



T.C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

**DENEYSEL SUBARAKNOİD KANAMADA
MELATONİNİN VAZOSPAZM ÜZERİNE
ETKİLERİNİN HİSTOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE
MORFOMETRİK AÇIDAN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. A. Murat GEYİK
NÖROŞİRURJİ ANABİLİM DALI**

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. İbrahim ERKUTLU

Haziran 2009

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

DENEYSEL SUBARAKNOİD KANAMADA
MELATONİNİN VAZOSPAZM ÜZERİNE
ETKİLERİNİN HİSTOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE
MORFOMETRİK AÇIDAN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. A. Murat GEYİK
NÖROŞİRURJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. İbrahim ERKUTLU

I. ÖNSÖZ

Nöroşirurji eğitimim sırasında üzerimde büyük emeği olan, mesleki yaşantım boyunca ilmi ve ahlaki yönünü her zaman örnek alacağım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Abdulvahap GÖK'e, tez çalışmalarım ve eğitimim sırasında her zaman desteğini görüp, tecrübelerinden faydalandığım sayın hocalarım Yrd. Doç. Dr. İbrahim Erkutlu ve Yrd. Doç. Dr. Mehmet Alptekin'e, sıkıntılı ve güzel günlerimi paylaştığım asistan arkadaşlarıma, patoloji çalışmalarım sırasında yardımını esirgemeyen Prof. Dr. Abdullay Aydın'a sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca benden hiçbir zaman yardımını esirgemeyen aileme ve asistanlık hayatım sırasındaki bu zorlu süreçte hep yanımda olan eşim ve biricik oğluma sonsuz sevgilerimle.

Dr. Murat GEYİK

Gaziantep, 2009

II. İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
KISALTMALAR	IX
TABLolar	XI
ŞEKİLLER	XII
RESİMLER	XIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Subaraknoid kanama	3
2.1.1. Tanımı	3
2.1.2. Tarihçe	3
2.1.3. İnsidans	3
2.1.4. Risk faktörleri	4
2.1.5. Nedenleri	5
2.1.6. Belirti ve bulguları	6
2.1.7. Komplikasyonları	6
2.2. Serebral vazospazm	7
2.2.1. Tanımı	7
2.2.2. Tarihçe	7
2.2.3. Vazospazmın epidemiyolojisi	8
2.2.4. Vazospazmın fizyopatolojisi	8
2.2.5. Anjiyografik özellikler	12
2.2.6. Tanı	12
2.2.7. Tedavi	12

2.3. Oksidatif stres ve vazospazm ile olan ilişkisi	14
2.4. Antioksidan savunma sistemleri	15
2.4.1. Antioksidan etki mekanizmaları	16
2.4.2. Endojen antioksidanlar	16
2.4.2.1. Enzimatik antioksidanlar	16
2.4.2.2. Nonenzimatik antioksidanlar	19
2.4.3. Eksojen antioksidanlar	19
2.4.4 Melatonin	19
2.4.4.1. Pineal bez	19
2.4.4.2. Melatonin sentezi	20
2.4.4.3. Melatonin sentezinin kontrolü	21
2.4.4.4. Melatonin etki mekanizması ve inaktivasyonu	22
2.4.4.5. Melatonin biyolojik etkileri	24
2.4.4.6. Melatonin antioksidan etkileri	24
2.5. Total antioksidan durum	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Gruplar	27
3.2. Cerrahi girişim	27
3.3. Total antioksidan ölçümü	31
3.4. Total oksidatif stres ölçümü	32
3.5. Oksidatif stres indeksi	32
3.6. İstatistiksel yöntem	32
4. BULGULAR	33
4.1. Makroskopik bulgular	33
4.2. Biyokimyasal (Total antioksidan ve oksidan) ölçüm bulguları	33
4.3. Histopatolojik bulgular	33
4.4. Morfometrik ölçüm bulguları	34

5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	46
7. KAYNAKLAR	47

IV. ÖZET

DENEYSEL SUBARAKNOİD KANAMADA MELATONİNİN VAZOSPAZM ÜZERİNE ETKİLERİNİN HİSTOPATOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE MORFOMETRİK AÇIDAN ARAŞTIRILMASI

Dr. Murat GEYİK

Uzmanlık Tezi, Nöroşirurji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. İbrahim ERKUTLU

Haziran 2009, 59 Sayfa

Subaraknoidal kanama sonrası lipid peroksidasyonunun aktive olması ve araşidonik asit metabolitlerinin artması, geç dönem vazospazm da görülen nöronal hasarın indikatörü olduğu çeşitli çalışma-larda gösterilmiştir. Bizim bu deneysel çalışmada amacımız bir antioksidan olan melatoninin subaraknoid kanamaya bağlı geç dönem vazospazmdaki baziler arter tonus değışikliklerini ve melatoninin oksidatif dengelere olan etkisini histopatolojik, biyokimyasal ve morfolometrik açıdan incelemektir.

Çalışmada ağırlıkları 300–350 g olan toplam 24 adet erkek Wistar cinsi sıçan kullanıldı. Denekler randomizasyon ile 4 gruba ayrıldı. IV. Grup hariç; I., II. ve III. grup deneklerde genel anestezi altında steril şartlarda interparietal-okspital sutürün hemen üstünden bir adet burr-hole açılarak sisterna magna ortaya kondu. Yaklaşık 0.3 ml beyin omurilik sıvısı (BOS) drene edildikten sonra ratların kuyruk arterinden alınan otolog kan (0.2ml) yavaş olarak sisterna magna içerisine enjekte edildi. Tedavi grubundaki ratlara (grup I (n=6, 10 mg) ve grup III (n=6, 5mg)) operasyon sonrası cilt kapatıldıktan hemen sonra melatoninin ilk dozu ve 24 saat sonrasında da ikinci dozu yine intraperitoneal yolla uygulandı. II.(n=6) ve IV.(n=6) gruplara ise herhangi bir tedavi uygulanmadı.

Sonuçta baziler arter morfolometrik çalışmalarda bütün gruplar ele alındığında (Kruskall-Wallis varyans analizi), melatonin 5 mg ve 10 mg verilen gruplarda (I. ve III. gruplar) baziler arter toplam alan ve damar duvar alanında kontrol grup ve yalnız subaraknoid kanama grubuna göre

istatistiki olarak belirgin derecede vazodilatasyon lehine artma olduğu görüldü ($p<0.05$). Melatonin verilen gruplarda (I. ve III. gruplar) kontrol ve yalnız SAK yapıp tedavi verilmeyen grubuna göre total antioksidan seviye, total oksidan seviye ve oksidatif stres indeksi seviyelerinde anlamlı bir değişiklik görülmedi ($p>0.05$).

Bu çalışmada mevcut literatürde önerilen terapötik dozlar uygulanmış fakat melatoninin total antioksidan düzeyini anlamlı ölçüde değiştirmedeği gözlenmiştir. Sonuç olarak melatonin deneysel subaraknoid kanamaya bağlı gelişen baziler arter vazospazmında morfometrik açıdan vazodilatasyona neden olsa da, beyin dokusundaki oksidatif dengeyi beklenen düzeyde etkilememiştir..

Anahtar Kelimeler: Serebral vazospazm, Subaraknoid kanama, Oksidatif metabolizma, Morfometri, Histopatoloji

VI. ABSTRACT

HISTOPATHOLOGIC, BIOCHEMICAL AND MORPHOMETRIC EFFECTS OF MELATONIN ON VASOSPASM IN EXPERIMENTAL SUBARACHNOID HEMORRHAGE

Residency Thesis, Department of Neurosurgery

Supervisor: Assist. Prof. İbrahim ERKUTLU

June 2009, 59 Pages

It has been previously demonstrated that activation of lipid peroxidation and increase in arachidonic acid metabolites which occur following a subarachnoid hemorrhage are indicators of neuronal injury that take place during late term vasospasm. The purpose of this experimental study is to investigate the histopathologic, biochemical and morphometric effects of melatonin on tonus of basillary artery and oxidative balances during subacute vasospasm following a subarachnoidal hemorrhage.

24 male wistar rats weighing between 300-350g were used in the study. Rats were divided randomly in to 4 groups. Rats in group I, II and III (except group IV) were operated under general anesthesia with sterile technique. A burr hole was made on the interparietal-occipital suture line and cisterna magna was exposed. 0,3ml of cerebrospinal fluid was drained and 0.2ml of otogenous blood obtained from tail artery was injected slowly into cisterna magna. Having sutured the surgical wound in group I (n=6, 10mg) and III (n=6, 5mg), the first dose of the melatonin was administrated intraperitoneally and then 2nd dose was administreted intraperitoneally at 24th hour after surgery. Rats in group II (n=6) and group IV (n=6) did not receive any treatment. Rats in group II (n=6) and group IV (n=6) did not receive any treatment.

Morphometric evaluation of basillary artery was conducted and results were compared between groups using Kruskall-Wallis variance analysis. In group I which

received 5mg melatonin and in group III which received 10mg melatonin, total area of basillary artery and area of vessel wall were found to be increased suggesting vasodilation ($p<0.05$). No significant changes were observed in levels of TAS, TOS and OSI in comparasion to control and subarachnoid hemorrhage groups ($p>0.05$).

In our study, regular therapeutic doses of melatonin were administered but the drug head no significant effect on total levels of antioxidants. As a result, melatonin causes a morphometric vasodilation on vasospasm of basillary artery after subarachnoid hemorrhage. It does not have a significant effect on the oxidative balance of brain tissue. This could have been caused by insufficient data on density and distribution of melatonin receptors in the paranchyma and vascular bed.

Key words: Cerebral vasospasm, Subarachnoid hemorrhage, Oxidative metabolism, Morphometry, Histopathology

VIII. KISALTMALAR

ACA	Anterior serebral arter
AVM	Arteriovenöz malformasyon
BOS	Beyin omurilik sıvısı
BOXes	Biluribin oksidasyon ürünleri
Ca	Kalsiyum
CAT	Katalaz
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
DA	Damar duvar alanı
ET	Endotelin
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GSH-Rx	Glutasyon redüktaz
GST	Glutasyon-S-Transferaz
GSSG	Okside glutasyon
H₂O₂	.Hidrojen peroksit
H.E	Hemotoksilen eozin
İA	Damar iç lümen alanı
i.p	İntraperitoneal
MAP kinaz	Mitojen aktive eden protein kinaz
MCA	Middle serebral arter
MIPAV	Medical Image Processing, Analysis and Visualization
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentetaz
n NOS	Nöronal nitrik oksit sentetaz
e NOS	Endotelyal nitrik oksit sentetaz
i NOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz

O₂⁻	Süper oksit radikali
OH⁻	Hidroksil radikali
ONOO⁻	Peroksinitrit
OSİ	Oksidatif stres indeksi
PCA	Posterior serebral arter
PT	Pars tuberalis
ROOH	Hidroperoksid
ROS	Reaktif oksijen ürünleri
SAK	Subaraknoid kanama
SOD	Süperoksid dismutaz
SF	Serum fizyolojik
SCN	Suprakiazmatik nükleus
SSS	Santral sinir sistemi
TA	Damar toplam alanı
TxA2	Tromboksan A 2
TAS	Total antioksidan seviye
TOS	Total oksidan seviye

X. TABLOLAR

Tablo 1. Parenkimal melatonine afinite gösteren bölgeler

Tablo 2. Vasküler yataktaki melatonin tutulum bölgeleri

Tablo 3. Grup 1 (SAK(+)) 10 mg melatonin)'deki deneklerin lümen alanı, duvar kalınlığı ve damar kesit alan ölçümleri

Tablo 4. Grup 2 (SAK(+))'deki deneklerin lümen alanı, duvar kalınlığı ve damar kesit alan ölçümleri

Tablo 5. Grup 3 (SAK(+)) 5 mg melatonin)'deki deneklerin lümen alanı, duvar kalınlığı ve damar kesit alan ölçümleri

Tablo 6. Grup 4 (SAK(-)) SF verilen)'deki deneklerin deneklerin lümen alanı, duvar kalınlığı ve damar kesit alan ölçümleri

Tablo 7. Tüm grupların toplam alan, iç alan, duvar alanı, duvar alanı/toplam alan, iç alan/toplam alan bulguları

Tablo 8. Tüm grupların toplam alan, iç alan, duvar alanı, duvar alanı-toplam alan oranı ve iç alan-toplam alan oranı yönünden Kruskal Wallis varyans analizi ile değerlendirilmesi

Tablo 9. Tüm grupların TAS, TOS ve OSİ yönünden Kruskal Wallis varyans analizi ile değerlendirilmesi

Tablo 10. Mann-withney U testi ile gruplar arası karşılaştırmada elde edilen p değerleri

Tablo 11. Mann-withney U testi ile gruplar arası toplam alan, iç alan, duvar alanı, TAS ve OSİ karşılaştırmaları

XI. ŞEKİLLER

Şekil 1. Subaraknoid kanama sonrası subakut dönem serebral vazospazm oluşumundaki faktörler

Şekil 2. Melatonin'in kimyasal yapısı

Şekil 3. Subakut dönem vazospazm da melatoninin rolü

Şekil 4. Baziler arterde morfometrik ölçüm tekniği

Şekil 5. 1. grup 3. denek mikroskopik incelemede baziler arter görülmekte (H.E x 200)

