurgery*, 1996.
36. Gennarelli, T., Mechanisms of cerebral concussion, contusion, and other effects of head injury. *Neurological Surgery*. 3Ed. Philadelphia: Saunders, 1990: p. 1953-1979.
37. Greve MW, Zink BJ. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*. 2009;76(2):97-104.
38. Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F. Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *The Journal of Neuroscience*. 1990;10(3):1035-41.

39. Bouma GJ, Muizelaar JP, Choi SC, Newlon PG, Young HF. Cerebral circulation and metabolism after severe traumatic brain injury: the elusive role of ischemia. *Journal of neurosurgery*. 1991;75(5):685-93.
40. Marmarou A, Anderson RL, Ward JD, Choi SC, Young HF, Eisenberg HM, et al. Impact of ICP instability and hypotension on outcome in patients with severe head trauma. *Special Supplements*. 1991;75(1S):S59-S66.
41. Miller JD, Piper I, Jones P. *Pathophysiology of head injury*. Neurotrauma New York: McGraw-Hill. 1996;61.
42. Bullock R, Zauner A, Tsuji O, Woodward J, Young H, Marmarou A. Excitatory amino acid release after severe human head trauma: effect of intracranial pressure and cerebral perfusion pressure changes. *Intracranial Pressure IX Tokyo: Springer-Verlag*. 1994:264-7.
43. Büki A, Povlishock J. All roads lead to disconnection?—Traumatic axonal injury revisited. *Acta neurochirurgica*. 2006;148(2):181-94.
44. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences*. 1999;22(9):391-7.
45. Isaac JT, Ashby MC, McBain CJ. The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron*. 2007;54(6):859-71.
46. Benveniste EN. Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor*. 1998;9:259-275.
47. Hickey WF, Hsu BL, Kimura H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res*. 1991;28:254-260.
48. Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Otto VI, Stahel PF, Kossmann T. Role of cerebral inflammation after traumatic brain injury: a revisited concept. *Shock*. 2001;16:165-177.
49. Kreutzberg G. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996;19:312-318.
50. Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Rev*. 1999;30:77-105.

51. Tajiri N, Hernandez D, Acosta S, Shinozuka K, Ishikawa H, Ehrhart J, et al. Suppressed cytokine expression immediately following traumatic brain injury in neonatal rats indicates an expeditious endogenous anti-inflammatory response. *Brain research*. 2014;1559:65-71.
52. Schmidt OI, Heyde CE, Ertel W, Stahel PF. Closed head injury—an inflammatory disease? *Brain Research Reviews*. 2005;48(2):388-99.
53. Fluiter K, Oppenhuizen AL, Morgan BP, Baas F, Ramaglia V. Inhibition of the membrane attack complex of the complement system reduces secondary neuroaxonal loss and promotes neurologic recovery after traumatic brain injury in mice. *The Journal of Immunology*. 2014;192(5):2339-48.
54. Clark RS, Schiding JK, Kaczorowski SL et al. Neutrophil accumulation after traumatic brain injury in rats: comparison of weight drop and controlled cortical impact models. *J Neurotrauma* 1994; 11(5): 499–506.
55. Csuka E, Hans VH, Ammann E et al. Cell activation and inflammatory response following traumatic axonal injury in the rat. *Neuroreport* 2000; 11(11): 2587–90.
56. Lucas S, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol* 2006; 147: 232–40.
57. Stamatovic SM, Shaku P, Keep RF, Moore BB, Kunkel SL, Van Rooijen N. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005;25:593-606.
58. Braughler JM, Hall ED. Central nervous system trauma and stroke: I. Biochemical consideration for oxygen free radical formation and lipid peroxidation. *Free Radic. Biol Med*. 1989;6(3):303-13.
59. Manwaring JD, Csallary AS. Malondialdehyde containing proteins and their relationship to E. *Lipids Biochem. Biopharmacol*. 1988;23:651-5.
60. Lewen A, Fujimura M, Sugawara T, Matz P, Copin JC, Chan PH. Oxidative Stress- Dependent Release of Mitochondrial Cytochrome c After Traumatic Brain Injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001;21:914-920.
61. Gallardo CC, Guzmán L, Maccioni RB. Shilajit: A Natural Phytocomplex with Potential Procognitive Activity *Int J Alzheimers Dis*. 2012;2012:674142.
62. Kumar MR, Reddy AG, Anjaneyulu Y, Reddy GD. Oxidative stress induced by lead and antioxidant potential of certain adaptogens in poultry. *Toxicol Int*. 2010 ;17(2):45-8.

63. Ghasemkhani N, Tabrizi AS, Namazi F, Nazifi S. Treatment effects of Shilajit on aspirin-induced gastric lesions in rats. *Physiol Rep*. 2021;9(7):e14822.
64. Khaksari M, Mahmmodi R, Shahrokhi N, Shabani M, Joukar S, Aqapour M. The Effects of Shilajit on Brain Edema, Intracranial Pressure and Neurologic Outcomes following the Traumatic Brain Injury in Rat. *Iran J Basic Med Sci*. 2013;16(7):858-864.

