



**T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ**

**BAĞCILAR SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ**

**İNİANTİL DÖNEMDE TEKRARLAYAN HAFİF KAFA TRAVMASI  
SONRASI ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ ORTAMDA TUTULMANIN GENÇ  
ERİŞKİNLİK DÖNEMİNDE KLİNİK VE PATOLOJİK BULGULARA  
ETKİSİ**

**Dr. Günay VAHABOVA**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**İSTANBUL/2022**



**T.C. SAğLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ**

**BAğCILAR SAğLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ**

**İNFRNTİL DÖNEMDE TEKRARLAYAN HAFİF KAFA TRAVMASI  
SONRASI ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ ORTAMDA TUTULMANIN GENÇ  
ERİŞKİNLİK DÖNEMİNDE KLİNİK VE PATOLOJİK BULGULARA  
ETKİSİ**

**Dr. Günay VAHABOVA**

**Tez DanıŐmanı: Prof.Dr.Feyza KARAGÖZ GÜZEY**

**Uz.Dr.Ebru DORUK**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**İSTANBUL/2022**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, hekimlik sanatının ve beyin ve sinir cerrahisinin temel ilkelerini öğrendiğim, her zaman öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, adilliği ve çalışkanlığı ile hep örnek aldığım değerli hocam Prof.Dr.Feyza KARAGÖZ GÜZEY'e, cerrahi bilgi ve becerilerimi geliştirmemde büyük emekleri olan Doç.Dr.İlker GÜLEÇ'e, Doç.Dr.Burak EREN'e, Doç.Dr.Nuri Serdar BAŞ'a, Uz.Dr.Azmi TUFAN'a, Uz.Dr.Ebru DORUK'a, Uz.Dr.Murat KARACAN'a, Uz.Dr.Mustafa Safi VATANSEVER'e ve Uz.Dr.Özgür Yusuf AKTAŞ'a sonsuz teşekkür ederim.

Tezimin tasarlanmasında ve hazırlanmasında büyük emeği olan tez danışmanlarım hocam Prof.Dr.Feyza KARAGÖZ GÜZEY'e ve Uz.Dr.Ebru Doruk'a, Patoloji kliniğinden Doç.Dr.Hüsniye Esra PAŞAOĞLU'na ve ekibine, Moleküler Biyoloji ve Genetik uzmanı Aslıhan ŞENGELEN'e, aynı zamanda deneysel çalışmam süresince desteklerinden dolayı BADABEM Sorumlu Yöneticisi Vet.Hek.Duygu Sultan ORAN'a ve ekibine derin minnettarlığımı sunarım.

Zorlu asistanlık dönemimde çok şey paylaştığımız, zorlukları beraber göğüslediğimiz, beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli uzmanlık öğrencisi arkadaşlarım Dr.Erhamit OKUTAN'a, Dr.Ece SAĞLAM ÇİFCİ'ye, Dr.Tayfun ŞAHİN'e, Dr.Erhan ABANOZ'a, Dr.Büşra Buket SAĞLAMER'e, Dr.Aslı AYDIN TAŞKOPARAN'a, Dr.Alper OLGUN'a, Dr.Ahmet CAFEROĞLU'na, Dr.Abdullah Serhat AKMAN'a, Dr.Ceyda AKYÜZ'e ve Dr.Ferhat AY'a, ayrıca bu sürede emeklerini ve hoşgörülerini esirgemeyen klinik hemşire ve personel ekibine çok teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, beni destekleyen, bu günlere gelmemi sağlayan başta rahmetli babam Mazahir Bağirov, canım annem Mansura Bağirova, sevgili eşim Orhan Vahab ve hayatımın anlamları sevgili kızlarım Maryam Vahab ve Madina Vahab olmakla tüm aileme çok teşekkür ederim.

**Dr. Günay VAHABOVA**

**İstanbul, 2022**

## ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada infantil dönemde tekrarlayan hafif kafa travması (thKT) modelinde travma sonrası zenginleştirilmiş çevre (ZÇ) tedavisinin genç erişkinlik döneminde davranışsal ve bilişsel bozukluklara ve patolojik bulgulara etkisini araştırdık.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmada 80 adet post-natal (PN) 10 günlük 20-30 gr ağırlığında cinsiyet farkı olmaksızın seçilmiş Sprague-Dawley cinsi rat kullanıldı. Denekler 10'ar rat bulunan 8 gruba ayrıldı: Erken ve geç sham (grup 5-6), erken ve geç kontrol (grup 7 ve 8), erken ve geç travma (grup 2 ve 4) ve erken ve geç tedavi grupları (grup 1 ve 3). Sham gruplarına sadece anestezi, travma ve tedavi gruplarına anestezi sonrası tekrarlayan travma uygulandı. Erken tedavi grubu travma sonrası PN 15. gün, geç tedavi grubu PN 25. günde zenginleştirilmiş kafese yerleştirildi. Travma ve tedavi gruplarında Kane'in ağırlık düşürme modeliyle 24 saat arayla 5 kez travma oluşturuldu. Erken sham, kontrol ve travma gruplarındaki denekler 16., geç sham, kontrol ve travma grupları ile tedavi gruplarındaki denekler 50.günde sakrifiye edildi.

Motor işlev değerlendirilmesinde denge testi ve eğik düzlem testi (EDT), öğrenme ve bilişsel işlev için yeni nesne tanıma (YNT) testi, öğrenme ve bellek için Morris su labirenti (MSL) testi, davranışsal değişiklikler ve anksiyete için yükseltilmiş artı labirent (YAL) testi kullanıldı. Beyinde doku hasarını değerlendirmek için hematoksilen eozin (HE), Nissl ve gümüş boyama, mikrogliozisi göstermek için iyonize kalsiyum bağlayıcı adaptör molekül (İBA-1), mikrogliya alt tiplerini değerlendirmek için indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve arginaz-1 (ARG-1), geç dönemdeki serebral dejenerasyonu göstermek için fosforile-TAU (p-TAU) 181 ve 231, amiloid prekursor protein (APP) ve amiloid-beta (A $\beta$ ), travmaya bağlı akson hasarı için glial fibriler asidik protein (GFAP) ve nörotrofik protein S100 B boyaları uygulandı.

**Bulgular:** Tekrarlayan travma erken dönemde denge ve motor işlevde bozulmaya neden oldu, ZÇ tedavisi sonrası bozulan işlevlerde düzelme görüldü. Benzer düzelme öğrenme ve bellek testlerinde de saptandı ve tedaviye erken başlanan grupta (Grup 1) düzelme geç başlanan gruptan (Grup 3) daha belirgindi. Stres düzeyi de tedavi gruplarında erken tedavi grubunda daha belirgin olmak üzere anlamlı olarak azalmıştı.

Gümüş boyama erken ve geç travma döneminde arttı ve erken tedavi sonrası daha belirgin olmak üzere tedaviyle azaldı. Nissl pozitifliği sadece erken tedavi sonrası azaldı, geç tedaviden yararlanmadı.

İmmün boyama sonuçları, thKT'nin A $\beta$ , APP, P-TAU 181, p-TAU 231, İBA-1, ARG-1, iNOS, GFAP, S100B düzeylerinde anlamlı artışa, ZÇ tedavisinin A $\beta$  dışında diğer tüm boyamalarda anlamlı azalmaya yol açtığını gösterdi. A $\beta$  boyaması tedaviden tam etkilenmedi. iNOS, p-TAU 181 ve 231, GFAP ve İBA-1 erken tedavi grubunda, geç tedavi grubundan daha iyi sonuç verdi, ancak iki grup arasındaki farklar anlamlı değildi. APP, ARG-1 ve S100 B pozitifliği ise sadece erken tedavi sonrası azaldı, geç tedaviden etkilenmedi.

**Sonuç:** Çalışmamız infantil dönemde thKT'na maruz kalan ratların travma sonrası ZÇ'de bulunmasının, travmanın neden olduğu genç erişkinlik dönemindeki davranış ve bilişsel bozuklukları ve anksiyeteyi azalttığını, keşfedici performansı artırarak öğrenme performansını iyileştirdiğini ortaya koydu. Ayrıca tedaviye erken başlamanın bilişsel işlevleri daha fazla iyileştirdiği görüldü.

**Anahtar Kelimeler:** Pediatrik tekrarlayan hafif kafa travması, zenginleştirilmiş çevre, nörokognitif fonksiyon, öğrenme testleri

## ABSTRACT

**Aim:** In this study, we investigated the effects of post-traumatic enriched environment (EE) treatment on behavioral and cognitive disorders and pathological findings in young adulthood in a recurrent mild head trauma (rmHT) model in infancy.

**Materials and Methods:** In the study, 80 post-natal (PN) 10-day-old Sprague-Dawley rats with a weight of 20-30 g, selected without any gender difference, were used. The subjects were divided into 8 groups with 10 rats in each group: early and late sham (groups 5-6), early and late control (groups 7 and 8), early and late trauma (groups 2 and 4), and early and late treatment groups (groups 1 and 3). While only anesthesia was applied to the sham groups, repetitive trauma was applied to the trauma and treatment groups after anesthesia. The early treatment group was placed in an enriched cage on the PN day 15 after trauma and the late treatment group on the PN day 25. In the trauma and treatment groups, 5 traumas were created with Kane's weight drop model with an interval of 24 hours. The subjects in the early sham, control and trauma groups were sacrificed on the 16th day, and the subjects in the late sham, control, trauma, and treatment groups were sacrificed on the 50th day.

Balance and inclined platform tests were used to evaluate motor function, new object recognition (NOR) test was used to evaluate learning and cognitive function, Morris water maze (MWM) test was used to evaluate learning and memory, and elevated plus maze (EPM) test was used to evaluate behavioral changes and anxiety. Hematoxylin eosin (HE), Nissl and silver staining were used to assess tissue damage in the brain, IBA-1 to show microgliosis, iNOS and arginase-1 (ARG-1) to assess microglia subtypes, phosphorylated-TAU (p-TAU) 181 and 231, amyloid precursor protein (APP) and amyloid beta (A $\beta$ ) to show late cerebral degeneration, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and neurotrophic protein S100 B stains were applied for trauma-induced axon damage.

**Results:** It was observed that repetitive trauma caused deterioration in balance and motor function in the early period, and the impaired functions improved after EE treatment. Similar improvement was also detected in learning and memory tests, and the improvement was more pronounced in the early treatment group (group

1) than in the late treatment group (group 3). Stress level was also significantly decreased in the treatment groups, more prominently in the early treatment group.

Silver staining increased in the early and late trauma period and decreased with treatment, being more pronounced after early treatment. Nissl positivity decreased only after early treatment and did not benefit from late treatment.

Immunostaining results showed that rmHT caused a significant increase in A $\beta$ , APP, P-TAU 181, P-TAU 231, IBA-1, ARG-1, iNOS, GFAP, S100B levels, and EE treatment provided a significant reduction in all staining levels except A $\beta$ . A $\beta$  staining was not completely affected by the treatment. iNOS, p-TAU 181 and 231, GFAP and IBA-1 performed better in the early treatment group than the late treatment group, but the differences between two groups were not significant. APP, ARG-1 and S100 B positivity decreased only after early treatment and were not affected by late treatment.

**Conclusion:** Our study revealed that housing of rats exposed to an infantile recurrent mild head trauma (rmHT) in EE after trauma reduced the behavioral and cognitive disorders and anxiety caused by the trauma in young adulthood, and improved learning performance by increasing exploratory performance. In addition, it was observed that starting treatment earlier improved cognitive functions more.

**Keywords:** Pediatric recurrent mild head trauma, enriched environment, neurocognitive function, learning tests

## SİMGE VE KISALTMALAR

- AAD:** Akut aksonal dejenerasyon  
**ABD:** Amerika Birleşik Devletleri  
**A $\beta$ :** Amiloid-beta  
**ACh:** Asetil kolin  
**AH:** Alzheimer hastalığı  
**ALS:** Amiyotrofik lateral skleroz  
**AMPA-kainate:** Amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole propionate-kainat  
**APP:** Amiloid prekursor protein  
**ARG-1:** Arginaz-1  
**ATP:** Adenozin trifosfatı  
**BDNF:** Beyin kaynaklı sinir büyüme faktörü  
**BK:** Bilinç kaybı;  
**BOS:** Beyin omurilik sıvısı  
**DAH:** Diffüz aksonal hasar  
**EDT:** Eğik düzlem Testi  
**GABA:** Gama aminobutirik asit  
**GFAP:** Glial fibriler asidik protein  
**GKS:** Glasgow koma skalası  
**HADYEK:** Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu  
**HE:** Hematoksilen eozin  
**HİE:** Hipoksik iskemik ensefalopati  
**İBA-1:** İyonize kalsiyum bağlayıcı adaptör molekül  
**İHK:** İmmunohistokimyasal  
**iNOS:** İndüklenebilir nitrik oksit sentaz  
**IOD:** İntensity of the optical density  
**KBB:** Kan beyin bariyeri  
**KKH:** Kontrollü kortikal hasar  
**LFP:** Lateral sıvı perküsyonu  
**LTP:** Uzun süreli potansiyalizasyon  
**MSLT:** Morris su labirenti tTesti  
**MSS:** Merkezi sinir sistemi  
**MOD:** Mean optical density (Ortalama optik yoğunluk)

**MS:** Multipl skleroz  
**NE:** Norepinefrin  
**NGF:** Sinir büyüme faktörü  
**NMDA:** N-metil-D-aspartat  
**PFA:** Paraformaldehid  
**PH:** Parkinson Hastalığı  
**PFK:** Prefrontal korteks  
**PKA:** Protein kinaz-A  
**PKC:** Protein kinaz-C  
**PN:** Postnatal  
**p-TAU:** Fosforile-TAU  
**PTA:** Posttravmatik amnezi  
**ROS:** Reaktiv oksijen radikalleri  
**ROT:** Reaktiv oksijen tüverleri  
**SÇ:** Standart çevre  
**SBÜ:** Sağlık Bilimleri Üniversitesi  
**SUAM:** Sağlık Uygulama Araştırma Merkezleri  
**TBH:** Travmatik beyin hasarı  
**thTBH:** Tekrarlayan hafif travmatik beyin hasarı/  
**thKT:** Tekrarlayan hafif kafa tıvması  
**TK:** Trafik kazası  
**YALT:** Yükseltilmiş artı labirent testi  
**YNT:** Yeni nesne tanıma testi  
**ZÇ:** Zenginleştirilmiş çevre  
**5HT:** Serotonin

## TABLolar, ŞEKİLLER ve RESİMLER

<b>Tablo 1:</b> Deney grupları ve uygulanan işlemler.....	21
<b>Tablo 2:</b> Deney gruplarına uygulanan testler.....	22
<b>Tablo 3:</b> Deney protokolünden çıkarılan ratlar.....	24
<b>Tablo 4:</b> İmmunhistokimyasal boyamalar için kullanılan antikorlar.....	34
<b>Tablo 5:</b> Travma öncesi ve travma sonrası denge testi sonuçları.....	37
<b>Tablo 6:</b> Travma öncesi ve sonrası 70 derecelik açđ için EDT sonuçları.....	38
<b>Tablo 7:</b> Morris su labirentinde, eğitim dönemi (ilk 4 gün) ve 5. gün test sonuçları.....	40
<b>Tablo 8:</b> Yeni nesne tanıma testi verilerinin gruplar arası değerlendirmesi.....	41
<b>Tablo 9:</b> YAL testinde grupların kapalı ve açık kolda geçirdikleri süre.....	42
<b>Tablo 10:</b> Gümüş ve Nissl boyama sonuçları.....	44
<b>Tablo 11:</b> İBA-1, iNOS ve ARG-1 immunhistokimyasal boyama sonuçları.....	48
<b>Tablo 13:</b> GFAP ve Nörotrofik Protein S100B immunhistokimyasal boyama sonuçları.....	50
<b>Şekil 1:</b> Papez halkası.....	16
<b>Şekil 2:</b> Travma öncesi ve sonrası denge testi sonuçları.....	38
<b>Şekil 3:</b> Travma öncesi tüm açđla için ve travma sonrası 70 derece için eğik düzlem test sonuçları.....	38
<b>Şekil 4:</b> Morris su labirenti test sonuçlarının gruplar arasındaki farkları.....	41
<b>Şekil 5:</b> Yeni nesne tanıma test sonuçlarının gruplar arası istatistiksel değerlendirmesi.....	42
<b>Şekil 6:</b> YAL testinde sıçanların açık ve kapalı kolda kalma sürelerinin karşılaştırılması.....	43
<b>Şekil 7:</b> Gümüş ve Nissl boyama görüntüleri ve istatistiksel sonuçları.....	45
<b>Şekil 8:</b> İBA-1, iNOS, ARG-1 immunhistokimyasal boyama sonuçları.....	47
<b>Şekil 9:</b> Amyloid-β ve APP immunhistokimyasal boyama sonuçları.....	48
<b>Şekil 10:</b> P-TAU 181 ve P-TAU 231 immunhistokimyasal boyama görüntüleri ve istatistiksel sonuçları.....	49
<b>Şekil 11:</b> GFAP ve S100B immunhistokimyasal boyama görüntüleri ve istatistiksel sonuçları.....	50
<b>Resim 1:</b> Sıçanlara ağırlık düşürme modeli ile travma uygulanması.....	24
<b>Resim 2:</b> Denge testi ve Eğik düzlem testinin uygulanması.....	25
<b>Resim 3:</b> Sıçanların Morris su labirentindeki görüntüsü.....	27
<b>Resim 4:</b> Yeni nesne tanıma testinin erişkin ve yavru ratlar üzerinde uygulanması.....	28
<b>Resim 5:</b> Sıçanın YALT düzeneğindeki görüntüsü.....	29
<b>Resim 6:</b> Zenginleştirilmiş kafesde sıçanların barındırılması.....	30
<b>Resim 7:</b> Deneklerin sakrifikasyonu.....	31
<b>Resim 8:</b> Beyin dokusundan frontal korteksin, tempotal korteksin ve hipokampusun ayrılması.....	31
<b>Resim 9:</b> HE boyama ışık mikroskobu incelemesi.....	44

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
ÖZET.....	II
ABSTRACT.....	IV
SİMGE VE KISALTMALAR.....	VI
TABLOLAR, ŞEKİLLER VE RESİMLER.....	VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. Kafa Travması.....	2
2.1.1. <i>Kafa Travması Tarihçesi</i> .....	2
2.1.2. <i>Kafa Travması Epidemiyolojisi</i> .....	3
2.1.3. <i>Kafa Travmasının Sınıflandırılması</i> .....	4
2.1.3.1. <i>Hafif Kafa Travması</i> .....	4
2.1.3.2. <i>Orta Dereceli Kafa Travması</i> .....	4
2.1.3.3. <i>Ağır Kafa Travması</i> .....	4
2.1.4. <i>Travmatik Beyin Hasarının Patofizyolojisi</i> .....	5
2.1.4.1. <i>Travmatik Beyin Hasarının Spesifik Patofizyolojisi</i> .....	6
2.1.4.1.1. <i>Ödem</i> .....	6
2.1.4.1.2. <i>Eksitotoksisite</i> .....	6
2.1.4.1.3. <i>Oksidatif Stres</i> .....	6
2.1.4.1.4. <i>Nöroinflamasyon, Hücresel Yanıt</i> .....	7
2.1.4.2. <i>Travmatik Beyin Hasarının Patofizyolojik Göstergileri</i> .....	8
2.1.4.2.1. <i>Histopatolojik Boyama Yöntemleri</i> .....	8
2.1.4.2.2. <i>İmmunhistokimyasal Boyama Yöntemleri</i> .....	9
2.1.5. <i>Kafa Travması Modelleri</i> .....	10
2.2. <i>Bilişsel (Kognitif) İşlevler</i> .....	12
2.2.1. <i>Dikkat</i> .....	12
2.2.2. <i>Öğrenme</i> .....	12

2.2.2.1. <i>Nonasosiyatif Öğrenme</i> .....	13
2.2.2.2. <i>Asosiyatif Öğrenme</i> .....	13
2.2.3. <i>Bellek</i> .....	14
2.3. <b>Öğrenme ve Bellekle İlgili Beyin Bölgeleri</b> .....	15
2.3.1. <i>Limbik Sistem</i> .....	15
2.3.2. <i>Hipokampus</i> .....	15
2.3.3. <i>Prefrontal Korteks. (PFK)</i> .....	17
2.4. <b>Öğrenmede yer alan nörotransmitterler</b> .....	18
2.5. <b>Zenginleştirilmiş Çevre ve Komponentleri</b> .....	19
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>21</b>
3.1. <b>Anestezi uygulanması</b> .....	<b>23</b>
3.2. <b>Travma uygulanması</b> .....	<b>23</b>
3.3. <b>Deneklere uygulanan davranış testleri</b> .....	<b>24</b>
3.3.1. <i>Denge Testi</i> .....	24
3.3.2. <i>Eğik Düzlem Testi</i> .....	25
3.3.3. <i>Morris Su Labirenti Testi</i> .....	26
3.3.4. <i>Yeni Nesne (Obj) Tanıma Testi</i> .....	27
3.3.5. <i>Yükseltilmiş Artı Labirent Testi (YALT)</i> .....	28
3.4. <b>Zenginleştirilmiş kafes</b> .....	<b>29</b>
3.5. <b>Sakrifikasyon ve Doku örneklerinin alınması</b> .....	<b>30</b>
3.6. <b>Histopatolojik İnceleme</b> .....	<b>32</b>
3.7. <b>İmmunhistokimyasal Boyama</b> .....	<b>33</b>
3.7.1. <i>İBA-1 İHC</i> .....	34
3.7.2. <i>iNOS İHC</i> .....	34
3.7.3. <i>Arginaz-1 İHC</i> .....	35
3.7.4. <i>Amyloid-beta İHC</i> .. ..	35
3.7.5. <i>Amiloid Prekursor Protein İHC</i> .....	35
3.7.6. <i>Fosforillenmiş-tau (P-TAU181) İHC</i> .....	35

3.7.7. Fosforillenmiş-tau (P-TAU 231) İHC.....	35
3.7.8. GFAP İHC.....	36
3.7.9. Nörotrofik Protein S100B İHC.....	36
3.8. İstatistik Analiz... ..	36
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>37</b>
4.1. Davranış Test sonuçları.....	37
4.1.1. Denge Testi Sonuçları .....	37
4.1.2. Eğik Düzlem Test Sonuçları.....	38
4.1.3. Morris Su Labirenti Test Sonucu.....	39
4.1.4. Yeni Nesne Tanıma Test Sonuçları .....	41
4.1.5. Yükseltilmiş Artı Labirent Test Sonuçları.....	42
4.2. Histopatolojik İnceleme .....	43
4.2.1. Hemotoksin Eozin Boyama Sonuçları.....	43
4.2.2. Gümüş Boyama Sonuçları.....	43
4.2.3. Nissl Boyama Sonuçları.....	44
4.3. İmmunhistikimyasal Boyama Sonuçları.....	45
4.3.1. İBA-1 İHC Sonuçları .....	46
4.3.2. iNOS İHC Sonuçları.....	46
4.3.3. Arginaz-1 İHC Sonuçları.....	46
4.3.4. Amyloid-beta İHC Sonuçları.... ..	47
4.3.5. Amiloid Prekursor Protein İHC Sonuçları.....	47
4.3.6. Fosforillenmiş-tau (p-TAU 231 ve p-TAU181) Sonuçları.....	48
4.3.7. GFAP İHC Sonuçları .....	49
4.3.8. Nörotrofik Protein S100B İHC sonuçları.....	49
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>51</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>62</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>62</b>

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bebeklerde ve çocuklarda travmatik beyin hasarı (TBH) önemli bir halk sağlığı sorunudur. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) her yıl 0-14 yaş arası 500.000'den fazla çocuğun TBH'na maruz kaldığı tahmin edilmektedir. Kafa travmalarının %75'i hafiftir ve %81-92'sinde bilinç kaybı görülmez (1). Hafif TBH'lı çocukların çoğu nispeten hızlı bir şekilde iyileşse de %10-30'unda 4-12 haftadan uzun süren kalıcı semptomlar gelişir ve bu durum okul performansını ve yaşam kalitesini etkiler (2)

Son yapılan çalışmalar, thTBH'nın kronik travmatik ensefalopati, Alzheimer Hastalığı (AH), demans, parkinsonizm, amiyotrofik lateral skleroz (ALS), multipl skleroz (MS), şizofreni gibi nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olduğunu göstermektedir (1). Aynı zamanda İsveç'te yapılan çocuklukta geçirilmiş hTBH'nın yetişkinlikte olumsuz sonuçlarla ilişkili olduğu ve yaralanma yaşının önemli olduğu bildirilmiştir (3). Yetişkinlerde thTBH'nın olumsuz etkilerinin altında yatan mekanizmalar büyük ölçüde bilinir, fakat gelişmekte olan beyne etkileri konusunda bilgimiz kısıtlıdır. Çocuklarda TBH'nın patofizyolojisini bilmek oluşabilecek hasarı önlememize ve potansiyel terapötik hedeflerin belirlenmesine yardımcı olacaktır.

İnfantil dönemde thTBH toplumda çeşitli nedenlerle görülür. Genelde uygunsuz çocuk bakımı sonucu oluşan düşmelere ve istismara bağlı ortaya çıkar. Çocuklarda motor yetenek geliştikçe travmaların sıklığında artış saptanır. Sık ve tekrarlayan hafif travmalar sonucu çocuklarda zamanla uyku bozukluğu, anksiyete ve depresyon gibi duygudurum bozuklukları ve motor beceri ve bilişsel işlevlerde gerileme gibi geç sorunlar gelişebilir. Aynı zamanda travma sonrası dakikalar, saatler, günler, hatta aylar içinde gelişen bozulmuş aksonal taşıma, anormal protein birikintileri, ilerleyici hücresel dejenerasyon, hücre ölümü ve beyin atrofisi gibi bir dizi patofizyolojik olay sonucu motor ve bilişsel işlevlerde hasar ve çeşitli nörodejeneratif bozukluklara yatkınlık ortaya çıkar (4).

Bu patofizyolojik olayları önleyecek veya etkisini azaltacak tedavi yöntemlerini araştıran çok sayıda çalışma vardır. Bu yöntemlerden biri zenginleştirilmiş çevre (ZÇ) tedavisidir. ZÇ, fiziksel ve keşifçi-araştırmacı aktiviteler, sosyal etkileşimler, yeni ve farklı uyaranlar gibi birçok bileşenden oluşur. Çevreyle etkileşim, yaşam boyunca beynin normal işlevlerini sürdürmesi için gerekli

olan sinaptik zenginliğin oluşmasında anahtar rol oynar. Yaşamın erken dönemlerinde maruz kalınan pek çok uyaran fizyolojik ve davranışsal gelişimi etkiler (5). Çocuklar için ZÇ'nin bir bileşeni olan oyun, çocuğun kendini anlatma, yeteneklerini anlama, sosyal, duygusal ve motor beceriler geliştirmesinde önemli bir araç olarak tanımlanır (6). ZÇ, çeşitli yollar üzerinden beyinde plastisite artışını uyarır, bazı uyarıcı nörotransmitterler aracılığıyla öğrenme ve bellek işlevlerine, beynin gelişimine ve olgunlaşmasına etki eder (5).