Şekil 6. 2. grup 1. denek mikroskopik incelemede baziler arter görülmekte (H.Ex200)

Şekil 7. 3. grup 3. denek mikroskopik incelemede baziler arter görülmekte (H.xE 200)

Şekil 8. 4. grup 5. denek mikroskopik incelemede baziler arter görülmekte (H.Ex200)

Şekil 9. Tüm grupların duvar alanı, iç alan ve toplam alan açısından karşılaştırılması

XII. RESİMLER

Resim 1. Rat kafatasındaki anatomik oluşumlar ve interpariyetal s    r lokalizasyonu

Resim 2. İnterpariyetal s    r   zerinden elektrikli mikrotur yardımı ile burr-hole a  lması

Resim 3. Burr-hole i  inden 25 gauge i  ne ile sisterna mangaya otolog kan enjeksiyonu

Resim 4. SAK sonrası beyin ve beyin sapı dokusunun makroskopik g  r  n    

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Serebral vazospazm subaraknoid kanamadan (SAK) sonra beyin tabanında bulunan geniş arterlerde ortaya çıkan patolojik daralmalardır ve genellikle etkilenen arterin distalindeki parenkimde doku perfüzyonundaki azalma ile birlikte (1). Vazospazm ilk kez anjiyografik olarak 1951’de Ecker ve Reimenschneider (2) tarafından gösterilmiştir. Serebral vazospazmın anjiyografik ve klinik olarak iki tanımlaması vardır. Anjiyografik vazospazm ana arter lümeninin segmental veya yaygın olarak daralmasıdır. Klinik vazospazm ise serebral arterlerin daralmasına bağlı ortaya çıkan iskeminin sonuçlarının oluşturduğu durumdur. Anjiyografik olarak saptanan vazospazm subakut dönem vazospazm olup SAK sonrası 3 ile 14. günlerde maksimuma ulaşır ve 2 ile 4. haftada giderek azalır. Vakaların hemen hemen yarısında vazospazm nörolojik defisitlerin ortaya çıkması ile kendini gösterir (3). Bugün gelinen noktada vazospazm gelişiminin çok etkenli olduğu düşünülmektedir. SAK sonrasında endotelial nitrik oksit sentetaz (eNOS) aktivitesinin azalması, nitrik oksid (NO) seviyesinin azalması NO’nin nitrit ve nitrat dönüşümü, serbest oksijen radikallerinin artması ve buna bağlı olarak membran fosfolipidlerinin oksidasyonu ve lipid peroksidasyonu, endotel hasarı ve vasküler düz kas hücre proliferasyonunun indüklenmesi vazospazmın altında yatan oksidatif metabolizmaya ait nedenler olarak sıralanmaktadır (4,5). Anevrizmal SAK sonrası görülen nörolojik fonksiyon gerilemesinin en önemli sebebi olan serebral vazospazm, SAK’nın ilk etkilerinden kurtulan olguların %50’sinden fazlasında anjiyografik, %32’sinde de klinik olarak gözlenir. SAK sonrasında izlenen klinik tabloda hastaların %12’si herhangi bir tıbbi tedavi verilmeden exitus olmakta, %25’i ilk 24 saat içinde, diğer %40-60’lık kısmı ise ilk 30 gün içinde exitus olmaktadır. Organizmalar, serbest radikallerin yol açtığı oksidatif hasara karşı kendilerini koruyabilmek için birçok savunma mekanizmasına sahiptirler. Bu mekanizmaların başında da süper oksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleri gelmektedir. Özellikle de mitokondrilerdeki elektron transport zinciri reaksiyonları sonucunda oluşan serbest radikallerin miktarının artması nedeniyle oksidatif stres oluşması, bu antioksidan savunma sistemi ile engellenmektedir.

Antioksidan özelliği kanıtlanan melatonin, lipofilik özelliğinden dolayı organizmada çok geniş alanda etki gösterebilmekte olup kan-beyin bariyerini rahatlıkla geçebilir, hücrelerin çekirdekleri dahil tüm organellere ulaşabilir. Bu özellik, dejeneratif veya oksidatif değışikliklere neden olan hastalıklara karşı makromoleküllerin ve özellikle mitokondri ve DNA'nın oksidatif hasardan korunmasında melatonine bir üstünlük kazandırmaktadır.

Bizim bu deneysel çalışmadaki ana amacımız potent bir antioksidan olarak bilinen melatoninin subaraknoid kanamaya bağlı subakut dönem vazospazm üzerine olan etkisini histopatolojik, biyokimyasal ve morfometrik açıdan incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. SUBARAKNOİD KANAMA (SAK)

2.1.1. Tanım

SAK, hemorajik özellikte inme tiplerinden olup, tüm inmelerin %6-8 ini oluşturur. Spontan SAK'da kan, subaraknoid aralığa aşağıdaki yollardan ulaşır:

- Bir arter veya bir venin yırtılması sonucu direkt olarak subaraknoid aralığa ulaşması
- Parankimdeki kanamanın ventriküllere ve buradan da subaraknoid aralığa geçmesi
- Subdural mesafedeki bir effüzyonun araknoidi yırtması
- Kortekse yakın bir kanamanın pia materi yırtarak subaraknoid aralığa geçmesi

2.1.2. Tarihçe

SAK'ın tarihçesine baktığımızda; 1761'de Morgagni, ilk olarak intrakranial anevrizmaları tanımlayanlardandır. 1778'de Biuni, SAK kliniğini ilk defa tanımlamıştır. 1819'da Sarre's subaraknoid kanamaların serebral kanamalardan ayrı ele alınması gerektiğini belirtmiştir. 1891'de Quincke, lomber ponksiyonu uygulamıştır. Bundan sonra BOS'un beyin cerrahisi pratiğine girmesi sonucu, SAK tanısını koymak oldukça kolaylaşmıştır. 1904'te Froin, SAK'lı hastalarda BOS'taki değişiklikleri araştırmıştır. 1927'de Moniz, serebral anjiyografiyi uygulamaya koyması sonucu SAK etiyolojisi hakkındaki bilgiler artmıştır. 1931'de Seckel, spontan kanamaları idiyopatik ve semptomatik olarak ikiye ayırmıştır. 1936'da Ehrenberg SAK'ı spontan ve travmatik olarak ayırmış olup spontan olanları da primer ve sekonder diye ayırmıştır (7).

Bilgisayarlı Tomografi, Manyetik Rezonans, serebral konvansiyonel ve dijital substraksiyon anjiyografisindeki ilerlemeler SAK olguları üzerindeki bilgilerimizi zamanla artmıştır.

2.1.3. İnsidans

Subaraknoid kanamalı bazı olguların ağır klinik tabloları nedeniyle tedavi başlamadan kaybedilmeleri, bazılarının da ilk gören hekimin yanlış teşhis etmesi nedeniyle günümüzde gerçek görülme oranlarını bildirmek oldukça güçtür. SAK tüm inmelerin %10'unu ve serebrovasküler ölümlerin %25'ini teşkil etmektedir. SAK'ın görülme sıklığı her 100.000'lik nüfusta yılda 10 ila 16 arasında değişmekle birlikte, bu oranların yaş ilerledikçe (ortalama 50 yaş) arttığı bildirilmiştir (8). SAK'ın dünyanın değişik ülkelerinde görülme sıklığı; Japonlarda 25/ 100 000, Amerika Birleşik Devletlerinde 6–16/100 000, Finlandiya da 15.7/100 000, Hollanda da 10/100 000 kişide görüldüğü bildirilmiştir. Finlandiya ve Japonya'da SAK'ın görülme oranları dünyanın diğer ülkelerine nazaran daha yüksektir. 1996 yılında Lin ve arkadaşları (9) yaptıkları bir meta analiz çalışmasında SAK'ın görülme sıklığının her 100.000'lik nüfusta yılda ortalama 10.5 kişi olduğunu bildirmişlerdir. SAK'ın mortalite oranı Pakarinen serisinde (10) %40.6 olarak bildirilirken, SAK sonrası yaşayanların 6 ay sonra %50-75'inin nörolojik defisit olmadan önceki hayatlarına dönebildiğini bildirilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 30 000 kişi SAK geçirirken, bunların %25'i ölmekte ve diğer %50'sinde önemli morbidite görülmektedir. 1997 yılında Hop ve arkadaşları (11) yaptıkları çalışmada, SAK'dan hayatta kalan hastaların %33'ünün başkalarının yardımına ihtiyaç duyduklarını bildirmişlerdir.

SAK'ın ortalama görülme yaşı inmenin diğer tiplerine nazaran daha düşük olmasına rağmen, en sık görülme yaşı 60 yaş olarak bildirilmiştir (12). Diğer epidemiyolojik çalışmalarda SAK'ın bir ileri yaş hastalığı olduğu konusunda fikir birliği vardır. SAK'ın görülme sıklığı kadınlarda daha fazla olmasına rağmen, hayatın ilk dekadında erkek/kadın oranı 4/1, beşinci dekada erkek/kadın oranı eşit iken, 6. dekada ise kadınlarda 10 kez daha yüksek görüldüğü bildirilmiştir (13). 1996 yılında Lin ve arkadaşları (9) kadınların erkeklerden 1.6 kez daha fazla SAK riski taşıdıklarını bildirmişlerdir. SAK'nın zencilerde beyaz ırka nazaran ortalama 2.1 kez daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (14). Bazı araştırmacılar SAK'ın insidansının mevsimlerle ilişkisini araştırmak için çalışmalar yapmışlardır. Bunlardan Chyatte ve arkadaşları (15) Subaraknoid kanamanın erkeklerde sonbaharın geç dönemlerinde, kadınlarda ise ilkbaharın sonunda daha çok görüldüğünü bildirmişlerdir.

2.1.4. Risk Faktörleri

1. Ailesel: SAK'ın en önemli fakat değiştirilemeyen risk faktörü ailevi predispozisyonudur. SAK'lı hastaların %5-20 sinde pozitif aile hikayesi vardır (16). SAK'lı olguların birinci derece akrabalarının aynı hastalığa yakalanma riski 3 ila 7 kat fazla olduğu bildirilirken, ikinci derecede akrabalarındaki görülme sıklığı ise genel popülasyonda bulunan rakamlara benzer olarak bildirilmiştir (17-20). SAK'lı hastaların çok az bir kısmını oluşturmalarına rağmen, subaraknoid kanamanın konnektif dokunun spesifik ailevi geçişli hastalıkları ile birlikte görüldüğü de bildirilmiştir. Ailevi geçişli SAK'ların en sık nedeni otozomal dominant geçişli polikistik böbrek hastalığıdır (21). Diğer ailevi geçişli SAK'ların nedenleri Ehler Danlos Tip IV ve Nörofibrinomatosis Tip 1 olup, bu hastalıklarda polikistik böbrek hastalarına nazaran daha az anevrizma görüldüğü bildirilmiştir (22). Marfan sendromu ile SAK'ın birlikte görüldüğü bildirilmesine rağmen, klinik kayıtları olan toplam 129 Marfan sendromlu olgunun hiçbirinde SAK hikayesi alınamamıştır (23).
2. Sigara: Sigara içmenin kısa veya uzun dönemde SAK için risk faktörü olduğu kesin olarak bilinmemekle birlikte, yapılan bir çalışmada sigara içildikten 3 saat sonra SAK riski en yüksek görüldüğü bildirilmiştir. Ayrıca sigarayı bırakanlarda hafif veya orta derecede sigara içenlere nazaran daha az SAK görüldüğü bildirilmiştir (24).
3. Alkol: Orta veya aşırı alkol alımı hemorajik strok için predominant bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir.
4. Hipertansiyon: Hipertansiyon primer intraserebral kanamalar için temel bir risk faktörü olmakla birlikte, SAK'lar için ise kısmi bir risk faktörüdür. Son yıllardaki hipertansiyon tedavisinin daha iyi yapılmasına rağmen, SAK'ın görülme sıklığında belirgin bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir (25).
5. Oral kontraseptif kullanımı: Bir çalışmada oral kontraseptif kullanımının SAK oluşma riskini 2 ila 6 kez daha fazla arttırdığı bildirilmiştir (26). Ancak bu çalışmaların çoğunda sigara, alkol ve hipertansiyon gibi diğer risk faktörleriyle karşılaştırmalı kontrolleri yapılmamıştır. Bu çelişkili görüşlerden dolayı oral kontraseptif kullanımı ile SAK arasında ilişki var mıdır sorusunun tam cevabı bulunamamıştır.
6. Madde bağımlılığı: Kokain ve amfetamin gibi madde kullanımının iskemik ve

hemorajik strok riskini artırdığı bildirilmiştir (27,28). Kokain alışkanlığı olanların %50'sinde anevrizma ve arteriovenöz malformasyonun (AVM) birlikte bulunduğu gösterilmiştir (29,30).

