



T.C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

DENEYSEL KAFA TRAVMASINDA

TAKROLİMUS'UN

HİSTOPATOLOJİK ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

DR. ALİ ATADAĞ

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

GAZİANTEP

HAZİRAN - 2021T.C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

DENEYSEL KAFA TRAVMASINDA

TAKROLİMUS'UN

HİSTOPATOLOJİK ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ali ATADAĞ

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. İbrahim ERKUTLU

TEZ ONAY SAYFASI

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL KAFA TRAVMASINDA TAKROLİMUS'UN

HİSTOPATOLOJİK ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Ali ATADAĞ

25/06/2021

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

Prof. Dr. Can DEMİREL

Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının “Tıpta Uzmanlık” derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. İbrahim ERKUTLU

Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile “Tıpta Uzmanlık” tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. İbrahim ERKUTLU

TEZ JÜRİSİ:

1. Prof. Dr. İbrahim ERKUTLU
2. Doç. Dr. A. Murat GEYİK
3. Prof. Dr. K. Zafer YÜKSEL

I.ÖNSÖZ

Beyin ve Sinir Cerrahisi uzmanlık eğitimim süresince bilgi, beceri ve tecrübelerini benden esirgemeyen, bu çalışmanın nihayetlenmesinde yüksek sabır ve katkı gösteren, vakalara ve hastalara yaklaşımıyla kendisini her zaman örnek aldığım, tez danışmanım saygı değer hocam Prof. Dr. İbrahim ERKUTLU' ya ve çalışkanlığıyla örnek aldığım, samimiyeti ve deneyimleriyle eğitimimdeki katkılarından dolayı değerli hocam Doç. Dr. A. Murat Geyik' e saygı ve sevgilerimi sunuyorum.

Rotasyon eğitimlerim sırasında değerli bilgilerinden faydalandığım Dr. Öğr. Üyesi Berna KAYA UĞUR' a ve tez çalışmam sırasındaki desteklerinden dolayı Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Sarper BOZKURT' a teşekkür ederim.

Bu süreçte sıkıntılı ve güzel günleri paylaştığım, başta iyi bir ekip arkadaşı olan kıymetli dostum Dr. Ali NEHİR olmak üzere tüm asistan hekim arkadaşlarıma, Murat EKİNCİ ve Birgül BAĞATUR olmak üzere tüm hemşire ve personel arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu günlere gelmemde büyük emeği olan kıymetli anne - babam Emine ve Mahmut ATADAĞ' a, her zaman yanımda olan ve uzmanlık eğitimim süresince her türlü desteği sağlayan sevgili eşim Uzm. Dr. Yıldız ATADAĞ' a ve varlığı benim için büyük mutluluk ve motivasyon kaynağı olan, uzmanlık eğitimim süresince kendisine ayıramadığım zamanlar nedeniyle en büyük fedakarlığı yapan canım kızım Zeynep Ceren'e sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Ali Atadağ

Gaziantep 2021

II. İÇİNDEKİLER

I.ÖNSÖZ	i
II. İÇİNDEKİLER	ii
III. ÖZET	v
IV. ABSTRACT	vi
V. KISALTMALAR	vii
VI. TABLO LİSTESİ	viii
VII. ŞEKİL LİSTESİ	ix
VIII. RESİM LİSTESİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kafa Travması	2
2.1.1. Tanımı	2
2.1.2. Epidemiyolojisi	2
2.1.3. Tarihçesi	2
2.2. Kafa Travmalarının Sınıflandırılması	3
2.2.1. Hafif Şiddette Kafa Travması	4
2.2.2. Orta Şiddette Kafa Travması	4
2.2.3. Ağır Şiddette (Ciddi) Kafa Travması	4
2.3. Kafa Travmasının Fizyopatolojisi	4
2.3.1. Primer Beyin Hasarı	5
2.3.1.1. Fokal Hasarlar	5

2.3.1.1.1. Kranium Fraktürleri	5
2.3.1.1.2. İntrakranial Hemorajiler	6
2.3.1.1.3. Kontüzyonlar	7
2.3.1.2. Diffüz Hasarlar	7
2.3.1.2.1. Konküzyon	7
2.3.1.2.2. Diffüz Aksonal Hasar	8
2.3.2. Sekonder Beyin Hasarı	8
2.3.3. Travmatik Beyin Hasarında Nörokimyasal Olaylar	8
2.3.3.1. Eksitotoksisite	8
2.3.3.2. Oksidatif Stres ve Radikallerin Etkileri	9
2.3.3.3. Kalsiyuma Bağlı Hücre Hasarı	9
2.3.3.4. Enflamasyon	10
2.3.3.5. Hücre Ölümü	10
2.4. Takrolimus	11
2.5. Dimetil Sülfoksit	12
2.6. Mannitol	13
3. MATERYAL ve METOD	16
3.1. Kafa Travması	16
3.1.1. Anestezi	17
3.1.2. Ratların Travmaya Hazırlanması	18
3.1.3. Travmanın Oluşturulması	19

3.2. Deney Gruplarının Planlanması	20
3.2.1. Sham Kontrol Grubu	21
3.2.2. Negatif Kontrol Grubu	21
3.2.3. Pozitif Kontrol Grubu	21
3.2.4. Taşıyıcı Kontrol Grubu	21
3.2.5. Tedavi Grubu	21
3.3. Histopatolojik Değerlendirme	22
3.4. İmmunohistokimya	23
3.5. Kullanılan İstatistiki Yöntem ve Analiz	26
4. BULGULAR	27
5. TARTIŞMA	30
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	35
6. KAYNAKLAR	36

III. ÖZET

DENEYSEL KAFA TRAVMASINDA TAKROLİMUS'UN

HİSTOPATOLOJİK ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Ali ATADAĞ

Uzmanlık Tezi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim ERKUTLU

Haziran 2021, 44 Sayfa

Amaç: Çalışmamızda Deneysel kafa travması oluşturulan sıçanlarda, bir immunsupresif ajan olan Takrolimus'un (FK506) oluşacak sekonder beyin hasarına karşı koruyucu etkisini araştırmak amaçlanmıştır. Sekonder beyin hasarı, beyin dokusunda oluşacak gliosizin GFAP boyanması sonrası Immun Reaktivite Skoru (IRS) ile değerlendirilmiştir.

Materyal ve Metod: Bu deneyde 40 adet Sprague-Dawley tipi 250-350 gr ağırlığında 10-12 haftalık sıçanlar cinsiyet seçimi yapılmaksızın kullanılmıştır. Her grupta 8 sıçan olacak şekilde 5 gruba ayrılan denekler, uygun şartlarda kafa travması oluşturulduktan 1 ay sonra sakrifiye edilerek beyinleri en blok olarak çıkarıldı ve histopatolojik olarak değerlendirildi.

Bulgular: Tüm grupların histopatolojik IRS değerleri Kruskal Wallis varyans analizi ile değerlendirildiğinde tüm gruplar arasında istatistiki farkların olduğu gözlemlendi. Daha sonra ikili gruplar şeklinde Mann Withney – U ile yapılan karşılaştırmada IRS değerinin en fazla Tedavi grubunda arttığı ($p<0,05$) fakat Negatif Kontrol, Pozitif Kontrol ve Taşıyıcı gruplarında artmasına rağmen istatistiki anlam ifade etmediği gözlemlendi. Sham grubunda ileri derece bir histopatolojik reaksiyon skorunun en az oranda görüldüğü tespit edildi.

Sonuç: İyileşme beklentimiz olan grupta yani FK506 verilen grupta travmatik alandaki gliosisin diğer kontrol gruplarına göre istatistiki olarak belirgin olarak artış gösterdiği görüldü. Bu durum FK506'nın henüz açıklanamayan bir mekanizma ile gliozisi engelleyemediği hatta arttırdığını göstermektedir. Sonuç olarak, FK506 immunsupresif ajanının beklenin aksine beyindeki travma sonrası hasarı azaltmadığı, aksine gliozisi arttırdığı ortadadır.

Anahtar Kelimeler: Kafa travması, Takrolimus, FK506, Gliosis, Sekonder Beyin Hasarı

IV. ABSTRACT

TACROLIMUS IN EXPERIMENTAL HEAD TRAUMA RESEARCH OF HISTOPATHOLOGICAL EFFECTIVENESS

Dr. Ali ATADAĞ

Dissertation, Department of Neurosurgery

Dissertation Advisor: Prof. Dr. İbrahim ERKUTLU

June 2021, 44 Pages

Purpose: In our study, we aimed to investigate the protective effect of Tacrolimus (FK506), an immunosuppressive agent, against secondary brain damage in rats with experimental head trauma. Secondary brain injury was evaluated by the Immunoreactivity Score (IRS) after GFAP staining of gliosis that will occur in the brain tissue.

Material and method: In this experiment, 40 Sprague-Dawley rats weighing 250-350 g were used without gender selection. The subjects, divided into 5 groups with 8 rats in each group, were sacrificed 1 month after head trauma under appropriate conditions, their brains were removed en bloc and evaluated histopathologically.

Findings: When histopathological IRS values of all groups were evaluated by Kruskal Wallis analysis of variance, it was observed that there were statistical differences between all groups. Later, in the comparison made with Mann Withney - U as paired groups, it was observed that the IRS value increased the most in the Treatment group ($p < 0.05$), but it did not make statistical significance although it increased in Negative Control, Positive Control and Carrier groups. It was found that an advanced histopathological reaction score was the least in the sham group.

Conclusion: It was observed that gliosis in the traumatic area increased significantly in the group in which we expected recovery, namely the group given FK506, compared to the other control groups. This situation shows that FK506 cannot prevent or even increase gliosis by an unexplained mechanism. In conclusion, it is clear that FK506 immunosuppressive agent does not reduce post-traumatic damage to the brain contrary to expectations, but rather increases gliosis.

Key Words: Head trauma, Tacrolimus, FK506, Gliosis, Secondary Brain Injury

V.KISALTMALAR

TBH: Travmatik Beyin Hasarı

B.T: Bilgisayarlı Tomografi

GKS: Glaskow Koma Skalası

DAH: Diffüz Aksonal Hasar

SDH: Subdural Hematom

ROT: Reaktif Oksijen Türevleri

NMDA: N-metil-D-aspartik asit

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

GFAP: Glial Fibriller Asit Protein

NO: Nitrik Oksit

KBB: Kan Beyin Bariyeri

APAF-1: Apoptoz Proteaz Aktive Edici Faktör - 1

FK506: Takrolimus

IRS: İmmun Reaktivite Skoru

DMSO: Dimetilsülfoksit

GAÜNDAM: Gaziantep Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi

SSS: Santral Sinir Sistemi

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

VI. TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Glaskow Koma Skalası	3
Tablo 2: Subdural Hematom Sınıflaması ve BT bulguları	6
Tablo 3: İmmün Reaktivite Skoru	24
Tablo 4: IRS Değerlerinin Kruskal Wallis Varyans Analizi	27
Tablo 5: Deneklerin Histopatolojik Değerlendirilme Puanları	28
Tablo 6: IRS Değerlerinin Mann Withney U Testi sonuçları	29



VII. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Takrolimus'un Moleköl Yapısı	11
Şekil 2: Mannitol'ün Moleköl Yapısı	14
Şekil 3: Marmarou Kafa Travması Modeli	16



VII. RESİM LİSTESİ

Resim 1: İntraperitoneal Anestezi Uygulaması	17
Resim 2: Saçlı Deri Traşı	18
Resim 3: Sagittal ve Koronal Süturların Ortaya Konulması	19
Resim 4: Kafa Travması Oluşturma Aleti	20
Resim 5: Mannitol İnfüzyonu	22
Resim 6: Sakrifikasyon Sonrası Çıkarılan Beyin Örnekleri	23
Resim 7: Hematoksilen - Eozin boyama sonrası preparatlar	23
Resim 8: Deney gruplarına ait GFAP boyalı preparatlar	25

1. GİRİŞ

Travmatik beyin hasarı çok sık gözlenen, hayatı tehdit eden ve kalıcı organ tehdidine sebebiyet veren bir hastalık grubudur. Travma sonrası birincil hasar (beyin kanaması, kafatası çökmesi, aksonlarda kopma v.b.) olduktan sonra hızlı bir şekilde ikincil hasar (mikroskopik işlevsel dokularda yırtılma, sinir hücrelerinin ölümü, kalsiyum ve diğer moleküler bağımlı hasar, beyin dokusunun şişmesi v.b.) denilen süreçler başlamaktadır (4,6). Henüz tıp bilimi bu ikincil hasarı önleyebilecek ilaç ya da tedbirler konusunda uzun yıllardır antiödem ajan olarak kullanılan %20 lik Mannitol solüsyonu dışında bir farmakolojik tedavi ajanını kullanıma sunamamıştır. Takrolimus (FK506) bağışıklık sistemini baskılayan ve organ transplantasyonunda insana transplante edilen organın reddedilmesini engelleyen immünosupresif bir ilaçtır. Daha önceki diffüz aksonal yaralanma ve travmatik beyin hasarı ile ilgili deneysel çalışmalarda (1) FK506'nın santral sinir sisteminde koruyucu bir etkisi olduğunu bildirmiştir. Bu etkisini moleküler düzeyde yapmakta (3) ve hücre ölümünü geciktirmektedir. Bu çalışmamızda, künt kafa travmalı deneklerde FK506'nın bu etkisini erken dönem verildiğinde gösterip göstermediğini beyin dokusu ortamında histopatolojik inceleme ile değerlendirdik. (2,5,7,8,9).