Bu çalışmada infantil dönemde thKT'na maruz kalmanın genç erişkinlik döneminde ne gibi patofizyolojik ve bilişsel hasarlara yol açtığı, bunların ZÇ tedavisinden ne düzeyde fayda gördüğü ve ZÇ'de barındırılmanın zamanlamasının tedaviye yanıtı etkileyip etkilemediği araştırıldı.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Kafa travması**

Kafa travması ile beyin dokusunda patofizyolojik bir süreç oluşması, geçici veya kalıcı zihinsel, fiziksel ve psikososyal fonksiyonları etkileyebilen azalmış veya değişken bilinç durumu TBH olarak adlandırılır (6).

#### **2.1.1. Kafa Travması Tarihçesi**

Kafa travmalarına ait ilk yazılı bilgilere Mısır'da bulunan, M.Ö. 3000-1600 yılları arasında yazıldığı düşünülen Edwin Smith papirüsünde rastlanmıştır. Bu papirüsün Mısırlı hekim İmhotep'e ait olduğu düşünülmektedir (7).

Kafa travmalarının tedavisinde trepanasyon (kafatasında beyin ve beyin zarına hasar vermeden delik açma yöntemi) modern olarak son 100 yılda gelişmesine rağmen, daha erken neolitik çağda (M.Ö. 7000-3000) uygulandığı bildirilmiştir. İnk mezarlarında ve başka kazılarda bulunan kafataslarının incelenmesinde trepanasyonun kullanıldığı görülür (8). Fransa kralı 2. Henry'nin 1510'da kafa travması geçirmesi üzerine Ambroise Pare orbita üstü hematomu operasyonla tedavi etmiştir (8).

Hipokrat, kafa travmasında yaralanan bölgenin gelişebilecek beyin hasarındaki önemini vurgulamış, kafa travmalarının öldürücü olabileceğini ve sağkalım için farklı kategoriler olduğunu belirtmiştir. Egeli Paul, kafa travmalarını kırıklara göre sınıflandırmış, Celsus (M.Ö. 25-M.S. 50) ve Galen (129-200) kafa

travmasında değişik sınıflandırmalar yapmıştır (9). İbni Sina (980-1037), Abu Kasım Zahrevi (Abulcasis; 936-1013) ve Razi (865-925) de eserlerinde kafa travmasına yer vermiştir. Razi kontüzyonu ilk tanımlayan, İbni Sina ise kafa travmasında trepanasyonu öneren bilim insanıdır (10).

Anadolu'da bronz çağında İkiztepe-Samsun ve Kültepe yörelerinde trepanasyon yapıldığı arkeolojik kazılarda ortaya çıkarılmıştır. En şaşırtıcı bulgulardan biri ise Urartu dönemine (M.Ö. 800) ait Dilkaya-Van yöresinde bulunan, kafa travması geçirmiş, orta meningeal arter dallarını çaprazlayan, frontalden oksipitale uzanan lineer fraktürü olan bir kafatasında 11x6 cm boyutlarında serbest flep kraniyotomi gerçekleştirilmiş olmasıdır (11). Kafa travmalarının tedavisi ile ilgilenen Şerefeddin Sabuncuoğlu bilgilerini "Cerrahiyetü'l-Haniyye" isimli kitabına aktarmış ve cerrahi teknikleri minyatür resimlerle anlatmıştır (10).

Türkiye Cumhuriyeti kurulduktan sonra kafa travmalarında cerrahi operasyonu ilk Mim Kemal Bey yapmış, 1924'te "Dimaağ ve Cümcüme Afetleri ve Tedavileri" adlı kitabı yayınlamıştır (8).

### **2.1.2. Kafa Travması Epidemiyolojisi**

Travmatik bryin hasarı, önemli bir halk sağlığı sorunudur ve Dünya Sağlık Örgütü TBH'nın ölüm ve sakatlığın önde gelen nedeni olduğunu belirtmiştir (12). Kanada ve ABD'de yılda yaklaşık 8 milyon kişi kafa travmasıyla acil servise başvurmaktadır, bu hastalar acil servis başvurularının %6,7'sini oluşturur. Bu başvuruların %75-90'ı hTBH olup prevalansı 100.000'de 100-300 kadardır (13). Kafa travmasının nedeni gelişmiş ülkelerde trafik kazaları (TK; %45), yüksekten düşme (%30), iş kazaları (%10), eğlence kazaları (%10) ve saldırı ile ilgili kazalardır (%5). Ülkemizde bu oranlar %40 yüksekten düşme ve %37 TK olarak bildirilmiştir (14).

Çocuklarda da kafa travmaları çok sıktır. ABD Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezleri tarafından yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre 0-14 yaş grubunda tahminen her yıl 475.000 kişi TBH'na maruz kalmaktadır, bunların %90'ı hafif yaralanmalardır, 37.000 hasta yatırılmakta ve 2.685'i kaybedilmektedir. hTBH'nın nedenleri çocuklarda yaş gruplarına göre farklılık gösterir; yenidoğanlarda en sık neden doğum travması iken, 18 ay altında düşme, TK ve çocuk istismarıdır. Daha büyük çocuklarda erişkinlere benzer şekilde TK, spor yaralanması ve darp öyküsü ilk sıralarda yer alır (4).

Hafif TBH'nin sık tekrarlaması sonrası yaşam kalitesini etkileyen uzun süren kalıcı semptomlar ortaya çıkabilir, bu nedenle hTBH önemli bir halk sağlığı sorunudur. Toplumda bu travmalar profesyonel sporcularda ve askeri personelde daha yaygın görülmekle birlikte çocuklarda da siktir (15).

Hastanemiz kalabalık ve çocuk oranı yüksek bir bölgede bulunmaktadır ve her gün çok sayıda çocuk kafa travması nedeniyle değerlendirilmektedir. Özellikle düşük sosyoekonomik ve kültürel düzeyde ve çok çocuklu ailelerdeki bebeklerde uygunsuz çocuk bakımı sonucu düşme, daha büyük kardeşleri tarafından darp edilme veya çocuk istismarı gibi nedenlerle thTBH sık görülmektedir. Bu hastaların hayatlarının sonraki dönemlerinden ortaya çıkan nörobilişsel ve davranış bozuklukları ve altta yatan patofizyolojik olayları araştıran sınırlı sayıda çalışma mevcuttur.

### ***2.1.3. Kafa Travmasının Sınıflandırılması***

Kafa travması, bilinç durumu, Glasgow Koma Skalası (GKS) puanı, posttravmatik amnezi süresi, eşlik eden fokal nörolojik bulguları varlığına göre sınıflandırılır (16). GKS, Teasdale ve Jennett tarafından 1974'te bozulmuş bilinç durumu ve komanın süre ve derinliğinin değerlendirilmesi için tasarlanmış olan ve üç parametreden oluşan bir skaladır: Göz yanıtı, sözel yanıt ve motor yanıt. Toplam 3-15 puan arasında değerlendirilir. Kafa travması GKS puanı ile belirlenen şiddetine göre 3 gruba ayrılır: Hafif (GKS 14-15), orta (GKS 9-13) ve ağır (GKS 3-8) kafa travması (16).

*2.1.3.1. Hafif kafa travması:* GKS 13-15 olan olgularda beyin bilgisayarlı tomografisinde akut patoloji genellikle yoktur, ancak geçici olarak fiziksel, emosyonel ve bilişsel bozukluklar görülebilir. Kafa travması olgularının %80'i bu gruptadır. Cerrahi müdahale gerektirecek bir patoloji görülme olasılığı çok düşüktür (%1) (17).

*2.1.3.2. Orta dereceli kafa travması:* GKS 9-13 arasında olan olgular tüm kafa travmalı hastaların %10 kadarını oluşturur, mortalite %20'den azdır. Fakat bu grubun %50 kadarı uzun dönem sakatlıkla sonuçlanır. %40 olguda beyin BT'de bulgu saptanır ve %8'inde cerrahi gerekir (17).

*2.1.3.3. Ağır kafa travması:* GKS'nun 8 veya daha düşük olduğu hastaları tanımlar. Kafa travması olgularının %10'unu oluşturur. Mortalite %35 kadardır, olguların %25'i cerrahi gerektirir (17).

#### ***2.1.4. Travmatik beyin hasarının patofizyolojisi***

Travmatik beyin hasarı karmaşık bir hastalık sürecidir ve birincil ve ikincil yaralanma mekanizmalarına bağlı yapısal hasarlara ve fonksiyonel bozukluklara neden olur. Birincil yaralanma, fokal ya da yaygın olabilir. Fokal yaralanma mekanizmaları, beyin dokusunda dış kuvvete maruz kalındığı sırada ortaya çıkan kontüzyon, laserasyon ve kanama; yaygın yaralanma mekanizmaları aksonların gerilmesi ve yırtılması (diffüz aksonal hasarlanma) ve beyin ödemi (18).

İkincil beyin hasarı, birincil hasarı izleyen dakikalar, günler ve haftalar içinde ortaya çıkan, prognozu önemli ölçüde kötü yönde etkileyen kan beyin bariyeri (KBB) bozulması, ödem ve nöroenflamasyon, mitokondriyal disfonksiyon, enerji yetmezliği, oksidatif stres, eksitoksisite, apoptozis ve nekroz gibi birbiriyle etkileşen bir dizi süreci kapsar. Bu mekanizmaların bir kısmı önlenemez ve ortaya çıkan hasar azaltılabılır. Böylece mortalite ve morbiditenin azaltılması mümkün olabilir (18). İkincil beyin hasarının oluşmasında etkili majör üç neden hipoksi (%30; PaO<sub>2</sub><65mmHg), hipotansiyon (%13; sistolik kan basıncı<90mmHg) ve anemidir (hemotokrit<%30). Ek olarak hiperkapni, hipokapni, hipertermi, hipoglisemi ve hiperglisemi gibi diğer sistemik nedenler de rol oynar (19).

Beyin dokusunda birincil ve ikincil mekanizmalarla oluşan hasar KT'nın şiddeti arttıkça belirginleşir. En ağır hasar ağır KT'nda ve daha az oranda orta dereceli travmada görülür. hTBH klinik olarak çoğu zaman masum görünür. Yine de ayrıntılı testler yapıldığında %30 kadar olguda uzun süreli bilişsel ve davranışsal sekeller saptanır. Bu da hKT'nın patofizyolojisinde altta yatan hücrel ve metabolik olayların orta derecede KT ile benzer olduğunu düşündürür (20).

Çocuklarla erişkinler arasında bazı anatomik farklılıklar olduğu için çocukların travmaya yanıtı yetişkinlerden farklıdır: Baş-vücut oranının erişkinlerden fazla olması, özellikle 1 yaş altında miyelinizasyonun tamamlanmamış olması, 2 yaş altında ak madde olgunlaşma ve farklılaşmasının yavaş olması, kafatası kemik tabakalarının ince, fontanellerin açık olması gibi nedenlerle çocuklarda beyin travmadan tam olarak korunamaz ve KT'nın daha ağır sonuçları olabilir (4).

Yine bebeklerde sütür hatlarının açık, subaraknoid boşlukların geniş olması, kafatasının bükülebilir bir yapı göstermesi ve beynin daha esnek olması nedeniyle erken çocukluk döneminde kitle etkisi gösteren kafa içi kanama insidansı çok daha düşüktür. Dört yaş sonrası kafatasının sertleşmeye ve kapalı bir sistem hâline

gelmeye başlamasıyla kitle etkisi yaratan kanama bulgularının görülme sıklığı artar (4).

#### 2.1.4.1. Travmatik beyin hasarının spesifik patofizyolojisi

##### 2.1.4.1.1. Ödem:

Beyin ödemi hücrelerarası alanda veya doğrudan hücre içinde anormal sıvı artışı ve buna bağlı gelişen beyin hacmi artışıdır. Vazojenik, hücresel, ozmotik ve interstisyel gibi farklı tipleri mevcuttur. Kafa travmasında en sık görülen tip hücresel veya sitotoksik ödemdir. Burada asıl sorun hücre iyon pompalarının bozulmasıdır. Bunun nedeni çoğu zaman iskemi sonucu pompaların çalışması için gerekli olan adenozin trifosfatın (ATP) tükenmesidir. Sodyum potasyum adenozin trifosfat (Na-K-ATPaz) enziminin çalışmaması, hücre içinde sodyum birikmesine neden olur. Sodyumu izleyerek anyonlar ve su da hücre içine girer ve giderek beyin ödemi gelişir. Vazojenik tipte ödem de TBH'nda görülebilir. Travma sonucu oluşan endotel hasarı damar içindeki proteinlerin ve diğer büyük moleküllerin hücreler arası sıvıya geçmesine ve bunun etkisiyle bu alanda sıvı birikmesine neden olur (21).

##### 2.1.4.1.2. Eksitotoksisite:

Merkezi sinir sisteminde (MSS) bazı aminoasitler, metabolik işlevlerin yanında nörotransmitter görevi de yapar. TBH modelleri travma sonrası beyin dokusunda glutamat ve aspartat gibi eksitator transmitterlerin arttığını gösterir. Glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonu nöronal hasara yol açar ve eksitotoksisite olarak adlandırılır. Glutamat membran reseptörlerinin uyarılması sodyum ve kalsiyumu hücre içine sokar ve potasyumun dışarı çıkmasına neden olur. Hücre içinde kalsiyum artışı membran geçirgenliğini ve mitokondri işlevlerini bozarak hücre ölümüne yol açabilir.

Sonuçta travma sonrası gelişen bu patofizyolojik olaylar aksonal transportun bozulmasına, aksonal dejenerasyona ve sinaptik disfonksiyona neden olarak öğrenme, bellek gibi bilişsel işlevlerin bozulmasına yol açabilir (12).

##### 2.1.4.1.3. Oksidatif stres:

Oksidatif stres, glutamat eksitotoksisitesi, hücre içi kalsiyum artışı ve reaktif oksijen radikalleri (ROS) üretilmesi ile ilişkilidir. Glutamat, beyinde en fazla bulunan eksitator nörotransmitterdir. KT sonrası glutamat seviyesindeki ani artış glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılmasına neden olur. Uzun süreli depolarizasyon ve ardından iyon dengesizliği ortaya çıkar.

Hücre içi kalsiyum artışıyla bazı enzimler uyarılır ve biyolojik membranları ve DNA'yı yıkmaya başlar. Bu olaylar nekrotik hücre ölümüne kadar gider. Antioksidanların azalması ROS üretimini artırır. Mikroglialar, makrofajlar ve nötrofillerden salınan reaktif oksijen türevleri (ROT) bir yandan KBB'nin bozulmasına ve vazojenik ödem gelişmesine, diğer yandan lipid, protein ve DNA hasarı yaparak enflamatuar programlı hücre ölümüne neden olur.

Sonuç olarak, eksitator aminoasitler, ROS, nitrik oksid (NO) türevleri ve proenflamatuar sitokinlerin artışı beyinde mitokondri ve sinapslarda işlev bozukluğuna, astrosit reaktivitesine, mikroglial aktivasyona, diffüz aksonal dejenerasyona, demiyelinizasyona ve KBB'nin yıkılmasına neden olarak bilişsel bozuklukları başlatır (12).

#### 2.1.4.1.4. Nöroenflamasyon/hücre sel yanıt:

Birincil ve ikincil beyin hasarı, proenflamatuar sitokinler, prostaglandinler, ROS ve komplemanlar gibi hücre sel mediatörlerin salınımını uyararak bağışıklık hücrelerini ve mikrogliaları harekete geçirir (12). Mikroglialın MSS'nde ana işlevi gereksiz nöronları ve sinapsları ortadan kaldırmak, nöronların hayatta kalmasını ve farklılaşmasını desteklemek ve nöronal bağlantının kurulmasını sağlamaktır. Mikroglia, morfolojik olarak ameboid ve dallanmış olarak 2 tipe ayrılır. Ameboid mikroglia olgunlaşmamış beyinde geç prenatal ve erken postnatal dönemlerde ortaya çıkar. Buna karşılık, normal yetişkin mikrogliası dallanmış görünümündedir. Beyin içinde, dallanmış mikrogliaların immünolojik olarak dinlenme durumunda olduğu bilinir. Enflamasyon ve çeşitli nörolojik bozukluklar sırasında mikroglia aktive olur ve hücrelerin dallanmış şekli kaybolur ve ameboid şekle dönüşür (22).

Travmatik beyin hasarı, mikroglialı uyarır, beyindeki sitokin üretimini artırır ve periferik bağışıklık hücrelerinin hasarlı bölgeye göçüne neden olur, ardından yerleşik mikroglia ve astrositlerin kronik aktivasyonu gelişir. Mikroglialar beyin hasarına ilk yanıt veren ve doğal immün yanıtı oluşturan hücrelerdir. Astrositlerle beraber devamlı aktivasyonları uzun süreli hasardan sorumlu olabilir. Mikroglial aktivasyon, sitokinlerin ve kemokinlerin üretimi ve ikincil aracıl arın salınması ile bir bağışıklık uyarı sistemidir.

Mikroglialar MSS yaralanması sonrası fagositoz, debrisin atılması, anjiyogenez ve yara iyileşmesinde görev alırlar. Makrofajlarda da olduğu gibi, M1 (pro-inflamatuar) ve M2 (anti-inflamatuar) olarak adlandırılan alt tiplere sahiptirler.

Aktive edilen fenotiplere bağlı olarak, sitotoksik veya nöroprotektif etki gösterebilirler. Travma sonrası erken safhada, hasarlı doku alanında M1 mikroglia baskındır. Hasarlı dokudaki M2 mikroglialar ise özellikle doku iyileşmesi döneminde görev alır (22,23).

Astrositler, TBH sonrası erken dönemde uyarılır. Hasarlı dokunun temizlenmesinde fagositik ve proenflamataur etkileri vardır. Astrogliazisten sorumludurlar. Travmadan 7 gün sonra glial skarın oluşmaya başladığı ve 60 gün kadar devam ettiği deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. Travma sonrası hücre ölümü erken saatlerde artar, 1 gün sonra azalır ve 3. günde tekrar pik yapar, bu durum, astrosit seviyesinin artması ile ilişkilendirilmiştir (24).

Nötrofiller, TBH'nin erken safhasında beyne yayılır ve yaralanma sonrası 2 saat içinde yaralanma bölgesinde ve beyin parenkiminde saptanabilir. Lizozomal enzimleri salgılar, serbest radikalleri salar, doğrudan küçük damarları tıkayarak kan akışını azaltır ve damar geçirgenliğini artırırlar. Bu şekilde KBB'nin bozulmasına ve beyin ödemi gelişimine katkıda bulunurlar. Nötrofillerin sekonder hasar gelişiminde de rolü olabileceği düşünülmektedir. Tavşanlarda yapılan bir çalışmada KT sonrası hasar bölgesine nötrofil göçünün bloke edilmesiyle nöronal hasar alanının küçüldüğü gösterilmiştir (25).

#### 2.1.4.2. *Travmatik beyin hasarının patofizyolojik belirteçleri*

##### 2.1.4.2.1 Histopatolojik boyama yöntemleri

Hematoksilin eozin, Gümüş ve Nissl boyalar travma sonrası hasarlı nöronlarda morfolojik değişiklikleri göstermede kullanılan histopatolojik boyama yöntemleridir.

*Hematoksilin eozin:* HE boyamasında tipik olarak, hücrelerin sitoplazması eozinofilik (asidofilik) ve kırmızı boyanırken, çekirdekler ve nükleoller “hematoksilinofilik” (bazofilik) ve mavi boyanır. Dejenere nöronlarda aksonal akımın durması ve organel birikimi sonucu aksonal şişme ve nükleer piknoz gelişir, bu da mikroskop altında hipereozinofilik yuvarlak granüller şeklinde görünür. Astrositler eozinofilik sitoplazmadan yoksun ve oldukça büyük çekirdeklere sahiptir. Aktive olduklarında sitoplazma miktarındaki artış nedeniyle eozinofilik görünürler (26).

*Nissl boyama:* Nissl cisimlerine özgü boyamadır. Bu cisimler nöron sitoplazmasında bulunan bazofilik kaba endoplazmik retikulum kümelerinden oluşur.

Ana işlevleri nöronal büyüme ve akson yenilenmesi için gereken proteinlerin sentezi ve taşınmasıdır. Travma ve dejeneratif hastalıklar sonucu gelişen aksonal hasarda Nissl cisimleri hasarı hafifletmek için sitoplazmanın hücre merkezinden periferine doğru yer değiştirir; buna merkezi kromatoliz denir. Bu durumda Nissl (+) hücrelerde anormal bazofili görülür ve mor boyanırlar (26).

*Gümüş boyama:* Dejeneratif sinir liflerini ve sinir hücrelerinde gelişen birikimlerin net bir şekilde görüntülenmesini sağlayan arjirofilik bir boyadır (26).

#### 2.1.4.2.2. İmmunhistokimyasal boyama yöntemleri

*İBA-1:* Mikroglia/makrofajların spesifik kalsiyum bağlayıcı proteinidir. Aktin paketlenme aktivitesine sahiptir. Aktive edilmiş mikroglia da psödopod oluşmasında ve fagositoza katkı sağlayarak beyin dokusu onarımında önemli rol oynar (27).

*iNOS:* L-Argininden NO sentezini katalizleyen NOS'un üç izoformu vardır: Endotelial NOS vasküler endotelde ve koroid pleksusta, nöronal NOS nöronlarda, iNOS makrofajlarda ve glial hücrelerde ekspres edilir. iNOS mikroglial aktivasyonun M1 belirteçidir (28).

*ARG-1:* NO dahil olmak üzere çeşitli metabolitler için öncü görevi gören yarı esansiyel bir aminoasittir. Bu enzimin 2 tipi vardır: Sitoplazmada bulunan ARG-1 ve mitokondride bulunan ARG-2. ARG-1 TBH'nın yüksek özgüllüğe ve duyarlılığa sahip önemli göstergelerinden biridir, aynı zamanda mikroglial aktivasyonun M2 belirteçidir (28).

*A $\beta$ :* APP'in enzimatik parçalanması sonucu ortaya çıkan 40-42 aminoasitten oluşan bir proteindir. A $\beta$  kümelenme sürecinde hücre yüzey reseptörlerini etkileyerek hücre içinde kalsiyum artışına neden olur, serbest radikal oluşturarak kortikal ve hipokampal nöronlarda oksidatif hasar yaratır (29).

*APP:* 19 kromozomda kodlanan tip 1 transmembran glikoproteinidir. Yetişkin beyninde, en yüksek düzeyde korteksin ön lobunda ve ön perisilvian korteks-operküler girusta bulunur. Mitokondriyal membranda biriktiğinde, iç mitokondriyal metabolitlerin ve proteinlerin translokasyonunu bloke ederek elektron taşıma zincirinin bozulmasına ve mitokondri disfonksiyonuna, sonuç olarak oksidatif strese ve nöronal hasara neden olur. Ayrıca sekretazlarla enzimatik parçalanarak A $\beta$  oluşumunu artırır, amorf fibril kümeleri (plaklar) halinde hipokampus, amigdala ve entorinal kortekste birikir (30).

*p-TAU 181 ve 231*: TAU proteininin ana görevi akson ve dendritlerdeki transportu sağlayan mikrotübüllerin organizasyonu ve stabilizasyonudur. Hiperfosforilasyona uğrayan Tau proteinleri mikrotübüllere bağlanamaz, birbirine bağlanarak apoptozu indükleyen agregatlar oluşturur. Bu agregatlar nörofibriler yumaklar halinde hipokampus, amigdala, entorinal korteks gibi hafızayı, öğrenmeyi ve duygusal davranışları etkileyen beyin bölgelerinde birikir ve çeşitli nörodejeneratif hastalıkların teşhisi ve prognozu için prognostik biyobelirteç olarak kullanılır. (31).

*GFAP*: Esas olarak MSS'ndeki astrositlerde bulunan ara filamentlerin tip III proteinidir. Altın standart bir astrosit belirteçidir. Nöral hücrelerin büyümesinde ve işlevselliğinde kritik rolü vardır. Astrositler nöral hasara yanıt olarak yaralanmaya ilk müdahale eden hücrelerdir. İnsanlarda TBH'nda GFAP pozitif astrosit sayısının arttığı gösterilmiştir (32,33).

*Nörotrofik Protein S100B*: Astrosit aktivasyonunun ve beyin fonksiyon bozukluğunun bir belirteci olan S100B, kalsiyum bağlayıcı bir proteindir, MSS'de, esas olarak astrositlerin sitoplazmasında ve çekirdeğinde bulunur. Astrositlerle komşu glial hücrelerden, koroid pleksusun epitel hücrelerinden ve oligodendrositlerden salgılanarak monositleri ve mikroglial hücreleri aktive eder ve proenflamatuar sitokinler ve serbest radikallerin salgılanmasına, sonuç itibarıyla nöronal dejenerasyona ve nörojenezin azalmasına neden olur (33).

### **2.1.5 Kafa travması modelleri**

Travmatik beyin hasarının en sık kullanılan deneysel kemirgen modelleri ağırlık düşürme, sıvı perküsyon yaralanması ve kontrollü kortikal yaralanmadır. Ayrıca kriyojenik travma ve enjeksiyon modelleri de mevcuttur. thTBH'nin patofizyolojisini araştıran modellerin çoğu yetişkin beynine odaklanmıştır. Yetişkin ve olgunlaşmamış beyin arasında yaralanma ve iyileşmeye yanıt olarak önemli farklılıklar vardır, olgunlaşmamış beyinde gözlenen artan plastisite, iyileşmede avantaj sağlayabilir (34,35).

Direkt dinamik modeller kapsamında yer alan *kontrollü kortikal hasar (KKH) modeli*, ilk olarak Lighthall (1988) tarafından geliştirilen invaziv darbe yöntemidir. Bu modelde kranyotomi sonrası duraya baskı yapmak için mekanik enerjinin kaynağı olarak basınçlı hava kullanılır. En önemli avantajı, zaman, hız ve çarpma derinliği gibi deformasyon parametrelerinin kontrol edilebilmesidir (35).

*Sıvı perküsyon modeli (LFP)* ilk olarak Lindgren ve Rinder (1965) tarafından tavşanda kullanılmıştır. Kranyotomi sonrası sağlam dural yüzeye çarpan ve epidural boşlukta hareket eden hızlı bir sıvı bolusunun etkisiyle travma gerçekleşir. Trepanasyon bölgesi orta hatta veya lateralde paryetal kemikte olabilir. Perküsyon, beyin dokusunun yer değiştirmesini ve deformasyonunu sağlar ve yaralanma şiddeti basıncın titreşim (vuruş) kuvvetine bağlıdır (35).