2.1.5. Nedenleri

1. Anevrizma rüptürü
2. Hipertansiyon ve ateroskleroz'a bağlı hemoraji
3. Vasküler malformasyonlar (AVM, kavernom)
4. İntrakraniyal tümörler (menenjiom, glioblastoma multiforme)
5. İnflamatuar ve enfeksiyöz hastalıklar (ensefalit, meningoensefalit, menenjit)
6. Kanama bozuklukları (hemofili, idiopatik trombositopenik purpura)
7. Sistemik hastalıklar (sistemik lupus eritematozus, periarteritis nodosa)
8. Antikoagulan tedavi komplikasyonu (heparin, kumadin)
9. Kafa travması
10. Nedeni bilinmeyenler

2.1.6. Belirti ve Bulguları

A. Belirtiler:

- Ani, şiddetli baş ağrısı
- Bulantı ve kusma
- Boyun ve sırt ağrısı
- Baş dönmesi
- Diplopi, fotofobi
- Yorgunluk

B. Bulgular:

- Ense sertliği
- Kerning ve brudzinski delilleri
- Hafif ateş yükselmesi
- Hipertansiyon
- Bulanık görme, görme alan defekti
- Subhiyaloid kanama

- Okulomotor sinir felci
- Hemiparezi
- Ajitasyon
- Konfüzyon
- Koma

2.1.7. Komplikasyonları

1. Kafa içi basınç artışı
2. İntraserebral kanama
3. İntraventriküler kanama
4. Subdural kanama
5. Hipertansiyon
6. Yeniden kanama (Rebleeding)
7. Serebral vazospazm
8. Nöbet
9. Hidrosefali
10. Solunum bozuklukları
11. Kardiyovasküler komplikasyonlar
12. Sıvı elektrolit bozuklukları
13. Tromboembolik komplikasyonlar
14. Nöropsikolojik bozukluklar

2.2. SEREBRAL VAZOSPAZM

2.2.1. Tanım

Serebral vazospazm, SAK sonrası kanla dolu subaraknoid mesafede yerleşik olan büyük arterlerin; yavaş gelişen, belirgin daralmasıyla karakterizedir. Beyin iskemisi ya da enfarktı ile sonuçlanabilen ve nörolojik kayıplara yol açan olaylar zinciridir (31).

2.2.2. Tarihçe

1925'te Florey mekanik ve elektriksel uyan ile serebrovasküler sistemde lokal spazm geliştiğini göstermiştir. 1944'te Zucker kan yıkım ürünlerinin vazospazma yol açtığını göstermiş ve takiben 1951 yılında Ecker ve Reimenschneider (2) serebral vazospazmı ilk kez

anjiyografik olarak göstermişlerdir. 1965 yılında Allcock ve Drake (31) SAK sonrası morbidite ve mortalitenin asıl sebebinin çoğunlukla vazospazm olduğunu göstermişlerdir. 1973 yılında Suzuki ve Yoshimoto (32) vazospazmlı hastalarda en önemli prognostik belirleyicinin hastanın bilinç düzeyi olduğunu belirterek yaş, cinsiyet, motor ve kranial sinir tutulumunun cerrahi sonuç üzerine etkilerinin önemli olmadığını belirttiler.

1970'li yıllarda uygulanan vazopressor ve sıvı replasmanı tedavileri ile sistemik kan basıncının ve santral venöz basıncın yükseltilerek hastalarda gelişmiş olan nörolojik kayıpların bazılarının geri döndürülebileceği gösterildi (32). 1979 yılında Niziuma ve arkadaşları (33) vazospazmın en sık orta serebral arterde görüldüğünü bildirdiler. 1977'de Grup ve arkadaşları (34) vazospazmı ilgili olarak yaptıkları ilk pozitron emisyon tomografi (PET) çalışmasında vazospazm olan bölgede serebral kan akımının ve oksijen metabolizma hızının azaldığını gösterdiler. 1980'li yıllarda Sasaki ve arkadaşları (35) oksihemoglobinin ootoksidasyon ile methemoglobine dönüşmesi sırasında açığa çıkan serbest oksijen radikallerinin membran fosfolipidlerinde peroksidasyona yol açtığını bununla serebral vazospazmın etyopatogenezinde önemli bir rolü olduğunu ileri sürdüler. Fischer ve arkadaşları (36) bilgisayarlı beyin tomografisinde subaraknoid mesafedeki pıhtı kalınlığının vazospazm gelişme ihtimali ile yakından ilişkili olduğunu gösterdiler.

Subaraknoid kanama geçirmiş bazı hastalar, kendilerinde vazospazmın gelişmesi açısından yüksek risk altındadır. Bunlar:

1. Gloskow koma skoru düşük hastalar
2. Şiddetli meningeal irritasyon bulgusu olan hastalar
3. Kranial bilgisayarlı tomografilerinde yaygın subaraknoid kanama bulunan hastalar (fischer grade yüksek olanlar)
4. Antifibrinolitik tedavi alan hastalar

2.2.3. Vazospazmın Epidemiyolojisi

Subaraknoid kanama insidansında coğrafi bölge, iklim, ırk gibi faktörlerin etkili olduğu bilinmektedir. SAK'ın gerçek sıklığının belirlenmesi bu vakaların bir kısmının daha hastanelere ulaşmadan önce ölmeleri nedeniyle zordur. Anevrizmal SAK ABD'de her yıl 100.000'de 10-

28 kişiyi etkilerken bu oran Japonya'da 100.000'de 25 kişi seviyesindedir. Ani ölümleri içeren geniş otopsi serilerinde SAK olguları, %25.7 gibi yüksek bir oranı kapsamaktadır. Biler ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada SAK sonrası hastaların %70'inde serebral vazospazm görülmektedir ve bu hastaların %36'sında beyin iskemisi ve enfarkta yol açacak derecede şiddetli vazospazm gelişmektedir. SAK'tan sonraki 4 ile 12. gün vazospazmın en sık görüldüğü zaman dilimidir. Serebral vazospazm gelişimi açısından diyabet, hipertansiyon, ateroskleroz, cinsiyet ve yaş arasında predispozan ya da tetikleyici bağlantı gösterilememiştir. Serebral arterlerdeki vazospazm özellikle anterior sirkülasyonda daha fazla görülmekte ve damarların proksimal kısımlarını daha fazla etkilemektedir.

2.2.4. Vazospazmın Fizyopatolojisi

Subaraknoid kanama sonrası gelişen fokal serebral iskeminin başlıca nedeni serebral vazospazmdır. Klinik olarak diğer iskemik inmelere farkı, ortaya çıkmasının öngörülebilirliği, önlenebilirliği ve tedavi edilebilirliğidir. Anevrizma kanamasından sonra gelişen en korkutucu komplikasyon tekrar eden kanamayken, erken cerrahinin yaygın olarak uygulanması sayesinde bu sorunun önemi azalmış ve artık vazospazm, subaraknoid kanamanın mortalite ve morbidite açısından en riskli komplikasyonu haline gelmiştir. Vazospazmdan söz edildiğinde anjiyografik ve klinik vazospazmı ayırmak gerekir. Anjiyografik vazospazm radyolojik olarak serebral damar çapında meydana gelen daralmayı ifade eder. Klinik vazospazm ise son yıllarda daha çok tercih edilen terim olan geç iskemik defisit ile eş anlamlı olarak kullanılır ve serebral damarların ilerleyici daralmasıyla birlikte gelişen iskemik belirti ve bulguların oluşturduğu sendromu tanımlar (37,38). Serebral vazospazmın görülme sıklığı literatürde farklılık göstermektedir. Bu durum hastayı kabul eden hastanenin özelliğine (acil hastaları kabul eden ya da geç dönemde sevk edilen hastaları yatıran), tanı ve tedavi protokollerindeki (erken ya da geç cerrahi uygulanması, anjiyografinin yapılış zamanı, transkraniyel doppler kullanımı gibi faktörler) farklılıklara bağlıdır. Dorsch (39,40) yaptığı literatür araştırmasında, 187 makalede ikinci haftada anjiyografi yapıldığında hastaların %67'sinde serebral vazospazm saptandığını, 297 makalede ise toplam 32188 SAK hastasından 10145'inde (%32) geç iskemik defisit geliştiğini belirtmiştir. SAK sonrası ilk üç gün içinde hastaneye kabul edilen 3521 hastayı içeren prospektif bir çalışmada vazospazm sonucunda %7.2 hastada ölüm, %6.3 morbidite gelişmiştir.

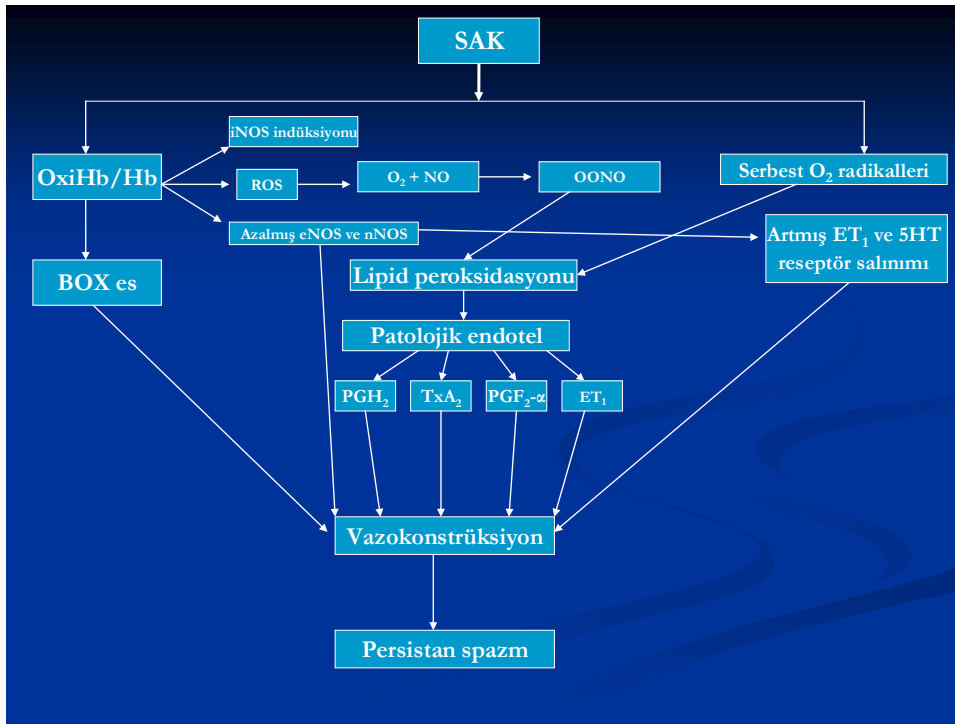
Serebral vazospazm oluş mekanizmasına göre akut, subakut ve kronik dönem olmak üzere üç dönem halinde incelenebilir. Akut vazospazmın subaraknoid kanama sonrası erken dönemde (10 dk-48 saat) hasarlanmış eritrosit ve aktive trombositlerden salınan potansiyel spazmojenler sonucu olduğu deneysel çalışmalarda ve SAK sonrası erken dönem hastalarda gösterilmiştir (41,42). Fiziopatolojisi kesin olmamakla birlikte subaraknoid mesafeye ulaşan kanın akut serebral vazospazmın gelişmesinde en önemli etken olduğu deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (43). Klinik çalışmalarda da anevrizma kanamasından hemen sonra elde edilen BT kesitlerinde saptanan kan miktarının, geç iskemik defisit gelişiminin en önemli göstergesi olduğu bildirilmiştir. Fisher ve ark. (44) BT'deki kan miktarını derecelendirmiş ve artan dereceler ölçüsünde vazospazm gelişme riskinin de arttığını ortaya koymuştur. Erken dönemde intrakraniyal anevrizma rüptürü sonrası subaraknoid mesafeye ani olarak taze kan dolumu olur, bu durumda beyin tabanındaki araknoid sisternlerin tıkanmasına yol açar (45). Subaraknoid mesafedeki kan varlığı ile vazospazm gelişimi arasında bir korelasyon vardır. Bunun iki nedeni vardır: Beyinde azalmış kan akımı ve kandan subaraknoid mesafeye salınan vazoaktif maddeler. SAK hızlı volem yükselmesine neden olmakta; beyin omurilik sıvısının (BOS) yavaş yer değiştirmesi nedeni ile de intrakraniyal basınç artmaktadır. Fakat beyin perfüzyon basıncındaki azalma uzar veya yaygınlaşırsa bilinç kaybı, nörolojik defisit ve bazende ölümle sonuçlanan iskemik inmelere yol açabilir. Serebral iskeminin geçici olsa bile sitokinler, adhezyon molekülleri, prostanoidler ve NO salınımını artırarak inflamatuvar reaksiyonu başlattığı söylenmektedir. Ayrıca perfüzyon basıncı normale döndüğünde reaktif oksijen molekülleri salınmakta, bu da endotel ve nöron hücrelerinde reperfüzyon zedelenmesine ve apoptotik hücre ölümüne yol açmaktadır (46).

SAK sonrası oluşan pıhtı içinde rüptüre anevrizmayı tamir etmek için aktive olmuş trombositler bulunmaktadır. Trombositlerden salınan serotonin ve tromboksan-A₂ gibi vazokonstriktör maddeler anevrizma etrafındaki damarlarda akut vazospazma yol açmaktadır. Bu olaylar 3-14. günler arasında gelişen subakut dönem vazospazmın da başlangıcında tetik rol oynamaktadır (46).