Literatürde (1,3) Takrolimus (FK506) 'un beyin ve omurilik travmalarında deneysel olarak kullanıldığı ve faydalı olabileceği belirtilmiştir fakat histopatolojik ve biyokimyasal olarak yapılan çalışmaların sayısı tedavi protokollerine geçecek kadar yeterli değildir. 1990'larda henüz laboratuvar ortamında kullanılmasına rağmen 2000'li yıllarda organ transplantasyonunda artık tedaviye girmesi bu farmakolojik ajanın bazı beyin ve omurilik ikincil hasarlarında kullanılma umudunu doğurmuştur.

Bu çalışma ile erken dönemde kafa travmalı hastalarda ikincil hasarı önleyebilecek (4) bir takım tedavi protokolleri geliştirebilmek, bu protokollerin uluslararası ve ulusal planda yer bulması, eğer etkinliği tespit edilirse sonuçlarının öncelikle deneysel olarak rapor edilmesi planlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Kafa Travması

2.1.1. Tanımı

Kafa travması, bir dış etken sonucu meydana gelen, yüz veya saçlı deri yaralanmasından ağır koma ve ölüme kadar gidebilen bir klinik tablodur. Kafa travması sonrası beyinde geçici veya kalıcı olarak meydana gelen bilinç durumu eksikliği, duyuşal, motor veya psikolojik bozukluk ise travmatik beyin hasarı (TBH) olarak adlandırılır. Kafa travmaları, günlük yaşamda ağır ve istenmeyen sonuçları olan cerrahi ve medikal bir problemdir. Bu kazaların engellenmesi, acil tedavisi ve tedavi sonrası rehabilitasyonu büyük zorluklar içermektedir.

2.1.2. Epidemiyojisi

Kafa travmaları dünyada çocuk ve genç erişkin ölümlerinin en önemli nedenlerindendir. 2018 yılında yapılan bir çalışma dünyada yıllık yaklaşık 70 milyon kişinin TBH geçirdiği ve bunların % 81'inin hafif, % 11'inin orta ve % 8'inin ciddi düzeyde olduğunu bildirmektedir (10). Ülkemizde 2009 yılında yapılan bir çalışmada acil servise kafa travması şikayetiyle yapılan başvuruların %66 erkek, %34 kadın hasta olduğu, yaş gruplarına göre ise %22 çocuk, %30 genç, erişkin hasta başvurusu olduğu görülmüştür. Kafa travması oluşumunda %40 ile düşme ve %37 ile trafik kazaları en sık nedenleri oluşturmaktadır (11). Diğer nedenler darp, ateşli silah yaralanmaları, ev iş ve spor yaralanmaları olarak sıralanabilir.

2.1.3. Tarihçesi

Kafa travması ile ilgili bilinen ilk incelemeler milattan önce 2800 yılında Mısırlı hekim İmhotep tarafınca yapılmıştır. Mısırlı hekim kafa travmalarını tedavi edilir, tedavi edilebilir ve tedavi edilemez olarak üç sınıfa ayırmıştır (12).

Anadoluda yapılan kazılarda Van – Dilkaya bölgesinde milattan önce 8. yüzyılda yaşayan Urartılar dönemine ait ilginç bir arkeolojik keşfe ulaşılmıştır. Onüç adet burr hole delindikten sonra bir kesici yardımıyla kranitomi yapılmış bir kafatası

bulunmuştur. 11*6 cm ebadında olan ve operasyon sonrası tekrar yerine konulan serbest kemik flebin orta meningeal arteri çaprazladığı göz önüne alınınca muhtemelen bir epidural hematomu boşaltmak için yapıldığı düşünülmektedir (13).

Avrupada Hippocrates (M.Ö.460-355), Cornecius Celcus (M.S. 1. yüzyıl), Galen (M.S.131-201) gibi hekimler trepanasyonu tedavi amacı ile kullanmışlardır. İbn-i sina 9. yüzyılda tedavi amaçlı trepanasyon önermiştir (13). Arap cerrahı Abulcasis M.S.11. yüzyılda özellikle çökme kırıklarını trepanasyonla tedavi etmiştir (14). Ambroise Pare, 1510'da Fransa kralı II.Henri' nin travmatik orbita üstü kafa içi hematom ameliyatını yapmıştır (14). Berengorius Bologna Üniversitesi'nde bir profesör olan Capri'li Jacop, 1518'de kafa travmaları üzerine ilk kitabını yazmıştır. Bu kitap sadece nöroşirürji konuları üzerine yazılmış ilk kitaptır (15). Hounsfield'in 1970'li yıllarda Bilgisayarlı Tomografiyi (BT) geliştirmesiyle intrakranial lezyonlara yaklaşımda büyük bir gelişme yaşanmıştır (14).

2.2. Kafa Travmalarının Sınıflandırılması

Şiddetine göre kafa travmaları Glaskow Koma Skalası (GKS) kullanılarak üç gruba ayrılır (Tablo 1)(16,17).

Tablo 1 : Glaskow Koma Skalası (16)

Göz Açma		Motor Yanıt		Verbal Yanıt	
Spontan	4	Spontan	6	Spontan	5
Sözel uyarı ile	3	Ağrıyı lokalize etme	5	Konfüze	4
Ağrılı uyaran ile	2	Ağrıdan kaçma	4	Anlamsız kelimeler	3
Cevap yok	1	Dekortike pozisyon	3	Anlamsız sesler	2
		Deserebre pozisyon	2	Tepki yok	1
		Cevap yok	1		

2.2.1. Hafif Şiddette Kafa Travması

Glaskow koma skorlaması 14-15 olan hastaları kapsar. Kafa travmalarının yaklaşık %80'i hafif şiddette travmatik beyin hasarı ile sonuçlanır. Kafa travması sonrası geçici bir amnezi veya diğer nörolojik fonksiyonlarda kısa süreli – geçici bir duraklama görülebilir. Bu tarz bir beyin hasarında BT bulgularında cerrahi müdahale gerektirecek patolojik bir lezyonla neredeyse hiç karşılaşılmamaktadır (16).

2.2.2. Orta Şiddette Kafa Travması

Glaskow koma skorlaması 9-13 ve arası olan hastaları kapsar. Genelde uyku hali, emirlere itaatte azalma görülür. BT bulgularında fraktürler, diffüz aksonal hasar, intraparakimal, ekstraparakimal hemorajiler görülebilir. Bu hastalarda ilerleyen saatlerde mutlaka kontrol BT ile kafa içi yer kaplayıcı lezyon takibi yapılmalıdır (7,8). Kafa travmalı hastaların %10'unda orta şiddette TBH görüldüğü ve bunlarda %40 oranında BT bulgusu pozitifliği, %8'inin operasyon ihtiyacı olduğu saptanmıştır (19,20).

2.2.3. Ağır Şiddette (Ciddi) Kafa Travması

GKS 3-8 olan hastalar bu grupta yer alırlar. Kafa travması geçirenlerin %10'u ağır şiddette TBH'na maruz kalırlar. Mortalitesi yaklaşık olarak %35 oranında olup vakaların %25'i cerrahi müdahaleye ihtiyaç gösterir (19,20). Ağır şiddette TBH geçiren hastalarda özellikle sekonder beyin hasarına yönelik önlemler almak ve tedavi düzenlemek hayati önem taşır.

2.3. Kafa Travmasının Fizyopatolojisi

Travmatik beyin hasarı kafa travması sonrası beynin fonksiyonlarında oluşan geçici veya kalıcı bir takım işlevsel bozulma tablosudur. Kafa travması sonrası TBH oluşmasına neden olan primer ve sekonder beyin hasarı olmak üzere 2 mekanizma mevcuttur. Kafa travmasında darbenin neden olduğu birincil hasar kaçınılmazdır

ancak kafa travmalı kişilerde tanı ve tedavideki amaç, ikincil beyin hasarına neden olacak olayları en aza indirmektir (21).

2.3.1. Primer Beyin Hasarı

Travmadan sonra direkt etki ile oluşan hasarlardır. Akson yırtılmaları, parankim laserasyonu, diffüz aksonal hasar (DAH), epidural, subdural, subaraknoid hematomlar, intraserebral hematomlar, çökme fraktürü gibi travma esnasında oluşan beyin hasarına bağlıdır (22). Diffüz ve fokal olmak üzere ikiye ayrılır. Klinik pratikte diffüz aksonal hasar ve fokal hasarlar çoğunlukla birlikte görülürler (23).

2.3.1.1. Fokal Hasarlar

2.3.1.1.1. Kranium Fraktürleri

Kafa kaidesinde veya konveksitede meydana gelebilir. Lineer fraktür, diastazis, çökme fraktürü veya kaide fraktürü şeklinde görülebilir.

Lineer Fraktürler:

Ağır kafa travmalı hastaların yaklaşık % 62'sinde lineer fraktür görülür. Tüm kranium fraktürlerinin %80'ini oluşturur. Erken dönem en sık komplikasyonu epidural hematom olup, geç dönemde leptomeningeal kiste neden olabilirler (24,25). Konveksite kırıklarının %17'si kaideye uzanım gösterir (25).

Çökme Fraktürleri:

Ağır kafa travmalı hastaların %11'inde çökme fraktürü görülebilir. Skalpin sağlam olduğu, dural penetrasyon olmayan çökme fraktürleri basit çökme, skalpin yaralandığı ancak duranın sağlam olduğu fraktürler açık çökme fraktürleri, skalp yaralanmasına çöken kemiğin parankime girerek eşlik ettiği durumlara ise komplike çökme fraktürü olarak isimlendirilir (25).

Kaide Fraktürleri:

Ağır kafa travmalı hastaların %4'ünde görülür. %17 oranında konveksite fraktürlerinin devamı şeklindedir. Kranial sinirlerin kaide fraktürünün yerleşim yerine göre yaralanma ihtimali gözden kaçırılmamalıdır. Otorre ve rinore kaide fraktürlerinde dikkat edilmesi gereken semptomlardır (25, 26).

2.3.1.1.2. İntrakranial Hemorajiler

Epidural Hematom:

Genelde lineer fraktür alanının altındaki arterial kanamalar nedeniyle kemik ve dura arasında oluşur. En sık temporal bölgede erişkinde (%75) görülür (25). Pediatrik grupta fraktür olmaksızın da görülebilir. Pediatrik grupta venöz kaynaklı epidural hematoma siktir. Oksipital, frontal, temporal veya posterior fossa bölgelerinde benzer oranlarda olabilir (27). Yaşla birlikte duranın üst yaprağında kemiğe olan yapışıklık arttığı için yaşlılarda epidural hematoma gelişmesi nadirdir (28). Epidural hematoma hastalarda Jacobson tarafından tanımlanan şiddetli travmayı takiben bayılma ve sonrasında geçici bir iyilik hali, ve sonrasında tekrar kötüleşmeyle giden 'lucid interval' denilen bir klinik tablo görülebilir. Tanısının hızlı konulması ve acil cerrahi iyi bir sonuç için oldukça önemlidir (29).

Subdural Hematom:

Kafa travmasını takiben araknoid ile dura arasında gelişen, köprü venlerin yırtılması sonucu oluşan kanama çeşididir. Beynin akselerasyon- deselerasyonu sonucu oluşur. %30 oranında kortikal arter kanaması sonrası olabilir (30). İlk 3 gün içerisinde tanı konulan subdural hematomlara (SDH) akut SDH, 3-14 gün arasında subakut SDH, 21 günden sonra tanı konulan SDH'lara kronik SDH adı verilmektedir (Tablo 2). Subdural hematomların %60'ı akut subdural hematomlardır ve bunlarında %60'ı mortal seyreder (31).

Tablo 2: Subdural hematoma sınıflaması ve BT bulguları (31)

	Gün	İçerik	BT bulgusu
Akut SDH	0- 3 gün	Taze kan	Hiperdens
Subakut SDH	3-14 gün	Pıhtılı kan	İzodens
Kronik SDH	14 gün sonrası	Likefiye kan	Hipodens

(BT: Bilgisayarlı Tomografi, SDH: Subdural hematoma)

Subaraknoid Kanamalar:

Kranial ya da spinal bölgede araknoid zar ile pia mater arasındaki beyin omurilik sıvısının bulunduğu subaraknoid boşluğa, genellikle arteriel kaynaklı olan kanamalardır (32). En sık nedeni travmalardır (33).

İntraserebral Hematomlar:

Intraparankimal hematomlar ve ventrikül içi hematomlar bu gruptadır. %20 oranında kafa travmasını takiben oluşur ve kitle etkisi gösterirler (34). Erişkinlerde çocuklara nazaran daha sık görülür. %80 oranında hipertansiyon, kitle içi kanama, anevrizmalar ve arteriovenöz malformasyonlar gibi nedenlerle oluşurlar. Kafa travmalarında hematom hacminin 50 cc'den fazla olduğu durumlarda mortalitenin anlamlı şekilde yükseldiği görülmüştür (35).