*Enjeksiyon modelleri* ise kafa içine kan veya diğer sıvıların enjeksiyonu ile hematom oluşturulmasına dayanır. Subdural mesafeye kan enjeksiyonu akut subdural hematomu taklit eder. Beynin içine kan enjeksiyonu ile intraserebral hematom oluşturulur (36).

*Kriyojenik yaralanma modeli* fokal beyin hasarına yol açarak TBH ile ilişkili KBB bozulmasını ve vazojenik beyin ödemi araştırmak için geliştirilmiştir. Duraya, aseton ve kuru buz (-78°C) karışımıyla veya sıvı nitrojen (-183°C) ile doldurulmuş bir bakır silindir dokundurularak hasar oluşturulur. Bazı çalışmalarda, deneğin kafatasına doğrudan bir kuru buz pelet uygulanmıştır. Açıkta kalan kortekse temas süresi değiştirilerek farklı yaralanma şiddetleri elde edilebilir (34).

*Ağırlık düşürme modelleri*, fokal ve yaygın beyin hasarı oluşturmak için genellikle serbest düşen ağırlığın yerçekimi kuvvetini kullanır. Travmanın şiddeti, düşürülen ağırlığın büyüklüğü ve yükseklik değiştirilerek ayarlanabilir (33).

-Feeney ağırlık düşürme modeli: Travmanın sağlam duraya uygulanmasıyla gerçekleştirilen bu rat modeli kanama ve KBB'nin hasar gördüğü bir kortikal kontüzyonla sonuçlanır. Enflamatuar süreçler mikroglia ve astrositlerin ve kompleman sisteminin aktivasyonuna ve nötrofillerin ve makrofajların istilasına yol açar. Ayrıca gecikmiş mikrodolaşım bozuklukları bildirilmiştir (33).

-Shohami ağırlık düşürme modeli: Ratlarda veya farelerde korunmasız kafatasının bir tarafına ağırlık düşürülerek kapalı TBH oluşturulur. Yaralanma şiddeti, kullanılan ağırlığın kütesine ve düşme yüksekliğine bağlıdır. Modelin önemli bir avantajı gaz anestezisi altında hızlı bir şekilde uygulanabilmesi ve yaralanmadan hemen sonra nörolojik skorlamaya izin vermesidir (33).

-Marmarou ağırlık düşürme modeli: Yaygın beyin hasarı oluşturmak için geliştirilmiştir. Deneğin sağlam kafatasına sabitlenmiş metalik bir disk üzerine 450

gramlık ağırlık 1 veya 2 m yükseklikten düşürülür. 1 m seviyesindeki yaralanmada ölüm olmadığı, 2 m’de ise deneklerin %59’unun öldüğü görülmüştür (34).

Literatürde pediatrik thKT için farklı modeller kullanılmıştır. En yaygın olanları ağırlık düşürme, kontrollü kortikal etki ve sıvı perküsyon modelleridir. Bu modeller travmanın şiddetinin ayarlanabilir olması nedeniyle pediatrik grupta kullanılabilir ve tekrarlanabilir özelliğe sahiptir. Pediatrik TBH modelleri daha sıklıkla kemirgenlerde olmak üzere, 7-10 günlük kuzu, 1-5 günlük domuz yavrularında da uygulanmıştır.

## **2.2 Bilişsel (Kognitif) işlevler**

Kognisyon, insan zihninin dünyayı ve çevresindeki olayları anlamaya yönelik yaptığı işlemlerin tümüdür. Bellek, öğrenme, dikkat, zeka, okuma-yazma, anlama, isimlendirme, tekrarlama, hesaplama, konuşma akıcılığı, düşünme, algılama, yargılama, soyutlama, duyguları ortaya koyma ve gerçeği değerlendirme yetilerinin hepsi birer bilişsel işlevdir (37).

### **2.2.1 Dikkat**

Dikkat bilişsel kaynaklarımızı hedef uyarana odaklarken, diğer uyarıları kısmen ya da tamamen filtreleme/süzgeçleme yetisidir (37,38).

### **2.2.2 Öğrenme**

Bilgi ve deneyime dayanarak davranışı değiştirebilme yeteneği sürecidir. Nörofizyolojik açıdan öğrenme, yaşanan bir deneyim nedeniyle sinir sisteminde gelişen kimyasal, elektriksel ve yapısal bazı değişiklikler sonucu yeni sinaptik bağların kurulması olarak açıklanır. Yaşanan yeni bir olay, nöronlar arasında yeni bağların kurulmasını sağlar, tekrar ve alıştırmalar bu bağları kuvvetlendirir (38).

Öğrenme 3 temel aşamada tamamlanır (38):

- 1.Öğrenmenin kazanılması (belleğe alma): a) Kodlama, b) İlişkilendirme;
- 2.Bilginin saklanması (depolama): a) Kalıcı hale getirme, b) Yeniden yapılandırma;
- 3.Bilginin geri çağırılması (hatırlama): a) Tarama, b) Geri çağırma.

İki çeşit öğrenme bulunur (38):

1.Nonasosiyatif öğrenme: a) Habitüasyon (alışma), b) Sensitizasyon (hassaslaştırma);

2.Asosiyatif öğrenme a) Şartlı refleks, b) Operan koşullanma.

2.2.2.1. *Nonasosiyatif Öğrenme*: Organizmanın bir uyarana bir veya tekrarlı şekilde maruz bırakılmasıyla ortaya çıkan öğrenme çeşididir. Böylelikle uyarının özellikleriyle ilgili bilgi edinilebilir. Habitüasyon ve sensitizasyon olmak üzere iki çeşidi bulunur.

a) Habitüasyon (alışma): İlk defa uygulanan, birey için alışılmışın dışında olan ve reaksiyona neden olan nötral bir uyarının, tekrarlanarak uygulandığında, giderek daha az elektriksel cevap oluşturması ve organizmanın uyarana alışmasıdır. Habitüasyonda, uyarının geldiği nöronun presinaptik zarında uyarının iletilmesini sağlayan kalsiyum kanallarının inaktivasyonu ile daha az kalsiyumun presinaptik zara girmesi, böylece daha az nörotransmitter salgılanması sağlanır (37). Böylece gelen uyarı söndürölmüş, organizma uyarıya alışmış olur.

b) Sensitizasyon (duyarlılaşma): Tekrarlanan uyarının, hoş veya nahoš olan başka bir uyarana bir veya daha fazla sayıda bir arada verilmesiyle daha büyük bir cevap meydana getirmesidir. Presinaptik uçtaki kalsiyum kanal etkinliğinin uzamasıyla kalsiyum yoğunluğu artar, buna bağlı olarak presinaptik sonlanmadan salınan nörotransmitter miktarı arttırılır (38).

2.2.2.2. *Asosiyatif Öğrenme*: Bir uyarana başka bir uyarının ilişkilendirildiği bir öğrenme çeşidi olan asosiyatif öğrenmenin iki tipi bulunur (38).

a) Klasik koşullanma (şartlı refleks): Tek başına verildiğinde cevap oluşturmayan veya çok az cevap oluşturan bir uyarının, cevap oluşturan başka bir uyarana tekrar tekrar verilmesi ve ilk uyarının tek başına verildiğinde de cevap oluşturması şeklinde meydana gelen refleks bir cevaptır (Rus fizyolog Ivan Pavlov'un köpeklerde yaptığı deney). Koşullu uyarının koşulsuz uyarandan önce gelmesi zorunludur (38).

b) Operan koşullanma: Organizmaya ödöl vererek veya cezadan sakınarak bazı görevleri yapmanın öğretildiği koşullanma şeklidir. Yiyecekte iğrenme koşullanması örnek verilebilir. Eğer tat alma, bulantı veya rahatsızlık meydana getiren bir ilacın verilmesiyle birlikte olursa, yiyeceğin tadını alan hayvanda yiyeceğe karşı kuvvetli bir iğrenme gelişir (38).

### 2.2.3 Bellek

Bellek bilgi ve yaşantıları kaydetme, saklama, tanıma ve geriye çağırma yetisidir. Deklaratif (eksplisit) ve prosedürel (implisit) olmak üzere iki tipi vardır:

Deklaratif (eksplisit, açıklayıcı) bellek, bilgiyi, olayları ve deneyimleri bilinçli bir şekilde akılda tutma ve hatırlama olarak ifade edilir. Kişiler, yerler ve nesnelere hakkında bilgi verir. Kendi içinde anlamsal (semantik) ve anısal (epizodik) bellek olarak ayrılır. Anlamsal bellek kelimeler, kurallar ve dil hakkında genel bilgileri, anısal bellek özgül bir zaman ve mekan içinde meydana gelen olayları ve deneyimleri ifade eder. Hipokampus, amigdala ve limbik sistemin diğer parçaları deklaratif bellek oluşumu için gereklidir (39).

Prosedürel (implisit, işlemsel, becerisel) bellek, neyin nasıl yapılacağına ait bellektir. Bir kez kazanıldıktan sonra bilinç gerektirmeden kendiliğinden gerçekleşen beceri ve alışkanlıkları kapsar: Bisiklete binmek, müzik aleti kullanmak gibi. Örumcekten korkmak gibi öğrenilmiş duygusal tepkileri de içerir. Bu tip belleğe katılan birincil alanlar sensorimotor korteks, bazal çekirdekler ve beyinciktir. Bireylerde deklaratif bellekte ciddi defisitler olsa bile prosedürel bellek sağlam olabilir (39).

Bellek süre açısından değerlendirildiğinde kısa, orta ve uzun süreli bellek olarak gruplandırılır. Kısa süreli bellek çok kısa ömrü olan anlık bellekten gelen bilgiyi bir süre akılda tutabilmeye yarar. Kısa süreli belleğe gelen bilgi ya ihmal edilir, unutulur, ya tekrar edilerek kısa süreli hafızada tutulur, ya da uzun süreli belleğe aktarılır. Orta süreli bellek, bilgilerin ve anıların dakikalarca ve haftalarca saklandığı bellektir. Anılar daha kalıcı biçime dönüşmek üzere tekrar edilmedikçe giderek söner ve yok olurken, tekrar edildikçe uzun süreli belleğe dönüşebilir. Çalışmalar orta süreli anıların presinaptik sonlanma veya postsinaptik zardaki birkaç dakikadan birkaç haftaya kadar kalıcı olabilen kimyasal veya fiziksel değişikliklerden kaynaklandığını göstermiştir. Uzun süreli bellek bilgilerin günlerden yıllara kadar saklanabildiği ve ilerleyen bir zamanda hatırlanabildiği bellektir. Yalnızca sinapslardaki kimyasal değişiklikleri değil, yapısal değişiklikleri de içerir. Kısa süreli belleğin, haftalar veya yıllar sonra hatırlanabilmek üzere uzun süreli belleğe dönüştürülmesine konsolidasyon (pekiştirme) denir (37-39).

Uzun süreli belleğin oluşabilmesi için yeni sinapslarda yeni protein sentezi gerekir. Sinaptik plastisitede uzun dönemde artan değişiklikler uzun süreli potansiyalizasyon (LTP) olarak adlandırılır (39).

Çalışma belleği, yürütülen göreve ilişkin bilginin etkin biçimde saklanmasını, kolayca ulaşılmasını ve değerlendirilmesini sağlar. Bazen kısa süreli bellek olarak

tanımlansa da manipüle edilebiliyor olması ve altta yatan nöral yapıların farklı oluşu çalışma belleğini kısa süreli bellekten ayırır. Çalışma belleği prefrontal korteksle ilişkilidir (40).

Mekansal bellek ise, canlının çevresel konum ve mekansal oryantasyonla ilgili bilgisinin kaydedilmesini ifade eder. İnsanlarda mekansal verilerin ve bilgilerin alınıp depolanmasından özellikle sağ hipokampusun sorumlu olduğu bilinmektedir (41).

Bilişsel işlevlerin yalnızca belirli anatomik yapılarla sınırlı olmayıp bu bölgeleri birleştiren asosiasyon alanlarıyla da ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu asosiasyon alanları içinde prefrontal ve limbik korteks bulunur (42).

### **2.3. Öğrenme ve Bellekle İlgili Beyin Bölgeleri**

#### **2.3.1. Limbik sistem**

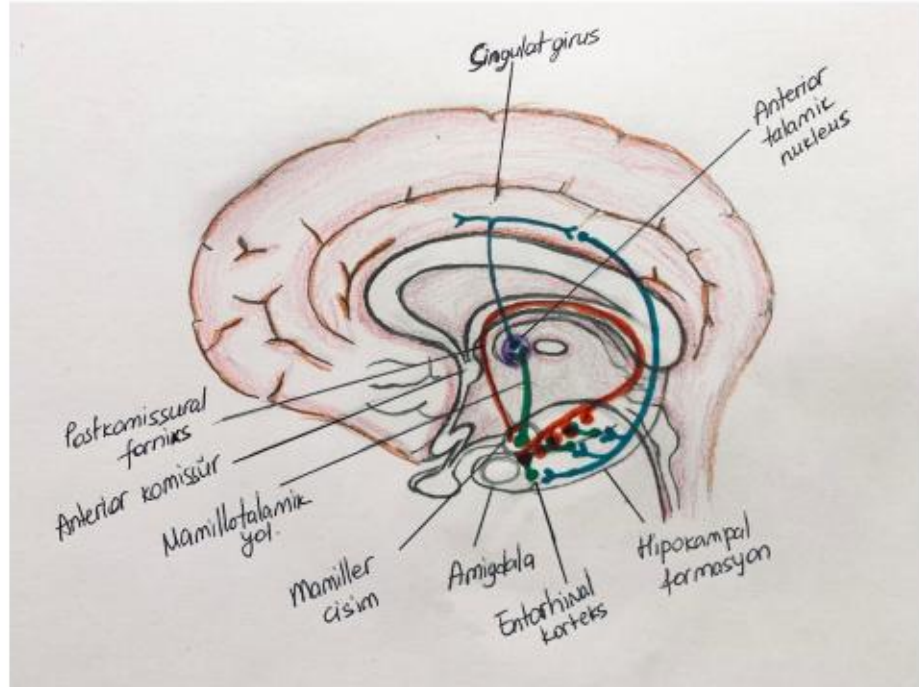
Limbik sistem duygusal süreçlerin kortikal kontrolünde ve bellek işlevlerinde görev alan beyin bölgelerini içerir ve hipokampus, hipotalamus, parahipokampal alan, girus singuli, subkallozal oluşumlar, talamusun ön çekirdekleri, nükleus akkumbens, orbitofrontal korteks, septal alan ve amigdaladan oluşur (37,42). Temel işlevleri, yeme davranışı, saldırma ya da kaçma reaksiyonu, agresyon ve cinsel içgüdülerin duygusal, otonomik ve endokrin yönünün sergilenmesine yöneliktir. Limbik sistem içinde bulunan hipokampus, özellikle hafıza ve mekânsal (üç boyutlu) problem çözmeye önemli rol oynar (37).

#### **2.3.2. Hipokampus**

Hipokampus, bir gri madde yapısı olup, 5-8 cm uzunluktadır, temporal lobun medial kısmında bulunur ve lateral ventrikülün temporal hornu ile yakın komşuluk içindedir. Embriyolojik olarak koroid fissür kavsinin dış parçasından gelişir. Koronal kesit incelemesinde denizatına benzediği için bu isimle anılır, “Ammon boynuzu” olarak da adlandırılır. Amigdaloid çekirdeklerle, temporal lobun ventromedial korteksini oluşturan parahipokampal girus arasında konumlanır (42,43).

Hipokampusun korteks yapısı, genişliğine, hücre yoğunluğuna ve hücre büyüklüğüne göre dört bölüme ayrılır: Kuyruk kısmı (CA1), kuyruğa yakın gövde kısmı (CA2), baş bölgesine yakın gövde kısmı (CA3) ve baş bölümü (CA4). CA1, CA2 ve CA3 esas hipokampusu oluşturur. İnsanlarda CA1 en büyük bölümdür, ayrıca piramidal nöronları hipoksik hasara en duyarlı bölgedir (43).

Hipokampus, dentat girus, subikuler kompleks, entorhinal korteksle (Brodman alan 28) birlikte “hipokampal formasyon”u oluşturur. Hipokampal formasyon serebral korteks, amigdala, hipotalamus, medial septal alan, mamiller cisimler gibi temel limbik sistem bölgeleriyle sayısız dolaylı bağlantılar içerir. Bu bağlantılar Papez halkasını oluşturur (Şekil 1). Hipokampal formasyon bilgiyi işler ve forniks aracılığıyla hipotalamusun mamiller cisimlerine iletir. Hipotalamus da singulat girusa bilgi akışını sağlar. Hipotalamustan çıkan bu bilgi sırasıyla mamiller cisimden anterior talamik çekirdeğe, ardından singulat girusa iletilir (42).



**Şekil 1:** Papez halkası

Hipokampus bellek ve öğrenmede kilit rol oynar ve bilginin bellekte kalıcı hale getirilmesini sağlar. İşlevi özellikle kısa süreli hafızayla ilgilidir. Epizodik hafıza, her gün yaşanan anıların kaydedildiği hafızadır. Bu anıların, mekanizma ne olursa olsun sağ ve sol hipokampus olmadan sözel veya görsel olarak kalıcı hale gelmesi mümkün değildir. Görsel hafızada sağ hipokampus, sözel hafızada sol hipokampus daha çok işlev görür ve bu bölgelerin hasarında ilgili hafızalarda kayıp görülür (37,43). Deneysel çalışmalarda hipokampustaki hücrelerin konum (yer) hafızasını da taşıdığı gösterilmiştir. Konum hafızası hipokampusun dentat girusun granüllü hücrelerinde saptanmış olup yapılan deneylerde denekler daha önce geçtiği yerlerden geçerken bu sınırlarda aktivasyon olduğu gösterilmiştir.

Hipokampusu etkileyen lezyonlarda görülen amnezide anıların kısa süreli bellekten uzun süreli belleğe alınmasında sorun vardır. Kelime bilgisi, genel kültür seviyesi ve uzak hafıza ise etkilenmez (39,43).

### **2.3.3. Prefrontal korteks (PFK)**

Hipokampusun bellek işlevi üzerindeki etkisi yarım yüzyıldır bilinmesine karşın, frontal korteksin belleğe katkısıyla ilgili bilgiler yenidir (44). *Gyri frontales superior, medius ve inferior*'un önemli bir kısmı ile *gyri orbitales ve gyrus cinguli*'nin ön yarısı PFK'ı oluşturur (40). PFK, hafıza, öğrenme, motor cevabın planlanması, düşüncelerin olgunlaştırılması ve bilgilerin analizi gibi işlevleri gerçekleştirir (45). Aynı zamanda kişilik ve davranışların oluşmasında, dikkatin oluşturulması ve sürdürülmesinde, kelimelerin tanınması gibi bilişsel işlevlerde de görev alır. Okumadan konuşma yapma, matematiksel işlem yapma, satranç ve briç oynama, fikir yürütme, hayal kurma, ileriye planlama gibi işlevleri de vardır (40).

Frontal lob işlev bozukluğunda, konfabulasyon sık gözlenen bir bellek kusurudur. Geri çağrılan bilginin özelleştirilmesinde ve anımsanan bilginin doğrulanması ve denetlenmesinde bozulma söz konusudur (45). Sağ prefrontotemporal bölgedeki hasar olaysal bilgiyi geri çağırma, sol hemisfer hasarı ise anlamsal bilgiye ulaşamamaya yol açar. PFK ayrıca dikkat gerektiren davranışlarda da önemli rol oynar (45).

Hipokampus ve medial temporal lob yeni bilgi öğrenmede, frontal-subkortikal alanlar daha önceden edinilen bilgileri hatırlamada görevlidir. Bundan dolayı hipokampus hasarında “anterograd amnezi” olurken, PFK hasarında “retrograd amnezi” ortaya çıkar. Yaşın artmasıyla birlikte hem hipokampal hem prefrontal kaynaklı bellek işlevlerinde bozulmalar görülebilir (44).

### **2.4. Öğrenmede rol oynayan nörotransmitterler**

Öğrenmede rol alan nörotransmitterler öncelikle glutamat, gama aminobutirik asit (GABA), dopamin, asetil kolin (ACh), serotonin (5HT) ve norepinefrin (NE) olarak bildirilmiştir ve öğrenmede bu kimyasalların karşılıklı ilişkisi söz konusudur. Ayrıca enkefalinler, vazopresin, adrenokortikotropik hormon, epinefrin, endorfinler, anjiyotensin II, nörotensin gibi nörohormonal maddeler de öğrenmede etkilidir. Hafızanın mekanizmasında rol alan birçok nörokimyasal madde de bilinir. Bunlar arasında protein kinaz-C (PKC), adenilat siklaz (cAMP), protein kinaz-A (PKA) ve kolesistokinin bulunur.

Belirtilen nörokimyasallar öğrenme üzerine etkili olurken bazı caerulein ve PKC inhibitörleri hafızanın bazı bileşenleri üzerinde inhibitör etki gösterir (39,46).

**Glutamat:** Glutamat, beyinde eksitator özellikler gösteren, aminoasit yapılı nörotransmitterdir. Hipokampusta yoğun olarak mevcuttur. Düşük dozlarda bellek için önemlidir. İnme ve TBH'nda glutamaterjik uyarı artar. Öğrenme için gerekli olan hipokampustaki LTP, N-metildiaspartat (NMDA) reseptör aktivasyonunu gerektirir (44). LTP glutamaterjik aktivitenin yoğun olduğu hipokampal CA1 bölgesinde daha çok gerçekleşir. AH'nda LTP işlevi bozulur. CA1 ve CA2 bölgelerindeki glutamaterjik nöronların glutamat reseptörlerinde azalma mevcuttur. Bu sorunlar AH ve bilişsel bozukluklara yol açar (44). Mevcut çalışmalarda AH'nda, glutamaterjik yolların dejenerasyonunun, hipokampal ACh salınmasını azalttığı ve amiloid plak oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (39).

**Asetil kolin:** Bellek işlevinde önemlidir. Kolinerjik sistem öğrenme ve kısa süreli bellek işlevleriyle ilişkilidir. Kolinerjik nöronlarda dejenerasyon, başta AH olmak üzere çeşitli demansların ortaya çıkmasına sebep olur. Antikolinerjik ilaçlar bellek bozukluğuna yol açar. Bu etkiye yaşlılar daha duyarlıdır. AH'nda ACh sentezinde yetersizlik dışında, sentezden sorumlu kolinasetil transferaz enzimi de azalmıştır (39,46).

**Serotonin:** Bilişsel işlevlerde 5HT'nin de rolü mevcuttur. Bazı AH olgularında dorsal raphe çekirdeğinde nöronal kayıp vardır. 5-HT<sub>2A</sub> reseptörleri ve 5HT<sub>2C</sub> reseptörleri öğrenme-bellekle ilişkilidir. Sıçan deneylerinde 5HT agonistlerinin, belleği ve asosiyatif öğrenmeyi artırdığı bulunmuştur (39,46).

**Norepinefrin:** Beyinde NE yollarının merkezi olan *locus ceruleus*'tan çıkan lifler limbik sistem, hipotalamus ve kortekse yayılır. Azalmış NE aktivitesi depresyon, dikkat ve konsantrasyon azalması, işlevsel bellekte yetersizlikle ilişkilidir. Deneysel çalışmalarda orta düzeyde NE'nin belleği olumlu etkilediği, strese bağlı yüksek miktarda salınan NE'nin ise belleğe zarar verdiği bulunmuştur. NE amigdala ile ilişkili duygusal belleği de etkiler (47).

**Dopamin:** MSS'nin dopaminerjik yolları olan mezolimbik ve mezokortikal yollar bilişsel işlevleri etkiler. Dopaminerjik innervasyonu olan bölgelerde LTP'nin gerçekleşmesinde endojen dopamin modülatör olarak rol oynar. Dopamin sinapslarda cAMP ve/veya kalsiyum düzeylerinde değişime neden olup LTP oluşumunu etkiler. Öğrenme-bellek işlevleriyle ilişkili nöronal aktiviteler için

önemlidir. Hipokampal dopaminerjik sistem uzaysal bellekle ilişkiliyken, striatal dopaminerjik sistem Parkinson Hastalığındaki (PH) bilişsel olaylardan sorumludur (37,46).

**Gama aminobütirik asit:** Beynin ana inhibitör nöromediyatörüdür (46). Çalışmalarda GABA-erjik ilaçların bellek retansiyonu ve öğrenmeyi etkilediği gösterilmiştir. Genellikle GABA-erjik ilaçlar belleği bozarken, antagonistler güçlendirir. Bir trisiklik antidepresan olan imipraminle yapılan bir çalışmada, imipraminin neden olduğu bellek bozukluklarından GABA-B reseptörlerinin sorumlu olabileceği bildirilmiştir (38,46).

### **2.5. Zenginleştirilmiş Çevre ve Komponentleri**

İlk olarak 1940'larda Dr. Donald Hebb evde barındırılan hayvanlarla laboratuvar ortamında barındırılan deney hayvanlarının farklı davranışlar sergilediğini fark etmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda, yaşamın her döneminde, gençlerin yanı sıra yaşlı deney hayvanlarında da ZÇ'nin nöronlarda yapısal ve işlevsel değişikliklere yol açtığı ve öğrenme ve bellek işlevlerini güçlendirdiği gösterilmiştir. ZÇ beyinde çeşitli nöroplastik değişiklikleri uyarmak için kullanılan deneysel bir manipülasyon yöntemidir (5).

Zenginleştirilmiş çevre, laboratuvar hayvanlarını daha fazla fiziksel ve/veya sosyal uyarıya maruz bırakmak anlamında kullanılan bir terimdir. 2 tipi vardır: Fiziksel ve sosyal zenginleştirme (5,47): Fiziksel zenginleştirme daha çok yapısal modifikasyonları içerir. Burada geniş bir yaşam alanı içinde platformlar, rampalar, plastik ve tahta oyuncaklar, küçük evler, salıncaklar, merdivenler, ziller, ipler, egzersiz yapılabilecek koşu tekerleri ve tüneller gibi uygun boyuttaki hayvan oyuncakları bulunur. Bu nesnelerin tümü aynı anda konulmaz, belirlenmiş zaman aralıklarında (genellikle haftada bir) yenileriyle değiştirilir ya da yerleri değiştirilmek suretiyle ortamda farklılık sağlanır (5). Sosyal zenginleştirme ise denekleri aynı alanda gruplar halinde barındırmayı ifade eder. İdeal olan, fiziksel ve sosyal zenginleştirmenin aynı anda uygulanmasıdır (5).