Subaraknoid mesafeye ulaşan bir başka kan şekilli elamanı olan eritrositlerin hemolizi sonucu da vazoaktif maddeler salınmaktadır. İn vitro ve in vivo çalışmalar bu maddeler arasında subakut dönem vazospazm gelişiminde ana sorumlunun oksihemoglobin olduğunu göstermiştir (47). Oksihemoglobinin hangi mekanizmayla damar düz kasında

kasılmaya neden olduğu kesin değildir. Olasılıkla birden fazla mekanizmayla etki etmektedir. Bunlardan en fazla kabul göreni oksihemoglobinin endotel hücrelerden vazokonstrüktör prostoglandinlerin salgılanmasına neden olan etkisidir. Araşidonik asit metabolizmasının ürünlerinden olan bu vazoaktif prostoglandinlerden; prostaglandin-F2 alfa (PGF2-alfa), prostaglandin D2 (PGD2), prostaglandin E2 (PGE2) ve tromboxan A2' nin vazospazmı artırdığı çeşitli deneysel modellerde gösterilmiştir (48,49).

Subakut serebral vazospazmın etyolojisinde serbest radikallerin etkisi de deneysel ve klinik çalışmalarda araştırılmıştır. Bunlardan oksihemoglobinin methemoglobine otooksidasyonu sırasında oluşan superoksit anyon radikali ve hemoglobinin yıkımı sırasında ortama yayılan demir bileşiklerinin Haber-Weiss reaksiyonunu katalize etmesiyle oluşan hidroksil radikali en önemlileridir. Serbest radikaller doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna neden olarak lipid peroksidasyonunu başlatırlar ve bu da yukarıda sözü edilen vazoaktif prostoglandinlerin üretilmesine neden olur (Şekil 1). SAK geçirmiş hastaların BOS incelemelerinde saptanan lipid peroksit düzeylerinin vazospazmın ağırlığıyla uyumlu olduğu gösterilmiştir (50,51). Ayrıca Şano ve ark. da intrasisternal enjekte edilen lipid hidroperoksidin vazospazma yol açtığını ortaya koymuşlardır (52).



Şekil 1. Subaraknoid kanama sonrası subakut dönem serebral vazospazm oluşumundaki faktörler (53). BOXes-bilirubin oksidasyon ürünleri, ET1- endotelin 1, Hb-hemoglobin, PGH2- Prostaglandin H 2,

PGF2 prostogalndin F 2, eNOS:-endotelial nitrik oksid sentetaz, OxiHb- oksihemoglobin, OONO-peroksinitrit, nNOS-nöronal nitrik oksid sentetaz, NO-nitrik oksid, ROS-reaktif oksijen ürünleri, TxA2-tromboksan A 2

Serebral damarların tonusu büyük ölçüde vasküler endotelyum tarafından düzenlenir. Bu, endotel kaynaklı gevşemeye yol açan faktör (Nitrik Oksit) ve endotel kaynaklı kasılmaya yol açan faktör (Endotelin) arasındaki dengeyle sağlanır. Oksihemoglobin doğrudan nitrik okside bağlanarak ya da oluşumuna neden olduğu superoksit anyon radikalinin nitrik oksidi ortadan kaldırmasıyla vasküler tonusu vazokonstriksiyon yapıcı yönde etkiler. Bununla birlikte endotel hücrelerinden endotelin salınımını da uyarak vazospazmı her iki yoldan stimüle eder (54).

Yukarıda kısaca özetlenen faktörlerin etkisiyle damar düz kaslarının uzun süreli kasılması vazospazma neden olur. Bu uzun süreli kontraksiyon ikincil olarak damarda hipertrofi, hiperplazi ve fibroze yol açar. Subakut serebral vazospazm klinik olarak SAK sonrası dördüncü günde başlar, yedi-sekizinci günler arasında en yüksek düzeyine çıkar ve şiddeti azalarak ikinci haftanın sonuna doğru düzelir. Klinik tablo majör ve minör bulgular olmak üzere ikiye ayrılır. Bilincin kötüleşmesi, motor defisit ya da afazi gibi hemisferik belirti ve bulgularının (majör) ortaya çıkması doğrudan vazospazm gelişimini düşündürür. Baş ağrısında artma, subfebril ateş gibi bulguların (minör) varlığında ise serebral vazospazmdan kuşulanmak ve hastayı yakından izlemek gereklidir (55).

2.2.5. Anjiyografik özellikleri

Anjiyografik olarak vazospazm etkilenen arterde kontrast madde akımının azalmasıyla saptanır. Anjiyografide vazospazm 3 günden önce hemen hemen görülmezken, 5 ile 14. günde maksimum arteriyel daralma gözlenir ve 2 ile 4. haftalara doğru aşamalı olarak düzelir.

2.2.6. Tanı

Serebral vazospazmın kesin tanısı serebral anjiyografi ile konur. Ateş yükselmesi, lökositöz vazospazmın kliniğinde sıklıkla ilk bulgudur ve bu tabloya nörolojik bozulmanın eklenmesi hastada vazospazmın gelişmekte olduğunu işaretidir (56). Vazospazmın tanısında kullanılan diğer noninvaziv tanı yöntemleri ise;

- Transkraniyal doppler ultrasonografi (TCD)
- Single photon emission computerize tomografi (SPECT)
- Pozitron emisyon tomografi (PET)
- Xenon bilgisayarlı tomografi
- Xenon-133
- Transkraniyal serebral oksimetre tetkikleri sayılabilir.

2.2.7. Tedavi

1. Cerrahi:

Son yıllarda giderek yaygınlaşan görüş erken cerrahi tedavi ve anevrizmanın kliplenmesi yönündedir. Yapılan çalışmalar vazospazm riskinin yüksek olduğu 4 ile 14. günler arasında yapılan cerrahi tedavinin yüksek morbidite ve mortalitesinin olduğunu göstermiştir. Erken cerrahi tedavi ile kanayan anevrizmanın kliplenmesi, yeniden kanama riskini azaltmakta, civar dokulardaki pıhtının temizlenmesine yardımcı olmaktadır.

Ayrıca hipervolemi, hemodilüsyon, hipertansiyon, trombolitik ve anjioplastik tedavi gibi agresif vazospazma karşı uygulanan medikal tedavi yöntemlerinin kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır (57-59).

2. Hipertansiyon-Hipervolemi-Hemodilüsyon (3-H) Tedavisi

Hipervolemi, hemodilüsyon ve hipertansiyon 3-H tedavisinin ana bileşenleridir. Bu tedavi yöntemi ile hastaların nörolojik defisitlerinin düzeldiğini ilk bildirenler Kosnik ve Hunt'tır. Sıvı yüklenmesi ile oluşturulan hemodilüsyon kan viskozitesini azaltır. Bunun sonucu olarak serebral kan akımı, serebral perfüzyon ve mikrosirkülasyon artar (60).

3. Damar düz kas kasılmasına yönelik tedaviler

Vasküler düz kasların kasılması çizgili kas ve kalp kasından daha farklı mekanizmalarla olmaktadır. Vasküler düz kaslar yavaş, tonik ve uzun süreli kasılırlar. Organizasyonları ve hücresel yerleşimleri kasıldıkları zaman damar boşluğunu daraltacak şekilde yapılanmıştır. Vasküler düz kasların kasılmasını engellemeye yönelik olarak kullanılan pek çok deneysel ajan klinik çalışmalarda benzer etkinliği gösterememiştir. Nicardipin ve intraarteriyel yüksek doz papaverin uygulamasının ise erken semptomatik vazospazmı etkin şekilde düzelttiği bildirilmiştir (61,62).

Serebral vazospazm sırasında hücre içi kalsiyum düzeyinde artış meydana gelir. Membran depolarizasyonu geliştiği zaman voltaj kontrollü kalsiyum kanalları açılır, hücre içine kalsiyum akışı olur. Serebral damar kasılmasında intrasellüler kalsiyum düzeyi esas olarak ekstrasellüler mesafedeki kalsiyum miktarına bağlıdır. Yapılan çahşmalar Ca kanal blokörü olan nimodipinin damarları genişletmekten ziyade iskemik nöronal hücrelere kalsiyum girişini engellediği, nöronal hasar ve ölümü önlediği sonuç olarak ta semptomatik vazospazm sıklığını %10'un altına indirdiği yönündedir. Bunun yanında nicardipin ve AT 877'nin transmembranal kalsiyum içe akımı yanında damar düz kas kontraksiyon mekanizmalarına aracılık eden hücre içi kalsiyum hareketini ve protein kinaz C'yi inhibe ederek, semptomatik ve anjiyografik vazospazmı azalttığı vurgulanmaktadır (63,64).

4. Anjioplasti

Gelişen endovasküler teknik ve teknoloji; bu girişimlerin serebral vazospazmın tedavisinde de bir seçenek olarak ortaya çıkmasını sağlamıştır. Bu yöntemlerden başlıca ikisi balon anjioplasti ve intraarteriyel papaverin uygulamasıdır. Balon anjioplastiyle yararlı sonuçlar bildirilmesine karşın işleme bağlı mortalitenin, %2-5 civarında olması, bu yöntemin vazospazm tedavisinde yaygın olarak kullanılmasını engellemiştir (65). Uzun yıllardan beri nöroşirürjiyenler tarafından spazmı çözmek üzere topikal olarak kullanılan papaverinin intraarteriyel selektif enjeksiyonu vazospazm tedavisinde kullanılmaktadır. İntraarteriyel papaverinin spastik damarı açmakta başarılı olduğu, ancak bu etkinin kısa sürede kaybolduğu ve tekrarlayan enjeksiyonlar yapılması gerektiği, bunun yanında anjiyografik spazmın açılmasıyla klinikteki düzelme arasında zayıf bir korelasyon bulunduğu bildirilmiştir (66,67). Papaverin enjeksiyonları sırasında intrakraniyal basıncın yükseldiği, bunun da serebral perfüzyon basıncını düşürüp iskeminin artmasına yol açabileceği, bu nedenle papaverin enjeksiyonlarının intrakraniyal basınç monitörizasyonu altında yapılması gerektiği önerilmiştir (68).

5. Anti inflamatuvar ajanlar

Canlı hücrelerin yabancı antijenlere karşı geliştirdiği karmaşık ve çok yönlü savunma mekanizması inflamasyon olarak adlandırılır. SAK'da ortamdaki kan pıhtısına karşı bir seri karmaşık hücresel ve moleküler inflamatuvar yanıt oluşur. Yapılan deneysel çalışmalarda

antiinflamatuvar ajan olan ibuprofen ve metilprednizolonun vazospazm da etkili oldukları gösterilmişse de klinik düzeyde etkileri görülememiştir (69).

6. Diğer tedaviler:

Vazospazm sonrası gelişen gecikmiş iskemik defisitın önlenmesi için son yıllarda geliştirilen ilaç tedavileri arasında magnezyum sulfat, statin ajanları (simvastatin, pravastatin), L-arginine, mexiletine, adenosin A1 reseptör agonistleri, clazosentan, edaravone, human eritropoetin ve melatonin öne çıkmaktadır. Bu ajanlar arasında antioksidanlar; oksidatif süreçlerin ve bu süreçlerin sonucunda gelişen lipid peroksidasyon kaskadlarının engellenmesinde önemli bir role sahip olup vazospazm tedavisinde gün geçtikçe önem kazanmaktadır (70).

2.3. OKSİDATİF STRES VE VAZOSPAZM İLE OLAN İLİŞKİSİ

Oksidatif stres, dokuda hasara yol açabilen reaktif oksijen türevlerinin (serbest radikaller) üretimi ve antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengenin reaktif oksijen radikallerinin lehine bozulması olarak tanımlanmıştır.

Serbest radikaller ortaklanmamış elektronlar içeren herhangi bir kimyasal türev olarak tanımlanabilir. Ortaklanmamış elektronlar herhangi bir atom veya molekülün kimyasal reaktivitesini arttırmaktadır. Serbest radikaller pozitif veya negatif yüklü olabilecekleri gibi yüksüz de olabilirler. Organik veya inorganik şekilde oluşabilirler. Hidroksil radikali ($\text{OH}^\cdot$), süperoksit anyonu ($\text{O}_2^\cdot$), demir ve bakır gibi geçiş metalleri, nitrik oksit (NO) ve peroksinitrit (ONOO) serbest radikallerin en yaygın örnekleridir.

Serbest radikaller vücutta meydana gelen çok sayıda farklı biyokimyasal reaksiyonların sonucunda ortaya çıkmaktadır, örneğin; hücresel oksijen metabolizması (mitokondriyel elektron transportu), araşidonik asit aktivasyonu, alyuvarlarda hemoglobinin methemoglobine otooksidasyonu, fagositoz, damar endoteli ve diğer hücrelerin NO üretimi, katekolamin oksidasyonu, inflamasyon, iskemi. Bütün bunlara ek olarak serbest radikaller; elektromagnetik radyasyon, sigara dumanı, zehirli gazlar, ilaçlar, karsinojen maddeler, pestisitler gibi eksojen faktörlere yanıt olarak da üretilirler (71-74).