2.3.1.1.3. Kontüzyonlar

Travma sonrası beyin parankiminde meydana gelen mikrokanamalar neticesinde oluşan ezilme, ekimoz olarak tanımlanır. Kontüzyonda laserasyondan farklı olarak pia mater sağlam olarak kabul edilir (36). Ağır şiddette kafa travmalarından sonra yaklaşık %20-30 oranında görülür (37). Genelde cerrahi müdahale gerektirmeyen lezyonlardır ancak birleşerek veya büyüyerek intraparaknimal hematoma dönüşebileceği unutulmamalıdır. En sık frontal ve temporal alanlarda kemiğe komşu parankimal dokuda meydana gelir. Travmayla aynı tarafta coup lezyon veya travmanın karşı tarafında counter-coup lezyon şeklinde gelişebilirler.

2.3.1.2. Diffüz Hasarlar

Travmatik beyin hasarı sonrasında en sık görülen tablo diffüz beyin hasarıdır. Konküzyon ve diffüz aksonal hasar (DAH) şeklinde görülebilir.

2.3.1.2.1. Konküzyon

Beynin travma sırasındaki akselerasyon – deselerasyonu nedeniyle aksonlardaki gerilmeye bağlı olarak meydana gelen, genellikle 3 haftadan daha uzun sürmeyen, beynin fiziksel, kognitif ve emosyonel fonksiyonlarındaki hafif ve

geçici bozulma olması durumudur. Diffüz aksonal hasarın en hafif formu olarak da tarif edilebilir. Genellikle geçici bilinç bulanıklığı görülür.

2.3.1.2.2. Diffüz Aksonal Hasar

Şiddetli kafa travması sonrasında aksonlarda ve miyelin kılıfta hasarlanma veya kopma ile giden beyin ve beyin sapında beyaz madde hasarı sonucu oluşan beyin hasarı çeşitlidir. Tanısı ancak mikroskopik incelemeler sonucunda konulabilir ancak karakteristik bölgelerde peteşiyel kanamalar DAH belirtisi olarak kabul edilir (22). Lezyonlar özellikle orta hat yapılarında; korpus kallozum, internal kapsül, üçüncü ventrikül çevresi, forniks, beyin sapı, serebral beyaz cevher, ponto-mezensafalik bileşke ve serebellumdadır (38,39). Lezyonlar BT’de 1-15 mm ebadında noktasal hemorajiler şeklinde görülebildiği gibi BT’de her zaman lezyonu görmek mümkün olmayabilir. Kliniği ağır komadan mortaliteye kadar değişiklik gösterir. Genelde dirençli koma halinden sorumlu tutulur. İyileşme durumu lezyonların yerleri ve yaygınlığı ile doğrudan ilişkilidir.

2.3.2. Sekonder Beyin Hasarı

Sekonder beyin hasarı travmadan dakikalar veya günler sonra ortaya çıkabilen, gelişen patolojik değişikliğe karşı vücudun fizyolojik yanıtı nedeniyle oluşan nöronal hasardır. TBH sonrası iyon kanallarının açılması, hücre içine kalsiyum akışı, serbest radikal bağlayıcılarının inaktivasyonu, beyin ödemi ve serbest radikal oluşumu beyin hasarına neden olur (40). Reaktif oksijen türevleri (ROT), serbest radikaller, kalsiyum bağımlı hücre hasarı, nörotransmitterler (glutamat, aspartat), gen aktivasyonu, inflamatuvar yanıt veya mitokondriyal disfonksiyon nedeniyle oluşabilir (41,42).

2.3.3. Sekonder Beyin Hasarında Nörokimyasal Olaylar

2.3.3.1.Eksitotoksisite

Travma sonrası nöronlarda bir eksitator nörotransmitter olan glutamat salınımında artış olur. Hücre dışı alanda artmış olan glutamat, NMDA (N–metil–D–aspartik asit) ve AMPA (α –amino–3–hidroksi–5–metil–4–isoksazolepropionik asit) gibi reseptörlerini uyararak hücre içine sırasıyla sodyum, klor ve kalsiyum girişini

artırır. Bu iyonik dengesizlik ATP bağımlı Na/K-ATPaz enzimi ile düzetilmeye çalışılsa da Ca^{+2} ile aktive olan lipaz, proteaz ve endonükleaz gibi enzimlerin metabolik aktiviteyi bozması nedeniyle tam olarak kompanse edilemez. Ca^{+2} 'nin aktive ettiği lipaz, proteaz ve endonükleaz gibi hücre duvarını ve hücre elemanlarını yıkan enzimler tarafından hücre ölümü indüklenmiş olur (43).

2.3.3.2.Oksidatif Stres ve Radikallerin Etkileri

Hücre metabolizması sonrası oluşabilen veya doğada bulunan nitrik oksit (NO), peroksinitrit, hidrojen peroksit, süperoksitler, hidroksil radikalleri, demir gibi metabolitler, hücre içinde bir takım serbest radikal reaksiyonlar oluşturabilirler. Bu reaksiyonlar hücre içinde hızla destrüksiyona veya hücre geçirgenliğini bozarak ani hücre ölümüne neden olabilir. Normal şartlarda insan organizması bu tarz reaksiyonlara karşı kendini koruyabilecek enzimlere sahiptir. Bu savunma mekanizmasına antioksidan sistem adı verilir. Ancak travma gibi etkenler sonrası oluşan artmış oksijen/nitrojen türevlerine veya demir gibi metabolitlere karşı hücrenin kendini savunamaması durumuna oksidatif stres adı verilir ve bu durum hücre ölümüne neden olmaktadır.

2.3.3.3. Kalsiyuma Bağlı Hücre Hasarı

Sekonder beyin hasarının en önemli nedenlerinden birisi hücre içindeki kalsiyum miktarında artma olmasıdır. Programlanmış hücre ölümünün başlatılması ile ilişkilidir. Nöron hasarı sonrası mitokondriyal şişme meydana gelir (44).

Mitokondri içerisinde kalsiyum artışı mitokondri membranında depolarizasyona ve hücre membranında iyon geçiş porlarının açılmasına neden olur. Böylece apoptozisin ilk evrelerine geçiş başlamıştır. Ayrıca mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ATP üretimini de bozarak ATP bağımlı iyon kanallarında disfonksiyona neden olur (45).

Ayrıca aksonlarda kalsiyum artışı sonrası normalde hücre içerisinde bulunan ve birçok fizyolojik görevi olan kalpain enzimleri aşırı aktive olarak impuls iletiminden

sorumlu aksonal proteinleri hedef alırlar ve sinir iletisinde bozulmaya neden olurlar (46).

2.3.3.4.Enflamasyon

Beyin dokusu kan beyin bariyeri (KBB) nedeniyle hücelere karşı geçirgen değildir (47). Ancak travma sonrası KBB’de bozulma nedeniyle özellikle lökositlerin kan beyin bariyerini geçerek beyinde enflamatuar süreçlerde rol aldığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (48). Beyinde, aktive mikrogliaların, ödemin ve nötrofillerin bulunması enflamasyonu işaret etmektedir. Nöroenflamasyon modellerinden de anlaşıldığı üzere serbest oksijen radikalleri ve interlökinlerin ana kaynağı mikrogilalardır (49). Oluşan beyin hasarının şiddetine göre TBH sonrası ilk 24 saatte nötrofilik infiltrasyon ve ilk 3-5 gün arası makrofajların bölgeye intikali gerçekleşir (50).Ancak bazı çalışmalar bölgeye nötrofil infiltrasyonu olmaksızın periferik makrofaj göçünün olduğunu göstermiştir. Bu farklılığın muhtemelen KBB deki bozulma şiddeti veya kişilerin immun sistem farklılığı ile ilgili olduğu düşünülmektedir (51). Glial hücreler ve immun sistem hücrelerinden salınan interlökinler, TNF- α , siklooksijenaz 2, fosfolipaz A2, prostaglandinler gibi sitokinler ve KBB’nin bozulması sonrasında artan serebrovasküler geçirgenlikle birlikte nöroenflamasyon gelişmiş olur ve beyin ödemi ile devam eder (52).

2.3.3.5.Hücre Ölümü

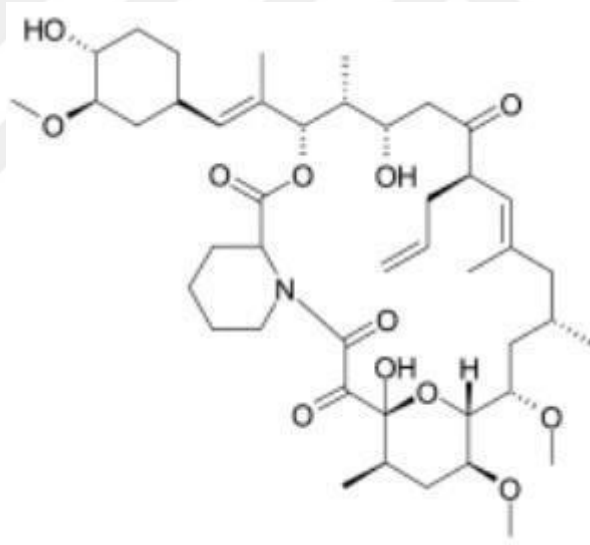
Travmatik beyin hasarı sonrası nekroz veya programlanmış hücre hasarı (apopitoz) nedeniyle hücre ölümü meydana gelir. Apopitoz, hücrelerin parçalanması için endojen hücresel enzimlerin aktif katılımını gerektiren programlanmış hücre ölüm süreci olarak tanımlanmaktadır (53,54). Bu süreç hücre volüm kaybını, endoplazmik retikulumun dilatasyonunu, sitoplazmik organellerin ve nükleer kromatinin yoğunlaşmasını içermektedir. Bu aşamadan sonra hücresel komponentler birer membran ile kaplanarak veziküller haline getirilerek apoptotik cisim adını alırlar ve fagositte edilirler (53). Apopitozun başlatılmasında birkaç yol mevcut olup bunlardan biri mitokondri tarafından kontrol edilir ve mitokondride

yerleşmiş apoptoz proteaz aktive edici faktör1 (APAF-1) ve kaspaz-9'u içerir. Bu yol sitokrom-c tarafından aktive edildiğinde APAF-1, pro-kaspaz-9'u aktifler. Kaspaz-8 ve kaspaz-9 mitokondri için en önemli kaspazlardır (53,55, 56, 57).

Santral sinir sistemi içinde apoptozla ilgili öncelikli diğer bir enzim kaspaz-3'tür. Yapılan deneysel çalışmalarda, kaspaz-3'ün memeli beyinlerinde morfogenetik hücre ölümleri sırasında önemli rol üstlendiği gösterilmiştir (55, 56, 57).

2.4. Takrolimus (FK506)

FK506 olarak da bilinen takrolimus, organ transplantasyonunda allograft rejeksiyonundan korunmak için kullanılan bir makrolid immünsüpresandır (Şekil 1)(58).



Şekil 1: Takrolimusun molekül yapısı (58)

Streptomyces tsukubaensis'den izole edilen takrolimus inflamasyon sırasında nötrofilleri regüle eden mikst lenfosit reaksiyonunun ve T lenfositler tarafından İnterlökin-2 (IL-2), interlökin-3 (IL-3), interlökin-4 (IL-4), interlökin-5 (IL-5), 3 gama-interferon, Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF), Tumor Necrosis Factor-alfa (TNF-alfa) salınımının inhibisyonuna neden olur (59). FK506,

Ca⁺² bağımlı sinyal transdüksiyon yolunu süprese ederek, IL-2'nin aracılık ettiği T helper hücrelerinin proliferasyonunu ilerleterek immünsüpresan özelliğini gösterir (60).

Bu ilaçlar etkilerini immünofilinler olarak adlandırılan, sitokinlerin yeni bir ailesi ile bağlanarak gösterirler (61). Bu yoldaki hız kısıtlayıcı enzimler bir kalsiyum-kalmodülin bağımlı protein fosfataz olan, kalsinörin (fosfataz-2B)'dir. Takrolimus, FK506 bağlayıcı protein (FKBPs) olarak adlandırılan intrasellüler protein ailesinden 12 kD bir immünofilin olan FKBP12'ye bağlanarak kalsinörini (CaN) inhibe eder. Primer olay; takrolimus ve FK506 bağlayıcı protein (FKBP12)'nin bir kompleks oluşturarak kalsinörine bağlanması ve fosfataz aktivitesini inhibe etmesidir (60, 62).

FK506'nın kendisi siklosporinle (kalsinörin inhibisyonu yoluyla etki eden diğer bir immünosupresan) karşılaştırıldığında yaklaşık 100 kat daha aktiftir ancak toksisitesi daha azdır (63, 64).

Takrolimus sitozolik hedef proteini FKBP (FK506- binding protein)'e yüksek afinite ile, özellikle FKBP-12'ye, bağlanarak kalsinörini bloke eder. Takrolimusun kalsinörini inhibe etmesi, immün ve inflamatuvar cevapta rol oynayan sitokinlerin, lenfokinlerin (IL-2, IL-3, IL-4, TNF-alfa, IFN) ve adhezyon moleküllerinin oluşumunu baskılar(65, 66).

FK506 yüksek lipofiliktir, farmakokinetik özelliği kişinin yağ doku oranına göre değişir. Oral biyoyaralanımı %22'dir ve pik konsantrasyona bir ile dört saatte ulaşır (67). Karaciger metabolik sisteminde CYP-3A (sitokrom-3A) enzim ailesi ile ilk geçiş eliminasyonuna uğrar ve metabolitleri safra ile atılır, ancak %1-3 kadarı idrarda bulunur (68).