Zenginleştirilmiş çevrenin MSS'ndeki yapısal ve işlevsel değişikliklerle nörokimyasal parametreler üzerine etkisini inceleyen pek çok çalışma yapılmıştır. Çalışmalarda ZÇ'nin beyin gelişimi ve plastisitesinde önemli rol oynadığı, dendritlerin sayısı, boyut ve dallanmasında, nörogenezde, sinaps hacim ve sayısında, kortikal ağırlıkta, sinaptik protein 5 ekspresyonunda, beyin kaynaklı sinir büyüme

faktörü (BDNF) ve sinir büyüme faktörü (NGF) gibi büyüme faktörlerinin düzeylerinde artışa yol açtığı bildirilmiştir.

Ancak ZÇ'nin hangi moleküler mekanizmayla bellek ve öğrenmeyi etkilediği kesin olarak bilinmemektedir (48). ZÇ'de tutulan deneklerin hipokampusunda bilişsel işlevlerin birleştirilmesi ve öğrenme-bellek performanslarının artmasında önemli rolü olan BDNF kodlayan mRNA ile NGF kodlayan RNA'ların ekspresyonları artar (48). BDNF, kolinerjik ve glutamaterjik sistemlerin nörokimyasal değişkenlerini yeniden şekillendirerek görsel kortikal plastisiteyi artırır ve belleği güçlendirir, dentat girusta nöron kaybını önler (49).

Zenginleştirilmiş çevrede bulundurulan deneklerde hipokampusta cAMP yanıtından sorumlu olan cAMP Response Element Binding (CREB) proteinin immunreaktivitesinin arttığı, yaşlı deneklerde ise beyin korteksinde cAMP seviyesinde artış olurken, hipokampusta olmadığı bildirilmiştir. PKC ve PKA'nın erken ve geç dönem bellek formasyonunda rol aldıkları düşünülmektedir (50). ZÇ PKA'ya bağlı hipokampal LTP indüksiyonundan sorumlu mekanizmalarla etkileşir ve LTP'yi artırır. NMDA reseptör aktivasyonu olduğu ve moleküler yolların birbiriyle etkileştiği bildirilmiştir (51). Ayrıca ZÇ'de tutulma beyin/vücut ağırlığı oranını ve kortikal kalınlığı artırır. Önemli bir çalışmada ZÇ'de tutulan deneklerde travma sonrası kortikal lezyon hacminin küçüldüğü gösterilmiştir (52).

Sonuç olarak ZÇ'nin, nöronal plastisite üzerinde olumlu etkileri olduğu ve nörodejeneratif hastalıklar, PH, AH, depresyon, şizofreni, TBH, epilepsi, otizm ve inme gibi durumların tedavisinde kullanılabileceği bildirilmiştir (52).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

Bu çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bağcılar Sağlık Uygulama Araştırma Merkezi Deneysel Araştırma Merkezinde (BADABEM) Tıpta Uzmanlık Eğitimi Yönergesine dayanarak ve Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı alınarak yapıldı (Proje No: 2020-33). Çalışma hastane döner sermayesi tarafından desteklendi.

Çalışmada 80 adet PN 10 günlük 20-30 gr ağırlığında Sprague-Dawley cinsi rat cinsiyet farkı gözetilmeden kullanıldı. Ratlar, 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü olan, iyi havalandırılmış, %60 rölatif nem oranına ve 20-24 °C ortam sıcaklığına

sahip, 4-6 hayvanlık standart ölçülerdeki (34x41x16 cm; uzunluk x genişlik x yükseklik) kafeslerde korunup, yem ve su ile *ad libitum* olarak beslendi. Denekler biyoistatistik uzmanı tarafından yapılan istatistiksel güç analizi hesaplamalarına göre her grupta 10 rat olacak şekilde 8 gruba ayrıldı (Tablo 1).

Çalışmanın 1. günü (PN 10. gün) tüm gruplara denge testi, EDT ve YNT'nin alışma aşaması, 2. gün (PN 11.gün) YNT'nin 1 dakikalık hatırlatma denemesinden 1 saat sonra gerçek test yapıldı. Ardından kontrol grupları dışında diğer gruplardaki ratlara (Grup I-VI) anestezi uygulandı. Gereken anestezi derinliği sağlandıktan sonra kısa ve uzun sham gruplarındaki ratlar (Grup V ve VI) uyandırıldı. Kontrol ve sham grupları hariç diğer gruplardaki ratlar ise (Grup I, II, III, IV) anestezi sonrası travma düzeneğine alınarak travmaya maruz bırakıldı. Bu işlem 24 saat arayla 5 kez tekrarlandı (11-15.günler). Her travma sonrası ratlar kafeslerine alındı ve anesteziden uyanmaları, genel durum kontrolü için gözlemlendi.

Erken tedavi grubundaki (Grup I) ratlar travmanın son günü (PN 15.gün), geç tedavi grubundaki (Grup III) ratlar travmadan sonra 10. gün (PN 25. gün) zenginleştirilmiş kafese (ZK) yerleştirildi. PN 16. gün itibariyle tüm ratlara planlanmış günlerde belirli davranış-motor ve öğrenme testleri yapıldı (Tablo 2). Yavru ratlar süttten kesildikten sonra (PN 25. gün) annelerinden ayrıldı.

**Tablo 1:** Deney grupları ve uygulanan işlemler

Gruplar	Sayı (n)	Grup İsmi	Uygulanan İşlem
Grup I	10	Travma ve erken tedavi	NK, 5 TT (PN 11-15.gün), PN 15. günde ZK, PN 50. gün sakrifikasyon
Grup II	10	Travma ve erken histoloji	NK, 5 TT (PN 11-15.gün), PN 16. gün sakrifikasyon
Grup III	10	Travma ve geç tedavi	NK, 5 TT (PN 11-15.gün), PN 25. günde ZK, PN 50. gün sakrifikasyon
Grup IV	10	Travma ve geç histoloji	NK, 5 TT (PN 11-15.gün), PN 50. gün sakrifikasyon
Grup V	10	Kısa sham	NK, 5 A (PN 11-15.gün), T yok, PN 16. gün sakrifikasyon
Grup VI	10	Uzun sham	NK, 5 A (PN 11-15.gün), T yok, PN 50. gün sakrifikasyon
Grup VII	10	Kısa kontrol	NK, A ve T yok, PN 16. gün sakrifikasyon
Grup VIII	10	Uzun kontrol	NK, A ve T yok, PN 50. gün sakrifikasyon

A: anestezi, NK: normal kafes, PN: postnatal, T: travma; TT: tekrarlayan travma; ZÇ: zenginleştirilmiş kafes

**Tablo 2:** Deney gruplarına uygulanan testler

Gün	Test
PN 10. Gün	Denge ve Eğik düzlem
PN 10-11. Gün	Yeni nesne tanıma
PN 16-17-18. Gün	Denge ve Eğik düzlem
PN 26-30. Gün	Morris su labirenti
PN 34-35. Gün	Yeni nesne tanıma
PN 43. Gün	Yükseltilmiş artı labirent

PN: Postnatal

Tüm testler tamamlandıktan sonra II, V, VII gruplardaki ratlar PN 16. günde, I, III, IV, VI, VIII gruplardaki ratlar PN 50. günde, anestezi altında sakrifiye edildi. Sakrifikasyon işlemi sırasında alınan beyin dokuları SBÜ Bağcılar SUAM Patoloji Anabilim dalı laboratuvarına gönderildi ve orada temporal ve frontal korteks ve hipokampus bölgeleri çıkarılarak parafin bloğa gömüldü. Sonrasında 2 µ kalınlığında kesitler alındı ve HE, gümüş, Nissl boya ile boyanarak histopatolojik açıdan incelenmek için hazırlandı. Aynı zamanda mikrogliozisi göstermek için İBA-1, mikrogliya alt tiplerini değerlendirmek için iNOS ve ARG-1, geç dönemdeki serebral dejenerasyonu göstermek amacıyla p-TAU 181, p-TAU 231, travmaya bağlı akson hasarını değerlendirmek için APP, Aβ, S100 B immunohistokimyasal boya ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi.

### 3.1. Anestezi uygulanması

Anestezi induksiyonu için ratlar 20×13×13 cm (uzunluk x genişlik x yükseklik) boyutlarında olan ısı kontrollü pleksiglas bir kutunun içine yerleştirildi. Kutuyla anestezi makinesi arasında gaz akımını sağlayan boru vasıtasıyla ratlara induksiyon için 1-2 dakika süresince %4-5 izofluran/%100 oksijen 0,5-1,0 L/dk hızla, idame için yine 1-2 dk süresince %1-2 izofluran/%100 oksijen 0,5-1,0 L/dk hızla inhalasyon yoluyla verildi. Anestezi süresince ratlar monitörize edildi (Datex-Ohmeda S/5 Avance, General Electric) ve solunum hızı, derinliği, ten rengi gözlemlendi. Anestezinin etkinliği dört ayak üstüne kalkma refleksinin olmaması, ayak ucunun ve kuyruğun sıkılması ile kontrol edildi.

### 3.2. Travma uygulanması

Travma düzeneği 1 m uzunlukta 2 cm çapında her iki ucu açık metal tüpten oluştu. Ağırlığın planlanan yükseklikte kalması ve serbest düşebilmesi için tüpün

üzerinde 80 cm yükseklikte iki delik açıldı ve bu deliklerden geçecek şekilde birer pim yerleştirildi.

Düzenegın alt kısmına 16 cm uzunluk, 10 cm genişlik ve 23 cm yükseklikte “U” şeklinde bir kutu konuldu. Kutunun üzeri ortası yüzeysel şekilde çizilmiş alüminyum folyo ile örtüldü, kutunun içine alüminyum folyodan 10 cm aşağıda olacak şekilde ayarlanmış 16 cm uzunluk, 10 cm genişlik ve 13 cm yükseklikte bir sünger yerleştirildi. Tüp alüminyum folyoya 2,5 cm yükseklikte duracak şekilde konumlandı ve böylece ağırlığın ratın verteksine 2,5 cm’den vurması sağlandı. Ağırlıklar her biri 10 g ağırlıkta, çapı 1,5 cm, kalınlığı 1 cm olan pirinçten hazırlandı ve 3 ağırlık birbirine sarılarak toplam 30 g ağırlığa ulaşıldı.

Anestezi sonrası ratlar yüzükoyun pozisyonda verteksi tüpün altına gelecek şekilde alüminyum folyonun üzerine yatırıldı ve pim çekilerek pimin üzerine yerleştirilmiş 30 g ağırlık 80 cm yükseklikten ratların orta hatta bregma ile lambdoid sütürleri arasına düşürülerek travma oluşturuldu (Resim 1). Ağırlık ve çarpmanın şiddetiyle ratlar alüminyum folyoyu yırtarak kutunun içindeki süngerin üzerine düştü. Travma sonrası ratlar kutudan alınarak kafeslerine konuldu. Burada ratların 2-3 dak içinde hareketlendiği gözlemlendi. Her rat için travma öncesinde düzenek kontrol edildi ve alüminyum folyo yeniden hazırlandı. Bu şekilde I-IV gruptaki deneklere günde bir defa 5 gün ardarda travma uygulandı. Her travma sonrası deneklere analjezik olarak 2mg/mL parasetamol içme suyuna katılarak verildi.

Travma sırasında ve sonrası takip süresinde toplam 6 denek kaybedildi ve protokolden çıkarıldı (Tablo 3).



**Resim 1:** Ratlara ağırlık düşürme modeli ile travma uygulanması.

**Tablo 3:** Deney protokolünden çıkarılan ratlar

Grup I	No 61	1.travma anında kafasında çökme kırığı
Grup I	No 15	1.travma sonrası ilk gün ağır TBH, sağ gözde ekimoz
Grup II	No 11	2. travma sonrası vücut ağırlığının %20'den fazla kayıp
Grup III	No 5	5. travma sonrası 2. gün vücut ağırlığının %20'den fazla kaybı
Grup III	No 25	5. travma sonrası 5. gün vücut ağırlığının %20'den fazla kaybı
Grup IV	No 10	3. travma sonrası vücut ağırlığının %20'den fazla kaybı

### 3.3. Deneklere uygulanan davranış testleri

Tüm denekler, davranış ve öğrenme testlerinden önce alışma için 30 dak. boyunca test odasına bırakıldı. Her test sonrası düzenekler koku ipuçlarını en aza indirmek için %70'lik etil alkolle silinerek temizlendi.

#### 3.3.1. Denge testi

Denge testi ve EDT ratların motor fonksiyon, sensörinöral denge ve koordinasyonunu test etmek için tasarlanmıştır. Test düzeneği 90 cm yükseklikte yerleştirilen 1,5 cm genişlik 80 cm uzunluk ve 1 cm kalınlıkta ahşap yürüyüş yolundan, 12 cm uzunluk, 6 cm genişlik, 2 cm kalınlıkta başlangıç ve son platformlardan, aynı zamanda düşmede hasarı önlemek için yumuşak bir muhafaza sisteminden oluştu. Tüm ratlara deney öncesi eğitim verildi. Öğrenme testinde deneğin 3 ardışık test süresinde yürüme platformu üzerinde durma süreleri kaydedildi (Resim 2). Öğrenme testi sonrası ratlar kafeslerine alınarak 2 saat dinlendirildi, ardından gerçek teste geçildi. Gerçek testte deneğin 3 ardışık test süresinde yürüme platformu üzerinde 60 sn durması başarılı kabul edildi (53).



**Resim 2:** Denge testi ve eğik düzlem testinin uygulanması. A, B: Deneyin denge düzeneğinde görüntüsü C: Deneyin 70 derece açıda eğik düzlem düzeneğindeki görüntüsü.

### ***3.3.2. Eğik düzlem testi***

Denek 45 derece açılı platform üzerine yerleştirildi ve platformun açısı 5'er derece arttırılarak 85 dereceye kadar çıkarıldı. Deneğe deney öncesi eğitim verildi. Her açı için 10 sn süren 3 deneme testi yapıldı. Her 3 denemede deneğin o açıda ne kadar kaldığı kaydedildi ve 3 denemenin ortalaması alındı. Öğrenme testi sonrası ratlar yine kafeslerine alınarak 2 saat dinlendirildi, sonrasında gerçek teste geçildi (Resim 2).

Gerçek testte her açı için 10 sn süren 3 ardışık test yapıldı. Sonuçta deneğin kendi pozisyonunu 10 sn süresiyle koruyabildiği en yüksek açı kaydedildi. Normal kriterlere ulaşmak için deneğin 70 derece açılı platform üzerinde test süresince 10 sn kalması gerekir (53,54).

### ***3.3.3. Morris su labirenti testi***

MSL 1981'de Morris tarafından uzamsal bellek ve yer öğrenme yeteneğini değerlendirmek için tasarlanmıştır (55). Labirent 180 cm çap ve 60 cm yükseklikte bir havuzdan oluşur. Havuz 28 cm derinliğinde su ile dolduruldu. Sıcaklığı 26 +/-1 °C olacak şekilde ayarlandı. Havuz eşit şekilde 4 alana bölündü. Kaçış platformu olarak, 10x10 cm çaplı ve 26 cm yükseklikte bir platform kullanıldı, platform su

yüzeyinden 2 cm aşağıya hedef bölge olarak seçilen 4. kadrana yerleştirildi. Havuzun suyu ratlar için zararlı olmayan gıda boyası ile beyaza boyandı. Havuzun bulunduğu odanın duvarlarına 3 farklı yönde görsel ipuçları yerleştirildi ve bunların havuzun içinden görülebilir olmasına özen gösterildi. Bu ipuçları ratın çevre ve kaçış platformu arasında ilişki kurup hipokampusunda özel haritasını oluşturarak kaçış platformunun yerini bulmasında yardımcı olmaktadır. Ratın yüzme hareketlerinin kayda alınması ve değerlendirilmesi için video izleme sistemi kullanıldı.

Deneklere PN 26. günden itibaren art arda 4 gün öğrenme testi, 5. gün bellek testi uygulandı. Her bir öğrenme testinde, ratlar havuzun içine yüzü duvara dönük olmak üzere sırasıyla 4 başlangıç noktasından birine yerleştirildi. Ratlara kaçış platformunu bulmaları için maksimum 120 saniye verildi. Bu süre içinde bulmaları halinde, deneklerin platformda 5 saniye kalmasına izin verildi, aksi takdirde ratlar kuyruklarından yakalanarak platformun üzerine yönlendirildi ve 30 sn orada kalmasına izin verildi. Her yüzdürme sonrası ratlar kağıt havlu ile kurutularak ısıtılmış kafeslerine götürüldü. Tüm deneklerin saklı platformu kaçınıcı saniyede buldukları kaydedildi (Resim 3).

Beşinci gün (PN 30) bellek aşamasında saklı platform çıkarıldı ve rat saklı platformun yerleştiği alandan en uzak nokta olan 2. ve 3. kadrانların kesişme noktasına konumlandırıldı. 30 sn süresince havuzu serbest dolaşarak incelemesine müsaade edildi. Yine video izleme sistemiyle kaçış platformunu aramak için hedef alanda geçirdiği süre kaydedildi (53).



### Resim 3: Sıçanların Morris su labirentindeki görüntüsü

#### 3.3.4. Yeni nesne (obje) tanıma testi

Farklı öğrenme ve hafıza aşamalarını test etmek için nispeten hızlı ve etkili bir araç olan bu test 1988'de Ennaceur ve Delacour tarafından tanımlanmış ve esas olarak ratlarda kullanılmıştır (56). Test, en az üç aşamaya dayanır: Alışma (öğrenme), hatırlatma ve gerçek test aşamaları (53). Öğrenme aşaması sadece iki özdeş nesnenin görsel olarak keşfedilmesini içerirken, test oturumu daha önce keşfedilen nesnelere birinin yeni bir nesneyle değiştirilmesini gerektirir. Kemirgenler doğuştan yenilik tercihine sahip olduklarından, tanıdık nesneyi hatırlayan bir kemirgen, yeni nesneyi keşfetmek için daha fazla zaman harcar (56).

Düzenek, yetişkin ratlar için 71 cm uzunluk, 51cm genişlik, 51 cm yükseklikte, infant ratlar için 52 cm uzunluk, 32 cm genişlik, 32 cm yükseklikte dikdörtgen ahşap bir kaptı. Çalışmayı yürüten kişinin ratı ve nesnelere aynı anda gözlemleyebilmesi için kabın üstü açıktı. Test süresince her rat için 3 nesne kullanıldı: Kalıcı, tuzak ve yeni nesne (yavru ratlar için kalıcı ve tuzak nesne olarak 2 adet 3,3 cm çap ve 1,5 cm yükseklikte yuvarlak beyaz ahşap lego, yeni nesne olarak 3 cm uzunluk, 3cm genişlik, 2 cm yükseklikte kare şekilli mavi plastik lego; yetişkin ratlar için kalıcı ve tuzak nesne olarak 2 adet 9 cm uzunluk, 9 cm genişlik, 16 cm yükseklikte kırmızı pleksiglas kutu, yeni nesne olarak 4,5 cm çap ve 4,5 cm yükseklikte yuvarlak beyaz plastik kap) (Resim 4).



Resim 4: Yeni nesne tanıma testinin erişkin ve yavru ratlar üzerinde uygulanması

Alışma aşamasında her rat, toplam 30 dak süre boyunca, kalıcı ve tuzak olmak üzere iki nesneyi serbestçe keşfetmesi için düzeneğe yerleştirildi. Ratların kalıcı ve tuzak nesneyle geçirdiği süre kaydedildi. Gerçek test aşaması, alışma aşamasından 24 saat sonra, aynı kalıcı ve tuzak nesnelere 1 dakikadan oluşan hatırlatma denemesiye başlatıldı. Ratlar hatırlatma denemesi sonrası kafesine geri gönderildi. 1 saatlik aradan sonra tuzak nesne yeni nesneyle değiştirildi ve ratların kalıcı ve yeni nesne ile geçirdiği zaman toplam 2 dakika boyunca kaydedildi. Nesnelere etkileşimi değerlendirmede ağız, burun ve ayakları ile olan dokunma davranışları da değerlendirildi. Yanlışıklıkla olan çarpmalar kaydedilmedi.

YNT testi hesaplaması için şu formül kullanıldı (57):

Tanıma indeksi=100 x Yeni nesneyi inceleme süresi / (Yeni nesneyi inceleme süresi +kalıcı nesneyi inceleme süresi)

### **3.3.5. Yükseltilmiş artı labirent testi (YALT)**

YALT, kemirgenlerde kaygı, stres benzeri davranışların değerlendirilmesinde kullanılan standart bir testtir. Montgomery'nin çalışmasından esinlenerek ve modifiye edilerek ilk olarak Handley ve Mithani tarafından anksiyetenin değerlendirilmesinde ve ilaçların anksiyoselektif etkilerinin taranmasında kullanılmıştır. Rodentlerin anksiyete davranışının değerlendirilmesi için açık kollarla geçirilen zamanın, kapalı kollarla geçirilen zamana oranlanması önerilir.

Düzenek iki açık kola dik yerleşen 2 kapalı koldan oluştu. Her bir kolun genişliği 10 cm ve uzunluğu 50 cm idi. Kapalı kolların, kenarlarında 40 cm yükseklikte duvarlar, açık kolların kenarlarında düşmeyi önlemek için 0,5 cm'lik bordürler vardı ve labirent yukarıdan 40 Watt ampulle aydınlatılmaktaydı. Düzenek yerden 55 cm yüksekte konumlandı (Resim 5). Deneklerin bilmedikleri çevreyi tanıma davranışları sırasında alanın yükseltilmiş olması anksiyeteyi arttırıcı bir etkendir (58).



**Resim 5:** Sıçanın YALT düzeneğindeki görüntüsü.

Denekler, açık ve kapalı bir kolun birleşimindeki merkezi platforma bırakıldı ve 5 dakika boyunca labirenti serbestçe keşfetmelerine izin verildi. Bu süre zarfında açık ve kapalı kollarda geçirdikleri toplam süre video izleme sistemi ile kaydedildi. Genelde ratlar açık kollara az girer, zamanın çoğunu kapalı kollarda geçirir. Ratların YALT alanında, donması/hareketsiz kalması, defekasyon yapması ve açık kollara oranla kapalı kollarda daha fazla vakit geçirmesi, anksiyete ile ilişkili davranışlar olarak tanımlanmıştır (58).

#### **3.4. Zenginleştirilmiş kafes**

ZK, NK'e göre daha geniş (120×100×80 cm'e 16×41×34 cm; yükseklik x uzunluk x genişlik) olup içinde ratlar için egzersiz yapabilecekleri koşu tekerlekleri, merdivenler, tırmanabilecekleri platformlar, içinden geçip saklanabilecekleri tüneller ve evlerin yanı sıra salıncaklar, toplar gibi metal, plastik ve ahşaptan oluşan çeşitli renkte ve boyutta nesnelere, aynı zamanda yem ve suya daha kolay ulaşabilmeleri için birkaç adet suluk ve yemlik bulunur (Resim 6). NK'te talaş tabakası, 1 adet yemlik ve suluk dışında herhangi bir nesne bulunmaz.

Zenginleştirilmiş kafeslerin her birinde 10'ar denek olması planlansa da kaybedilen ratlar nedeniyle 8'er denek kaldı. ZK içindeki nesnelere, su ve yiyecek dağıtıcılar deneklerin yeni keşifler yapabilmeleri için her gün farklı yerlerde konumlandırıldı, haftada 2 defa yenileriyle değiştirildi.

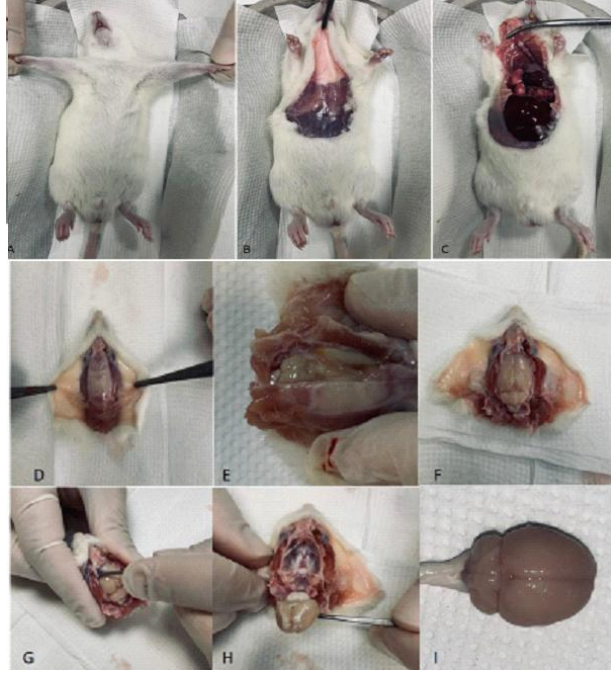


**Resim 6:** Zenginleştirilmiş kafeste sıçanların barındırılması

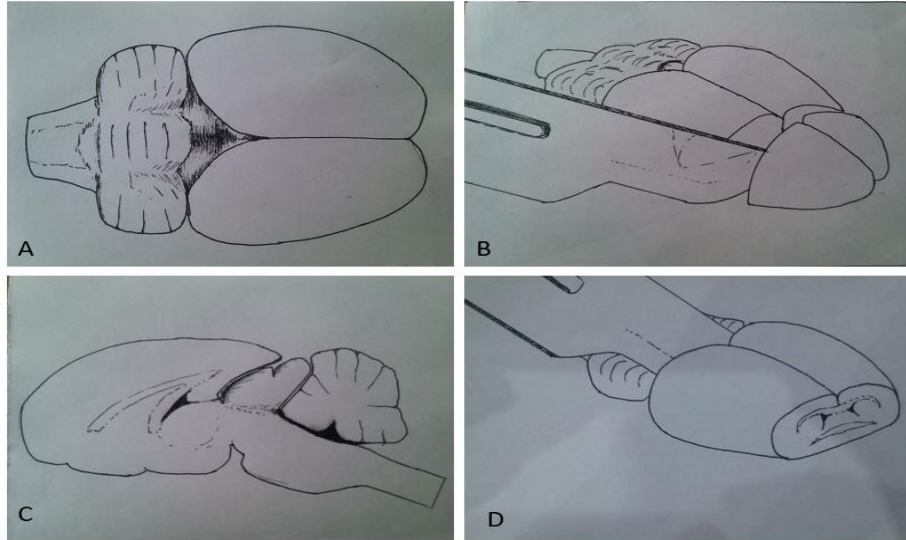
### **3.5. Sakrifikasyon ve doku örneklerinin alınması**

İşlem öncesi ratlara nazal inhalasyon yoluyla anestezi uygulandı. Uygun anestezi derinliği sağlandıktan sonra ratlar ameliyat masasına alınarak sırtüstü pozisyonda yatırıldı. Göğüs kafesinin altından cilt kesisi ile işleme başlandı. Bilateral kotlar kesilerek göğüs kafesi kaldırıldı. Torakotomi sonrası kardiyak eksanguinasyon yapıldı. Bunun için transkardiyak 200 cc fosfat tamponlu tuzlu su çözeltisi (PBS) uygulandı. Ratların beyin dokusunu fikse etmek için PBS sonrası transkardiyak yolla 100 cc %4 paraformaldehid (PFA) perfüze edildi. Ardından PN 16. gün uygulanan sakrifikasyonlarda cerrahi makas, PN 50. gün uygulananlarda giyotin ile dekapitasyon sağlandı. Dekapitasyonu takiben foramen magnum tarafından kraniektomiye başlandı. Kranium 2-3 parça halinde alındı. Disektörle iki yanlı yapışıklıklar açıldıktan sonra uygun elevatör kullanılarak beyin dokusu çıkartılıp tek parça halinde buz bataryası üzerine konuldu (Resim 7).