Organizmada serbest radikallerin oluşumundan hemen sonra etkisizleştirilmesini sağlayan güçlü savunma sistemleri bulunmaktadır. Serbest radikallerin oluşum hızı ile etkisizleştirilme hızı dengede olduğu sürece, organizma bu bileşiklerden etkilenmemektedir. Buna karşılık savunma azalır veya bu zararlı bileşiklerin oluşum hızı sistemin savunma gücünü aşarsa, bu denge bozulmakta ve serbest radikallerin zararlı etkileri ortaya çıkmaktadır. Aerop organizmalar biyolojik yapıları nedeniyle serbest radikal oluşumuna ve bu bileşiklerin zararlı etkilerine açıktırlar (75). Normal koşullarda hafif düzeyde seyreden oksidatif stres, özellikle iki nedenle artmaktadır:

1. Sitokrom P 450 2E1 (CYP2E1) izoenzimin artmış ekspresyonu; süperoksit, hidroksil ve hidroksietil radikallerinin üretiminden sorumludur.
2. Serbest yağ asitlerinin peroksizomal beta oksidasyonu; hidrojen peroksit (H_2O_2) üretimine yol açmaktadır.

2.4. ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Hücre ve dokular, radikal ürünleri ve reaksiyonlarını inhibe eden bir sisteme sahiptir. Bunlar “antioksidan savunma sistemleri” veya kısaca “antioksidanlar” olarak bilinirler. Antioksidan savunma; radikal metabolit üretiminin önlenmesi, üretilmiş radikallerin temizlenmesi, oluşan hücre harabiyetinin onarılması, sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması ve endojen antioksidan kapasitenin artırılması işlevini yapar. Antioksidanların spesifik olarak rollerinin araştırıldığı çalışmalarda; antioksidan savunma sisteminin hücrenin intrasellüler, membran düzeyinde ve ekstrasellüler kompartmanlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Antioksidanlar, endojen kaynaklı ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilirler (76).

-Sellüler Antioksidanlar:

Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz ve sitokrom oksidaz (77).

-Membran Antioksidanları:

Vitamin E: Membran lipitlerinde çözünerek peroksidasyon zincirini kırar.

Koenzim Q: Mitokondriyel enerji metabolizmasında bir antioksidan olarak rol alır.

Beta karoten: Radikal türleri toplar, ayrıca singlet oksijen oluşumunu inhibe eder (77).

-Ekstrasellüler Antioksidanlar:

Transferrin, laktoferrin, haptoglobulinler, albümin, seruloplazmin, bilüribin, ürik asit, glikoz gibi moleküller temel ekstrasellüler antioksidanlardır. Hücreler arası ortamda üretilen serbest radikal metabolitlerin demir ve bakır gibi katalizör metal iyonları ile karşılaşmalarının engellenmesi, ekstrasellüler antioksidan savunmanın temel yoludur.

2.4.1. Antioksidan Etki Mekanizmaları

A. Toplayıcı (scavenging) etki

Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf bir moleküle çevirme işlemine toplayıcı etki denir. Antioksidan enzimler bu tip bir etki gösterirler.

B. Bastırıcı (quencher) etki

Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren olaya bastırıcı etki adı verilir. A vitamini ve flavinoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

C. Onarıcı (repairing) etki

D. Zincir kırıcı (chain breaking) etki

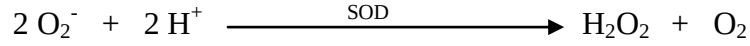
Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye zincir kırıcı etki denir. E vitamini, hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.

2.4.2. Endojen Antioksidanlar

2.4.2.1. A. Enzimatik Antioksidanlar

1. Süperoksit dismutaz (SOD): Oksijen tüketen tüm organizmalarda yaygın olarak bulunan metalloproteinlerden olan SOD ilk olarak 1968 yılında Mckord ve Fridovich

tarafından tanımlanmıştır (78). Bu enzim süperoksidin, hidrojen peroksid ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar.



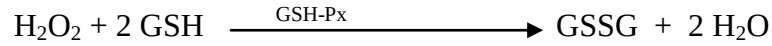
SOD içerdiği metal iyonlarına göre (CuZn) SOD, (Mn) SOD ve (Fe) SOD olmak üzere üç sınıfa ayrılır. Mitokondrial form olarak bilinen (Mn) SOD insan karaciğer sitozolünde de bulunmuştur. (CuZn) SOD 21. kromozom, (Mn) SOD 6. kromozomda yer alan genlerle kodlanmaktadır. (CuZn) SOD homodimer yapıdadır ve katalitik aktivitesi için bakır, yapısal bütünlüğü için ise çinko gereklidir. Siyanür ile geri dönüşümsüz olarak inhibe olan (CuZn) SOD, H_2O_2 ile geri dönüşümlü olarak inhibe olur (78).

Enzimin ısıya ve diğer zorlayıcı etkilere dirençli oluşu saflaştırılmasında kolaylık sağlar. Farklı formların birbirlerinden ayrılmasında, (CuZn) SOD dışındaki enzimlerin siyanüre dirençli oluşları ve (Mn) SOD'un H_2O_2 'den etkilenmemesi kullanılmaktadır.

Süperoksit anyonunun (O_2^-) dismutasyonu, SOD enziminin biyolojik rolüdür. Yüksek pO_2 'ye maruz kalan hücrelerde SOD enziminin arttığı belirlenmiştir. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit anyonu üretimi olmasına rağmen bu enzim sayesinde intraselüler süperoksit seviyesi düşük tutulur. SOD enziminin ekstrasellüler aktivitesi oldukça düşüktür. Özetle hücrenin oksijenizasyonun artması, metabolik hızda artma ve redoks-aktif maddelere maruz kalış nedenli süperoksit radikal miktarında artış, SOD enziminin sentezinde artışa yol açar (79).

2. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px): Selenyum (Se) bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki farklı yapıda olan GSH-Px enzimleri, H_2O_2 ve organik peroksitlerin detoksifikasyonunda rol oynar. Özellikle eritrosit membran bütünlüğünün devamı için GSH-Px çok önemlidir.

GSH-Px enziminin moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 85 kD'dur. Tetramerik, 4 selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. GSH-Px aşağıdaki reaksiyonları katalizler.



Eritrositteki GSH-Px, Se bağımlı olmakla beraber karaciğer gibi bazı dokular, enzimin Se bağımsız tipini de içermektedir.

H_2O_2 ve organik peroksitlerin indirgenmesi sırasında oksitlenen GSH, başlıca pentoz fosfat yolundan sağlanan NADPH ve glutatyon redüktaz (GSH-Rx) enzimi yardımıyla indirgenerek reaksiyonların devamlılığı sağlanır. GSH-Px'in Se bağımlı tipinin hem H_2O_2 hem de diğer peroksitlere etkili olduğu, Se bağımsız tipinin ise sadece organik peroksitleri indirgediği bilinmektedir. Geniş bir tür ve organ dağılımı olan Se bağımlı GSH-Px hücre düzeyinde büyük ölçüde sitozolde yer almaktadır. Mitokondride ise Se bağımsız GSH-Px aktivitesine rastlanmıştır. Buna karşılık katalazın fazla miktarda bulunduğu peroksizomlarda enzim aktivitesine rastlanmamıştır. GSH-Px fagositik hücrelerde önemli foksiyonlara sahiptir. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, hücresel düzeyde solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma, H_2O_2 artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açmaktadır (80,81).

3. Katalaz (CAT): Aktif merkezinde 4 hem grubu içeren tetramerik yapılı bir hemoproteindir. Görevi, hidrojen peroksidi, oksijen ve suya parçalamaktır. Peroksidaz aktivitesine sahip oluşuna ek olarak, bu enzim, bir molekül hidrojen peroksidi elektron verici bir substrat olarak diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir.

CAT

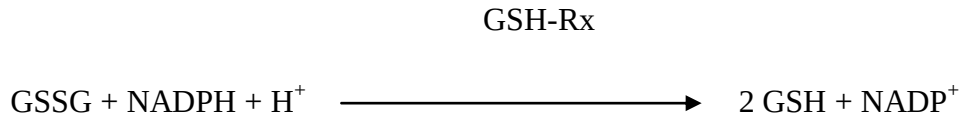


4. Glutasyon -S- transferaz (GST) : Başta araşidonik asid ve lineolat hidroperoksidleri olmak üzere lipid peroksidlerine karşı GST'lar Se-bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek bir defans mekanizması oluştururlar.

5. Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi: Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz, aşağıdaki reaksiyonla süperoksidi detoksifiye eder.



6. Glutasyon Redüktaz (GSH-Rx) : GSSG, tiol içeren proteinlerin konformasyonu ve aktivitesi üzerine zararlı etkileri olan prooksidan bir maddedir. Bu okside formun ileride kullanılmak üzere tekrar redükte GSH'a dönüştürülmesi gerekmektedir. Çünkü organizmanın GSH deposu sınırlıdır. GSH-Rx, NADPH varlığında GSSG'yi tekrar redükte GSH'ya dönüştürür (82).



2.4.2.2. B. Nonenzimatik Antioksidanlar

1. α -tokoferol (E-vitamini)
2. β -karoten
3. Askorbik asit
4. Melatonin
5. Ürik asit
6. Bilirubin
7. Glutasyon
8. Seruloplazmin
9. Albumin

10. Transferin

11. Ferritin

2.4.3. Eksojen Antioksidanlar

Allopürinol, folik asit, C vit, trolox-C, asetil sistein, adenozin, mannitol, barbitüratlar

2.4.4. Melatonin

Melatonin ilk kez 1958 yılında kurbağa ve balıkların melanositlerinde bulunan bir renk pigmenti olarak tanımlanmış (83) ancak daha sonra 1993 yılında melatoninin bütün memeli hayvanlarda bulunan, pineal bezden salınan ve canlıların biyolojik ritmini düzenleyen bir hormon olduğu gösterilmiştir.

Hatta 1996 yılından sonra da omurgasızlar ve protozoalar da dahil olmak üzere birçok canlının yapısında varlığı ispatlanmıştır.

2.4.4.1. Pineal Bez

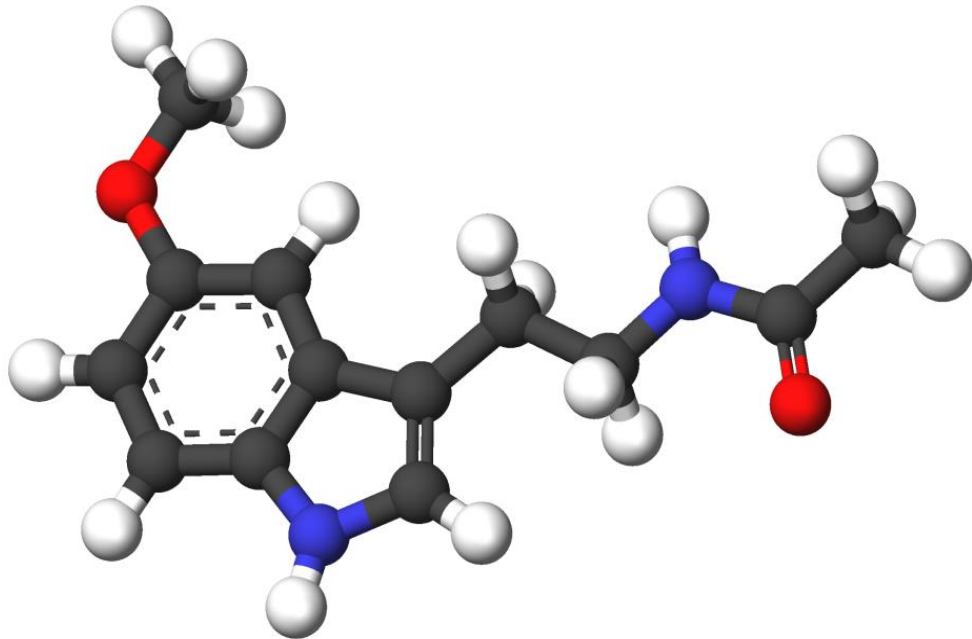
Pineal bez (epifiz bezi), insanlarda üçüncü ventrikülün arkasında yer alır. Total vücut ağırlığına göre oldukça küçük olan bu bez (insanlarda 50–150 mg), böbrekten sonra vücudun en çok kan akımına sahip ikinci organıdır. Bezin yapısı, bez hücrelerinin çoğunu oluşturan ve gerek indolaminleri (çoğunluğu melatonin) gerekse peptidleri (arjinin, vazotosin v.b) üreten pinealositler ve nöroglia hücreleri olmak üzere iki hücre türünden oluşur. Pineal bez, memelilerde fotik informasyonları nöroendokrin sinyallere dönüştürür. Retinadan algılanan görsel bilgiler, hipotalamusun suprakiazmatik çekirdeği ve sempatik sinir sistemi yoluyla, pineal beze yansıtılır (84).

Fotik impulslar taşıyan sempatik efferent lifler pineal beze ulaştığında, özellikle karanlıkta, norepinefrinin pinealosit membranında beta-adrenerjik reseptöre bağlanması ile bir seri reaksiyon başlar. Membranda adenil siklaz aktivitesi ve dolayısıyla cAMP yapımı stimüle olur; cAMP de melatonin ve diğer indolaminlerin biyosentezini katalizleyen enzimleri aktive eder (85).