2.5. Dimetil Sülfoksit (DMSO)

DMSO ilk kez Alexander Saytzeff tarafından 1867'de bulunmuş ve Swanson tarafından 1985 yılında dipolar, aprotik çözücü olarak tarif edilmiştir. DMSO renksiz, berrak olup +18 °C donan dipolar, aprotik ve higroskopik bir çözücüdür. DMSO cilt ve mukozalarla temas sonrası hızla vücutta neredeyse tüm dokulara ve hatta hücre organellerine kadar penetre olur ve bu penetrasyonun hızı DMSO'nun

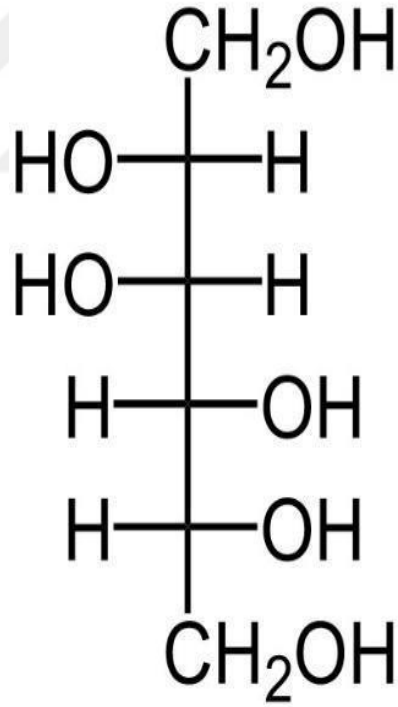
konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Penetrasyon sırasında biyomembranlarda geri dönüşümlü minimal değişiklikler oluşmaktadır. DMSO'nun biyotransformasyonu karaciğer ve böbrekte olup, sülfoksit redüktaz enzimi ile dimetil sülfide dönüşür. DMSO'nun vücuttaki yarılanma ömrü yaklaşık 11–14 saattir. Dipolar özelliği nedeni ile hidrojen bağlarındaki hidrojen protonlarını (H^+) ve ayrıca ortamdaki hidroksil ($-OH$) radikallerini bağlayıcı etkiye, metaboliti olan dimetil sülfid ise serbest oksijen radikal bağlama özelliğine sahiptir. Bu nedenle de hidrofilik ve 7 lipofilik karaktere aynı anda sahip olup, birçok madde için, özellikle birçok protein ve steroid için güçlü solvent rolü oynar. Böylece lipofilik membranlar dahil birçok biyolojik bariyer DMSO için geçirgen olabilmektedir. Tüm bu özellikleri doğrultusunda in vivo topikal ve/veya intravasküler uygulamada DMSO ve metaboliti dimetil sülfidin antioksidan, antiinflamatuvar, hücre koruyucu, radyoprotektif ve antiiskemik etkileri mevcuttur.(69)

Vücutta oluşan dimetil sülfidin sedatif ve hemolitik yan etkileri vardır. DMSO intravasküler yolla 1g/kg altı dozda uygulandığında genelde infüzyon yerinde intravasküler hemoliz ve lentiküler değişiklikler dışında belirgin sistemik yan etki oluşturmaz. Deney hayvanlarında yüksek dozlarda hepatotoksisite ve nefrotoksisite oluşturduğu gösterilmiştir (69). Kronik kullanımda deri reaksiyonlarından intravasküler hemolize kadar geniş bir spektrumda yan etkileri ortaya çıkar. İn vivo ve in vitro çalışmalarda intravasküler hemoliz kanıtlanmış olup, bu etki DMSO konsantrasyonu, veriliş hızı ve osmolalitesi ile doğru orantılıdır (70). İntravenöz uygulamalarda DMSO'nun trombositler üzerinde antiagregan etkisi olduğu ve fibrin oluşumunu azalttığı, buna karşılık endotel üzerinde koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir. Ancak %20'den az konsantrasyonlarda ve yavaş intravenöz uygulamalarda bu etkiler azalmaktadır.(70)

2.6. Mannitol

Mannitol hipertonic ve hiperosmolar bir ajan olup molekül ağırlığı 182 daltondur. Altı karbonlu ve altı hidroksil grubu içeren basit bir şekerdir. Beyin ödeminin tedavisinde kafa içi basıncını azaltmak için en fazla kullanılan ajandır (71)

Kafaçi basıncı düşürücü etkisinin başlaması 1-5 dakika arasındadır. Maksimum etkisi 20-60 dakikadır. 0,25 gr/kg mannitol dozunun bazı hastalarda KİB'ı azaltmada yeterli olduğu gösterilmiştir. Ancak doz 1 gr/kg'a kadar çıkılabilir. Önceki yüksek doz daha sonraki dozun etkinliğini azaltır. Bunun için en ufak etkin dozu kullanmak gerekir. Mannitolun etkinliği lup üzerinden etki eden diüretiklerin kullanımı ile birleştigi zaman sinerjik olarak artar. Serum ozmolaritesi 320 mOsm/L olduğu sürece etkilidir. Bu düzeyin üzerinde böbrek yetmezliği ve sistemik asidoz meydana gelebilir. Mannitol diüretik etki mekanizması şu şekilde gerçekleşmektedir: Mannitol glomerülerden süzöldükten sonra proksimal tübüllerden geçerken reabsorbe edilmez, filtratın ozmolaritesinin yükselmesine ve sodyum konsantrasyonunun düşmesine neden olur, böylece suyun reabsorpsiyonunu azaltır; su ile birlikte Na⁺ ve Cl⁻ iyonlarının reabsorpsiyonu da azalır (Şekil 2: Mannitolün' moleküler yapısı)(74).



Şekil 2: Mannitolün Moleküler Yapısı

Mannitolün intrakranial basınç düşürücü etkisinin olası mekanizmaları:

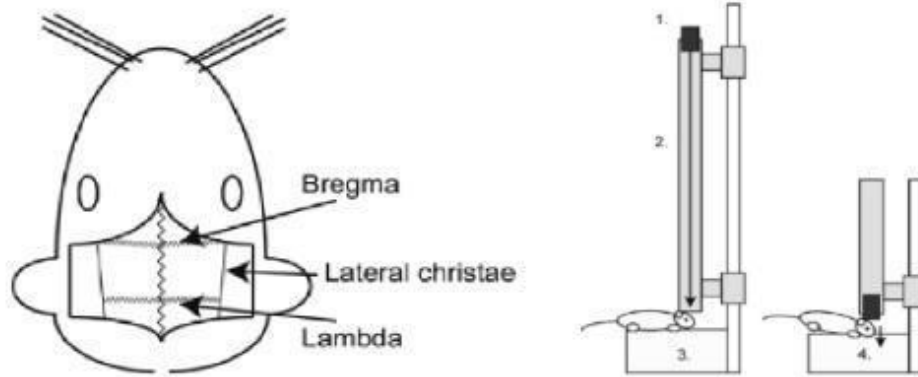
BOS yapımını azaltır, BOS'un emilimini artırır. Böylece intraventriküler hacim azalır (75). Ekstravasküler aralıktan intravasküler aralığa suyu çekerek beyin su içeriğini azaltarak ve kan viskozitesini azaltarak intrakranial vazokonstriksiyon oluşturup beyin kan volümünü düşürerek intrakranial basıncı düşürür(76). Hemodinamik açıdan vazodilatatör bir ajan olduğundan beyin kan akımında otoregülasyonla hem direkt hem de indirekt değişikliklere yol açar (77). Beyin cerrahi hastalarının kortikosteroid kullanımına sekonder hiperglisemi, dehidratasyon veya gastrointestinal sistem kanaması, BUN artışı gibi sebeplerle osmolarite artışına meyilli oldukları bilindiğinden bu hastalara laboratuvar tetkikler yapılmaksızın mannitol verilmemesinin uygun olacağı belirtilmektedir. (78, 79).

3. MATERYAL VE METOD

Bu deneysel çalışma, Gaziantep Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde (GAÜNDAM) yapılmış ve histolojik preparatlar Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında değerlendirilmiştir. Çalışma için Gaziantep Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı'ndan 09.10.2018 tarih, 73 protokol no ve 2018/23 karar no ile onay alınmıştır. Kullanılan denekler GAÜNDAM'dan temin edilmiştir. Çalışmada 40 adet erkek, Sprague-Dawley tipi, 250-350 gr ağırlığında 10-12 haftalık sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar çalışma süresince oda ısısında (20 ± 2 °C) ve 12'şer saatlik aydınlık / karanlık ortamında tutulup, standart pelet sıçan yemi ile beslenerek, suya serbestçe ulaşabilmeleri sağlandı. Çalışmaya başlamadan önce sıçanlar bir hafta süreyle bu ortamda izlendi ve ortama uyum sağlamaları gözlemlendi. Deneyde Beyin ve Sinir cerrahisi Anabilim Dalı cerrahi deney aletleri, deneysel kafa travması düzeneği kullanılmıştır.

3.1. Kafa Travması Modeli

Kafa travması, Marmarou ve arkadaşları tarafından tarif edilen Marmarou impakt akselasyon modeli ile oluşturuldu (Şekil 3) (80).



Şekil 3: Marmarou Kafa Travması Modeli (80)

3.1.1. Anestezi

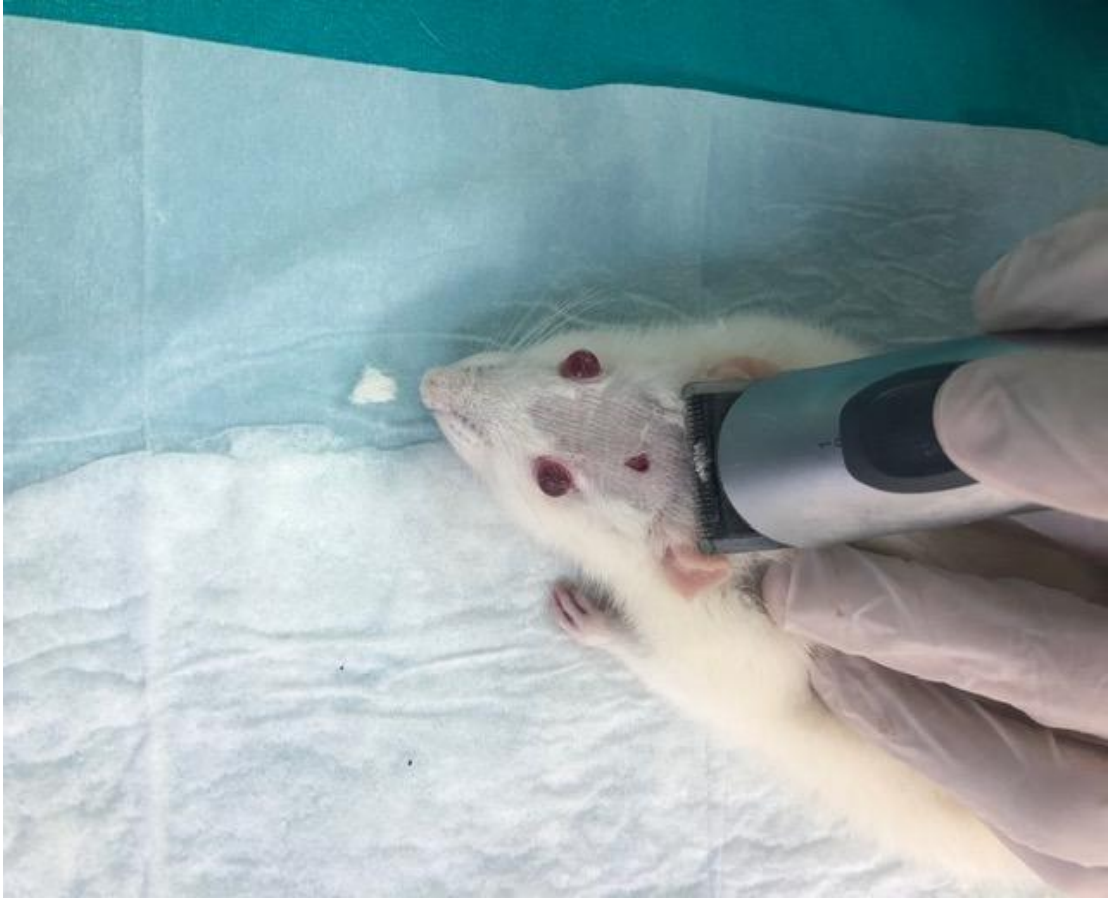
İntraperitoneal yolla verilen 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar 50 mg/ml 10 ml flakon, Pfizer, İstanbul) ve 5 mg/kg ksilazin (Rompun %2 solüsyon, 50 cc. flakon, Bayer, İstanbul) ile sıçanlarda gerekli sedasyon sağlandı (Resim 1).



Resim 1: İntraperitoneal anestezi uygulanması

3.1.2. Ratların Travmaya Hazırlanması

İntraperitoneal anestezi işlemi sonrası deneklerin sedasyonu ağırlı uyaran ile kontrol edildi. Yeterli sedasyona ulaşan deneklerin kafaları traş edildikten sonra Povidon İyot ile cerrahi temizlik yapıldı (Resim 2).



Resim 2: Saçlı derinin traş edilmesi

Daha sonra anterior - posterior planda saçlı deri açılarak coronal, sagittal ve lambdoid sütürler ile bregma ortaya konuldu (Resim 3). Kafatasının kırılmasını engellemek amacıyla steril yuvarlak 1 cm çapındaki ve 1 mm kalınlığındaki metal plaka bu açıklığa yerleştirilerek denek başının sağ yarı kısmı Kafa

Travması Cihazı altına yerleştirildi. Sıçan kafalarının altına akselerasyonu sağlamak ve çene gibi kafa alt dokularını korumak amaçlı sünger bir yastıkçık yerleştirildi.