Önce bistüriyle serebellum ve medulla spinalis uzaklaştırıldı, sonra interhemisferik olarak beyin dokusu ikiye ayrıldı. Alınan dokular 0,1 M konsantrasyonda PFA içinde Patoloji bölümüne gönderildi (Resim 8).



**Resim 7:** Deneklerin sakrifikasyonu. A: Sıçanın ameliyat masasına yatırılması, B: Torakotomi için cilt kesisi, C: Göğüs kafesinin açılması, D: Dekapitasyon sonrası skalp kesisi, E, F: Kraniektomi yapılması, G, H: Beyin dokusunun çıkarılması, I: Çıkarılmış beyin örneği.



**Resim 8:** Beyin dokusundan frontal korteksin, tempotal korteksin ve hipokampusun ayrılması (Çizim Dr. Tayfun ŞAHİN'e aittir.)

### 3.6. Histopatolojik İnceleme

Alınan beyin dokusu örnekleri 24 saat süreyle 0,1 M konsantrasyonda PFA içinde muhafaza edildi, ardından 24 saat arayla sırasıyla %15 ve %30 sükröz çözeltilerine aktarıldı. Beynin temporal ve frontal korteks ve hipokampus bölgeleri

çıkarılarak önce doku takibine alındı, sonra usulüne uygun şekilde parafin bloğa gömüldü. Parafin bloklar bir süre dondurulduktan sonra mikrotom (Leica RM2255) ile 2µm kalınlığında kesitler halinde lamlara alındı. Bu kesitler 60°C sıcaklıktaki etüvde deparafinize olması için 1 saat bekletildi. Ardından aşağıda belirttiğimiz boyama yöntemleri ile HE, gümüş ve Nissl boyaları ile boyandı. Boyanmış kesitler artan etanol konsantrasyonlarında kurutuldu ve her biri 2 dakika olmak üzere 3 kez ksilen ile işleme tabi tutuldu ve ksilen bazlı bir ortamla sabitlendi. Ardından lamalar Sakura Tissue-Tek Film cihazına (lam kapama cihazı) kapatılarak mikroskopta incelenecek hale geldi.

İnceleme gruplara kör olan bir patolog tarafından yapıldı. Boyanan lamlara ışık mikroskopunda (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) ×400 oküler büyütmede bakıldı. Hipokampus, frontal korteks ve temporal kortekste benzer hücre yoğunluğu gösteren alanlardan ışık mikroskopu altında ×200 büyütmede rastgele fotoğraflar çekildi ve dijital görüntü analizine gönderildi. Bu alanların hücre kompozisyonunun eşit/benzer özellikte olmasına özen gösterildi.

Etüvden alınan kesitler HE boyaması için oda sıcaklığında bekletildikten sonra azaltılmış etanol konsantrasyonlarıyla (%100, %95, %80, %70 ve %50) hidratlandı, distile su ile durulandı ve hematoksilin çözeltisi ile boyandı. Daha sonra, numuneler 1 dakika boyunca %1 sodyum bikarbonat ile işleme tabi tutuldu ve ardından distile su ve %80 etanol ile durulandı, son olarak da 1 dakika boyunca eozin solüsyonu ile boyama yapıldı. Normal hücreler eozinofilik (asidofilik) ve kırmızı boyanan zengin sitoplazmaya, “hematoksilinofilik” (bazofilik) ve mavi boyanan büyük yuvarlak çekirdeğe sahipken, dejenere hücrelerde, hücre küçülmesi, sitoplazmik yoğunlaşma ve büzüşme, aksonal akımın durması ve organel birikimi sonucu aksonal şişme ve nükleer piknoz gelişir, bu da mikroskop altında hipereozinofilik yuvarlak granüller şeklinde görünür. Oluşan bu değişiklikler ışık mikroskopunda ×400 oküler büyütmede incelendi ve hasarın derecesi hafif, orta, şiddetli olarak değerlendirildi.

Gümüş boyama için alınan doku örnekleri aynı şekilde hazırlandı. Deparafinizasyon ve rehidrasyondan sonra alınan kesitlerde üreticinin talimatlarına göre FD NeuroSilver Kit II (FD NeuroTechnologies, Ellicott City, MD) kullanılarak gümüş boyama yapıldı. Boyama sonucu ışık mikroskopide hücre cisminde çok sayıda siyah granuler birikintileri olan hasarlı nöronlar görüldü. Aynı zamanda bu

alanda endotel hücreleri siyah boyanmış damarsal yapılar da saptandı. Bu alanlardan ×200 büyütmede rastgele fotoğraflar çekildi ve dijital görüntü analizine gönderildi.

Nissl boyama için deparafinizasyon ve rehidrasyondan sonra alınan kesitler %0,1 cresyl violet solusyonu (Sigma C5042) pH 4,7 ile 10 dakika 37<sup>0</sup> C’de boyandı. Farklılaşma için %95 etanol + birkaç damla %10 asetik asit çözeltisi kullanıldı. Boyama sonucu ışık mikroskopide mor renkli sitoplazmik boyanmış piknotik dejenere nöronlar saptandı. Bu alanlardan ×200 büyütmede rastgele fotoğraflar çekildi ve dijital görüntü analizine gönderildi.

### **3.7. İmmünohistokimya boyamalar**

Deparafinize edilen lamalar oda sıcaklığında 10 dak bekletildikten sonra Ventana BenchMark ULTRA XT otomatik immünohistokimyasal boyama cihazında (Roche, İndianpolis, ABD) multimer teknolojiye dayalı XT DAB V3 protokolü ile boyandı. Endojen peroksidaz aktivitesi %3 hidrojen peroksit ile 4 dak 37<sup>0</sup> C’de (UltraView Universal DAB Inhibitor, Ventana) bloke edildi. İmmünohistokimyasal boyamalar uygulandı. Ardından kesitler primer antikorlarla inkübe edildi. Antijen Retrieval yöntemi için ROCHE/ Cell Conditioning 1 (CC1) (EDTA) ve ROCHE/ Cell Conditioning 2 (CC2) ile CC1 ve CC2 Standart protokolü uygulandı. Sekonder görüntüleme için ROCHE/ UltraView Universal DAB Detection Kit ile ‘Standart UltraView IHC’ Protokolü uygulandı. Son karşıt boyama, Ventana hematoksilen ve mavileştirme reaktifi ile yapıldı. Kesitler 5-10 dakika Tris tamponu (pH 7,6) ile yıkandı, ksilen bazlı bir sabitleyici kullanılarak sabitlendi, Sakura Tissue-Tek Film cihazına (lam kapama cihazı) kapatılarak mikroskopta incelenecek hale geldi. İlgili alanlarda x200 büyütmede rastgele fotoğraflar çekildi ve dijital görüntü analizine gönderildi. İmmünohistokimya için kullanılan boyamalar Tablo 4’te listelendi.

#### **3.7.1. İBA-1 İHC**

Affinity Biosciences Ohio, ABD firmasından tedarik edilen AB\_2838405 (Poliklonal) İBA-1 antikoruna 1:100 antikor dilüsyonu ile 2 saat antikor inkübasyonu uygulandı. Antijen Retrieval yöntemi için ROCHE/ Cell Conditioning 2 (CC2) ile 91<sup>0</sup> C ısıtılarak 8 dak standart protokolü uygulandı. Boyama sonucu ışık mikroskopide normal mikroglial hücrelerden daha kısa ve daha az dallanmış uzantılara, siyah boyanmış nükleus ve sitoplazmaya sahip multipl mikroglial hücreler görüldü.

#### **3.7.2. iNOS İHC**

Affinity Biosciences (Ohio, ABD) firmasından tedarik edilen AB\_2833391 (Poliklonal) iNOS antikoruna 1:150 antikor dilüsyonu ile 2 saat antikor inkübasyonu uygulandı. Antijen Retrieval yöntemi için ROCHE/ Cell Conditioning 2 (CC2) ile 91<sup>0</sup> C ısıtılarak 8 dak standart protokolü uygulandı. Hafif-orta şiddetli sitoplazmik boyanma gösteren büyük nükleuslu hasarlı nöronlar ve sitoplazması kuvvetli boyanmış virgül şekilli mikroglial hücreler görüldü.

**Tablo 4:** İmmunhistokimyasal boyamalar için kullanılan antikorlar.

Antikor	Konak	Dilüsyon	Katalog No	Firma
AIF1/İBA1 Antibody	Rabbit	1:50-1:200 (1:100)	DF6442	Affinity Biosciences
APP Antibody	Rabbit	1:50-1:200 (1:175)	AF6084	Affinity Biosciences
Phospho-TAU (Thr181) Antibody	Rabbit	1:50-1:200 (1:200)	AF3149	Affinity Biosciences
Phospho-TAU (Thr231) Antibody	Rabbit	1:200 (1:150)	AF3147	Affinity Biosciences
iNOS Antibody	Rabbit	1:50-1:200 (1:150)	AF0199	Affinity Biosciences
ARG-1 Antibody	Rabbit	1:50-1:200 (1:75)	DF6657	Affinity Biosciences
S100 Beta (EP32), RMab	Rabbit	1:100-1:500 (1:150)	BSB 2180	Bio SB
GFAP (G-A-5), MMab	Mouse	1:250-1:1000 (1:250)	BSB 5566	Bio SB
Amyloid-Beta (RBT-A4), RMab	Rabbit	1:50-1:200 (1:50)	BSB 3446	Bio SB

### 3.7.3 Arginaz-1 İHC

Affinity Biosciences (Ohio, ABD) firmasından tedarik edilen AB\_2838619 (Poliklonal) ARG-1 antikoruna 1:75 antikor dilüsyonuyla 104 dak antikor inkübasyonu uygulandı. Antijen Retrieval yöntemi için ROCHE/ Cell Conditioning 2 (CC2) ile 35<sup>0</sup> C ısıtılarak 4 dak standart protokolü uygulandı. Travma sonrası hipokampus, frontal korteks ve temporal kortekste kuvvetli nuklear, zayıf sitoplazmik Arg-1 (+) boyanma gösteren sayıca artmış mikroglial hücreler görüldü.

### 3.7.4. Amyloid beta İHC

Bio SB (Santa Barbara, CA, ABD) firmasından tedarik edilen RBT-A4 (Monoklonal) A $\beta$  antikoruna 1:50 antikor dilüsyonu ile 56 dak antikor inkübasyonu

uygulandı. Antijen Retrieval yöntemi için ROCHE/ Cell Conditioning 1 (CC1) (EDTA) ile 95<sup>0</sup> C ısıtılarak 8 dak standart protokolü uygulandı. Çok sayıda sitoplazmik ve nuklear yerleşimli kuvvetli boyanmış noktasal birikimleri olan hasarlı nöronlar görüldü.

#### **3.7.5. Amiloid Prekursor Protein (APP)**

Affinity Biosciences (Ohio, ABD) firmasından tedarik edilen AB\_2834853 (Poliklonal) APP antikoruna 1:175 antikor dilüsyonu ile 52 dak antikor inkübasyonu uygulandı. Antijen Retrieval yöntemi için ROCHE/ Cell Conditioning 2 (CC2) ile 91<sup>0</sup> C ısıtılarak 8 dak standart protokolü uygulandı. Hasarlı bölgede beyin parenkiminde ekstraselüler alanda yaygın kahve renkli birikimler görüldü.

#### **3.7.6. Fosforillenmiş-TAU 181**

Affinity Biosciences (Ohio, ABD) firmasından tedarik edilen AB\_2834584 (Poliklonal) p-TAU 181 antikoruna 1:200 antikor dilüsyonu ile 56 dak antikor inkübasyonu uygulandı. Antijen Retrieval yöntemi için ROCHE/ Cell Conditioning 1 (CC1) (EDTA) ile 36<sup>0</sup> C ısıtılarak 4 dak standart protokolü uygulandı. Hasarlı nöronların aksonlarında ve sitoplazmasında kuvvetli plaklar şeklinde birikimler görüldü.

#### **3.7.7. Fosforillenmiş-TAU 231**

Affinity Biosciences (Ohio, ABD) firmasından tedarik edilen AB\_2834582 (Poliklonal) p-TAU 231 antikoruna 1:150 antikor dilüsyonu ile 80 dak antikor inkübasyonu uygulandı. Antijen Retrieval yöntemi için ROCHE/ Cell Conditioning 2 (CC2) ile 35<sup>0</sup> C ısıtılarak 4 dak standart protokolü uygulandı. Şişmiş nukleuslu hasarlı nöronların aksonlarında ve sitoplazmasında şiddetli boyanma görüldü, komşu nöropilde vakuolizasyon dikkati çekti.

#### **3.7.8. GFAP İHC**

Bio SB (Santa Barbara, CA, ABD) firmasından tedarik edilen G-A-5 (Monoklonal) GFAP antikoruna 1:250 antikor dilüsyonu ile 32 dak antikor inkübasyonu uygulandı. Antijen Retrieval yöntemi için ROCHE/ Cell Conditioning 1 (CC1) (EDTA) ile 36<sup>0</sup> C ısıtılarak 4 dak standart protokolü uygulandı. Astrositlerin yıldız şekilli fibriller uzantılarında kuvvetli pozitif sitoplazmik boyanma görüldü.

#### **3.7.9. Nörotrofik Protein S100B İHC**

Bio SB (Santa Barbara, CA, ABD) firmasından tedarik edilen EP32 (Monoklonal) S100B antikoruna 1:150 antikor dilüsyonu ile 44 dak antikor

inkübasyonu uygulandı. Antijen Retrieval yöntemi için ROCHE/ Cell Conditioning 2 (CC2) ile 36<sup>0</sup> C ısıtılarak 4 dak standart protokolü uygulandı. Kuvetli boyanmış nükleus ve sitoplazmaları olan astrositlerin yoğun olduğu hipokampus, frontal korteks ve temporal kortekst alanları belirlendi.

### **3.8. İstatistiksel analiz**

İmmünohistokimya, gümüş ve Nissl pozitif boyanan hücrelerin istatistiksel değerlendirilmesi görüntü analiziyle yapıldı. Bunun için öncelikle sıçan beyninin atlası temel alınarak ilgilendiğimiz alanlar ışık mikroskopunda (Olympus BX51, Tokyo, Japonya)  $\times 400$  oküler büyütmede belirlendi (59). Daha gerekli alanlardan rastgele  $\times 200$  büyütülmüş görüntüler alındı, Fiji Software (ImageJ v2) yazılımı kullanıldı ve pozitif boyanan hücrelerin ortalamasının yüzdesi saptandı (51).

Hedeflenen proteinlerin IHC boyama sonuçları APP ve GFAP proteini için IOD (intensity of the optical density) değeri hesaplanarak (60), diğer proteinler için ise % pozitif hücre sayısı hesaplanarak sunuldu. Gümüş boyama sonucu ortalama optik yoğunluk (MOD) analizi ile (MOD = log (maksimum yoğunluk/ortalama yoğunluk)) (61), Nissl boyama "Nissl-pozitif siyah hücreler" sayısı belirlenip total hücre ile oranlaması sonucunda % dejenere hücre sayısı olarak sunuldu.

İstatistiksel analiz ve grafik oluşturma, GraphPad Prism Yazılımı sürüm 7.00 kullanılarak yapıldı. Öncelikle verilerin normal dağılım gösterip göstermedikleri Shapiro-Wilks testi ile kontrol edildi. Histopatolojik değerlendirmelerde iki grup arasındaki fark two-tailed Student's t-testi ile belirlendi. Davranış testlerinin değerlendirilmesi tek- ya da çift-yönlü ANOVA'yı takiben Tukey post hoc testi uygulandı. Tüm veriler ortalama  $\pm$  SEM olarak sunuldu. İstatistiksel anlamlılık kriteri  $p < 0,05$  olarak belirlendi.

## **4. BULGULAR**

### **4.1. Davranış Test sonuçları**

#### **4.1.1. Denge Testi Sonuçları**

Doğum sonrası 11. gün travma öncesi denge testinin sonuçları tüm gruplarda benzerdi. Travma sonrası sham ve travma gruplarında kontrol grubuna göre belirgin bozulma izlendi (Tablo 5). Her grubun 1., 2. ve 3. gün sonuçları kendi içinde karşılaştırıldığında düz platform üzerinde ortalama durma sürelerinin giderek arttığı

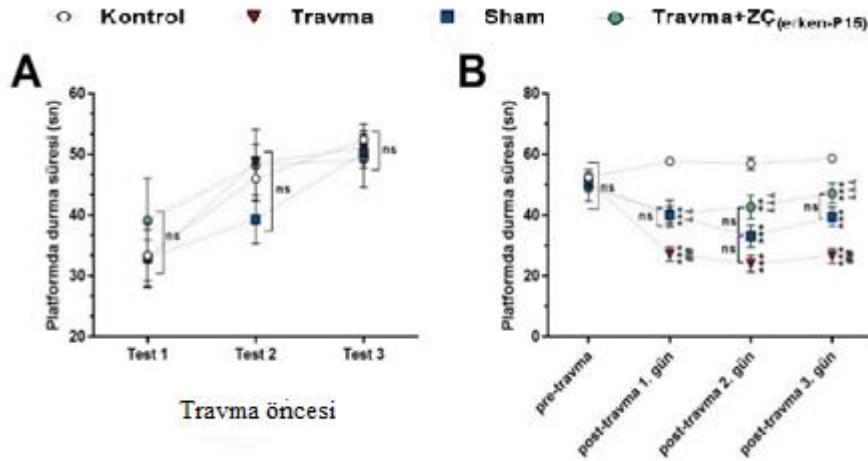
görüldü, bu da tekrarlayan travma veya tekrarlayan anestezi sonrası da motor gelişimin az da olsa devam ettiğini gösterdi.

İlk gün (PN 16. gün) sham, travma ve tedavi gruplarının sonuçları kontrol grubundan anlamlı farklıydı. Erken tedavi grubunun sonuçları daha travma sonrası ilk günden başlamak üzere 3 test için de travma grubundan anlamlı düzeyde iyi idi (1., 2. ve 3. günler için sırasıyla  $p=0,0077$ ,  $p=0,0005$  ve  $p=0,0005$ ) (Şekil 2 A ve B)

**Tablo 5:** Travma öncesi ve travma sonrası denge testi sonuçları

Denge Testi	Kontrol Ort±SS	Sham Ort±SS	Travma Ort±SS	Tedavi Ort±SS
Travma öncesi	52,4±11,49	50,3±11,43	51,03±12,1	49,2±14,64
Travma sonrası	Test 1	57,75±5,94	40±9	27,2±9,04
	Test 2	56,9±9,1	33,1±11,5	24±10,9
	Test 3	58,65±4,52	39,5±9,86	26,55±10,14

Ort: Ortalama; SS: Standart sapma



Şekil 2: Travma öncesi (A) ve sonrası (B) denge testi sonuçları

#### 4.1.2. EDT Sonuçları

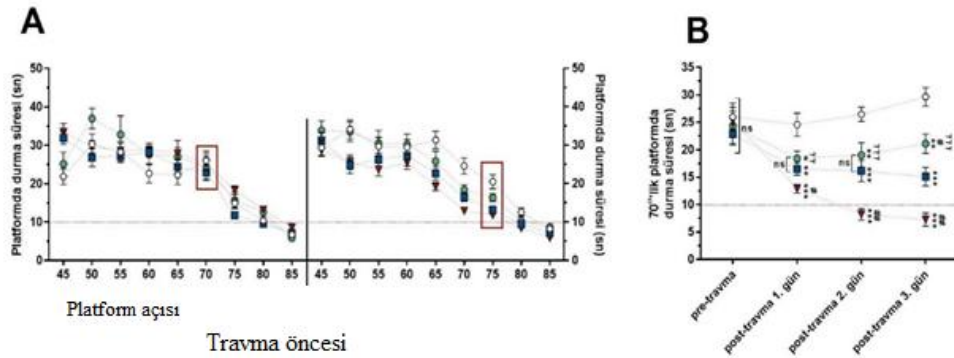
Doğum sonrası 11. gün travma öncesi EDT'nde tüm gruplardaki deneklerin kendi pozisyonlarını 10 sn süreyle koruyabildikleri en yüksek açı 80 derecedeydi, gruplar arasında fark yoktu (Tablo 6 ve Şekil 3). Travma sonrası gerçek test aşamasında 1., 2. ve 3.gün ratların kendi pozisyonlarını 10 sn süreyle koruyabildikleri en yüksek açı kontrol grubunda 80, diğer gruplarda 75 derecedeydi. Sonuç olarak tüm gruplar gerekli kritere ulaştı.

Travma sonrası 3 gün üst üste test yapıldı (PN 16-18. günler). İlk gün deneğin 70 derece açıda kendi pozisyonunu koruyabildiği süre açısından tedavi ile sham grupları arasında fark yoktu, tedavi grubunun sonucu tedaviye başlayalı henüz 1 gün olmasına rağmen travma grubundan anlamlı düzeyde iyiydi ( $p=0,001$ ). 2. ve 3. gün test sonuçları da tedavi ve travma grupları arasında anlamlı farklıydı (sırasıyla  $p=0,0001$  ve  $p<0,0001$ ). Tüm bu sonuçlar tedavinin travma sonrası oluşan denge sorunlarına çok erken dönemde bile olumlu etki ettiğini gösterdi (Tablo 6 ve Şekil 3).

**Tablo 6:** Travma öncesi ve sonrası 70 derecelik açı için EDT sonuçları

EDT 70 derece	Kontrol Ort±SS	Sham Ort±SS	Travma Ort±SS	Tedavi Ort±SS
TT öncesi	25,99±11,22	22,88±7,86	25,36±8,92	24,29±10,95
TT sonrası 1.test	24,57±9,36	16,51±5,18	12,9±3,2	18,4±4,25
TT sonrası 2.test	26,45±5,91	16,15±8,77	8,21±4,02	19±7,21
TT sonrası 3.test	29,65±7,54	15,1±7,64	7,27±3,97	21,1±5,6

EDT: Eğik düzlem testi; Ort: Ortalama; SS: Standart sapma; T: Tekrarlayan travma



**Şekil 3:** Travma öncesi tüm açılar için (A) ve travma sonrası 70 derece için (B) eğik düzlem test sonuçları.

#### 4.1.3. Morris Su Labirenti Test Sonuçları

Gruplar kendi içinde değerlendirildiğinde 1. günden 4. güne kadar (öğrenme testleri) hedef platformu bulmayı öğrendikleri görüldü. Gruplar her öğrenme testi için birbiriyle karşılaştırıldığında kontrol grubunun platformu en kısa, travma grubunun en uzun sürede bulunduğu, sham grubunun 2., 3. ve 4. günlerde platformu bulma süresinin hemen hemen aynı kaldığı ve bu sürelerin 4. günde erken tedavi grubuna yakın olduğu, istatistiksel olarak fark olmadığı görüldü ( $p=0,101$ ). Travma gruplarında tekrarlayan günlerde platformu bulma süreleri giderek azalsa da, fark

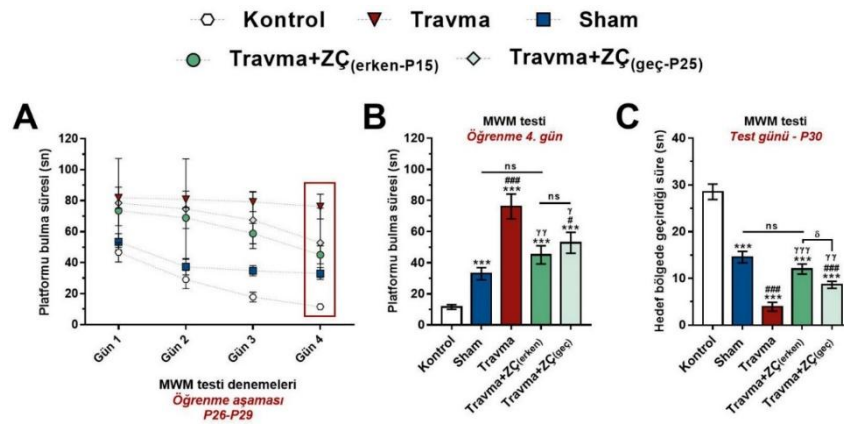
anlamli değildi. Erken ve geç tedavi gruplarında öğrenme sürelerinde belirgin azalma oldu, 4. günde süre sham gruplarına yaklaştı ve sham gruplarıyla aralarında istatistiksel fark kalmadığı görüldü (erken ve geç tedavi grubu için sırasıyla  $p=0,101$  ve  $p=0,196$ ). Sham grubu ile kontrol grubu arasında 1. ve 2. günlerde platformu bulma süresinde çok az fark varken 3. ve 4. günlerde bu fark belirgin arttı, bu da öğrenmenin tekrarlayan anesteziden de etkilendiğini düşündürdü. Öğrenmenin son günü (4. gün) erken ve geç tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p=0,3973$ ) (Tablo 7 ve şekil 4).

Su labirenti testinin 5.günü platform çıkarıldıktan sonra grupların önceden platformun bulunduğu kadranda geçirdiği süre ile bellek değerlendirmesi yapıldı. Kontrol grubunun hedef bölgede en uzun, travma grubunun en kısa zaman geçirdiği gözlendi. Sham grubu da kontrol grubuna kıyasla hedef bölgede az zaman geçirdi. Hem erken hem geç tedavi gruplarıyla travma grubu arasındaki fark anlamlıydı ( $p<0.0001$  ve  $p=0.0009$ ). Fakat erken tedavi grubunu ile sham grubu arasında anlamlı fark yoktu ( $p=0.1356$ ) (Tablo 7 ve şekil 4).