2.4.4.2. Melatonin Sentezi

Melatonin diğer adıyla N-asetil-5-metoksitriptamin ilk kez sığır pineal ekstrelerinde melanin granüllerini agrege etme ve kurbağa derisinin rengini açma yeteneği fark edilerek tanımlanmıştır (83).

Melatonin biyosentezi, kandan beze difüze olan triptofanın, pineal bezde triptofan hidroksilaz enzimi ile hidroksillenmesiyle başlar. Böylece meydana gelen 5-hidroksi triptofan, L-aromatik aminoasit dekarboksilaz enzimi ile karboksil grubunu kaybeder ve neticede serotonin (5-hidroksi triptamin) meydana gelir. Pineal bez, serotonin konsantrasyonu açısından vücutta en zengin organdır. Serotonin asetilasyonu, N-asetil transferaz aracılığı ile gerçekleşir. Burada Asetil CoA, asetil donörü olarak rol oynar. Meydana gelen N-asetil serotonin, metil donörü olarak S adenosil metionin'in kullandığı ve hidroksi indol-O-metil transferaz'ın katalizlediği son basamakta N-asetil 5-metoksitriptamin; yani melatonine dönüşür ve böylece melatonin biyosentezi tamamlanır (Şekil 2). Bu mekanizmada hız kısıtlayıcı enzim aril-alkilamin-N-asetil transferaz (AANAT) olarak adlandırılan enzimdir (86). Bu enzim, β ve α -1 adrenerjik reseptörler üzerinden etki gösteren epinefrinin nokturnal sempatik salgısına yol açar. Bu enzimin negatif feedback mekanizmaları ile düzenlenmesinde ise cAMP, MAP kinaz fosfataz 1 gibi birçok enzim ve proteinin rol aldığı bilinmektedir (87,88).



Şekil 2. 5- Metoksi N- Asetil triptamin (Melatonin)

2.4.4.3. Melatonin Sentezinin Kontrolü

Melatonin salgısı, canlı türlerine göre farklılık gösteren sirkadiyen bir ritme sahiptir. Bu farklılık, hormonun gece pikinin meydana geldiği saatler ve süreleri ile ilgilidir. Serum melatonin konsantrasyonu, geceleri gündüze göre 3–10 kat daha yüksektir. Melatonin salgısının sirkadiyen ritmi endojen kökenlidir, bu da uyarıların suprakiazmatik çekirdekten çıktığını yansıtır (87). Melatonin sentezi ve salgılanması karanlıkta uyarılırken, ışık ile baskılanır. Gün ışığının bulunduğu saatlerde, retinadaki fotoreseptör hücreleri hiperpolarizedir; bu da norepinefrin salınmasını baskılar. Karanlıkla birlikte polarize olan fotoreseptör hücreler norepinefrin salgırlar. Norepinefrin hem triptofanın dolaşımdan beze girişini artırmakta, hem de pinealosit membranındaki β -1 reseptörleri aracılığıyla membrandaki adenil siklazı aktive ederek, hücre içi siklik adenozin monofosfat (cAMP) seviyelerini yükseltmektedir. cAMP etkisiyle, melatonin sentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan N-asetil transferaz aktivitesi yükselmekte, böylece melatonin sentez ve salgılanması başlamaktadır. Melatonin sentez ve salınımı arttıkça bu hormon, pasif difüzyonla dolaşıma geçer (88).

2.4.4.4. Melatoninin Etki Mekanizması ve İnaktivasyonu

Pineal bezden dolaşıma verilen melatonin lipofilik özelliğinden dolayı direkt olarak veya spesifik reseptörler aracılığıyla hedef hücrelere ulaşır (88). İnsan beynin çeşitli bölgelerinde, bağırsaklarda, overlerde, kan damarlarında ve karaciğerde, melatonin reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir (Tablo 1,2). Farmakolojik ve kinetik gruplara ait zara bağlı iki melatonin bağlanma yeri tanımlanmıştır: MT1 (yüksek afinite (pikomolar)) yerleri ve MT2 (düşük afinite (nanomolar)) yerleri (89,90). MT1 reseptörlerinin aktivasyonu hedef hücrelerde adenilat siklaz aktivitesinin baskılanmasına neden olur. MT1 reseptörü; termoregülasyonda, arterial vazokonstriksiyonda, kanser hücrelerinin proliferasyonunda, üreme ve metabolik fonksiyonlarda rol alır. MT2 reseptörü ise, SCN'deki nöronal termoregülasyonda,

retinada dopamin salgısının inhibisyonunda, vazodilatasyonun indüklenmesinde (Şekil 3), arterial yatakta lökosit rulo formasyonunun oluşumunun engellenmesinde ve immun cevabın artırılmasında rol oynadığı bilinmektedir (91).

Tablo 1. Parenkimal melatonine afinite gösteren bölgeler.

1.SCN *
2.PT *
3.Hipotalamus ventromedial nükleuslar
4.Hipotalamus dorsomedial nükleuslar
5.Anterior hipotalamus
6.Medial preoptik alan
7.Serebral korteks
8.Area postrema
9.Amigdala
10.Retina

* En sık I ¹²⁵-iyodomelatonin afinitesi olan bölgeler

Tablo 2. Vasküler yataktaki melatonin tutulum bölgeleri

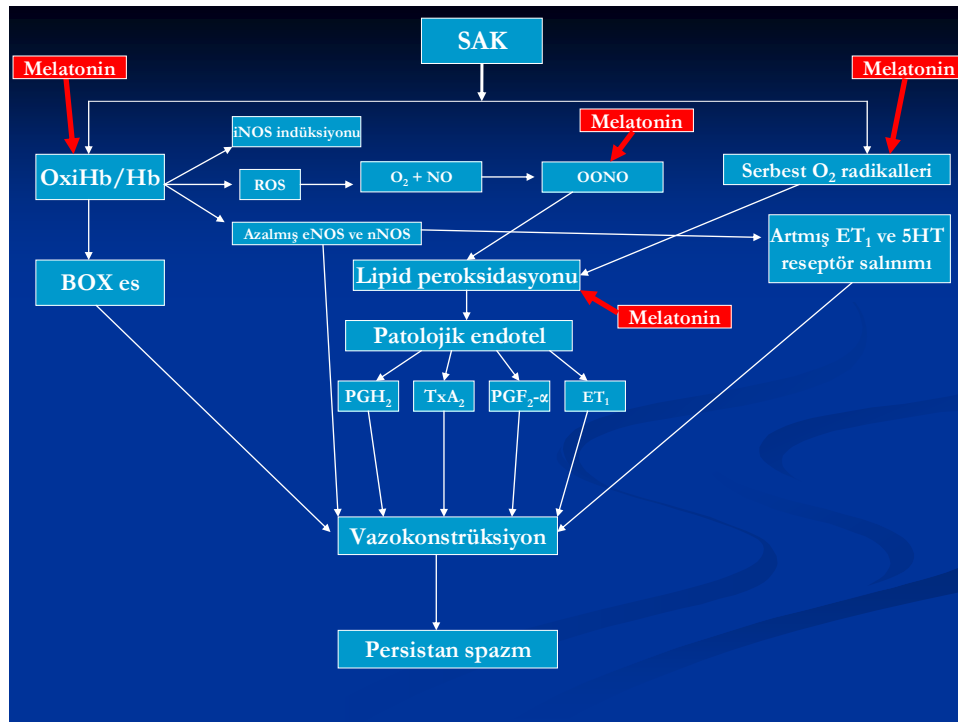
1.MCA
2.ACA
3.PCA
4.Rodent ve rat kuyruk arteri

Lipofilik özelliği nedeniyle hücrenin tüm fraksiyonlarına kolaylıkla girebilen melatoninin (92), sitozolik ve nükleer bağlanma yerleri de tanımlanmıştır.

Örneğin; sitozolik kalmodulin'e bağlanarak adenilat siklaz, fosfodiesteraz gibi hedef enzimlerle olduğu kadar yapısal proteinlerle de etkileşerek doğrudan kalsiyum geçişi üzerinde de etki gösterebilir (93).

Melatoninin inaktivasyonu, başlıca karaciğerde gerçekleşir. İndol halkasının 6. konumundan hidroksile olan melatonin, daha sonra sülfat ve glukronik asitle konjuge edilerek idrarla atılır.

Melatoninin idrardaki başlıca metaboliti 6-sülfatoksi melatonin olup, plazma melatonin düzeyinin iyi bir göstergesidir. Diğer önemli metaboliti ise; N1- acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) molekülüdür (94).



Şekil 3. Subakut dönem vazospazm da melatoninin rolü (78)

2.4.4.5. Melatoninin Biyolojik Etkileri

Melatoninin uyku, sirkadiyen ritim, duygu durumu, cinsel olgunlaşma ve üreme, kanser, termoregülasyon ve yaşlanma gibi birçok biyolojik olayla ilişkili olduğu bildirilmiştir.

2.4.4.6. Melatoninin Antioksidan Etkileri

Başta kalp hastalıkları, kanser, vazospazm ve birçok dejeneratif hastalıkların etiolojisinden serbest radikal hasarı sorumlu tutulmaktadır. Antioksidan moleküller bu hasarı önlemektedirler. Melatoninin de antioksidan etkisi *in vivo* (95) ve *in vitro* (96) çalışmalarla gösterilmiştir. Melatonin yapısında bulunan pirol halkası nedeniyle O₂ ve OH• radikallerini yakalamada yüksek bir kapasiteye sahiptir. Toksik hidroksil radikalleri ile reaksiyona girerek, bütün hücre kompartmanlarındaki biyomolekülleri, serbest radikal oluşumuna karşı bölgesel olarak yerinde korur. Çok reaktif olan hidroksil radikallerinin yıkıcı etkilerine karşı primer nonenzimatik savunma mekanizmasını oluşturur. Yapılan araştırmalarda organizmayı oksidatif hasara karşı korumada melatonin bilinen diğer antioksidanlardan (mannitol, glutatyon, E vitamini, askorbik asit gibi) daha etkili görülmüştür (97). Askorbik asit (C vitamini), alfatokoferol (E vitamini) ve glutatyon (GSH) gibi antioksidanlardan farklı olarak, melatonin peroksid radikalini yakalayarak, yayılmakta olan lipid peroksidasyonunu sonlandırmaktadır. Melatoninin bu etkilerinin diğer antioksidanlardan daha güçlü olduğu *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir.

Melatonin direkt antioksidan etkilerinin yanı sıra, dolaylı olarak da antioksidan sisteme katkıda bulunur. Sıçanlarda karaciğer, böbrek ve beyin dokusu glutatyon peroksidaz aktivitesinin, melatonin uygulandıktan sonra arttığı gözlenmiştir. Pinealektomi yapılan sıçanların karaciğer, akciğer ve beyin dokusu glutatyon peroksidaz aktivitesinde anlamlı düşüşler saptanmıştır (97).

1993 yılında antioksidan özelliği ortaya çıkarılan melatonin, lipofilik özelliğinden dolayı organizmada çok geniş alanda antioksidan etki gösterebilmektedir. Melatonin, kan-beyin bariyerini rahatlıkla geçebilir, hücrelerin çekirdekleri dahil tüm organellerine ulaşabilir. Bu özellik, dejeneratif ya da proliferatif değişikliklere neden olan hastalıklara karşı makromoleküllerin ve özellikle DNA'nın oksidatif hasardan korunmasında melatonine bir üstünlük kazandırmaktadır. Ancak bu antioksidan etkiler, melatoninin gece ulaştığı doruk değerlerin çok üstündeki değerlerde görülür. Melatoninin bu bağlamda başka bir üstünlüğü, diğer bazı antioksidanların aksine, çok yüksek dozlarda (200mg/gün) ve uzun süre (5 yıl) kullanımda bile toksik etkisinin görülmemesidir (98).

Son yıllarda melatoninin doğrudan serbest radikalleri temizleme özelliğinin yanı sıra, ekzojen melatonin verilmesinin, önemli bir antioksidan enzim olan glutatyon peroksidaz aktivitesini de artırdığı gösterilmiştir (97).

Ayrıca melatoninin; fizyolojik ve patofizyolojik birçok olayda rol alan önemli bir molekül olan nitrik oksit (NO)'in, sentezi ve dolaşımdaki miktarı üzerine etkilerini inceleyen çalışmalar yapılmıştır. NO'nun fizyolojik etkisi; çözünabilir guanilat siklazın cGMP oluşturmak üzere aktive olmasıyla gerçekleşmektedir. Melatonin düzeyinin azalması birçok dokuda guanilat siklaz aktivitesinin azalmasına neden olur. Bunun sonucu olarak cGMP düzeyi azalır, cAMP düzeyi artar. Böylece hücre membran kalınlığı artarak dejeneratif hasar oluşumu hızlanır. Yaşlanma sürecinin incelenmesi sırasında ortaya çıkan bu özelliği melatoninin, nitrik oksit sentaz enziminin aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesine neden olmuş ve bu çalışmalar sonucunda melatoninin aynı zamanda oldukça etkili bir nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörü olduğu bulunmuştur (99,100). NO ile melatonin arasındaki ilişki incelendiğinde, melatoninin NO ile nitrosomelatonin oluşturmak üzere reaksiyona girdiği ve O₂ varlığında NO ile O₂'nin reaksiyona girmesi sonucu oluşan peroksinitrit anyonunun da melatonin tarafından tutulduğu ileri sürülmüştür (101).