Resim 3: Koronal ve sagittal sütürlerin ortaya konması

3.1.3. Travmanın Oluşturulması

Pleksiglas malzemeden mam l ve 2 cm çapındaki bir sütun içinden 450 gr a ırlı ındaki ağırlık 1 metre yükseklikten 1 kez olmak kaydı ile serbest düşmeye bırakılarak kafa travması oluşturuldu (Resim 4)(80,81,82). Travma sonrası cilt sütüre edilerek kapatıldı. Travma sonrası ölen sıçan olmadı.



Resim 4: Kafa Travması Oluşturma Aleti (80)

3.2. Deney Gruplarının Planlanması

Her grupta 8 adet denek olmak üzere 5 grupta toplam 40 adet denek kullanıldı. Denekler posttravmatik 30. günde sakrifiye edildi ve beyinleri çıkarılarak

%10'luk formaldehitte tespit edildi. Deney gruplarının oluşturulması aşağıda ifade edilen şekilde düzenlendi:

3.2.1. Sham kontrol grubu (1.Grup, n=8):

Bu gruba herhangi bir künt kafa travması uygulanmadı ve kafa cildi açılıp kapatılarak cerrahi simülasyon yapıldı.

3.2.2. Negatif kontrol grubu (2.Grup, n=8):

Bu gruba da künt kafa travması uygulandı fakat hiçbir tedavi protokolü verilmedi. Bu gruptan amaç FK506'nın ve onun çözücüsünün etkilerinin değillenebilmesini sağlamak idi.

3.2.3. Pozitif kontrol grubu (3.Grup, n=8):

Bu gruba da künt kafa travması uygulanarak ardından travmayı hemen takiben ilk 1. saatte tedavi protokolü olarak 0,571 gr/kg %20'lik Mannitol solüsyonu toplam 1 ml volüm olacak şekilde kuyruk veni kanülasyonu aracılığı ile 15 dakika boyunca intravenöz infüzyon tek doz olarak şeklinde uygulandı (Resim 5).

3.2.4. Vehicle (Taşıyıcı) kontrol grubu (4.Grup, n=8):

Bu gruba yine künt kafa travması uygulandı ve taşıyıcı/çözücü madde olarak tedavi ve pozitif kontrol grubu ile aynı volümde Dimethyl sulfoxide(DMSO) travmayı hemen takiben ilk 1. saatte tedavi grubundaki çözücü olarak kullanıldığı miktar hesaplanarak toplam 1 ml içinde olacak tarzda yani tedavi ile aynı volümde kuyruk veni kanülasyonu aracılığı ile intravenöz infüzyon ve tek doz olarak uygulandı.

3.2.5. Tedavi grubu (5.Grup, n=8) :

Bu gruba künt kafa travması uygulandı ve travmayı takiben ilk 1. saatte tedavi protokolü olarak 3 mg/kg Takrolimus, Dimethyl sulfoxide icinde çözülerek toplam 1 ml volüm olacak şekilde, kuyruk veni kanülasyonu aracılığı ile tek doz

olarak uygulandı. Bu protokol kafa travmalı bir hastanın en erken 1 saat içinde acile başvurabileceği mantığından hareket ile planlanmıştır.



Resim 5: Mannitol infüzyonu

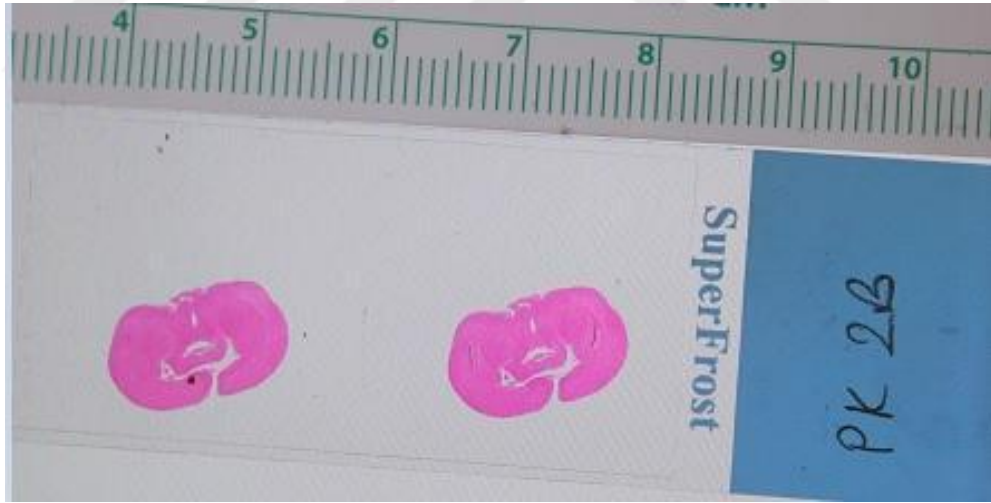
3.3. Histopatolojik Değerlendirme:

Sakrifikasyon sonrası sıçan beyinlerinin tümü numune olarak alındı (Resim 6). Dokular %10 tamponlu formaldehit içinde 48 saat tespit edildi. Doku örnekleri takip cihazına konuldu. Takip cihazında dehidratasyonu sağlamak için sırayla %70, %80, %90 ve %100' lük alkollerden geçirildi. Şeffaflaştırma için doku örnekleri birer saatten 2 kere ksilolden geçirildikten sonra parafine alıştırma için 2,5 saat saf parafinde bekletildi. Doku takip cihazından alınan örnekler Leica Eg1150H parafin istasyonunda saf parafine gömülerek parafin bloklar elde edildi. Elde edilen parafin bloklardan 4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Hazırlanan kesitler 30 dakika 70 °C etüvde bırakıldıktan sonra 2 saat ksilende tutularak deparafinize edildi. Örnekler dereceli alkol serilerinden (%100, %95, %75 ve %50) geçirilerek dehidrate edildi. Doku kesitlerinin bir kısmı Hematoksilen & Eozin (H-E) ve NeuN

(nöroneal nükleer antijen) ile boyandıktan sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi (Resim 7).



Resim 6: Sakrifikasyon sonrası çıkarılan beyin örnekleri



Resim 7: Hematoksilen - Eozin boyama sonrası preparatlar

3.4. İmmünohistokimya

Sıçan beyinlerine ait travmatik doku içeren ve doku takip artefaktı içermeyen uygun parafin bloklar, immunohistokimyasal incelemede kullanılmak amacı ile kesit

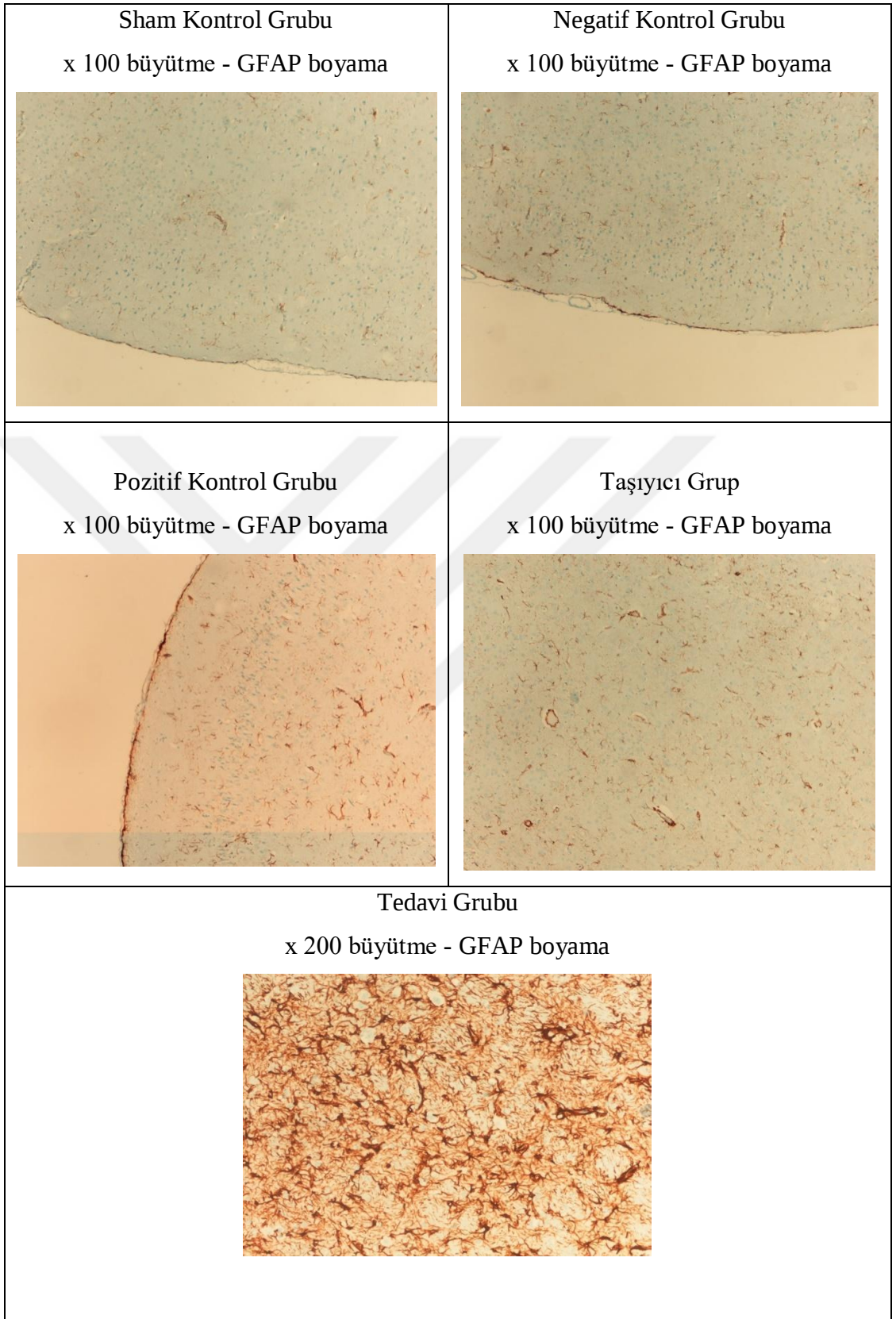
almak için seçildi. Her parafin bloktan elde edilen 4 mikron kalınlığındaki kesitler, polyllisine kaplı lam üzerine alındı. Lamlar ilk olarak 37°C'de, 15 dakika etüvde bekletildi. Sonrasında ise GFAP (Glial Fibriller Asit Protein) ve H&E (Hemotoksilen Eozin) ile otomatik boyama cihazında (Ventana Bench Mark Ultra, SN: 316054) immünohistokimyasal boyama işlemi yapıldı. Boyanan tüm kesitler Nikon Eclipse E600 ışık mikroskopu altında, boyanma yaygınlığı ve şiddeti açısından bir patolog tarafından değerlendirildi (Resim 8).

Patolojik preparatlar; gliosis (GFAP ile), konjesyon, ödem, enflamasyon ve piknozis değerleri göz önüne alınarak değerlendirildi (Tablo 5). Gliosis; Immun Reaktivite Skoru (IRS) kullanılarak hesaplandı (Tablo 3).

Tablo 3: Immun Reaktivite Skoru

İmmün Reaktivite Skoru (IRS)		
A: Pozitif Hücrelerin Yüzdesi	B: Boyanma Yoğunluğu	IRS Score (AxB)
0= Pozitif hücre yok	0= Boyanma yok	0-1 = Negatif
1= %10'dan daha az Pozitif hücre	1= Zayıf reaksiyon	2-3 = Zayıf pozitif (+ pozitif)
2= %10-50 Pozitif hücre	2= Orta reaksiyon	4-8 = Orta pozitif (++ pozitif)
3= %51-80 Pozitif hücre	3= Şiddetli reaksiyon	9-12 = Güçlü pozitif (+++ pozitif)
4= %80'den daha fazla Pozitif hücre		

(A:Pozitif Hücrelerin Yüzdesi, B: Boyanma Yoğunluğu, GFAP: Glial Fibriler Asidik Protein, IRS:İmmün Reaktivite Skoru, IRS Skor'u (AxB) : 0-12 arasında oluşmaktadır.)



Resim 8: Deney gruplarına ait GFAP boyalı preparatlar
(**GFAP:** Glial Fibriler Asidik Protein)

3.5. Kullanılan İstatistiki Yöntem ve Analiz:

Öncelikle deneklerden elde edilen verilerin normal dağılıma uyup uymadığı ve parametrik test varsayımlarını sağlayıp sağlamadığı, homojen olup olmadığı, normal dağılıma uyup uymadığı **Kolmogorov – Smirnov testi, Levene testi ve deskriptif istatistikler** ile tespit edildi. Normal dağılıma uyan veriler **ortalama +/- standart sapma ile**, uymayanlar ise **ortanca +/- standart hata** ile ifade edildi. Tüm bu sonuçlar içinde **p<0.05** şart değerini sağlayanlar istatistiki olarak anlamlı kabul edildi. Tüm bu istatistiki ölçümler için için **SPSS for Windows V.22** programı kullanıldı. Deneklerden elde edilen sürekli değişkenler ile ilgili değerlerin gruplar arası karşılaştırılması **Kruskal Wallis Varyans Analizi** ile yapılarak öncelikle gruplar arasında istatistiki bir fark olup olmadığı tespit edildi. Daha sonra gruplar arasında farklılıklar olan ölçümlerde; travma öncesi ve sonrası bağımlı grupların 2’li kombinasyonlar tarzında karşılaştırması **Wilcoxon signed rank Testi** ile yapıldı. Bağımsız gruplararası farklılıklar ise **Mann-Whitney U testi** ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. İstatistiki sonuçlar

Tüm grupların histopatolojik IRS değerleri (Tablo 6) Kruskal Wallis varyans analizi ile değerlendirildiğinde tüm gruplar arasında istatistiki farkların olduğu gözlemlendi. ($p<0,05$). (Tablo 4).