**Tablo 7:** Morris su labirentinde, öğrenme dönemi (ilk 4 gün) ve bellek (5. gün) test sonuçları.

MSL testi	Gün	Kontrol Ort±SS	Sham Ort±SS	Travma Ort±SS	Erken tedavi Ort±SS	Geç tedavi Ort±SS
ğrenme dönemi	1	46,72±20,98	53,45±17,96	81,9±22,68	73,63±32,03	78,54±28,69
	2	29,09±19,63	37,45±17,33	80,9±17,79	68,9±22,65	74,63±32,42
	3	17,81±10,18	34,81±11	79,18±20,86	58,81±21,6	67,54±18,44
	4	11,54±4,98	33±12,97	76,18±26,69	45,09±19,37	52,81±22,41
Bellek testi	5	28,55±5,52	14,55±4,08	3,9±3,17	12±3,57	8,63±2,5

MSL: Morris su labirenti; Ort: Ortalama; SS: Standart sapma



**şekil 4:** Morris su labirenti test sonuçlarının gruplar arasındaki farkları.

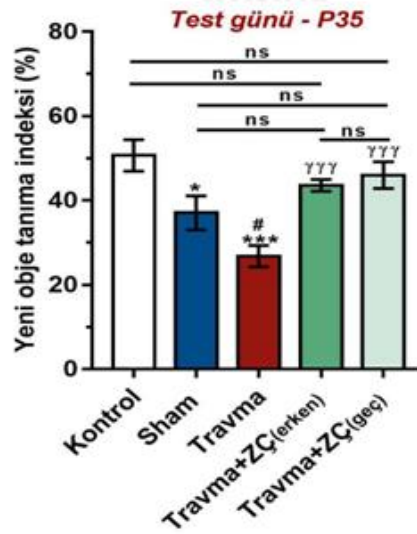
#### 4.1.4. Yeni Nesne Tanıma Testi Sonuçları

Doğum sonrası 10-11. günlerde yapılan YNT testlerinde ratlar testin herhangi aşamasında kalıcı, tuzak ve/veya yeni nesnelere ilgilenmedi ve bu yaş grubunun YNT testi için uygun olmadığına karar verildi. PN 34-35. günlerde yapılan YNT testinde kontrol grubunun yeni nesneyle geçirdiği zaman indeksi diğer gruplardan daha fazlaydı. Bu süre hem sham hem travma grubundan anlamlı uzundu ( $p=0,0241$ ,  $p<0,0001$ ). Tedavi gruplarında kontrol ve sham grubundan anlamlı fark yokken, travma grubundan anlamlı uzundu ( $p<0,0001$ ) (Tablo 8 ve Şekil 5).

**Tablo 8:** Yeni nesne tanıma testi verilerinin gruplar arası değerlendirilmesi

YNT	Kontrol Ort±SS	Sham Ort±SS	Travma Ort±SS	Erken tedavi Ort±SS	Geç tedavi Ort±SS
Test	50,7±11,91	37,09±12,08	26,81±8,02	43,61±4,38	46,06±10,04

YNT: Yeni nesne tanıma; Ort: Ortalama; SS: Standart sapma



**Şekil 5:** Yeni nesne tanıma test sonuçlarının gruplar arası istatistiksel değerlendirilmesi

#### 4.1.5. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Sonuçları

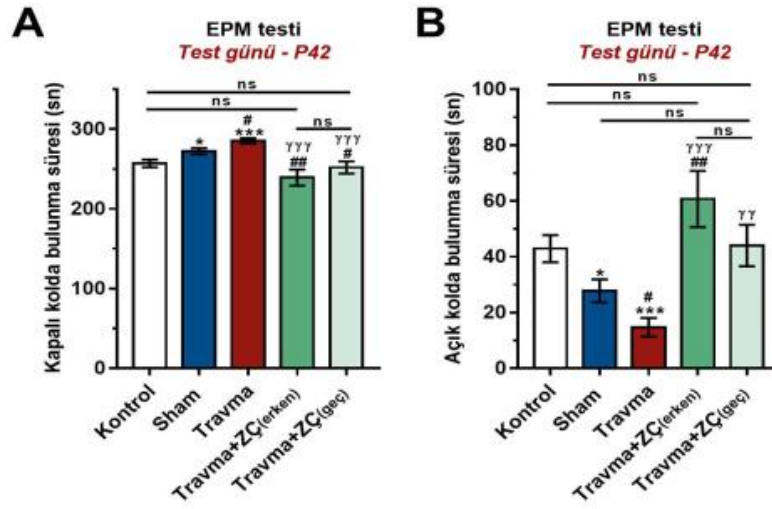
Açık kolda en kısa kalan grup travma grubuydu, erken tedavi grubu en uzun süre kaldı. Kapalı kolda en uzun kalan grup travma grubuydu. Bu da strese en fazla maruz kalan grubun travma grubu olduğunu gösterdi. Tedavi gruplarıyla kontrol

grubu arasında ve erken ve geç tedavi grupları arasında anlamlı fark saptanmadı (Tablo 9 ve Şekil 6).

**Tablo 9:** Yükseltilmiş artı labirent testinde grupların kapalı ve açık kolda geçirdikleri süre.

YAL	Kontrol Ort±SS	Sham Ort±SS	Travma Ort±SS	Erken tedavi Ort±SS	Geç tedavi Ort±SS
Kapalı	257,1±15,34	272,2±12,96	285,3±10,49	239,3±31,89	252±24,19
Açık	42,9±15,34	27,8±12,96	14,7±10,49	60,7±31,89	44±23,54

YAL: Yükseltilmiş artı labirent; Ort: Ortalama; SS: Standart sapma



**Şekil 6:** YAL testinde sıçanların açık ve kapalı kolda kalma sürelerinin karşılaştırılması.

## 4.2. Histopatolojik İnceleme Sonuçları

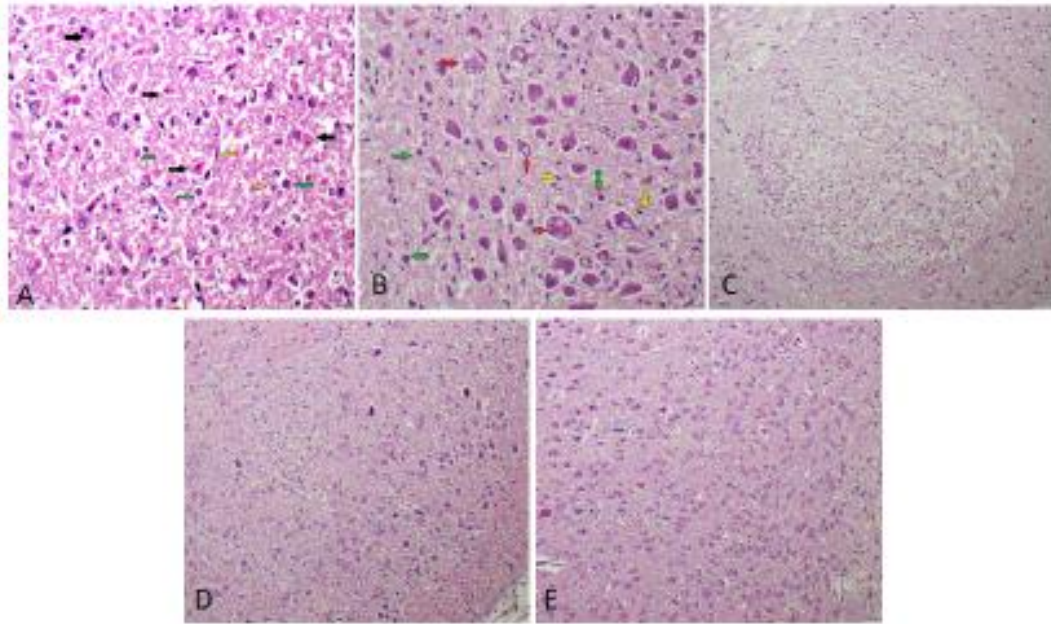
### 4.2.1. Hemotoksin Eozin Boyama Sonuçları

Kontrol gruplarından (Grup VII-VIII) alınan kesitlerde oligodendrositlerle çevrili nöronların görüldüğü fizyolojik sınırlarda beyin dokusu görüntüsü elde edildi. Diğer gruplarda piknotik çekirdekli, kondanse eozinofilik sitoplazmalı apoptotik nöronlar (Resim 9, siyah ok), gliosis olarak değerlendirdiğimiz sayıca artmış astrositler, mikroglial aktivasyon göstergesi olan artmış mikroglial hücreler, vakuolize sitoplazmalı hasarlı nöronlar, çevre dokuda ödem gibi nöronal hasar bulguları izlendi. Travma gruplarında nöronal hasar bulguları şiddetliyen tedavi gruplarında sham grubu ile benzer orandaydı. Erken ve geç tedavi grupları arasında belirgin farklılık yoktu. Kontrol gruplarında nöronal hasar bulgusu izlenmedi.

### 4.2.2. Gümüş Boyama Sonuçları

Kontrol gruplarında gümüş boyama MOD değerleri en düşük seviyedeydi (Grup 7'de  $0,1096 \pm 0,003807$  ve Grup 8'de  $0,1174 \pm 0,00349$ ). Tekrarlayan anestezi sonrasında sham gruplarında artış görüldü, travma sonrası en yüksek değerlere ulaştı. Tedavi gruplarında tekrar azaldı (Tablo 10 ve Şekil 7).

Travma gruplarının sonuçları kontrol ve sham gruplarından anlamlı farklıydı ( $p < 0,0001$ ). Travma sonrası erken ve geç dönemler arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p = 0,6363$ ). Tekrarlayan anestezi sonrası erken ve geç dönemler arasında da anlamlı fark yoktu. Tedavi gruplarının değerleri travma gruplarından anlamlı farklıydı ( $P < 0,05$ ).



**Resim 9:** HE boyama ışık mikroskobu incelemesi. A: Şiddetli hasar (Siyah ok: Piknotik çekirdekli, kondanse eozinofilik sitoplazmalı apoptotik nöronlar; yeşil ok: gliosis, sayıca artmış astrositler; sarı ok: mikroglial aktivasyon) B: Şiddetli hasar (Kırmızı ok: Vakuolize sitoplazmalı hasarlı nöronlar), C: Hafif hasar, D: Orta hasar, E: Normal doku (Mavi ok: Oligodendrositlerle çevrili nöronlar).

#### 4.2.3. Nissl Boyama Sonuçları

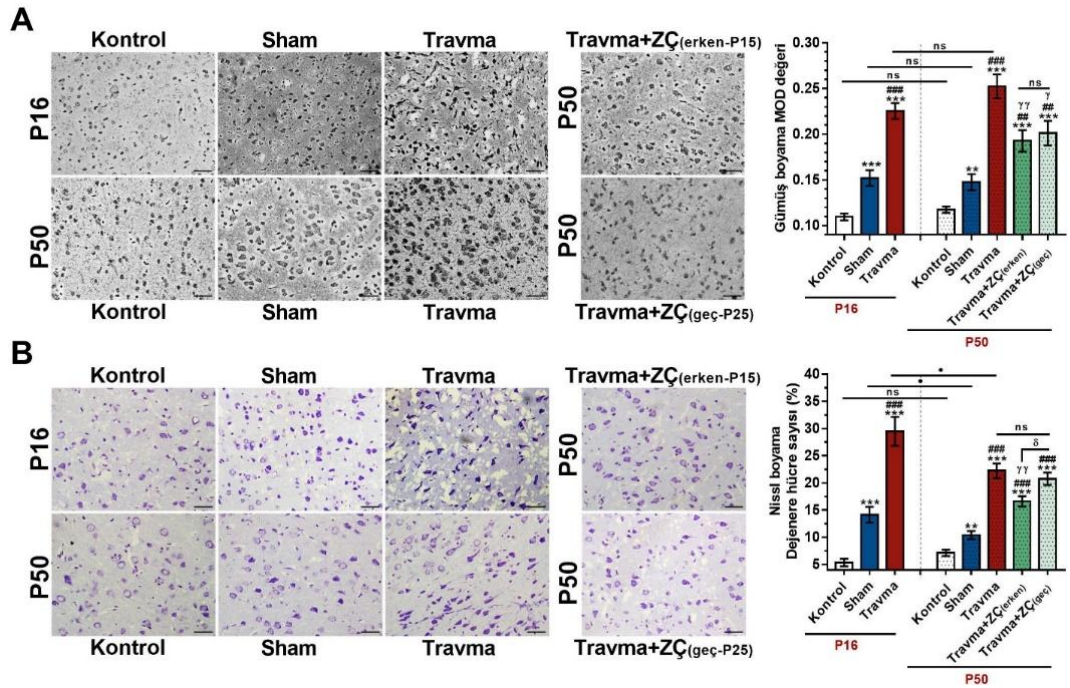
Nissl + boyanan hücre sayısı kontrol gruplarında en düşük, travma gruplarında en yüksek saptandı (Tablo 10 ve Şekil 7). Sham gruplarında da travma grubu kadar olmasa da pozitif hücre sayısında bir miktar artma görüldü, kontrol gruplarından anlamlı yüksekti. Tedavi ile pozitif hücre sayısı azaldı ve tedaviye erken başlanması anlamlı olarak daha belirgin azalma sağladı. Erken ve geç tedavi

grupları (p=0,0122) ve erken tedavi grubuyla travma grupları arasındaki fark anlamlıydı (p=0,0031).

**Tablo 10:** Gümüş ve Nissl boyama sonuçları.

	Gümüş MOD; ort±SE	Nissl n (+) %, ort±SE
Grup 1	0,1926±0,01173	16,61±0,9514
Grup 2	0,2254±0,008721	29,49±2,661
Grup 3	0,2012±0,01349	20,75±1,144
Grup 4	0,2524±0,01297	22,22±1,342
Grup 5	0,152±0,008578	14,14±1,447
Grup 6	0,1476±0,008807	10,4±0,7484
Grup 7	0,1096±0,003807	5,376±0,6888
Grup 8	0,1174±0,00349	7,13±0,5611

MOD: mean optic density; n: sayı; ort: ortalama; SE: standart hata



**Şekil 7:** Gümüş ve Nissl boyama görüntüleri ve istatistiksel sonuçları. \* Kontrol grubuna göre kıyaslama, # Sham grubuna göre kıyaslama, g Travma grubuna göre kıyaslama, δ Tedavi gruplarının kendi arasındaki kıyaslama, • P16 sakrifiye edilen gruplar ile P50 sakrifiye edilen gruplar arasındaki kıyaslama, ns: not significant (p>0.05). (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001)

### 4.3. İmmünohistokimyasal Boyama Sonuçları

#### 4.3.1. İBA-1 İHC Sonuçları

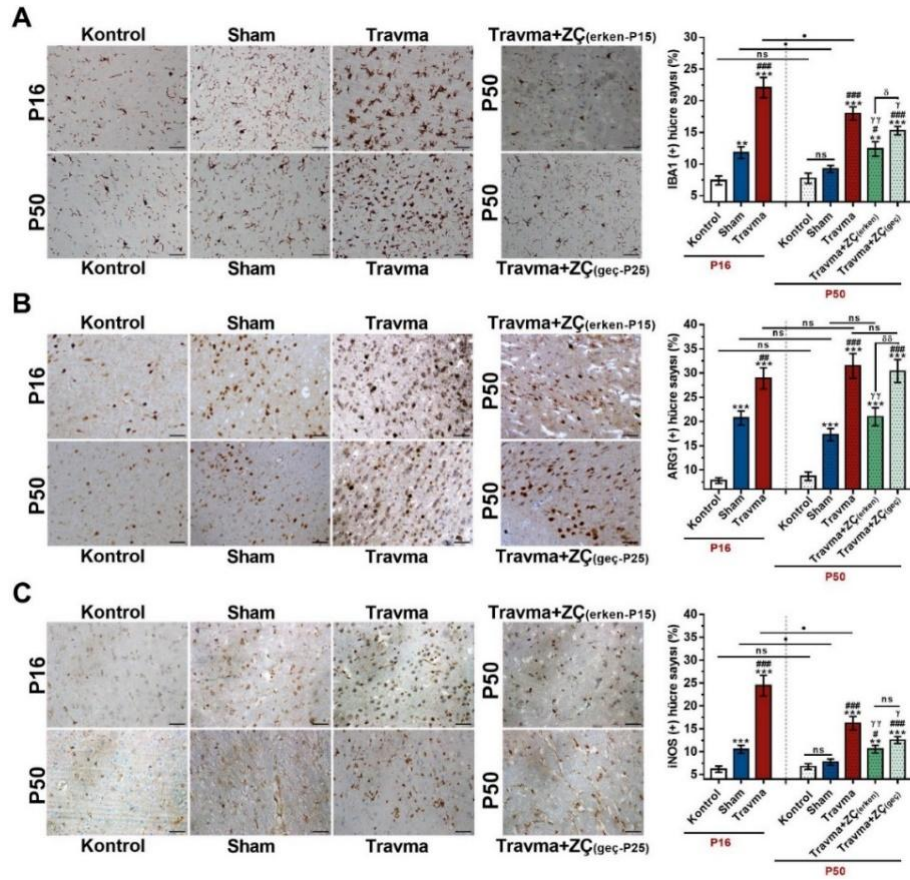
İBA-1 (+) hücre sayısı kontrol gruplarında en düşük düzeydeydi. Sham gruplarında pozitif hücre sayısında artış görüldü, ancak uzun dönem kontrol grubu ile

arasında anlamlı fark yoktu ( $p=0,1529$ ), kısa dönem kontrol grubundan anlamlı farklıydı. Travma grubunda pozitif hücre sayısı diğer gruplara kıyasla yüksekti. Travma sonrası erken dönemde geç döneme göre anlamlı yüksek izlendi. Tedavi gruplarında travma grubuna göre belirgin azalma görüldü. Erken tedavi grubuyla geç tedavi grubu arasında istatistiksel olarak düşük seviyede de olsa anlamlı fark vardı ( $p=0,0435$ ) (Tablo 11 ve Şekil 8).

**Tablo 11:** İBA-1, iNOS ve ARG-1 immunhistokimyasal boyama sonuçları

	İBA-1 n (+) %; ort±SE	iNOS n (+) %; ort±SE	ARG-1 n (+) %; ort±SE
Grup 1	12,38±1,152	10,56±0,8378	20,97±1,846
Grup 2	22,05±1,59	24,42±2,241	28,93±2,19
Grup 3	15,27±0,6636	12,53±0,7506	30,39±2,361
Grup 4	17,97±1,029	16,22±1,475	31,49±2,554
Grup 5	11,78±0,9334	10,51±0,8752	20,71±1,445
Grup 6	9,193±0,5497	7,722±0,6766	17,29±1,273
Grup 7	7,402±0,7104	6,162±0,6619	7,832±0,5968
Grup 8	7,727±0,814	6,745±0,5982	8,703±0,8881

ARG-1: Arginaz 1; İBA-1: iyonize kalsiyum bağlayıcı adaptör molekülü; i-NOS: indüklemlenmiş nitrik oksit sentaz, n: sayı; ort: ortalama; SE: standart hata



**Şekil 8:** İBA-1, iNOS, ARG-1 immunhistokimyasal boyama sonuçları. \* Kontrol grubuna göre, # Sham grubuna göre, g Travma grubuna göre, δ Tedavi grupları arası, • P16 ile P50 sakrifiye edilen gruplar arası, ns: not significant ( $p>0,05$ ). (\* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ )

#### 4.3.2. iNOS İHC Sonuçları

Uzun dönem kontrol ve sham grupları arasında anlamlı fark görülmedi ( $p=0,5219$ ). En düşük düzeyde İNOS pozitifliği kontrol grubunda, en yüksek düzeyde pozitiflik travma sonrası erken histoloji grubunda görüldü. Travma grubu kontrol ve sham gruplarından anlamlı yüksekti ( $p<0,0001$ ). Tedavi grubunda travma sonrası artmış iNOS pozitif hücre sayısında belirgin azalma görülse de travma grubuna göre fark istatistiksel olarak erken tedavi grubunda daha anlamlıydı ( $p=0,0037$ ). Erken ve geç tedavi grupları arasında anlamlı fark yoktu ( $p=0,0965$ ) (Tablo 11 ve Şekil 8).

#### 4.3.3. Arginaz-1 İHC Sonuçları

ARG-1-pozitif boyanan hücre sayısı kontrol grubunda en düşük, travma grubunda en yüksekti. Erken tedavi grubunda travma grubuna kıyasla pozitif hücre sayısında belirgin anlamlı fark görülürken ( $p=0,0037$ ), geç tedavi grubunda bu fark ortadan kalkmıştı ( $p=0,7562$ ). İki tedavi grubu arasında da ileri derecede anlamlı fark vardı ( $p=0,0056$ ) (Tablo 11 ve Şekil 8).

#### 4.3.4. Amyloid beta İHC Sonuçları

Amiloid beta (+) hücre sayısı kontrol gruplarında en düşüktü. Sham grubunda artış izlendi. Travma grubunda en yüksek düzeydeydi. Tedavi gruplarında hafif azalma görülse de travma gruplarından anlamlı farklılık göstermedi ( $p=0,5197$ ) (Tablo 12 ve Şekil 9).

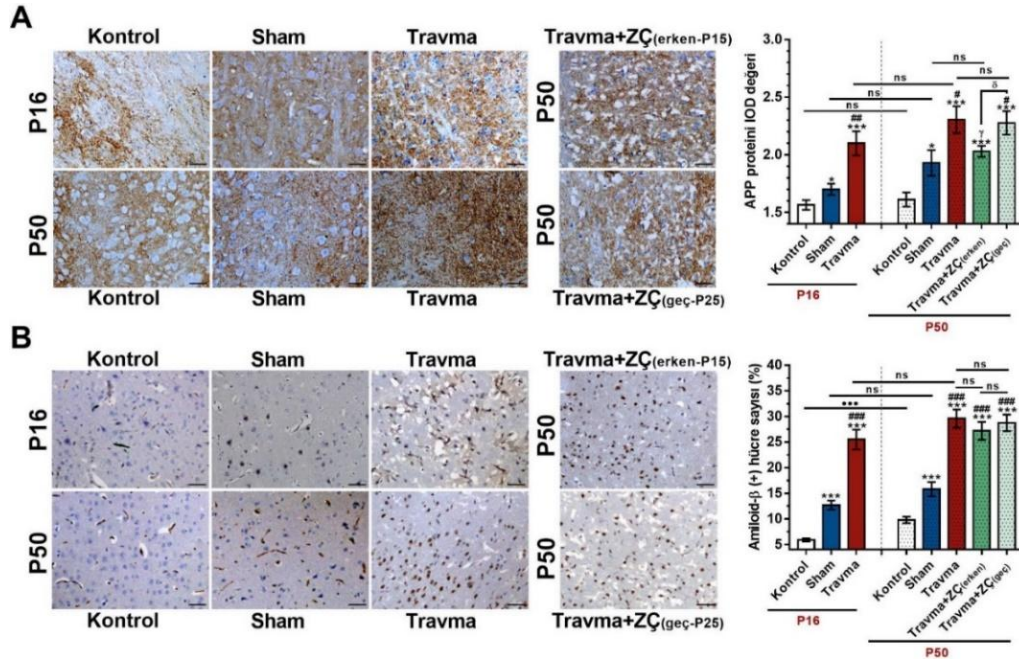
**Tablo 12:** Amyloid- $\beta$ , APP, P-TAU 181 ve P-TAU 231 boyama sonuçları

	A $\beta$ n (+) %; ort $\pm$ SE	APP n (+) %; ort $\pm$ SE	p-TAU 181 n (+) %; ort $\pm$ SE	p-TAU 231 n (+) %; ort $\pm$ SE
Grup 1	27,18 $\pm$ 1,757	2,03 $\pm$ 0,04858	32,44 $\pm$ 18,89	2,241 $\pm$ 1,995
Grup 2	25,51 $\pm$ 1,931	2,1 $\pm$ 0,1044	4,44 $\pm$ 33,98	2,625 $\pm$ 2,89
Grup 3	28,75 $\pm$ 1,614	2,277 $\pm$ 0,1029	35,27 $\pm$ 24,93	2,663 $\pm$ 1,052
Grup 4	29,58 $\pm$ 1,806	2,305 $\pm$ 0,1164	45 $\pm$ 37,81	2,725 $\pm$ 4,075
Grup 5	12,69 $\pm$ 0,90,86	1,701 $\pm$ 0,04876	19,86 $\pm$ 23,41	1,859 $\pm$ 1,431
Grup 6	15,8 $\pm$ 1,386	1,93 $\pm$ 0,1111	25,97 $\pm$ 24,13	1,991 $\pm$ 1,566
Grup 7	5,903 $\pm$ 0,3111	1,565 $\pm$ 0,0427	10,09 $\pm$ 8,667	0,9059 $\pm$ 0,8358
Grup 8	9,803 $\pm$ 0,6417	1,612 $\pm$ 0,06063	16,77 $\pm$ 11,38	0,9705 $\pm$ 1,744

APP: Amiloid prekursor protein; p-TAU: fosforillenmiş tau, n: sayı; ort: ortalama; SE: standart hata

#### 4.3.5. Amiloid Prekursor Protein (APP) İHC Sonuçları

Kontrol gruplarında APP değeri en düşük seviyede idi. Sham gruplarında artış görüldü. Travma sonrası en yüksek düzeydeydi. Travma grupları kontrol ve sham gruplarından anlamlı farklıydı ( $p < 0,05$ ). Erken tedavi grubunda azalma oldu, travma grubundan anlamlı farklıydı ( $p < 0,0429$ ). Geç tedavi grubunda travma grubundan farklı değildi ( $p = 0,86$ ) (Tablo 12, Şekil 9).