Melatoninin gerek doğrudan gerekse dolaylı yollarla oksidatif hasara karşı koruyucu etkilerinin bulunması subaraknoid kanama sonrası serebral vazospazm, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, ateroskleroz, sepsis gibi oksidatif hasarın rol oynadığı patolojik olaylardaki öneminin gün geçtikçe artmasına neden olmaktadır.

2.5. TOTAL ANTİOKSİDAN DURUM

Normal fizyolojik koşullarda organizma, endojen veya eksojen nedenlerle oluşan serbest radikaller ve bunlara bağlı oluşan oksidatif stres ile mücadele eden kompleks bir antioksidan defans sistemine sahiptir. Vücudun oluşan oksidan durumlara karşı redoks ayarını sürdürebilmesinde plazma çok önemlidir. Çünkü plazma, antioksidanların vücudun tüm bölümlerine taşınımını ve dağıtımını gerçekleştirir (102).

Total antioksidan duruma en büyük katkı plazmadaki antioksidan moleküllerden gelmektedir. Plazmada serbest demiri toplayan transferrin ve seruloplazmin gibi proteinler yanında serbest radikalleri kapan zincir kırıcı antioksidanlar da

bulunmaktadır. Albumin, ürik asit ve askorbik asit insan plazmasındaki total antioksidan durumun %85'inden fazlasını oluşturur. Bu fark kanda bilirubin, GSH, flavinoidler, α -tokoferol ve β -karoten gibi antioksidan durumun komponentlerine nazaran albumin, ürik asit ve askorbik asitin seviyelerinin fazla olmasına bağlıdır. Plazmada antioksidanlar bir etkileşim içindedir. Bu etkileşimden dolayı bileşenlerin tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir etki oluşmaktadır.

Bu sinerjizme örnek olarak, glutatyonun askorbatı, askorbatın da tokoferolün yeniden aktifleşmesini sağlaması verilebilir. Total antioksidan durumun ölçümü, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler verebilir. Bu yüzden Erel'in geliştirdiği yöntem sayesinde kanın antioksidatif durumunu saptamada bireysel antioksidanlardan ziyade bunların toplam antioksidan değerini veren toplam antioksidan kapasite (TAS) ölçümü yaygınlaşmaktadır (103,104).

3.GEREÇ- YÖNTEM

Bu çalışma Gaziantep Üniversitesi Etik Kurulundan 30.06.2008 tarih ve 06-2008/128 karar nolu etik kurul izini alınarak Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD deney hayvanları araştırma laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmada 250–300 gr ağırlığında Wistar cinsi erkek sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar standart hayvan yemi ve su ile beslenip $21\pm1^{\circ}\text{C}$ oda sıcaklığında 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık siklusunda tutulmuşlardır.

3.1.Gruplar:

Çalışmada toplam 24 adet wistar cinsi sıçan kullanılmıştır. Denekler 4 gruba ayrılmıştır;

I.Grup (n=6): Deneysel SAK oluşturulan ve melatonin (10 mg/kg) intraperitoneal olarak operasyondan hemen sonra ve 24 saat sonrasında toplam 2 doz verilen grup

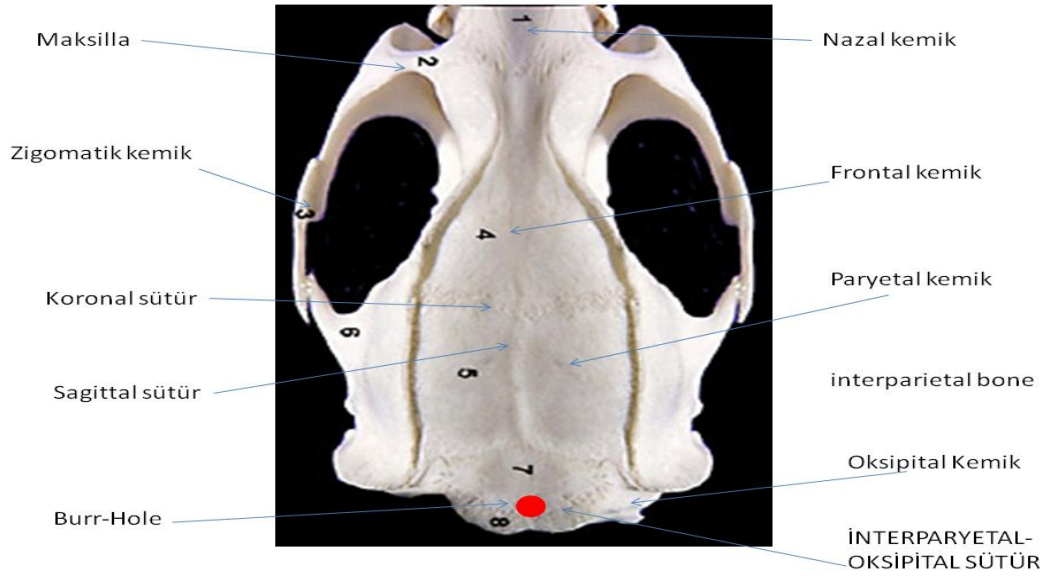
II.Grup (n=6): Sadece deneysel SAK oluşturulan fakat melatonin verilmeyen grup (Kontrol)

III.Grup (n=6): Deneysel SAK oluşturulan ve melatonin (5mg/kg) intraperitoneal olarak operasyondan hemen sonra ve 24 saat sonrasında toplam 2 doz verilen grup

IV.Grup (n=6): Deneysel SAK oluşturulmayan i.p SF verilen grup

3.2. Cerrahi girişim:

Denekler bir gece önceden aç bırakılıp, 10 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®, %5'lik Solüsyon, Parke-Davis lisansı ile Eczacıbaşı İlaç Sanayi, Levent, İstanbul) intraperitoneal uygulanarak genel anestezi sağlandı. Sonra sıçanlar prone pozisyonda baş 20° fleksiyonda iken dört ekstremitelerinden tespit edilip oksipitoservikal kısımları tıraş edilerek Polivinilpirolidon iyod (Polyod® %10'luk solusyon, Drogan İlaç Sanayi, Ankara) ile saha temizliği yapıldı. SAK planlanan ratlar da orta hat oksipito-servikal insizyonla oksipital adeleler diseke edildi. Interparietal-okspital sutürün hemen üstünden bir adet burr-hole açılarak sisterna magna ortaya kondu (Resim 1-2).



Resim 1. Rat kafatasındaki anatomik oluşumlar ve interpariyetal sütür lokalizasyonu



Resim 2. İnterpariyetal sütür üzerinden elektrikli mikrotur yardımı ile burr-hole açılması



Resim 3. Burr-hole içinden 25 gauge iğne ile sisterna mangaya otolog kan enjeksiyonu

Yaklaşık 0.3 cc BOS drene edildikten sonra ratların kuyruk arterinden alınan otolog kan (0.2cc) yavaş bir şekilde sisterna magna içerisine 25 gauge iğne ile enjekte edildi (Resim 3). Hayvanlar intrasisternal kan pıhtı formasyonu oluşturması için 10-15 dk kadar 45 derecelik trandelenburg pozisyonun da yatırıldı. Deney boyunca ısıtıcı lamba ile deneklerin ısılarının sabit tutulması sağlandı ve saha aralıklı olarak steril serum fizyolojik ile yıkandı. Adele dokusu ve cilt 3/0 Vycril ile suture edilerek cerrahi saha kapatıldı. Sonrasında I. ve III. Gruplara melatonin cilt suture edildikten hemen sonra ve 24 saat sonrasında toplam 2 doz halinde uygulandı.

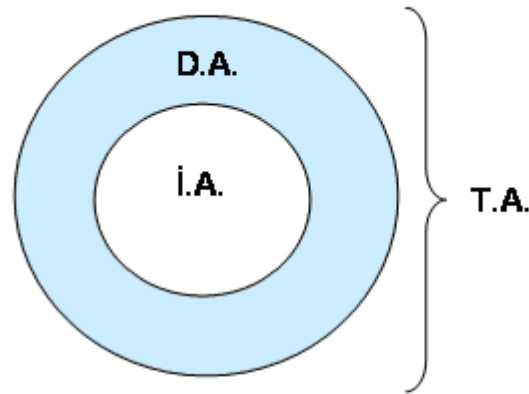
İşlem öncesi bütün deneklere 50 mg/kg sefalosporin i.p. profilaktik olarak uygulandı. Cerrahi yara yerleri 9 gün boyunca Polivinilpirolidon iyod ile pansuman yapıldı.

Tüm denekler 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık siklusunda kaldıkları ve her grubun kendisine ait kolayca standart rat yemi ve su ihtiyaçlarını karşılayabilecekleri kafeslerde takip edildi.

Gruplardaki denekler 9 gün takip edildikten sonra yüksek doz (50mg/kg) Ketamin Hidroklorür İM. verilerek sakrifiye edildi. Öncelikle her hayvandan beyin dokusu ve beyin sapı olmak üzere 2 adet numune alındı. Beyin dokusu total antioksidan kapasite (TAS), total oksidant seviye (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) çalışılabilmesi amacıyla -80 °C'de depolanarak muhafaza edildi.

Çalışmanın yapılacağı zaman tüm doku örnekleri oda ısısına getirildikten sonra çalışıldı. Beyin sapı baziller arter'e zarar vermeden histopatolojik inceleme için %10'luk formol solüsyonu içerisinde üç gün süreyle fiksasyon amacı ile bekletildi. Patoloji bölümüne ulaştırılan bu dokulardan baziller arter, yatağında kalacak şekilde boyu 4 mm ve eni 3 mm olan preparatlar mikroskop altında hazırlanarak parafine gömüldü. Parafin bloklar hazır hale geldikten sonra her hayvanın baziller arterinden 0.5 mikron kalınlığında 4 adet kesit alındı. Alınma sıralarına göre kodlandı. Bu kesitler deparafinizasyonu takiben hemotoksilen eozin ile boyandı ve 400 büyütme altında fotoğraflanarak incelemeye alındı.

Hazırlanan preparatlar Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda mikroskop altında X200 büyütmede incelenerek tüm kesitlerin fotoğrafları çekildi. Çekilen bu fotoğraflar MIPAV (Medical Image Processing, Analysis and Visualization Center for Information Technology (CIT), National Institutes of Health (NIH), Version:3.1.3 2007-03-30) programı kullanılarak baziller arter lümen çapı, duvar kalınlığı, lümen alanları ve damar kesit alanları milimetrekaare olarak ölçüldü (Şekil 4).



D.A. : Damar alanı
İ.A. : Damar iç (lumen) alanı
T.A. : Toplam alan (D.A.+İ.A.)

Şekil 4. Baziler arterde morfometrik ölçüm tekniği

3.3. Total antioksidan seviye (TAS) ölçümü:

Total antioksidan kapasite daha önce literatürde bildirilen Erel yöntemi ile ölçüldü (133). Bu ölçüm yönteminde 2,2' - azinobis - (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radikali (ABTS radikali) kullanılmaktadır. ABTS radikali, antioksidan konsantrasyonuna ve antioksidan kapasiteye göre mavi ve yeşil rengini kaybetmektedir. Bu renk değişikliği, absorbans değeri 660 nm'de ölçülerek değerlendirme yapılmaktadır. Bu ölçüm metodunun prensibi hidrojen peroksit varlığında ABTS molekülünün $ABTS^+$ molekülüne okside olmasına dayanmaktadır. 30 mmol/L asetat tamponu ve pH: 3,6'da koyu yeşil renkte olan radikalın, asetat tamponu 0,4 mol/L, pH: 5,8 olduğunda rengi açılmaktadır. Renk değişimi ile örnek içindeki antioksidan miktarı arasında ters ilişki bulunmaktadır. Reaksiyon hızı standart yöntem olan Trolox ile kalibre edilmektedir. Birimi Trolox equivalent/L'dir.

3.4. Total Oksidant Seviye (TOS) Ölçümü:

Erel tarafından geliştirilen tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir. Örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyonla oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda xilenol orange ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Birim $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eqv. / L}$ 'dir

3.5. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Total Oksidan Seviye (TOS) / Total Antioksidan Seviye (TAS) şeklinde bölünerek Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) hesaplandı. Birim AU'dir.

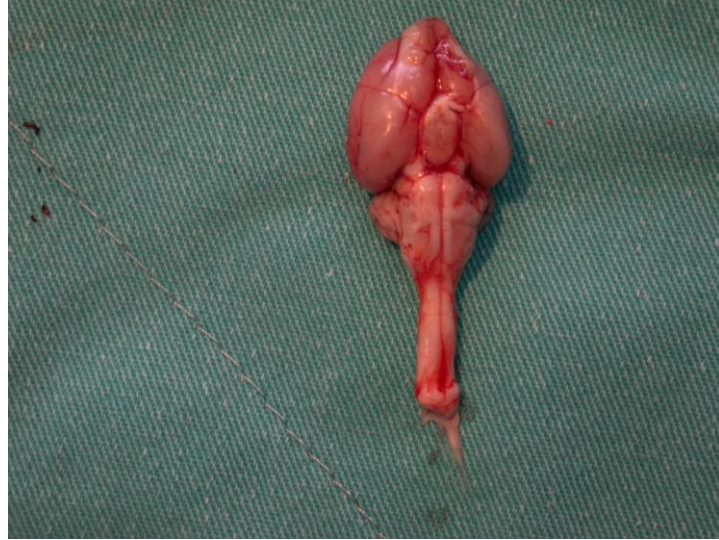
3.6. İstatistiki Yöntem

Veriler Windows XP home işletim sisteminde SPSS for Windows Release 15.0 istatistik programı ile grupların tümü non-parametrik testlerden "Kruskal Wallis Varyans Analiz Testi" kullanılarak değerlendirildi. Gruplar arası ikili karşılaştırmalar ise yine non-parametrik testlerden "Mann-Withey-U" testi ile yapıldı.