Tablo 4: IRS değerleri Kruskal Wallis varyans analizi

	IRS_ORANI
Chi-Square	31.772
df	4
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: grup

Daha sonra ikili gruplar şeklinde Mann Withney – U ile yapılan karşılaştırmada IRS değerinin en fazla Tedavi grubunda arttığı ($p<0,05$) fakat NK, PK ve Taşıyıcı gruplarında artmasına rağmen istatistiki anlam ifade etmediği gözlemlendi (Tablo 6). Sham grubunda histopatolojik reaksiyon skorunun en az oranda görüldüğü tespit edildi. İlginç olan FK506 immünosupresif ajanı alan deneklerde beklenenin aksine, travma alanında değil, travmanın karşı tarafında (kafa tabanındaki counter-coup alanda) reaksiyon ve dolayısıyla gliozisin daha fazla olduğu gözlemlendi. Tüm histopatolojik bulgular Tablo 5’da özetlenmiştir.

Tablo 5: Deneklerin Histopatolojik Değerlendirilme Puanları

	Konjesyon	Ödem	İnflamasyon	Piknozis	Immun Reaktivite Skoru*		
					Boyanma Yoğunluğu	Pozitif Hücrelerin Yüzdesi	Gliozis (IRS) Score
Sham 1	0	0	Fark yok	Fark yok	1	%15 (2 puan)	1*2 = 2
Sham 2	0	0	Fark yok	Fark yok	1	%5 (1 puan)	1*1 = 1
Sham 3	0	0	Fark yok	Fark yok	1	%5 (1 puan)	1*1 = 1
Sham 4	0	0	Fark yok	Fark yok	1	%5 (1 puan)	1*1 = 1
Sham 5	0	0	Fark yok	Fark yok	1	%5 (1 puan)	1*1 = 1
Sham 6	0	0	Fark yok	Fark yok	1	%10 (2 puan)	1*2 = 2
Sham 7	0	0	Fark yok	Fark yok	1	%5 (1 puan)	1*1 = 1
NK 1	+3	2	Fark yok	Fark yok	2	%25 (2 puan)	2*2 = 4
NK 2	+3	2	Fark yok	Fark yok	2	%25 (2 puan)	2*2 = 4
NK 3	+3	2	Fark yok	Fark yok	2	%25 (2 puan)	2*2 = 4
NK 4	+3	3	Fark yok	Fark yok	2	%20 (2 puan)	2*2 = 4
NK 5	+3	3	Fark yok	Fark yok	2	%25 (2 puan)	2*2 = 4
NK 6	+3	3	Fark yok	Fark yok	2	%20 (2 puan)	2*2 = 4
NK 7	+3	3	Fark yok	Fark yok	2	%20 (2 puan)	2*2 = 4
NK 8	+3	2	Fark yok	Fark yok	2	%15 (2 puan)	2*2 = 4
PK 1	+2	1	Fark yok	Fark yok	2	%20 (2 puan)	2*2 = 4
PK 2	+3	1	Fark yok	Fark yok	2	%20 (2 puan)	2*2 = 4
PK 3	+2	2	Fark yok	Fark yok	2	%20 (2 puan)	2*2 = 4
PK 4	+3	2	Fark yok	Fark yok	2	%20 (2 puan)	2*2 = 4
PK 5	+2	2	Fark yok	Fark yok	2	%20 (2 puan)	2*2 = 4
Taşıyıcı 1	+3	2	Fark yok	Fark yok	2	%30 (2 puan)	2*2 = 4
Taşıyıcı 2	+3	2	Fark yok	Fark yok	2	%30 (2 puan)	2*2 = 4
Taşıyıcı 3	+3	2	Fark yok	Fark yok	2	%35 (2 puan)	2*2 = 4
Taşıyıcı 4	+3	3	Fark yok	Fark yok	2	%30 (2 puan)	2*2 = 4
Taşıyıcı 5	+3	3	Fark yok	Fark yok	2	%35 (2 puan)	2*2 = 4
Taşıyıcı 6	+3	3	Fark yok	Fark yok	2	%30 (2 puan)	2*2 = 4
Tedavi 1	+1	2	Fark yok	Fark yok	3	%90 (4 puan)	3*4 = 12
Tedavi 2	+2	2	Fark yok	Fark yok	3	%80 (4 puan)	3*4 = 12
Tedavi 3	+2	2	Fark yok	Fark yok	3	%90 (4 puan)	3*4 = 12
Tedavi 4	+1	2	Fark yok	Fark yok	3	%90 (4 puan)	3*4 = 12
Tedavi 5	+2	2	Fark yok	Fark yok	3	%80 (4 puan)	3*4 = 12
Tedavi 6	+2	3	Fark yok	Fark yok	3	%90 (4 puan)	3*4 = 12
Tedavi 7	+1	2	Fark yok	Fark yok	3	%85 (4 puan)	3*4 = 12
Tedavi 8	+2	2	Fark yok	Fark yok	3	%90 (4 puan)	3*4 = 12

Tablo 6: IRS değerleri Mann Withney-U test sonuçları

	Grup 1-2	Grup 1-3	Grup 1-4	Grup 1-5	Grup 2-3	Grup 2-4	Grup 2-5	Grup 3-4	Grup 3-5	Grup 4-5
Mann-Whitney U	.000	.000	.000	.000	17.500	21.000	.000	15.000	.000	.000
Wilcoxon W	28.000	28.000	28.000	28.000	32.500	42.000	28.000	36.000	15.000	21.000
Z	-3.435	-3.071	-3.261	-3.595	.000	.000	-3.742	.000	-3.464	-3.606
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001	.002	.001	.000	1.000	1.000	.000	1.000	.001	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b	.003 ^b	.001 ^b	.000 ^b	1.000 ^b	1.000 ^b	.000 ^b	1.000 ^b	.002 ^b	.001 ^b

5. TARTIŞMA

Travmatik beyin hasarı (TBH), % 30-50 gibi yüksek bir ölüm oranına sahiptir. Özellikle ikincil yaralanma, yaralanma alanını ve ciddiyetini belirleyen en önemli faktörlerden biridir. TBH, kalsiyum düzensizliği ve inflamasyon gibi komplikasyonlara neden olabilirken, nöronlarda ve glial hücrelerde hücre içi kalsiyum aşırı yüklenmesi, hücre ölümüne yol açan ortak bir son yoldur. Aşırı hücre içi kalsiyum, inflamasyonu başlatmak, serbest radikaller oluşturmak ve sitoskeletal hasarı indüklemek için çeşitli biyokimyasal yolları işaret eder (102,103).

Kalsinörin (CaN), şu anda Ca^{2+} / CaM'ye bağlı olduğu bilinen tek serin-treonin fosfatazdır ve doğrudan Ca^{2+} tarafından düzenlenir. Hücresel sinyalleşme süreçleri sırasında CaN, aktive edilmiş T hücresinin (NFATc) nükleer faktörünün sitoplazmik alt biriminin defosforilasyonunu indükler, bu da başka bir alt birimle (NFATn) birleştiği çekirdeğe ilerlemesine izin verir. Bu kompleks daha sonra transkripsiyonu yukarı regüle etmek ve çoklu hücre fonksiyonlarının düzenlenmesine katılmak için interlökin-2 (IL-2) dahil olmak üzere çoklu sitokin genlerinin promoterleri ile birleşir (104). Bununla birlikte, bu aktiviteler immünosupresör FK506 tarafından inhibe edilirler (105,106).

FK506, oldukça etkili ve düşük toksisiteye sahip bir immünsüpresandır. Organ nakli yapılan hastalarda ilk seçenek olarak Siklosporin A yerine yaygın olarak kullanılmaktadır. FK506, CaN aktivitesini ve NFATc defosforilasyonunu inhibe eden bir kompleks oluşturmak için FK506 bağlayıcı protein 12 (FK BP12) ile birleşir. Dolayısıyla IL-2 ve interlökin-3 (IL-3), interferon- γ (IFN- γ) ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) dahil olmak üzere diğer sitokinlerin ekspresyonunu etkiler ve T hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ederek ve bağışıklık yanıtlarını azaltır (107,108).

Bir diğer konu da beynin travmaya ve diğer birçok patolojik hakarete tepkileri, önemli astrosit reaksiyonlarını içerir (83, 84). Glial fibriller asidik protein

(GFAP) ilk olarak 1971 yılında izole edilen, merkezi sinir sistemi hücre iskeletinin önemli bir bölümünü oluşturan ve sadece glial hücrelerde bulunan bir proteindir. GFAP, S100 β gibi astro-glial hasar için bir biyo-belirteçtir. S100 β 'dan farklı olarak GFAP, felçten TBH'ya kadar herhangi bir beyin hasarından sonra salınan beyne özgü bir proteindir (85). GFAP, olgun astrositlerin ve diğer glial hücrelerin hücre iskeletinin bir parçasını oluşturan ancak Santral Sinir Sistemi (SSS) dışında bulunmayan, astroglial hasarın bir belirteci olan, bir tip III ara filamenttir. Gliozaya neden olan ve ardından GFAP'ı düzenleyen SSS hasarı, GFAP'ı beyin hasarı taraması için çekici bir aday biyobelirteç haline getirir. Son çalışmalar, beyin hasarı sonrası yükseltilmiş GFAP'ı veya arıza ürünlerini (GFAP-BDP) belgelemiştir. Yetişkin hastalarda hafif, orta veya şiddetli TBH'dan sonra hem Beyin Omurilik Sıvısı'daki (BOS) hem de serumdaki bu yüksek GFAP düzeyleri, çocuklarda da TBH büyüklüğü ve sonuçları ile ilişkilidir (86,87,88).

Astrositlerin aktivasyonu ve buna bağlı olarak gelişen reaktif glioz, nörotravma dahil olmak üzere merkezi sinir sisteminin birçok patolojik hastalıklarında görülmektedir (83). Bu tür travmalarda GFAP immüno-reaktivitesinde bir artış olduğu kabul edilir. Reaktif astrositoz genellikle GFAP immün boyama ile tanımlanır ve artan sayıda yoğun şekilde boyanmış süreçler ile genişlemiş hücreleri gösterir (89). Bu tür yaralanmaların hassas bir belirteci olması kabul edilmekle birlikte GFAP immünoreaktivitesinde hafif bir artış, genellikle normal boyama modelinden ayırt etmek zordur (90).

Çok sayıda deneysel çalışma, FK506'nın TBH'yı izleyen erken evrede nörotrofik ve nöro-koruyucu etkiler gösterdiğini zaten göstermiştir (107,108). Ancak, bu etkilerin altında yatan mekanizma belirsizliğini korumaktadır. Bazı çalışmalar, FK506 aktivitesinin immünofilin FKBP52'ye bağlı olduğunu ve işlevini steroid hormon (SRE) yolu ve hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) yolu aracılığıyla gösterdiğini ileri sürmüştür (109,110).

Bu arada birçok araştırma kortikal yaralanmanın yakınındaki perifokal gliozise odaklanmıştır (91, 92, 93). Nörotravmalarda yaralanmadan bir ay sonra,

kapsamlı ve ilerleyen nöronal hücre kaybı olmaktadır ve nöronal hücre kaybının meydana geldiği bölgede (yani kortikal lezyonun çevresinde) geçici bir astrosit tepkisi oluşmaktadır (94, 95, 96). SSS travmasında vimentin yukarı regülasyonunun tam işlevi bilinmemektedir, ancak GFAP ve vimentin glial skar oluşumunda örtüşen işlevlere sahip gibi görünmektedir, çünkü yalnızca hem GFAP hem de vimentinde gen eksikliği olan fareler nörotravma sonrasında zayıflatılmış glial skar reaksiyonları sergilemektedir (97).

Bizim çalışmamız, klinik kullanımda olan Takrolimus (FK506) isimli immunosupresan ajanın, bahsedilen gliosis ve hasarı engelleme potansiyeli var mıdır sorusunu cevaplamak için başlamıştır. Çünkü bu ajan genel olarak immün sistemi hücresel ve moleküler yollardan baskılamakta ve inflamasyon süreçlerini geciktirmektedir. Bu yüzden de transplantasyon cerrahisi sonrasında kullanılmaktadır (98, 99, 100). Takrolimus, esas olarak interlökin 2 (IL-2) transkripsiyonunun inhibisyonuna neden olarak T lenfosit aktivasyonunu inhibe eder, bunun sonucu olarak immünsüpresif etkiyi sağlar. Literatürde bazı transplant vakalarında her ne kadar solid organı koruması ve organ rejeksiyonunda engelleme gösterse de SSS’de istenmeyen etkilerinin olabileceği de bildirilmiştir (101). Dolayısı ile çalışmamızda transplantasyonda kullanılan bu ajanın; travmatik beyin hasarı sonrası ikincil hasarı ve gliosisi nasıl etkilediği ve koruyucu bir farmakolojik ajan olup olamayacağının araştırılması planlandı.