**Şekil 9:** A-β ve APP immunhistokimyasal boyama sonuçları. \* Kontrol grubuna göre, # Sham grubuna göre, g Travma grubuna göre, δ Tedavi grupları arası, • P16 ile P50 sakrifiye edilen gruplar arası, ns: not significant ( $p > 0,05$ ). (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ )

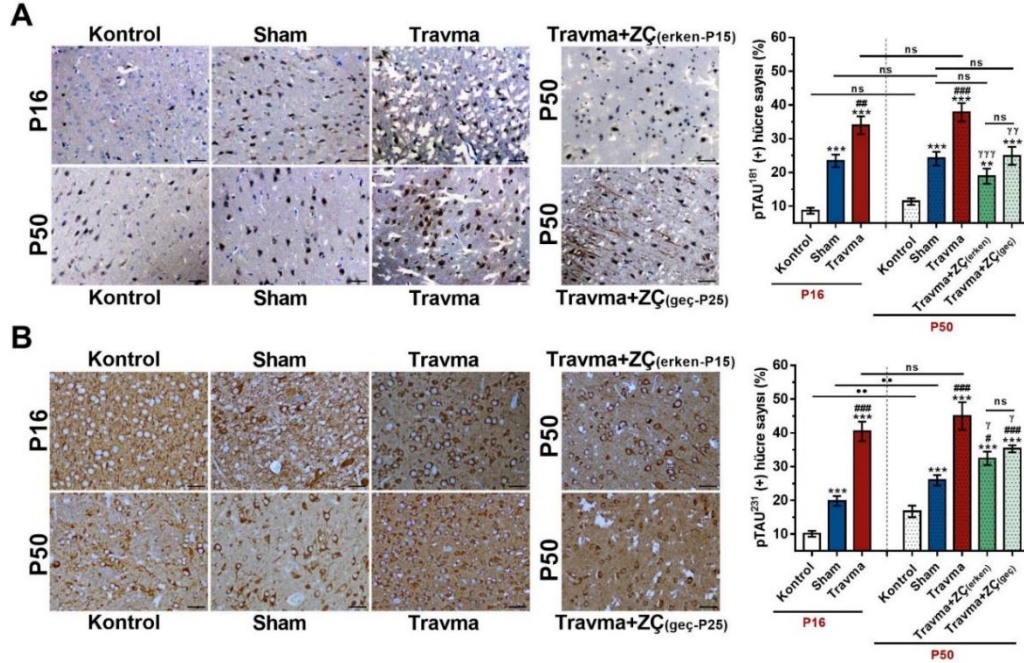
#### 4.3.6. Fosforillenmiş-TAU 231 ve 181 sonuçları

Fosforillenmiş TAU 231 pozitif hücre sayısı en düşük kontrol grubunda, en yüksek travma sonrası geç histoloji grubunda saptandı. Tedavi gruplarında travma sonrası anlamlı azalma oldu. Tedavi grupları arasında anlamlı fark yoktu ( $p = 0,2261$ ). Bu da tedaviye erken ve geç başlamanın P-TAU 231 pozitif hücre sayısında belirgin farklılık oluşturmadığını gösterdi (Tablo 12 ve Şekil 9). P-TAU 181 pozitif hücre sayısı travma gruplarında yüksekti ve tedavi ile anlamlı azalma gösterdi ( $p = 0,0065$ ) (Tablo 12 ve Şekil 10).

#### 4.3.7. GFAP İHC Sonuçları

Travma grubunda GFAP değerlerinde kontrol ve sham gruplarına göre artış saptandı. Travma sonrası erken ve geç dönemde fark yoktu. Tedavi sonrası

değerlerde anlamlı azalma görüldü, erken tedavi grubunda fark daha belirgindi (p=0,002). Erken ve geç tedavi grupları arasında da anlamlı fark vardı, erken dönemde daha düşüktü (p=0,0208). Sham gruplarında da kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik izlendi (p<0,0001) (Tablo 13 ve Şekil 11).



**Şekil 10:** P-TAU 181 ve P-TAU 231 immunhistokimyasal boyama görüntüleri ve istatistiksel sonuçları. \* Kontrol grubuna göre, # Sham grubuna göre, g Travma grubuna göre, δ Tedavi grupları arası, • P16 ile P50 sakrifiye edilen gruplar arası, ns: not significant (p>0,05). (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001)

**Tablo 13:** GFAP ve Nörotrofik Protein S100B immunhistokimyasal boyama sonuçları.

	GFAP İOD; ort±SE	S100-B n (+) %, ort±SE
Grup 1	1,265±0,04017	23,54±1,273
Grup 2	1,811±0,09532	32,88±2,97
Grup 3	1,407±0,03928	29,72±2
Grup 4	1,717±0,1186	29,74±2,534
Grup 5	1,37±0,03935	24,87±1,34
Grup 6	1,373±0,04121	19,54±1,613
Grup 7	1,071±0,03008	14,76±0,791
Grup 8	1,143±0,0244	14,46±1,039

İOD: intensity optic density; n: sayı; ort: ortalama; SE: standart hata

#### 4.3.8. Nörotrofik Protein S100B İHC Sonuçları

S100B (+) boyanan hücre sayısı kontrol grubunda en düşük, travma gruplarında en yüksek düzeydeydi. Sham gruplarında kontrol grubuna göre artış



GFAP gibi İHK boyalar kullanıldı. Sonuçta thTBH sonrası ZÇ'de tutulmanın erken ve geç dönemde oluşan hasarı azalttığı ve tedaviye erken başlanmasının düzelmeyi belirginleştirdiği saptandı.

İnsanlarda hTBH en yaygın beyin hasarı türüdür (51). hTK'nın tekrarlama birikici etkiye neden olabilir. Yapılan son çalışmalar thTBH'nin kronik travmatik ensefalopati, travma sonrası stres bozukluğu, AH, demans, parkinsonizm, şizofreni, ALS ve MS gibi bir dizi nörodejeneratif hastalık ile ilişkili olduğunu göstermiştir (62).

ABD'de her yıl yaklaşık yarım milyon çocuk kafa travması nedeniyle hastaneye başvurmaktadır ve bu çocukların %40 kadarını 5-14 yaş arası çocuklar, %11,6'sını 1 yaşın altındaki bebekler oluşturmaktadır. Fetal hayatın son üç ayında ve doğumdan sonraki ilk iki yılda (kemirgenlerde bu ilk 2 hafta ile sınırlıdır) insan beyninde dendritik ve aksonal büyüme, sinaptogenez ve miyelinizasyon gibi önemli nörogelişimsel değişiklikler meydana gelir. Bu kritik dönemde etki eden TBH, derin nöronal ve aksonal dejenerasyona yol açar. Bu hasarın tekrarlama geri döndürülemez patofizyolojik olaylara neden olabilir ve yetişkinliğe kadar devam eden bilişsel sorunlar oluşabilir. (63).

Xu ve ark.'nın çalışmasında 8-10 haftalık farelere 5 gün boyunca tekrarlayan hafif kontrollü kortikal hasar oluşturma yöntemiyle KT uygulanmış sonuçta bilişsel eksikliklere, beyaz cevherde patolojik değişikliklere, p-TAU ve APP seviyelerinde patolojik artışa neden olduğu görülmüştür (64). Pinkowski ve ark. 4 gün boyunca günde bir kez thTBH'na maruz bıraktığı farelere iki gün sonra eşleştirilmiş görsel ayırt etme eğitimine başlamış, hTBH'nin dikkat eksikliğine ve öğrenmede önemli zorluklara neden olduğunu kanıtlamıştır (65). Huh ve ark.'nın 11 günlük sıçanlara KKT yöntemi ile 3 gün uyguladığı thTBH modelinde 7 gün sonra travma almış sıçanların ak madde ve korteksinde atrofi, aynı zamanda reaktif astrogliazis bulguları saptanmıştır (32).

### **Model ve denek seçimi**

Beyin dokusu üzerindeki ilk etkiden kaynaklanan ani hücre ölümü geri dönüşümsüz olduğundan tedavi prensipleri birincil hasarı derinleştiren ikincil yaralanma kaskadlarının kesintiye uğramasına ya da inhibisyonuna odaklanır. Bununla birlikte, günümüzde etkinliği kanıtlanmış nöroprotektif tedavi protokolü

bulunmamaktadır. Hayvan modellerinin kullanımı, ikincil yaralanma süreçlerinin daha iyi anlaşılması ve yeni tedavilerin geliştirilmesi için esastır.

Kafa travması için model oluşturmak güçtür, çünkü gerçek travmalar oldukça karmaşık mekanizmalarla ortaya çıkar. Bir model oluştururken mümkün olduğunca uygulanan mekanik kuvvetin yönünün, tipinin ve akselerasyon deselerasyon hızının basite indirgenmesine çalışılır. Literatürde travma modeli oluşturmak için birçok yöntem denenmiştir. Ağırlık düşürme modelleri uygulaması nispeten kolay olduğu için sık tercih edilir. Literatürde çok sayıda farklı ağırlık düşürme modeli vardır. 2 m yükseklikten 450 gr ağırlık düşürmeye dayanan Marmarau modelinde %12,5 oranında kafatası kırığı ve %44 oranında mortalite bildirilmiştir (66). Bu modelin 1m yüksekten 300 gr ağırlık düşürme şeklindeki bir modifikasyonunda orta derecede TBH oluşturulabileceği gösterilmiştir (67). Bu modellerde cilt açılır ve ağırlık sabitlenmiş kafaya düşürülür. Kane modelinde sabitlenmemiş kafaya ağırlık düşürülmesi tercih edilmiştir ve tekrarlayan hafif darbeler yapılmasına uygundur. Bu modelde 22-25 gramlık erişkin farelere 24 saat arayla 5 gün üst üste 1 metreden 95g ağırlık düşürmekle travma uygulanmış, sonuçta hafif astrositik reaktivite (GFAP'nin artan ekspresyonu) ve artmış p-TAU, ödem ve mikrogial aktivasyon gibi belirgin histolojik ve immünohistokimyasal bulgular gelişmiş, aynı zamanda lokomotor aktivitede bozulma gözlenmiştir (53).

Bir çalışmada yetişkin farelerde hTBH oluşturmak için 30 gram ağırlık kullanılmıştır. Uygulanan bu modelde fare nöral dokusunda apoptoz ve nöroinflamasyon gelişmiş, kafatasında fiziksel bir hasar görülmemiştir (68). Yine başka bir çalışmada AH modeli oluşturmak için yetişkin farelerin vertekslerine 80 cm yükseklikten 30 gram ağırlık düşürülmüştür (69). Yetişkin fare ağırlığının 10 günlük ratın ağırlığına eşit (22-25 gr) olmasından dolayı, çalışmamızda hKT oluşturmak için bu çalışmalara uygun şekilde 80 cm yükseklikten 30 gram ağırlık düşürmeyi tercih ettik. Shishido'nun çalışmasında (69) farelerin skalpına çelik kask yerleştirilmesine rağmen biz çalışmamızda, Kane modelinde olduğu gibi, ağırlığı serbest kafaya uyguladık (53). Sonuçta infantil ratlarda oluşturduğumuz tekrarlayan travma modelinde hTBH gelişti ve travma bölgesinin komşulugunda kontüzyon veya kortikal madde kaybı izlenmedi.

Yapılan araştırmalar sonucunda insanların miyadında doğum zamanındaki nörolojik gelişiminin, sıçanların PN 10. gününe eşdeğer olduğu gösterilmiştir (70). Bu nedenle çalışmamız bu dönem sıçanlarda yapıldı.

İnfantil ratlarda thTBH'nin etkilerini araştıran bir çalışmada 24 saat arayla 3 günlük tekrarlayan travma uygulandığında 7. günde dış kapsülde ve korpus kallozumda aksonal argirofili, İBA-1 boyamasında mikrogliyal aktivasyonunda artış (ameboid mikrogliya) görülmüş, denge, MSL ve YAL gibi davranış ve öğrenme testlerinde fark bulunmamıştır. Bu nedenle daha etkili bir thTBH oluşturmak için çalışmamızda Kane modelindeki gibi 24 saat arayla 5 gün üst üste travma uygulamayı tercih ettik ve hafif astrositik reaktivite (GFAP'nin artan ekspresyonu), artmış p-TAU, ödem ve mikrogliyal aktivasyon gibi belirgin histolojik ve immünohistokimyasal bulgular geliştiğini izledik.

#### **Denge, motor aktivite, öğrenme, bellek ve anksiyete testleri:**

İnsanlarda thTBH, postural denge ile ilgili sorunlara neden olabilir (53). Çalışmamızda denge ve ED testleri sonuçlarında düz ve açılı platformda durma sürelerinin tekrarlayan travma ve anestezi sonrası arttığı, ZÇ tedavisinin denge işlevindeki olumsuz etkiyi kısa süreli tedavide kısmen, ama uzun süreli tedavi sonrası belirgin olarak, motor işlev bozukluğunu erken dönemden itibaren geri döndürdüğü gözlemlendi. Travma olmaksızın tekrarlayan anestezinin de daha düşük düzeyde de olsa işlevlerde olumsuz etkiye yol açtığı görüldü.

Literatürde ZÇ'nin öğrenme ve belleğin değerlendirildiği MSL ve YNT ile anksiyete ve lokomotor aktivitenin değerlendirildiği YAL, açık alan ve zorunlu yüzme testleri sonuçlarında olumlu etkileri gösterilmiştir (53-58). Sparling ve ark.'nın bir çalışmasında ratlar gestasyonel ve postpartum dönemde ZÇ'ye alınıp, YAL testi uygulanmış, açık kola girişin ve burada geçirilen sürenin ZÇ'de yaşıyan grupta daha fazla olduğu görülmüş, bu sonuç anksiyetede azalma lehine yorumlanmıştır (71).

Çalışmamızda MSL testinde deneklerin travma sonrası platformu bulma süreleri tekrarlayan anestezi ve travma sonrası bozuldu, ZÇ tedavisi sonrası süre anlamlı derecede kısaldı, ayrıca hedef platformda geçirilen sürede de tedavi sonrası anlamlı artış oldu. Bu durum travma sonrası ZÇ tedavisinin öğrenme ve bellek üzerinde olumlu etkisi olduğunu düşündürdü. Tedaviye erken başlanması daha

etkili olduğu saptandı. Erken tedavi grubunda bellekteki bozukluk belirgin düzelme gösterdi, ancak kontrol grubu düzeyine ulaşamadı.

Diğer öğrenme testi olan YNT testi sonuçları da travma sonrası öğrenme işlevinin belirgin bozulduğunu, hem erken, hem de geç başlanan tedavi sonrası ise anlamlı düzelme olduğunu, hatta öğrenmenin hemen hemen normale yakın düzeylere ulaştığını gösterdi. Sham gruplarında yeni nesne ile geçirilen süre tekrarlayan anestezinin etkisine bağlı olarak azalmıştı. Lakin bu azalma travma kadar ağır değildi. Bu da tedavinin bilişsel işlev üzerinde oluşturduğu pozitif etkinin tekrarlayan anestezi sonucu oluşan öğrenme geriliğini de azalttığını gösterdi. Bu sonuçlar hipokampusa bağlı uzaysal belleğin ZÇ tedavisinden fayda gördüğünü düşündürdü.

Sıçanların travma sonrası stres düzeyini değerlendiren YAL testi sonuçları hem tekrarlayan travma, hem de tekrarlayan anestezi sonrası anksiyete düzeyinde belirgin artış olduğunu, tedavi sonrası travmanın olumsuz etkilerinin anlamlı azaldığını, tedaviye erken başlamanın anlamlı olarak daha etkili olduğunu, hatta sham grubundan daha iyi sonuca ulaşıldığını ortaya koydu. Bu da ZÇ tedavisinin sadece travmanın değil anestezinin de olumsuz etkilerini geriye çevirdiğini, stres ve anksiyete düzeyini azalttığını gösterdi.

### **Histolojik bulgular:**

Travmatik beyin hasarı sonrası hasarlı hücrelerin derecesini belirlemek için gümüş, Nissl ve HE gibi histolojik boyalar kullandık. Akson hasarını gösteren HE boyama preparatlarında diğer çalışmalarda da bildirilen anormal vakuolize sitoplazmalı, piknotik hiperkromatik çekirdekli, düzensiz gövdeli nöronlar saptadık. HE boyamamızda ayrıca interstisyel alanda sıvı toplanması (ödem) da gördük. Tedavi ve anestezi gruplarındaki nörodejenrasyonun şiddetini hemen hemen aynı bulduk.

Nissl boyamada ise travma sonrası erken dönemde korpus kallozum ve hipokampusta izlenen Nissl + siyah nöronlar bizim çalışmamızda da izlendi (72). Gümüş boyamada travma uygulanan bölgede argirofilik aksonal dejenerasyon görüldü. Literatürde bu bulgunun ilerleyici bir dejeneratif sürecin belirtisi olduğu bildirilmiştir (1). Çalışmamızda travma sonrası artan gümüş boyama yoğunluğu ve Nissl-pozitif hücre değerleri tedavi sonrası belirgin şekilde azaldı. Nissl boyama sonuçlarındaki değişikliğin özellikle erken tedavi gruplarında daha anlamlı olduğu izlendi. Bu da erken başlanan ZÇ tedavisinin nöronal hasarın azaltılması ve

nörodejeneratif hastalıkların ve bunlara sekonder oluşabilecek bilişsel bozuklukların önlenmesinde önemli olduğunu düşündürdü. Ayrıca bu boyamalarla sham gruplarında da artmış pozitif dejenere hücreler görüldü. Lakin buradaki hücre yoğunluğu travma gruplarındaki kadar şiddetli değildi. Bu bulgular tekrarlayan anestezinin de beyinde travmadan daha düşük düzeyde de olsa bir miktar yapısal hasara neden olduğunu gösterdi.

### **İmmünohistokimya bulguları**

#### *GFAP ve S100:*

TBH'da gelişen nöroinflamasyondan sorumlu hücreler astrositler ve mikroglialardır. Astrositler KBB'nin gelişimi, serebral kan akışının düzenlenmesi, sinaptogenez, nörojenez, nörotrofik faktörlerin salınımı ve nöronlara enerji sağlanmasında önemlidir. Serebral iskemi, astrositlerde morfolojik değişikliklere yol açarak astrositlerin reaktif hale gelmesine neden olur. Reaktif astrositler ürettikleri proenflamatuar modülatörler yardımıyla glial skara (astrogliazis) neden olur (32,73). Astrogliazis, hücrel hipertrofi, proliferasyon ve artan GFAP ekspresyonu ile karakterizedir. Astrogliaziste GFAP pozitif hücrelerdeki artışın, yeni astrositlerin oluşumundan değil, daha çok GFAP sentezindeki artıştan ve önceden var olan hücrelerde glial filamentlerin yoğunlaşmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (53).

Astrosit aktivasyonunun diğer bir belirteci olan S100B, beyin hasarı sırasında astrositlerden salınır, düşük dozlarda S100B, nöroprotektif etki gösterir, ancak yüksek seviyelerde nörotoksik olabilir. S100B nöroinflamasyonu uyarır ve apoptozu indükleyerek nöron hasarına yol açar, aynı zamanda KBB'nin bozulmasının bir belirtecidir. Ayrıca S100B düzeyindeki artışın AH, şizofreni gibi nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olduğu, öğrenme ve bellek gibi işlevleri etkilediği bildirilmiştir. Bunun yanı sıra S100B'nin travma sonrası neonatal nöronlardan astrositlerden ve mikroglialardan salınarak nöronal hasarı azalttığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (33,73).

Çalışmamızda astrogliazis göstergesi olarak GFAP ve S100B biyobelirteçlerini kullandık. Travma sonrası GFAP ve S100B düzeylerindeki belirgin artış literatürle uyumlu bulundu. Klinik çalışmalarda da TBH'nın beyinde yoğun GFAP reaksiyonuna neden olduğu bildirilmiştir (53). ZÇ sonrası, özellikle erken tedavi grubunda GFAP ve S100B değerlerinde anlamlı düşüş saptadık. Bu durum ZÇ'nin astrositlerin astroglial aktivasyonunu azaltıp, buna sekonder nöroprotektif

etki oluşturduğunu düşündürdü. Erken tedavi grubunda sham grubundan daha az sayıda GFAP ve S100B (+) hücre gördük. Bu da erken tedavinin tekrarlayan anestezinin neden olduğu astrosit aktivasyonu üzerinde de pozitif etki sağladığını gösterdi.

#### *İBA-1, İNOS ve Arg-1:*

Mikroglia, fagositik ve antijen sunma yetenekleri olan, özelleşmiş bağışıklık hücreleridir (1,32). Aktive edilmiş mikroglia travmaya yanıt olarak, yaralanma bölgesindeki hücre kalıntıları fagosite etmede temizleyici görevi yapar. Beyin hasarı olduğunda, uyarının tipine ve büyüklüğüne bağlı olarak mikroglia M1 izoformu tarafından sitotoksisiteyi artıran proenflamatuar faktörler veya M2 izoformu tarafından yara iyileşmesine ve doku onarımına yardımcı olan antienflamatuar nöroprotektif faktörler salgılanır. İlk basamak yaralanmaya tepki olarak faydalı olsa da sitokinlerin ve serbest radikallerin salınımı TBH'nın ikincil aşamasında zararlı olabilir (22,28).

Literatürde mikroglial nöroenflamasyonun immunhistokimyasal belirteci olarak İBA-1; M1 ve M2 izoformlarının belirteçleri olarak sırasıyla iNOS ve ARG-1 bildirilmiştir (22). Yetişkin farelerde yapılan bir çalışmada thTBH sonrası 2. günde başlayan ve 7 haftaya kadar devam eden İBA-1 boyanması görülmüştür (74). Argininin 2 izoformu mevcuttur (ARG-1 ve ARG-2). Deneysel çalışmalarda ARG-1'in serebral korteks, hipokampus, beyincik, pons, medulla ve omurilikte ARG-2'den daha fazla eksprese edildiği ve ARG-1'in arginin-ornitin-glutamat-GABA yolağı üzerinden öğrenmede önemli rol oynadığı bildirilmiştir (28).

Deneysel thTBH'nin immün belirteçlerinin araştırıldığı bir çalışmada TBH sonrası 24 saat içinde periferik kanda ARG-1 ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir (75). htTBH'nin uzun dönem nörolojik sonuçlarının araştırıldığı başka bir çalışmada posttravmatik 7. günde eksternal kapsül bölgesinde iNOS pozitif, amigdalada ARG-1 pozitif mikroglia artışı görülmüş, 21.günden sonra geç dönemde mikroglial aktivasyon saptanmamıştır (1). Oysa travmatik ölüm sonrası insan beynindeki patolojik değişiklikleri araştıran bir çalışmada, yaralanmadan yıllar sonra bile mikroglial aktivasyonunun olabileceği bildirilmiştir (76).

Uzamış mikroglial aktivite AH, PH, ALS ve MS gibi nörodejeneratif hastalıkların oluşmasına neden olur ve bu hastalarda motor ve bilişsel işlevlerde ciddi bozulmalar görülür (22).

Çalışmamızda tekrarlayan kafa travması sonrası mikroglial aktivasyonu göstermek için İBA-1, iNOS ve ARG-1 boyamalarını uyguladık. Travma sonrası her 3 belirteçte pozitif artış saptadık. ZÇ tedavisi alan gruplarda erken grupta daha belirgin olmak üzere belirteçlerin düzeylerinde azalma görülmesi mikroglial aktivasyonda azalma olduğunu düşündürdü. Bu da özellikle erken tedavinin mikroglial aktivasyonu kısıtladığını ve beyin hasarını azalttığını gösterir. İBA1 (+) hücre sayısında sham gruplarında artış görüldü, sonuçlar kısa dönem kontrol grubundan anlamlı farklıydı, ancak uzun dönem kontrol grubu ile arasında anlamlı fark yoktu. Bu da tekrarlayan anestezinin beyin dokusunda akut dönemde İBA-1-pozitif hücre sayısında artışa neden olduğunu, ama geç dönemde bu etkinin gerilediğini gösterdi. Sham gruplarındaki artmış mikroglial aktivite erken tedavi grubuyla hemen hemen aynı düzeydeydi. Bu da erken tedavinin travmanın olumsuz etkilerini azalttığını, ancak anestezinin zararlı etkilerini tamamen ortadan kaldıramadığını düşündürdü.

*Amiloid- $\beta$ , P-TAU ve APP:*

Tekrarlayan hTBH, A $\beta$  ve mikrotübül ilişkili bir protein olan P-TAU'dan oluşan yanlış katlanmış protein kümelerinin birikimini tetikleyerek AH ve kronik travmatik ensefalopati gibi bazı nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde ve etiolojisinde önemli rol oynar (63). Nörofibriler yumaklar aynı zamanda hücre iskeleti bütünlüğünü ve aksonal iletiyi bozarak hücre ölümüne de neden olabilir (29,30). BOS ve beyin parenkiminde A $\beta$  düzeyindeki artışın bilişsel bozukluklarla korele olduğu saptanmıştır. Ayrıca erken demansı olan hastalarda A $\beta$  birikiminin mikroglial ve astroglial hücreleri aktive ettiği gösterilmiştir. Mikroglial ve astroglial hücre aktivasyonu sekonder hasarın gelişmesinde ana mekanizmalardan biridir (30).

TAU oligomerlerinin, A $\beta$ 'ya benzer bir şekilde nörodejenerasyon ve bellek bozukluğu ile bağlantılı olduğu düşünülür. AH tanısı için BOS'ta p-TAU 231 ve p-TAU 181 özgülüğü karşılaştırılmış ve p-TAU 231'in n daha özgül olduğu bildirilmiştir (31).

Akut TBH çalışmalarında TBH sonrası A $\beta$  ve TAU birikiminin yanı sıra APP üretiminin ve birikiminin de arttığı gösterilmiş, APP üretimi hipokampusta nöronal

kayıpla ilişkilendirilmiştir. Erişkin farelerde yapılan tTBH çalışmasında PFK ve korpus kallozumda APP birikimi gösterilmiştir (63,75). Travma sonrası APP'nin hücrel gen ekspresyonu da artar (77).

Çalışmamızda travma sonrası geç dönemde literatürle uyumlu olarak p-TAU 181 ve p-TAU 231'in yanı sıra A $\beta$  ve APP proteinlerinde belirgin artış izlendi. Bu da infantil dönemde thTBH'nin daha ileri yaşlarda nörodejeneratif hastalıklara neden olabileceğini ve nörobilişsel işlev bozuklukları gelişebileceğini düşündürdü. Tekrarlayan anestezi sonrası akut ve kronik dönemde sham grubunda APP ve A $\beta$  (+) hücre sayısında artış görüldü. Lakin travma grubundaki kadar şiddetli değildi. Bu da tekrarlayan anestezinin bilişsel işlevler üstünde travma kadar ağır olmasa da bir miktar hasar oluşturduğunu ortaya koydu. APP'nin erken tedavi sonrası azalması erken tedavinin travma sonrası kronik dönemde gelişen AH, demans, MS, PH ve ALS gibi nörodejeneratif hastalıkların ZÇ ile önlenebilirliğini düşündürdü. Tedaviye geç başlanması APP değerlerini azaltmadı. Tedavi gruplarında travma ve tekrarlayan anesteziye bağlı artmış p-TAU 181 ve p-TAU 231 pozitif hücre sayısında azalma görüldü. Bu azalma erken tedavi grubunda sham grubundan daha düşük, geç tedavi grubunda ise sham grubu ile aynı oranda pozitifliğe neden oldu. Bu da tedaviye erken başlandığında anestezinin negatif etkisinin tamamen ortadan kalktığını gösterdi.

Amiloid  $\beta$  birikintileri ZÇ tedavisinden hemen hiç etkilenmedi. Bu durumun çalışmamızda kullanılan antikor klonundaki farklılıklara, dilüsyon farklılıklarına veya boyama tekniğindeki farklılıklara bağlı gelişmiş olabileceği düşünüldü.

### **Zenginleştirilmiş Çevre Tedavisi:**

Travmatik beyin hasarında klinik uygulamadaki mevcut tedavilerin etkinliği azdır. Travma sonrası nörodejenerasyon gelişmesini önlemek ya da ilerlemesini durdurmak için yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi gerekir. Son zamanlardaki deneysel ve klinik çalışmalar, farklı ortam koşullarının beyin fonksiyonları üzerinde etkisi olabileceğini göstermiş (52), özellikle ZÇ tedavisi ile deneysel çalışmalarda iyi sonuçlar alınmıştır. Çevresel zenginleştirme, genişletilmiş bir yaşam alanı, artan sosyalleşme ve hayvanların sıklıkla etkileşime girdiği yeni uyaranlardan oluşan bir klinik öncesi nörorehabilitasyon modelidir (49).