Hipotezimizin merkezinde konumlandığımız FK506 ajanının; özellikle travma sonrası erken dönemde verilerek, sekonder beyin hasarını oluşmadan önlenmesi amaçlanmıştır. Özellikle bu ilacın günlük hayatta rutinde transplantasyon hastalarında siklosporine tercih edilmesi, daha potent olması ve yan etkilerinin nispeten daha az olması tercih sebebimiz olmuştur. Literatürde çok sayıda çalışma siklosporinin ve FK506’ nın hem deneysel periferik sinir hem de beyin travmalarında olumlu etkilerinin olduğunu bildirmesine rağmen bu ilaçlar günlük pratikte

kullanıma girememiştir. Bu durum FK506'nın seçtiğimiz senaryoya uygun bir farmakolojik ajan olabileceğini fakat henüz yeterli alt yapının yani sebep sonuç ilişkisinin olmadığını göstermektedir. Literatürde barbitürat, aquaporinler, antiplateletler gibi birçok ajan çalışılmasına rağmen henüz mannitol ve benzeri birkaç ajan dışında rutinde kullanılabilen ilaç bulunmamaktadır (111,112).

Daha önce gliosis süreçlerinin tespitinde hem klinik de hem de deneysel çalışmalarda kullanılan GFAP immunohistokimyasal işaretçisinin bu çalışmada IRS skorlama sistemiyle değerlendirilmesi sonrası gruplar IRS skor sistemi ile puanlanarak nicel ölçümler edilerek karşılaştırıldı. İlginç olarak iyileşme beklentimiz olan grupta yani FK506 verilen grupta travmatik alandaki gliozisin diğer kontrol gruplarına göre istatistiki olarak belirgin olarak artış gösterdiği görüldü. Bu durum FK506'nın henüz açıklanamayan bir mekanizma ile gliozisi engelleyemediği hatta arttırdığını göstermektedir.

Hali hazırdaki hayvan deneyi modellerinin çokluğu, devamlı yeni metodların tariflenir olması ve standardizasyondaki eksiklikler bize kafa travması modeli üzerinde literatürün ortak bir konsensüs üzerinde anlaşamadığını göstermektedir (113,114) .

Dolayısı ile bu çalışma her ne kadar literatür destekli bir model kullansa da yukarıdaki nedenlerden dolayı eksikleri olabilecektir. Ayrıca travma standardizasyonu dışında; verilecek ajanın dozu, verilme şekli, başlangıç zamanı, süresi gibi parametreler henüz kesinlik kazanmamış olması bu modelimizde beklenti içinde olduğumuz ilacın etki etmemesinin bir nedeni olabilir.

Literatürde TBH sonrası verilen FK506 ile beyin hasarının azalmadığını gösteren pek çalışma olmasa da Shin ve arkadaşlarının diyabetik sıçanlara takrolimus vererek yaptıkları çalışmada, takrolimus ile tedavi edilen sıçanlarda lokomotor aktivitede azalma ve belirgin depresif davranış gözlemlendi. Ayrıca bu çalışmada takrolimus tedavisi ile γ -aminobütirik asit ve serotonin reseptörlerinin mRNA seviyelerinde önemli düşüşler gözlemlenmiştir (114). Böbrek veya karaciğer transplantasyonu yapılmış ve takrolimus tedavisi almış hastalara beyin fonksiyonu, yapısı ve enerji metabolizmasının değerlendirilmesi için bilişsel testler, manyetik rezonans görüntüleme ve tüm beyin 31-fosfor manyetik rezonans spektroskopisi yapılan bir çalışmadaki veriler de karaciğer ve böbrek naklinden sonra uzun vadede bilişsel bozulma olduğunu göstermektedir (115). Ayrıca bazı çalışmalar daha kapsamlı ve geri dönüşü olmayan beyin hasarına ilişkin kanıtlar ortaya koymuştur (116). Wijdicks ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ise takrolimus seviyesi ile nörotoksisite gelişimi arasında net bir ilişki göstermemiş olsa da, takrolimus dozunun azaltılması veya ilacın kesilmesi genellikle nörolojik semptomların gerilemesine yol açtığı görülmüştür (117). Bütün bunlar farklı sebeplerle verilen FK506 tedavisinin beyin hasarını artırdığını düşündürmekte ve çalışmamızı da desteklemektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, FK506 immunosupresif ajanının beklenin aksine beyindeki travma sonrası hasarı azaltmadığı, aksine gliozisi arttırdığı ortadadır. Bu ve bunun benzeri immun sistemin istenmeyen tepkilerinin geciktirici olduğu bilinen ajanların; beyin travması alanında daha çok deneysel çalışmalar yapılarak; farklı ilaç doz ve şemaları, farklı travma modelleri ve daha çok sub-grupların kullanıldığı deneysel çalışmalara ihtiyaç olduğu bir gerçektir. Bu nedenle fizyopatolojik mekanizmaları açıklamak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

- 1- Giordani F. , Benetolli A. , Favero-Filho L. A. , Lima K. C. M. , CestariJunior L. , and Milani H. Tacrolimus (FK506) reduces ischemia-induced hippocampal damage in rats: a 7- and 30-day study. *Brazilian Journal of Medical and biological Research* (2003) 36:495-502
- 2- Gökdemir G. S. , Gökdemir M. T. , Karakılıç A. Z. (2016). Total Oxidative Stress, Total Antioxidant Status And Erythrocytes Status In Patients With Acute Ischemic Stroke. *Acta Medica Mediterranea*, 2017: 33: 157
- 3- Huang T. Q. , Song J. N. , Zheng F. W. , Pang H. G. , Zhao Y. L. , Gu H. and Zhao J. J. (2017). Protection of FK506 against neuronal apoptosis and axonal injury following experimental diffuse axonal injury. *MOLECULAR MEDICINE REPORTS* 15: 3001-3010, 2017. Doi:10.3892/mmr.2017.6350
- 4- Johnson V. E. , Stewart W. , Smith D. H. (2011). Axonal pathology in traumatic brain injury. doi:10.1016/ j.expneurol.2012.01.013
- 5- Kavakli H. S. , Erel O. , Karakayali O. , Neselioglu S. , Tanriverdi F. , Coskun F. and Kahraman A.F. (2010). Oxidative stress in isolated blunt traumatic brain injury. *Scientific Research and Essays* Vol. 5(19), pp. 2832-2836
- 6- Lin Y. , Wen L. (2013). Inflammatory Response Following Diffuse Axonal Injury. *International Journal of Medical Sciences*. 2013;10:515-521. doi: 10.7150/ijms.5423
- 7- . Tyurin V. A. , Tyurina Y. Y. , Borisenko G. G. , Sokolova T. V. , Ritov V. B. , Quinn P. J. , Rose M. , Kochanek P. , Graham S. H. and Kagan V. E. (2000). Oxidative Stress Following Traumatic Brain Injury in Rats: Quantitation of Biomarkers and Detection of Free Radical Intermediates. *Journal of Neurochemistry* 75, 2178–2189
- 8- Yirün M. C. , Ünal K, ğen N. A. , Yirün O. , Aydemir Ç. , Göka E. (2016). Evaluation of Oxidative Stress in Bipolar Disorder in terms of Total Oxidant Status, Total Antioxidant Status, and Oxidative Stress Index. *Arch Neuropsychiatry* 2016; 53: 194-198 • DOI: 10.5152/npa.2015.10123
- 9- O. Erel and S. Neselioglu, “A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis,” *Clinical Biochemistry*, vol. 47, no. 18, pp. 326–332, 2014
- 10- Dewan MC, Rattani A, Gupta S, Baticulon RE, Hung YC, Punchak M, Agrawal A, Adeleye AO, Shrimel MG, Rubiano AM, Rosenfeld JV, Park KB. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2018;1-18.

- 11- Kafa travmalı hastalarda epidemiyolojik çalışma. Aykut Karasu, Pulat Akın Sabancı, Tufan Cansever¹, Kemal Tanju Hepgöl, Murat İmer, İlyas Dolaş, Korhan Taviloğlu. Ulusal travma ve acil cerrahi dergisi 2009.
- 12- Gökalp Z. Hamit. Nöroşirürji ders kitabı, Mars Matbaası, Ankara, 1998.
- 13- Missios S. Hippocrates, Galen and the uses of trepanation in the ancient classical world. Neurosurg Focus. 2007; 11- 23
- 14- Erbeni A: History and development of neurosurgery in Anatolia (part one). Turkish Neurosurgery 1993;3:1-5.
- 15- Paşaoğlu A. Erişkinde Kafa Travmaları. Temel Nöroşirürji Cilt I, Türk Nöroşirürji Derneği Yayınları Ankara 2005:316-23
- 16- Textbook of Neurological Surgery. Batjer HH, Loftus CM (eds). Volume 3, X. Cranial and Cerebral Trauma Section. 2003;2795- 2803
- 17- Liau LM, Bergsneider M, Becker DP. Volume 3, Chapter 67, Pathology and Pathophysiology of Head Injury. Neurological Surgery Youmans 1998
- 18- Stiell, I.G., et al., Variation in ED use of computed tomography for patients with minor head injury. Annals of emergency medicine, 1997;30:14-22
- 19- D.W.Wright , L.H.M., Tintinalli's Emergency Medicine. Head Trauma in Adults and Children, Ed. E. Judith. McGraw Hill Professional 2010.
- 20- M.H.Biros , W.G.H., Rosen's Emergency Medicine 8th Edition. Head Injury
- 21- E. Zaloshnja, T. Miller, J. A. Langlois, and A. W. Selassie, "Prevalence of long-term disability from traumatic brain injury in the civilian population of the United States 2005," Journal of Head Trauma Rehabilitation, 2008:394-400.
- 22- Greenwald, B.D., D.M. Burnett, and M.A. Miller, Congenital and acquired brain injury. 1. Brain injury: epidemiology and pathophysiology. Archives of physical medicine and rehabilitation, 2003;84:3-7.
- 23- Marik PE, Varon J, Trask T. Management of head trauma. Chest 2002; 122: 699-711
- 24- Teasdale, G.M. and D.I. Graham, Craniocerebral trauma: protection and retrieval of the neuronal population after injury. Neurosurgery, 1998; 43:723-737
- 25- R.K. Narayan, J.E.W., J.T. Povlishock, Neurotrauma. Neuropathology of head injury, ed. D.I.Graham. McGraw Hill Companies 1996.
- 26- 30. KERMAN, M., et al., Evaluation of clinical results in 40 patients with basal skull fracture. Turkish Neurosurgery, 1999.

- 27- Burjorjee, J.E., R. Rooney, and M. Jaeger, Epidural Hematoma Following Cessation of a Direct Oral Anticoagulant: A Case Report. *Reg Anesth Pain Med*, 2018;43:313-316
- 28- Chicote Álvarez, E., et al., Epidemiology of traumatic brain injury in the elderly over a 25 year period. *Rev Esp Anesthesiol Reanim*, 2018: 65: 546-551.
- 29- Rosenthal, A.A., et al., Traumatic Epidural Hematoma: Patient Characteristics and Management. *Am Surg*, 2017;83:438-440.
- 30- McKee, A.C. and D.H. Daneshvar, The neuropathology of traumatic brain injury. *Handb Clin Neurol*, 2015;127:45-66.
- 31- Haselsberger K, Pucher R, Auer LM. Prognosis after acute subdural or epidural haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)*. 1988;90:111-6.
- 32- Akdemir H; Subaraknoid kanama Temel Nöroşirürji 1. Baskı, Cilt 1, TND 2005:441- 447.
- 33- Rinkel GJ, Wijricks EF, Hasan D, Kienstra GE, Franke CL, Hageman LM, Vermeulen M, van Gijn J: Outcome in patients with subarachnoid haemorrhage and negative angiography according to pattern of haemorrhage on computed tomography. *Lancet* 1991;338: 964 – 968.
- 34- 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;21:473-477
- 35- Cepeda, S. et al., Traumatic Intracerebral Hemorrhage: Risk Factors Associated with Progression. *J Neurotrauma*, 2015;32:1246-53
- 36- Seth Love AP, James Ironside and Herbert Budka. Greenfield's Neuropathology. In: Colin Smith SmaA-CD, editor. *Trauma*. 2015: 637-83
- 37- Khoshyomn S, Penar PL, Nagle K, Braff SP. Survival after severe penetrating non-missile brainstem injury: case report. *J Trauma*. 2004;56:1131-4.
- 38- Sharp DJ, Beckmann CF, Greenwood R, et al. Default mode network functional and structural connectivity after traumatic brain injury. *Brain*. 2011;134:2233-2247.
- 39- Warner MA, Marquez de la Plata C, Spence J, et al. Assessing spatial relationships between axonal integrity, regional brain volumes, and neuropsychological outcomes after traumatic axonal injury. *J Neurotrauma*. 2010;27:2121-2130.
- 40- Jain K.K. Neuroprotection in traumatic brain injury. *Drug Discovery Today* 2006;13:1082–1089.

- 41- Gourin CG, Shackford SR. Production of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β by human cerebral microvascular endothelium after percussive trauma. *The Journal of trauma*. 1997;42:1101-7
- 42- Shohami E, Gallily R, Mechoulam R, Bass R, Ben-Hur T. Cytokine production in the brain following closed head injury: dexanabinol (HU-211) is a novel TNF- α inhibitor and an effective neuroprotectant. *Journal of neuroimmunology*. 1997;72:169-77.
- 43- Udomphorn Y, Armstead WM, Vavilala MS. Cerebral blood flow and autoregulation after pediatric traumatic brain injury. *Pediatr Neurol*. 2008;38:225-34.
- 44- Buki A, Povlishock JT. All roads lead to disconnection? Traumatic axonal injury revisited. *Acta Neurochir (Wien)* 2006; 148: 181–93
- 45- Saelens X, Festjens N, Vande Walle L et al. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004; 23: 2861–74
- 46- Huang Y, Wang KK. The calpain family and human disease. *Trends Mol Med* 2001; 7: 355–62
- 47- Benveniste EN. Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998; 9: 259–75.
- 48- Hickey WF, Hsu BL, Kimura H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* 1991; 28: 254–60
- 49- Nakajima K, Kohsaka S. Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2004; 4: 65–84
- 50- 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: 499–506
- 51- Csuka E, Hans VH, Ammann E et al. Cell activation and inflammatory response following traumatic axonal injury in the rat. *Neuroreport* 2000; 11: 2587–90
- 52- Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth*. 2007;99:4-9.
- 53- Villa P., Kaufmann S. H., Earnshaw W. C. Caspases and caspase inhibitors. *TIBS* 1997;22:388-393.
- 54- Wyllie A. H. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 1997;53:451-465.
- 55- Cohen G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997;326:1-16.

- 56- Citron B. A., Arnold P. M., Sebastian C., Qin F., Sundaravalli M., Ameenuddin S., Landis M. E., Festoff B.W. Rapid upregulation of caspase-3 in rat spinal cord after injury: mRNA, protein, and cellular localization correlates with apoptotic cell death. *Exp Neurol* 2000;166:213-226.
- 57- Zou H., Henzel W. J., Liu X., Lutschg A., Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *c. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997;90:405-413.
- 58- Krentz AJ, Dousset B, Mayer D, McMaster P, Buckels J, Cramb R, Smith JM, Natrass M. Metabolic effects of cyclosporin A and FK506 in liver transplant recipients. - *The U.S. , Diabetes* 1993;43:1753–1759 .
- 59- Mycophenolate Mofetil, Tacrolimus): Unapproved Uses, Doses or Indications. *Clin. Derm.*2002; 20:505-517.- Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, et al. FK506, A novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*-*J.Antibiot* 1987; 40:1249.
- 60- Nishiyama M, Izumi S, Okuhara M. Discovery and development of FK506 (Tacrolimus), a potent immunosuppressant of microbial origin. Merluzzi VJ, Adams J, editors. *The search for anti-inflammatory drugs*. Boston (MA): Birkhauser, 1995: 65-104.
- 61- Starzl TE, Schreiber SL, Albers MW. Hepatotrophic properties in dogs of human FKBP, the binding protein for FK 506 and rapamycin. *Transplantation* 1991; 52: 751-753
- 62- Siekierka JJ, Hung SHY, Poe M, et al. A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature* 1989: 341: 755-7.
- 63- McDiarmid SV, Busuttil RW, Ascher NL, Burdick J. FK506(tacrolimus) compared with cyclosporine for primary immunosuppression after pediatric liver transplantation. *Transplantation* 1995;59:530-536.
- 64- Shaw LM, Kaplan B, Kaufman D. Toxic effects of immunosuppressivedrugs: Mechanism and strategies for controlling them. *Clin Chem* 1996;42:1316- 1321.
- 65- Plosker GL and Foster RH. Tacrolimus: A further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. *Drugs* 2000;59:323-389.
- 66- Kincaid R, Higuchi S, Tamura J, Giri P, Polli JW. Calmodulin-dependent protein phosphatase from *neurospora crassa*. Molecular cloning and expression of recombinant catalytic subunit. *J Biol Chem* 1991;226:18104–112
- 67- Venkataraman R, Jain A, Cadoff E, Warty W, Iwasaki K. Pharmacokinetics of FK506: Preclinical and clinical studies. *Trasnplant Proc* 1990;22:52-56

- 68- Undre NA, Stevenson P, Schafer A. Pharmacokinetics of tacrolimus: Clinically relevant aspects. *Transplant Proc* 1999;31:21-24
- 69- Swanson B.N.. Medical use of dimethyl sulfoxide. *Review Clin Basic Pharmacol* 1985;5:1-33.
- 70- Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji: Hacettepe Taş Yayınları 2005.
- 71- Hartwell RC, Sutton LN. Mannitol, intracranial pressure, and vasogenic edema. *Neurosurgery*. 1993;32:444-50.
- 72- Raslan A, Bhardwaj A. Medical management of cerebral edema. *Neurosurgical focus*. 2007;22:1-12.
- 73- Grasso G: An overview of new pharmacological treatments for cerebrovascular dysfunction after experimental subarachnoid hemorrhage. *Brain Res Brain Res Rev*, 2004; 44: 49-63
- 74- Artrra AA. CSF dynamics, cerebral edema, and intrracranial pressure, Ed. Ablin MS, *Textbook of Neuroanesthesia* Mc Graw Hill Companies 1997:61-115.
- 75- Silver P, Nimkoff L, Siddigi Z et al. The effect of mannitol on intracranial pressure in relation to serum osmolality in a cat model of cerebral edema. *Intensive Care Med* 1996; 22: 434-8.
- 76- Muizelaar JP, Wei EP, Kontos HA, Becker DP. Mannitol causes compensatory cerebral vasoconstriction changes. *J Neurosurg* 1983; 59: 822-8.
- 77- Pollay, M., Blood-brain barrier: cerebral edema. *Neurosurgery*, 1996;1: 335-344.
- 78- Artru, A. *CSF dynamics, cerebral edema, and intracranial pressure*. Textbook of Neuroanesthesia, 1997.
- 79- Experimental Neurosurgery in Animal Models Edited by Mirosław Janowski, Series Ed. Wolfgang Walz, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada page 4, ISSN 0893-2336, Springer Science Business Media New York 2016.
- 80- Foda MA, Marmarou A. A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. *J Neurosurg* 1994;80:301–313.
- 81- Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg* 1994;80:291–300.
- 82- Norenberg MD. Astrocyte Responses to CNS Injury. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1994;53:213–20

- 83- Faden AI. Pharmacological Treatment of Central Nervous System Trauma. *Pharmacol Toxicol.* 1996;78:12–7.
- 84- Papa L, Edwards D, Ramia M. Exploring Serum Biomarkers for Mild Traumatic Brain Injury. In: Kobeissy FH, editor. *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects* [Internet]. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2015
- 85- Mannix R, Eisenberg M, Berry M, Meehan WP, Hayes RL. Serum biomarkers predict acute symptom burden in children after concussion: a preliminary study. *J Neurotrauma.* 2014;31:1072–5
- 86- Fraser DD, Close TE, Rose KL, Ward R, Mehl M, Farrell C, et al. Severe traumatic brain injury in children elevates glial fibrillary acidic protein in cerebrospinal fluid and serum: *Pediatr Crit Care Med.* 2011;12:319–24
- 87- Lo EH, Lok J, Ning M, Whalen MJ. *Vascular Mechanisms in CNS Trauma.* Springer Science & Business Media; 2013:523
- 88- Eng LF. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J Neuroimmunol.* 1985;8:203–14
- 89- Bignami A, Dahl D. Astrocyte-specific protein and neuroglial differentiation. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic protein. *J Comp Neurol.* 1974;153:27–38
- 90- Calvo JL, Carbonell AL, Boya J. Co-expression of glial fibrillary acidic protein and vimentin in reactive astrocytes following brain injury in rats. *Brain Res.* 1991;566:333–6
- 91- Schiffer D, Giordana MT, Cavalla P, Vigliani MC, Attanasio A. Immunohistochemistry of glial reaction after injury in the rat: Double stainings and markers of cell proliferation. *Int J Dev Neurosci.* 1993;11:269–80
- 92- Takamiya Y, Kohsaka S, Toya S, Otani M, Tsukada Y. Immunohistochemical studies on the proliferation of reactive astrocytes and the expression of cytoskeletal proteins following brain injury in rats. *Brain Res.* 1988;466:201–10
- 93- Lewén A, Li GL, Nilsson P, Olsson Y, Hillered L. Traumatic brain injury in rat produces changes of beta-amyloid precursor protein immunoreactivity. *Neuroreport.* 1995;6:357–60
- 94- Lewén A, Li GL, Olsson Y, Hillered L. Changes in microtubule-associated protein 2 and amyloid precursor protein immunoreactivity following traumatic brain injury in rat: influence of MK-801 treatment. *Brain Res.* 1996;719:161–71

- 95- Nilsson P, Hillered L, Olsson Y, Sheardown MJ, Hansen AJ. Regional Changes in Interstitial K⁺ and Ca²⁺ Levels following Cortical Compression Contusion Trauma in Rats: J Cereb Blood Flow Metab [Internet]. 2016.
- 96- Pekny M, Johansson CB, Eliasson C, Stakeberg J, Wallén A, Perlmann T, et al. Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. J Cell Biol. 1999;145:503–14
- 97- Miyata S, Ohkubo Y, Mutoh S. A review of the action of tacrolimus (FK506) on experimental models of rheumatoid arthritis. Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al. 2005;54:1–9
- 98- Baker R, Jardine A, Andrews P. Renal Association Clinical Practice Guideline on post-operative care of the kidney transplant recipient. Nephron Clin Pract. 2011;118:311-347
- 99- Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg. 2009;9:1-155
- 100- Eidelman BH, Abu-Elmagd K, Wilson J, Fung JJ, Alessiani M, Jain A, et al. Neurologic Complications of FK 506. Transplant Proc. 1991;23:3175–8
- 101- Schanne FA, Kane AB, Young EE, Farber JL . Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. Science 1979;206:700–702
- 102- Szydlowska K, Zawadzka M, Kaminska B. Neuroprotectant FK506 inhibits glutamate-induced apoptosis of astrocytes in vitro and in vivo. J Neurochem 2006;99:965–975.
- 103- Viola JPB, Carvalho LDS, Fonseca BPF, Teixeira LK NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development. Braz J Med Biol Res 2005;38:335–344
- 104- Kissinger CR, Parge HE, Knighton DR, Lewis CT, Pelletier LA, Tempczyk A, Kalish VJ, Tucker KD, Showalter RE, Moomaw EW Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12–FK506–calcineurin complex. Nature 1995; 378:641–644.
- 105- Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A . Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. Genes Dev 2003;17:2205–2232.
- 106- Aylor DO. Cardiac transplantation: drug regimens for the 21st century. Ann Thorac Surg 2003;75:S72–S78
- 107- Gold BG. FK506 and the role of the immunophilin FKBP-52 in nerve regeneration 1. Drug Metab Rev 1999;31:649–663.

- 108- Suda S, Shimazaki K, Ueda M, Inaba T, Kamiya N, Katsura K, Katayama Y (2011) Combination therapy with bone marrow stromal cells and FK506 enhanced amelioration of ischemic brain damage in rats. *Life Sci* 89(1–2):50–56
- 109- Oda Y, Gao G, Wei EP, Povlishock JT (2011) Combinational therapy using hypothermia and the immunophilin ligand FK506 to target altered pial arteriolar reactivity, axonal damage, and blood–brain barrier dysfunction after traumatic brain injury in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 31(4):1143–1154
- 110- Poulter MO, Payne KB, Steiner JP (2004) Neuroimmunophilins: a novel drug therapy for the reversal of neurodegenerative disease? *Neuroscience* 128(1):1–6
- 111- Kelly S, Yenari MA (2002) Neuroprotection: heat shock proteins. *Curr Med Res Opin* 18(S2):s55–s60
- 112- Dilmen Ök, Akçıl EF, Tunalı Y (2015) Intensive Care Treatment in Traumatic Brain Injury *Turk J Anaesthesiol Reanim*; 43: 1-6.
- 113- Beynon, C., Hertle, D.N., Unterberg, A.W. *et al.* Clinical review: Traumatic brain injury in patients receiving antiplatelet medication. *Crit Care* 16, 228 (2012).
- 114- Shin YJ, Chun YT, Lim SW, Luo K, Quan Y, Cui S, Ko EJ, Chung BH, Lee J, Hong S, Lee MY, Kang HG, Yang CW. Influence of Tacrolimus on Depressive-Like Behavior in Diabetic Rats Through Brain-Derived Neurotrophic Factor Regulation in the Hippocampus. *Neurotox Res.* 2019 Aug;36(2):396-410. doi: 10.1007/s12640-019-00062-6. Epub 2019 Jun 14. PMID: 31201731.
- 115- Pflugrad H, Noßel P, Ding X, Schmitz B, Lanfermann H, Barg-Hock H, et al. (2020) Brain function and metabolism in patients with long-term tacrolimus therapy after kidney transplantation in comparison to patients after liver transplantation. *PLoS ONE* 15(3): e0229759.
- 116- Bechstein WO. Neurotoxicity of calcineurin inhibitors: impact and clinical management. *Transpl Int.* 2000;13(5):313-26. doi: 10.1007/s001470050708. PMID: 11052266.
- 117- Wijdicks EFM, Wiesner RH, Dahlke LJ, Krom RAF (1994) FK5060 induced neurotoxicity in liver transplantation. *Ann Neurol* 35: 498-501