Deneysel çalışmalarda ZÇ'de tutulmanın neonatal hipoksik-iskemiye maruz kalmış rat modellerinde nöral doku hasarlanmasını ve akut hücre ölümünü azalttığı,

hipokampusta doku kaybını ve hafıza bozukluklarını önlediği gösterilmiştir (78). ZÇ koşulları yeni sinir hücresi oluşumunu (nörojenez) artırır ve özellikle hipokampus ve kortikal gri maddedeki nöronlarda nörotrofik faktörlerin artışı sağlayarak nöroprotektif etki gösterir (49,50). ZÇ'nin sinaptik yapısal değişikliklerle öğrenme ve belleği güçlendirdiği, travmadan önce uygulanmasının TBH'nin neden olduğu mekansal öğrenme ve hafıza hasarını azalttığı bildirilmiştir (50,52).

Zenginleştirilmiş çevrenin amiloid plak nöropatolojisi olan farelerde bilişsel gelişime olumlu etkisi gösterilmiştir, ancak amiloid patofizyolojisine etkisi tartışmalıdır. Selvi ve ark.'nın çalışmasında ZÇ'de tutulan hayvanların APP, A $\beta$  ve TAU seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla daha düşük olduğu bildirilmiştir (78). Jankowsky ve ark.'nın iki çalışmasında ise ZÇ grubundaki deneklerde amiloid miktarında artış olmasına rağmen, bilişsel bozukluklarda iyileşme gösterilmiştir (79). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde ZÇ tedavisi bilişsel işlevlerde olumlu etki göstermesine rağmen A $\beta$  düzeylerinde azalma sağlamadı.

Bir çalışmada ZÇ'nin astrosit hacmi, sayısı ve bunlarla ilişkili GFAP pozitifliğinde azalmaya neden olduğu gösterilmiş ve ZÇ'nin hipokampusta yaşla birlikte artan gliozisi önlediği düşünülmüştür. Duran ve ark.'nın çalışmasında HİE oluşturulmuş ratlarda prenatal ve erken postnatal dönemde ZÇ'de tutulmanın HİE'nin neden olduğu akut hücre ölümünü azalttığı, nörogelişimsel gecikmeyi ve bellek üzerinde oluşabilecek sorunları önlediği, hipokampusta ve pariyetal kortekste GFAP seviyesini azalttığı gösterilmiştir (80). Bu sonuçlar bizim bulgularımızla uyumludur.

Zenginleştirilmiş çevre genç ve yaşlı sıçanlarda kortikal ağırlığı ve kortikal kalınlığı da artırır. Bu artışa sinir hücresi büyüklüğünün, dendritlerin sayısı ve uzunluğunun ve postsinaptik kalınlığın artmasının neden olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda dendritik dallanmanın arttığı gözlenmiştir. ZÇ'deki hayvanlarda nöronların somalarının ve nükleuslarının büyüklüğünün arttığı, dendritlerin sayısının ve boyutlarının, sinaps hacminin ve sayısının, glia hücrelerinin sayısının arttığı ve doku greftinin daha başarılı olduğu bulunmuştur (49-52).

Zenginleştirilmiş çevrenin nörodavranış testleri üzerine olan etkileri araştırılırken bazı çelişkili sonuçlarla karşılaşmıştır. Bunun nedeninin denek için hazırlanmış ZÇ modellerinin tipi, deneğin ortama erken/geç dönemde girmesi, ortamda kalış süresi, deneğin yaşı, türü ve cinsiyeti, modelin diğer bileşenleri gibi

değişikliklere bağlı olabileceği düşünülmektedir. Örneğin ZÇ, farelerde nesnelere tanınması testlerindeki performansı artırır. Ancak NMDA reseptör işlevleri artırılan farelerde bu artış belirgin değildir. Bu durum NMDA reseptör aktivitesinin artırılmasının ZÇ'nin etkilerini maskeleydiğini düşündürür. Ancak farklı olarak YNT testinde, ZÇ'de tutulan ve NMDA reseptör aktiviteleri artırılanlarda sadece NMDA reseptör aktivitesi artırılanlara göre, bellek performansları daha uzun süre yüksek kalır (48).

Kemirgenlerde nörodavranış testlerinin zaman zaman güvenilir sonuçlar vermemesinin diğer bir nedeni, normal şartlarda gece veya alacakaranlıkta yaşayan bu hayvanlara, normalde uyumaları gereken bir zamanda, ışık ortamında deneyler yapılıyor olmasıdır. Ayrıca, ZÇ tedavisinin sonuçlarını etkileyen diğer faktörler, ZÇ'ye maruz kalınan yaş, süre ve ZÇ oluşturma prosedürüdür. İnfantil dönemdeki denekler nöronal plastisite açısından daha şanslıdır, bu da travma sonrası hasara daha ılımlı yanıt vermelerini, tedaviden daha iyi sonuç alınmasını sağlar (5). Literatürde TBH sonrası ZÇ tedavisine erken veya geç dönem başlanması tedavinin başarısını etkileyip etkilemediğini araştıran çalışmalar mevcuttur. Bunlardan Johansson'un yayınında ZÇ'nin ertelenebilir olduğu, sensorimotor fonksiyonun iyileştirilmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (79). Başka bir çalışmada ise ZÇ'nin ne zaman başladığından çok, en az 2 hafta devam etmesinin daha önemli olduğu vurgulanmıştır (81).

Çalışmamızda YNT gibi öğrenme testlerinin sonuçlarının tedavinin zamanlamasıyla ilişki olmadığı, MSL ve YAL gibi öğrenme ve stres testlerinin erken başlanan tedaviden daha fazla yarar gördüğü izlendi. Gümüş, iNOS, p-TAU 181 ve p-TAU 231 haricindeki belirteçler erken tedavi grubunda, geç tedavi grubuna göre daha iyi sonuçlar gösterdi. Gümüş, iNOS ve p-TAU 181 boyama sonuçları erken ve geç tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmasa da travma ile tedavi grupları ayrı ayrı değerlendirildiğinde erken tedavi grubunun daha yüksek düzeyde olumlu sonuç verdiği görüldü. APP erken tedavi grubunda tedaviye yanıt gösterirken, geç tedavi grubunda değişiklik gözlenmedi. Aβ ise hem erken hem de geç tedavi gruplarında ZÇ tedavisine yanıt vermedi.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar üzerinde tekrarlayan travmanın etkisi olduğu kadar her travma öncesi uygulanan anestezinin de etkisi olduğu düşünülebilir. İnfantil ratlarda 5 gün boyunca tekrarlayan anestezinin yetişkinlik döneminde bilişsel

işlevlerde bozukluğa neden olduğu bildirilmiştir (82). Anestezi kaynaklı bu etki doza ve maruziyet süresine bağlıdır ve belirli bir ilaç sınıfının ajanlarıyla sınırlı bir durum değildir (83).

Çalışmamızda da bu sonuçlarla uyumlu şekilde YNT testinde yeni nesne ile geçirilen süre, YALT testinde açık kolda geçirilen süre, MSL testinde ise hedef bölgede geçirilen süre tekrarlayan anestezinin etkisine bağlı olarak sham gruplarında azaldı. Lakin bu azalmalar travma grubundaki kadar belirgin değildi. Bu da tekrarlayan anestezinin, öğrenme ve belleği, travma kadar olmasa da negatif yönde etkilediğini düşündürdü.

#### **Kısıtlamalar:**

Çalışmamızın eksikliklerinden birinin cinsiyet değerlendirmesi yapılmaması olduğu ileri sürülebilir. Literatürdeki bazı çalışmalarda hTBH sonrası bakılan biyokimyasal belirteçlerin ve bilişsel testlerin cinsiyetle farklılık gösterebildiği, aynı zamanda uygulanan tedaviden de cinsiyete bağlı farklı sonuçlar elde edilebildiği belirtilmesine rağmen karşı görüşte yayınlar da olması ve cinsiyet farklılıklarının çalışmamızın odak noktası olmaması nedeniyle bu durum gözardı edilmiştir. Bir çalışmada thTBH oluşturulan dişi sıçanlarda artmış GFAP ekspresyon bulgusu, erkek sıçanlara göre daha yüksek astrogliozis ve enflamasyon yanıtı gösterebilecekleri şeklinde yorumlanmıştır (84). MSL performansındaki cinsiyet farklılıklarına ilişkin mevcut kanıtlar çelişkilidir. Bazı araştırmalar, erkeklerin uzamsal öğrenmede bir avantaja sahip olduğunu gösterirken, diğerleri, bu avantajın, kadınların stres tepkisini hafifletmeyi amaçlayan ek eğitime tabi tutulduklarında ortadan kalktığını öne sürer. Bununla birlikte, güncel çalışmalar MSL performans testinde temel cinsiyet farkının olmadığı yönündedir (85).

Çalışmamızın deneysel olması başka bir dezavantajdır, çünkü özellikle ratlarda yapılan davranış çalışmaları klinik çalışmalardan farklı sonuç verebilir. Bu nedenle hTBH sonrası ZÇ tedavisinin etkisinin uygun klinik çalışmalarla desteklenmesi gereklidir.

## **5. SONUÇ**

Çalışmamızda infantil dönemde thTBH'nin erken ve geç dönemde bilişsel işlevlere, beyindeki histolojik ve immünohistokimyasal bulgulara etkisini ve erken ve

geç dönemde uygulanan ZÇ tedavisinin bu olumsuz etkileri geri döndürme derecesini araştırdık.

Sonuç olarak, çalışmamız thTBH sonrası ZÇ tedavisinin kaygıda azalma, mekansal öğrenme ve hafıza performansında artış gibi olumlu işlevsel etkilerinin olduğunu gösterdi. ZÇ tedavisi alan deneklerde yeni bir ortama uyum sağlama yeteneklerinin daha iyi olduğu, bu yeni ortamda özgürce hareket ederek araştırma ve keşfetmeye yönelik davranış özellikleri sergiledikleri, mekansal verileri daha etkili kullandıkları ve anksiyete düzeylerinin daha az olduğu izlendi. Aynı zamanda tedaviye erken başlamanın tedavinin etkinliğini arttırdığı da gösterildi. Bu sonuç histolojik ve immünohistokimya bulgularıyla desteklendi. Tekrarlayan anestezi ve travmanın neden olduğu astrogliosis, mikroglial aktivasyon ve nörodejeneratif hastalıkların belirteçlerindeki artış özellikle erken dönemde başlayan ZÇ tedavisinden yarar gördü.

## 7. KAYNAKLAR

1. Fidan E, Lewis J, Kline AE, Garman RH, Alexander H, Cheng JP, et al. Repetitive Mild Traumatic Brain Injury in the Developing Brain: Effects on Long-Term Functional Outcome and Neuropathology. *J Neurotrauma*. 2016, 33(7):641-651.
2. Zemek R, Barrowman N, Freedman SB, Gravel J, Gagnon I, McGahern C, et al. Clinical Risk Score for Persistent Postconcussion Symptoms Among Children With Acute Concussion in the ED. *JAMA*. 2016; 315(10):1014-25.
3. Sariaslan A, Sharp DJ, D'Onofrio BM, Larsson H, Fazel S. Long-Term Outcomes Associated with Traumatic Brain Injury in Childhood and Adolescence: A Nationwide Swedish Cohort Study of a Wide Range of Medical and Social Outcomes. *PLoS Med*. 2016;13(8):e1002103.
4. Araki T, Yokota H, Morita A. Pediatric Traumatic Brain Injury: Characteristic Features, Diagnosis, and Management. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2017;57(2):82-93.
5. Simpson J, Kelly JP. The impact of environmental enrichment in laboratory ratsbehavioural and neurochemical aspects. *Behav Brain Res*. 2011; 222(1): 246-264.

6. Anderson T, Heitger M, Macleod AD. Concussion and mild head injury. *Practical Neurology* 2006; 6(6):342-57.
7. Sanchez GM, Burridge AL. "Decision making in head injury management in the Edwin Smith Papyrus". *Neurosurg Focus* 2007; 23(1):1-5.
8. Ökten Aİ, Okay Ö. Kafa Travmalarının Tarihçesi. *Ulusal Travma Dergisi* 1998; 4(2):86-8.
9. Missios S. Hippocrates, Galen and the uses of trepanation in the ancient classical world. *Neurosurg Focus* 2007; 23:11.
10. Uzel İ. Cerrahiyetü'l Haniyye. *Türk Tarih Kurumu Yayınları*, Ankara 1992.
11. Erbenği A. History and development of neurosurgery in Anatolia (part one). *Turkish Neurosurgery* 1993; 3:1-5.
12. Fehily B, Fitzgerald M. Repeated Mild Traumatic Brain Injury: Potential Mechanisms of Damage. *Cell Transplant*. 2017; 6(7):1131-1155.
13. National Center for Injury Prevention and Control. Report to Congress on Mild Traumatic Brain Injury in the United States: Steps to Prevent a Serious Public Health Problem. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 2003.
14. Karasu A, Sabancı PA, Cansever T, Hepgöl KT, İmer M, Dolaş İ, et al. Epidemiological study in head injury patients. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 2009; 15(2):159-163
15. Chendrasekhar A, Kuczabski B, Cohen D, Grageda M, Genovese-Scullin D, Patwari J, et al. Delayed Sequelae Related to Mild Traumatic Brain Injury in Children. *Glob Pediatr Health* 2020; 7:2333794X20947988.
16. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet* 1974; 2(7872): 81-4.
17. Wright DW. Tintinalli's Emergency Medicine. Head Trauma in Adults and Children, ed. E. Judith. 2010: McGraw Hill Professional.
18. Werner C, Engelhard K, Pathophysiology of traumatic brain injury, *BJA: Br J Anaesth* 2007; 99 (1): 4–9.
19. Ergüngör MF. Kafa Travmalarında Patofizyoloji, İçinde Temel Nöroşirurji. Türk Nöroşirurji Derneği Yayınları. Ankara 2005.
20. Mckee AC, Daneshvar DH. The neuropathology of traumatic brain injury. *Handb Clin Neurol*. 2015; 127:45-66.

21. Güzey FK. Kafaiçi Basınç ve Beyin Biyomekaniği İçinde Biyomekaniğin Temelleri; Naderi S, Karakoç Y (editörler); SBÜ Yayınları, İstanbul, 2020, pp47-58..
22. Guo S, Wang H, Yin Y. Microglia Polarization From M1 to M2 in Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci.* 2022; 14:815347.
23. Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol.* 2016;53(2):1181-1194.
24. Karve IP, Taylor JM, Crack PJ: The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br J Pharmacol* 2016; 173(4):692-702,
25. Clark WM, Madden KP, Rothlein R, Zivin JA: Reduction of central nervous system ischemic injury in rabbits using leukocyte adhesion antibody treatment. *Stroke* 1991; 22:877–883.
26. Staining methods/ Staining of nevre tissue. Core curriculum of Neuropathology. Digital and Computational Neuropathology.Tokyo Metropolitan İnstitute of Medical Science. <https://pathologycenter.jp/crrinpa/crrinpa10.html>.
27. Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S. Microglia/macrophage-specific protei\*\*n Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem.* 2004; 88(4):844-56.
28. Madan S, Kron B, Jin Z, Al Shamy G, Campeau PM, Sun Q, et al. Arginase overexpression in neurons and its effect on traumatic brain injury. *Mol Genet Metab.* 2018; 125(1-2):112-117
29. Link DJD, Butterfield DA. Oxidative stress precedes fibrillar deposition of Alzheimer's disease amyloid beta-peptide (1-42) in a transgenic *Caenorhabditis elegans* model. *Neurobiol Aging,* 2003. 24(3): 415-20.
30. Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, et al. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin.* 2017; 38(9):1205-1235.
31. Spiegel J, Pirraglia E, Osorio RS, Glodzik L, Li Y, Tsui W, et al. Greater specificity for cerebrospinal fluid P-tau231 over P-tau181 in the differentiation of healthy controls from Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2016; 49(1):93-100.
32. Huh JW, Widing AG, Raghupathi R. Basic science; repetitive mild non-contusive brain trauma in immature rats exacerbates traumatic axonal injury and axonal calpain activation: a preliminary report. *J Neurotrauma.* 2007; 24(1):15-27.

33. Duran Burda JE, Sofroniew MV. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 2014; 81:229–248..
34. Albert-Weissenberger C, Sirén AL. Experimental traumatic brain injury. *Exp Transl Stroke Med.* 2010 13;2(1):16.
35. O'Connor WT, Smyth A, Gilchrist MT. Animal models of traumatic brain injury: A critical evaluation. *Pharmacol Therap* 2011; 130:106–113.
36. Jenkins A, Maxwell WL, Graham DI. Experimental intracerebral haematoma in the rat. Sequential light microscopical changes. *Neuropath Appl Neurobiol* 1989; 15: 477-86.
37. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji (14.baskı), Çeviri Editörü: Berrak Çağlayan Yeğen, GüneşTıp Kitabevleri, 2022.
38. Ganong WF. Tıbbi Fizyoloji (25.baskı), Çeviri editörü: Ayse Dogan, İstanbul, Baris Kitabevi, 2022
39. Barrett K, Brooks H, Boitano S, Barman S. Ganongs' Review of Medical Physiology (23.edition), The United States, The McGraw-Hill Companies Inc., 2012, p289.
40. Nyberg L, Marklund P, Persson J, Cabeza R, Forkstam C, Peterss KM, et al Common prefrontal activations during working memory, episodic memory and semantic memory. *Neuropsychology* 2003; 41:371-377.
41. Nunn JA, Graydon FJ, Polkey CE, Morris RG. Differential spatial memory impairment after right temporal lobectomy demonstrated using temporal titration. *Brain.* 1999; 122 (1): 47-59.
42. Schultz C, Engelhardt M. Anatomy of the hippocampal formation. *Front Neurol Neurosci.* 2014; 34:6-17.
43. İzci Y, Erbaş YC. Hipokampus: Yapısı ve Fonksiyonları. *Türk Nöroşir Derg* 2015, 25(3), 287-295.
44. Simons JS, Spiers HJ. Prefrontal and medial temporal lobe interactions in long-term memory. *Nature Rev Neurosci*, 2003; 4: 637-648
45. Duncan J. Ana adaptive coding model of neural function in prefrontal cortex. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 820-829.
46. Yüksel, N. Psikofarmakoloji (3.baskı), İstanbul: MN Medikal ve Nobel Tıp Kitabevi, 2007.

47. Chamberlain SR, Müller U, Blackwell AD, Robbins TW, Sahakian BJ. Noradrenergic modulation of working memory and emotional memory in humans. *Psychopharmacology (Berl)* 2006; 188(4):397-407.
48. Cai R, Zhou X, Guo F, Xu J, Zhang J, Sun X. Maintenance of enriched environment-induced changes of auditory spatial sensitivity and expression of GABAA, NMDA, and AMPA receptor subunits in rat auditory cortex. *Neurobiol Learn Mem.* 2010; 94(4): 452-460.
49. Ajagbē A O, Ajenikoko M K, Ajiboye E O. An Overview of the Therapeutic Effects of Environmental Enrichment on Traumatic Brain Injury. *J Clin Basic Res.* 2021; 5 (4) :9-15
50. Williams BM, Luo Y, Ward C, Redd K, Gibson R, Kuczaj SA, et al. Environmental enrichment: Effects on spatial memory and hippocampal CREB immunoreactivity. *Physiol. Behav.* 2001; 73: 649–658.
51. Duffy SN, Craddock KJ, Nguyen PV. Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus dependent memory. *Learn. Mem.* 2001; 8: 26–34.
52. Hannan AJ. Environmental enrichment and brain repair: harnessing the therapeutic effects of cognitive stimulation and physical activity to enhance experience-dependent plasticity. *Neurobiol Appl Neurobiol.* 2014; 40(1):13-25.
53. Kane MJ, Angoa-Pérez M, Briggs DI, Viano DC, Kreipke CW, Kuhn DM. A mouse model of human repetitive mild traumatic brain injury. *J Neurosci Methods.* 2012; 203(1):41-9.
54. Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg.* 1977; 47(4):577-81.
55. Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc.* 2006; 1(2):848-58.
56. Lueptow LM. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *J Vis Exp.* 2017 30;(126):55718.
57. Bevins R A, Besheer J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nature Prot,* 2006; 1(3), 1306–1311

58. Satomoto M. Neonatal exposure to sevoflurane induces abnormal social behaviors and deficits in fear conditioning in mice. *Japanese J Anesthesiol.* 2010; 59(SUPPL.Nov):628–637.
59. Swanson LW: Brain Maps: Structure of the Rat Brain. 3 ed. USA: Elsevier Inc; 2004.
60. Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS One.* 2014; 9(5):e96801.
61. Patera F, Cudzich-Madry A, Huang Z, Fragiadaki M. Renal expression of JAK2 is high in polycystic kidney disease and its inhibition reduces cystogenesis. *Sci Rep.* 2019; 9(1):4491.
62. Edwards G 3rd, Moreno-Gonzalez I, Soto C. Amyloid-beta and tau pathology following repetitive mild traumatic brain injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 483(4):1137-1142.
63. Dikranian K, Cohen R, Mac Donald C, Pan Y, Brakefield D, Bayly P, et al. Mild traumatic brain injury to the infant mouse causes robust white matter axonal degeneration which precedes apoptotic death of cortical and thalamic neurons. *Exp Neurol.* 2008; 211(2):551-60.
64. Xu X, Cowan M, Beraldo F. Repetitive mild traumatic brain injury in mice triggers a slowly developing cascade of long-term and persistent behavioral deficits and pathological changes. *Acta Neuropathol Commun* 2021; 9, 60.
65. Pinkowski NJ, Guerin J, Zhang H, Carpentier ST, McCurdy KE, Pacheco JM, et al. Repeated mild traumatic brain injuries impair visual discrimination learning in adolescent mice. *Neurobiol Learn Mem.* 2020; 175:107315.
66. Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J.Neurosurg* 1994; 80(2): 291–300.
67. Ucar T, Tanriover G, Gurer I, Onal MZ, Kazan S Modified experimental mild traumatic brain injury model. *J Trauma.* 2006; 60(3):558-65.
68. Wang YS, Hsieh W, Chung JR, Lan TH, Wang Y. Repetitive mild traumatic brain injury alters diurnal locomotor activity and response to the light change in mice. *Sci Rep.* 2019; 9(1):14067.

69. Shishido H, Kishimoto Y, Kawai N, Toyota Y, Ueno M, Kubota T, et al. Traumatic brain injury accelerates amyloid- $\beta$  deposition and impairs spatial learning in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2016; 629:62-67.
70. Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein LJ. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol*. 2013; 106-107:1-16.
71. Sparling JE, Mahoney M, Baker S, Bielajew C. The effects of gestational and postpartum environmental enrichment on the mother rat: A preliminary investigation. *Behav Brain Res*. 2010; 208(1): 213-223.
72. Ooigawa H, Nawashiro H, Fukui S, Otani N, Osumi A, Toyooka T, et al. The fate of Nissl-stained dark neurons following traumatic brain injury in rats: difference between neocortex and hippocampus regarding survival rate. *Acta Neuropathol*. 2006; 112(4):471-81.
73. Patabendige A, Singh A, Jenkins S, Sen J, Chen R. Astrocyte Activation in Neurovascular Damage and Repair Following Ischaemic Stroke. *Int J Mol Sci*. 2021; 20;22(8):4280.
74. Shitaka Y, Tran HT, Bennett RE, Sanchez L, Levy MA, Dikranian K, et al. Repetitive closed-skull traumatic brain injury in mice causes persistent multifocal axonal injury and microglial reactivity. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2011;70:551-67.
75. Petrone AB, Gionis V, Giersch R, Barr TL. Immune biomarkers for the diagnosis of mild traumatic brain injury. *NeuroRehabilitation*. 2017; 40(4):501-508.
76. Johnson VE, Stewart JE, Begbie FD, Trojanowski JQ, Smith DH, Stewart W. Inflammation and white matter degeneration persist for years after a single traumatic brain injury. *Brain*. 2013; 136(Pt 1):28-42.
77. Plummer S, Van den Heuvel C, Thornton E, Corrigan F, Cappai R. The Neuroprotective Properties of the Amyloid Precursor Protein Following Traumatic Brain Injury. *Aging Dis*. 2016; 15;7(2):163-79.
78. Selvi Y, Gergerlioglu H, Akbaba N, Oz M, Kandeger A, Demir E, et al. Impact of enriched environment on production of tau, amyloid precursor protein and, amyloid- $\beta$  peptide in high-fat and high-sucrose-fed rats. *Acta Neuropsychiatr*, 2017;29, 291-8.

79. Johansson BB. Functional outcome in rats transferred to an enriched environment 15 days after focal brain ischemia. *Stroke* 1995; 27(2): 324–326.
80. Durán-Carabali LE, Arcego DM, Odorczyk FK, Reichert L, Cordeiro JL, Sanches EF, et al. Prenatal and Early Postnatal Environmental Enrichment Reduce Acute Cell Death and Prevent Neurodevelopment and Memory Impairments in Rats Submitted to Neonatal Hypoxia Ischemia. *Mol Neurobiol*. 2018; 55(5):3627-3641.
81. Matter AM, Folweiler KA, Curatolo LM, Kline AE. Temporal effects of environmental enrichment-mediated functional improvement after experimental traumatic brain injury in rats. *Neurorehabil Neural Repair*. 2011; 25(6):558-64.
82. Demirgan S, Akyol O, Temel Z, Şengelen A, Pekmez M, Ulaş O, et al. Intranasal levosimendan prevents cognitive dysfunction and apoptotic response induced by repeated isoflurane exposure in newborn rats. *Arch Pharmacol*. 2021; 394(7):1553-67.
83. Zhu C, Gao J, Karlsson N, Li Q, Zhang Y, Huang Z, et al. Isoflurane anesthesia induced persistent, progressive memory impairment, caused a loss of neural stem cells, and reduced neurogenesis in young, but not adult, rodents. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010; 30(5):1017-30.
84. Wright DK, O'Brien TJ, Shultz SR, Mychasiuk R. Sex matters: repetitive mild traumatic brain injury in adolescent rats. *Ann Clin Transl Neurol*. 2017; 4(9):640-654.
85. Boscolo A, Ori C, Bennett J, Wiltgen B, Jevtovic-Todorovic V. Mitochondrial protectant pramipexole prevents sex-specific long-term cognitive impairment from early anaesthesia exposure in rats. *Br J Anaesth*. 2013; 110 Suppl 1(Suppl 1):i47-52.