5.BULGULAR

4.1. Makroskopik bulgular

Çalışmamızda toplam 24 denek kullanıldı ve 10 günlük izleme alındılar. Deneklere ait beyin dokusunun makroskopik incelemesinde uygun subaraknoid kanama modelinin oluştuğunu gözledik (Resim 4).



Resim 4. SAK sonrası beyin ve beyin sapı dokusunun makroskopik görünüşü

4.2. Biyokimyasal (Total antioksidan ve oksidan) ölçüm bulguları

Erel yöntemi ile uygulanan (133,134) biyokimyasal total antioksidan ve oksidan ölçümleri Kruskal Wallis Varyans Analizi kullanılarak incelendiğinde TAS, TOS ve OSI değerleri bakımından gruplar arasında herhangi bir fark olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir (Tablo 9). Dolayısıyla daha sonra gruplar arası ikili karşılaştırmaya gerek görülmemiştir.

4.3. Histopatolojik bulgular

Preparatlar mikroskop altında X200 ve X400 büyütmede incelendiğinde; SAK yapılarak 10 mg melatonin verilen grup deneklerinde (grup 1) hemen hemen tüm deneklerde incelenen baziler arter lümenlerinde arasında genişlik bakımından belirgin bir fark görülmediği , damar lümenlerinin tek sıralı endotel tabakası ile çevrildiği, endotel tabakası altındaki internal elastik lamina tabakaları düzensizlik göstermeksizin arterleri çevrelediği gözlemlendi. Ayrıca media tabakası düz kas hücrelerinde ve adventisiyada histopatolojik olarak önemli morfolojik değişiklikler gözlenmedi (Şekil 5). SAK yapılarak tedavi olarak 5 mg melatonin verilen grupta da (grup 3) yine grup 1 deki benzer bulgular mevcut idi. SAK yapıp tedavi verilmeyen grupta ise (grup 2) tedavi gruplarına oranla az da olsa vazospazma bağlı lümende daralma görülsede (Şekil 6) SAK yapılmayan ve tedavide verilmeyen gruba kıyasla belirgin bir lümen daralması gözlenmedi (Şekil 7 ve 8). Dolayısıyla tedavi ve kontrol grupları arasında histopatolojik açıdan hafif vazospazm dışında önemli bir fark gözlenmedi.

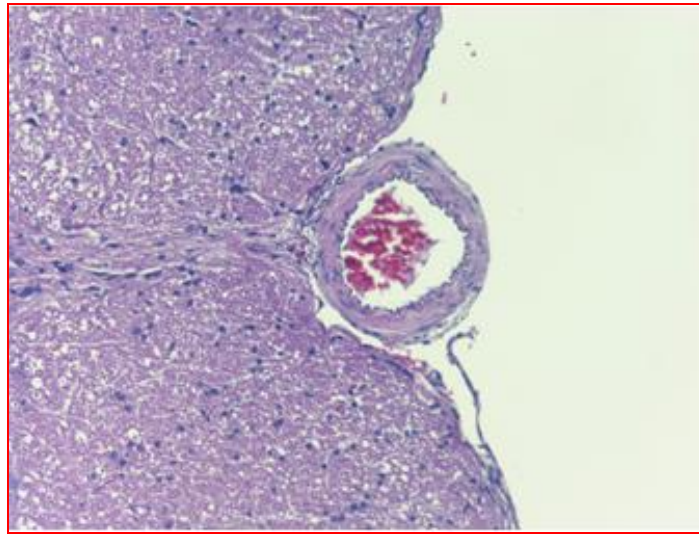
4.4.Morfometrik ölçüm bulguları

Gruplar arası karşılaştırma tüm grupların baziler arter kesit (H.Ex200) ortalamalarının (Şekil 5-9) morfometrik incelenmesiyle yapılmıştır. MIPAV programıyla ölçülen TA, İA, DA, DA/TA ve İA/TA oranları incelendiğinde ise sadece TA, İA ve DA parametreleri için gruplar arasında anlamlı ($p<0.05$) fark olduğu Kruskal Wallis varyans analizi ile tespit edilmiştir (Tablo 8).

Bu yüzden sadece anlamlı çıkan bu parametreler ele alınarak gruplar arası ikili karşılaştırmalar (Mann-Withney U testi) yapılmıştır (Tablo 10,11). Bu karşılaştırmalar sonucunda; 5 ve 10 mg melatonin tedavisi verilen SAK'lı grupların ve her ikisinde SAK oluşturulmadan sadece i.p serum fizyolojik verilen kontrol grubuna göre melatonin

damar alanlarını istatistikî olarak anlamlı ölçüde artırdığı ($p<0.05$) gözlenmiştir (Tablo 5). Ayrıca bahsi geçen bu tedavi gruplarının sadece SAK oluşturulup hiçbir tedavi uygulanmayan kontrol gruplarına oranla TA, İA ve DA parametrelerinin hemen hemen tamamında istatistikî olarak anlamlı artışlar ($p<0.05$) saptanmıştır (Tablo 3-6).

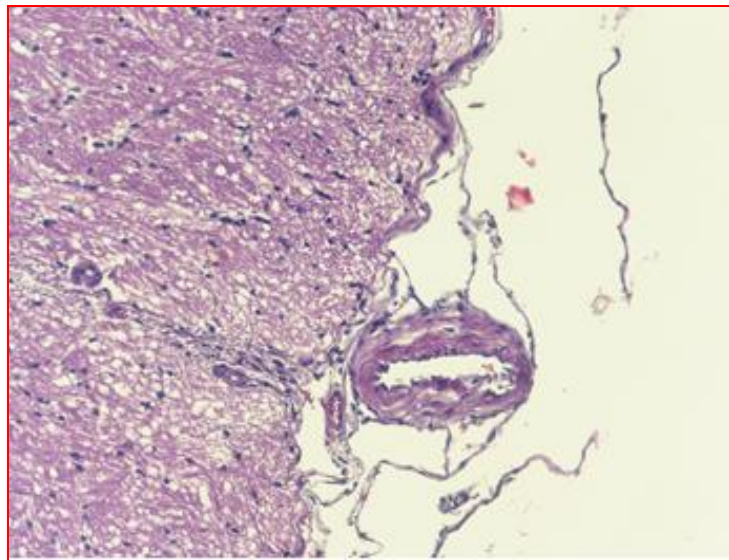
Bu arada kendilerine sadece SAK yapılarak hiçbir tedavi uygulanmayan grup ile SAK yapılmayan ve de melatonin tedavisi uygulanmayan sadece SF tedavisi verilen grup arasında yapılan karşılaştırmada ise damar alanı ölçümleriyle ilgili hiçbir parametrede istatistikî olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Tablo 10). Fakat istatistiki olarak anlamlı olmasada sadece SAK yapılan grupta, SAK yapılmayan kontrol grubuna göre toplam alanda % 2, iç alanda ise % 6.3 oranında daralma olduğu saptanmıştır.



Şekil 5. 1.grup 3.denekte mikroskobik incelemede baziler arter görülmekte (H.E x 200)

Tablo 3. Grup 1 (SAK(+)) 10 mg melatonin)'deki deneklerin lümen alanı, duvar kalınlığı ve damar kesit alan ölçümleri

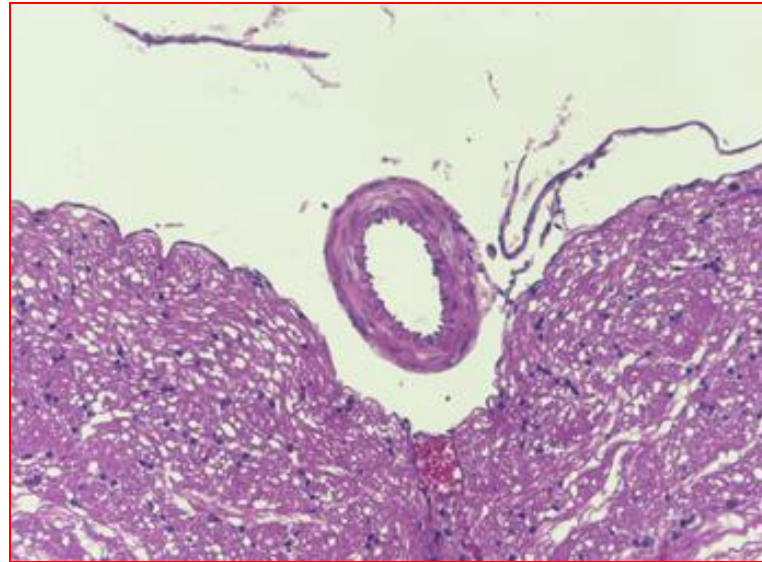
Denek no	TA	İA	DA	DA/TA	İA/TA
1	118961	43429	75532	0.63493	0.36506
2	85599	39054	46545	0.54375	0.45624
3	68498	16842	51656	0.75412	0.24587
4	89197	31917	57280	0.64217	0.35782
5	83293	27820	55473	0.66599	0.33400
6	94127	34494	59633	0.63353	0.36646



Şekil 6. 2.grup 1.denek mikroskopik incelemede baziler arter görülmekte (H.Ex200)

Tablo 4. Grup 2 (SAK(+))’deki deneklerin lümen alanı, duvar kalınlığı ve damar kesit alan ölçümleri

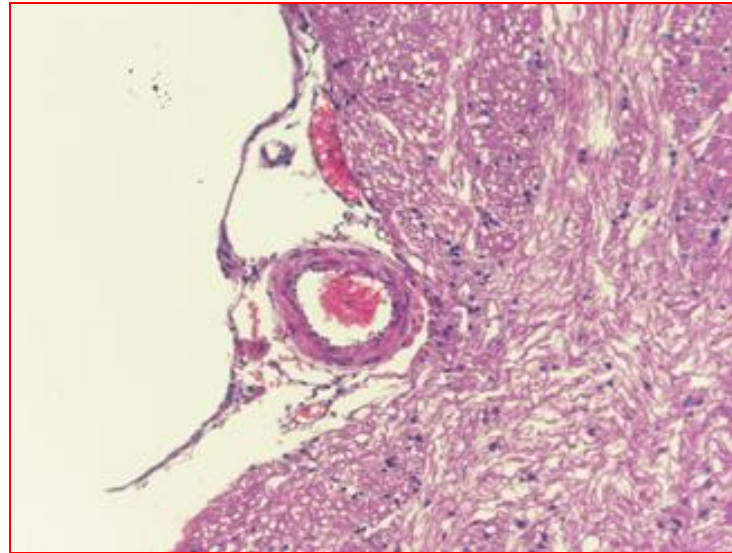
Denek no	TA	İA	DA	DA/TA	İA/TA
1	50800	12378	38422	0.75633	0.24366
2	58721	19171	39550	0.67352	0.32647
3	48683	14261	34422	0.70706	0.29293
4	81201	29947	51254	0.63119	0.36880
5	74094	23616	50478	0.68126	0.31873
6	46650	8588	38062	0.81590	0.18409



Şekil 7. 3.grup 3.denek mikroskopik incelemede baziler arter görülmekte (H.xE 200)

Tablo 5. Grup 3 (SAK(+)) 5 mg melatonin’deki deneklerin lümen alanı, duvar kalınlığı ve damar kesit alan ölçümleri

Denek no	TA	İA	DA	DA/TA	İA/TA
1	98025	19841	78184	0.79759	0.20240
2	92688	30772	61916	0.66800	0.33199
3	105512	44975	60537	0.57374	0.42625
4	64022	16590	47432	0.74087	0.25912
5	94681	44222	50459	0.53293	0.46706
6	95860	27420	68440	0.71395	0.28604



Şekil 8. 4.grup 5.denek mikroskopik incelemede baziler arter görülmekte (H.Ex200)

Tablo 6. Grup 4 (SAK(-) SF verilen)'deki deneklerin lümen alanı, duvar kalınlığı ve damar kesit alan ölçümleri

Denek no	TA	İA	DA	DA/TA	İA/TA
1	42747	15940	26807	0.62710	0.37289
2	30296	7580	22716	0.74980	0.25019
3	90325	21737	68588	0.75934	0.24065
4	66669	19653	47016	0.70521	0.29478
5	61256	19967	41289	0.67404	0.32595
6	75971	30330	45641	0.60076	0.39923

Tablo 7. Tüm grupların TA, İA, DA, DA/TA, İA/TA bulguları ölçümleri

Gruplar	TA	IA	DA	DA/TA	IA/TA
SAK(+) 10mg melatonin	89945.84 ± 16631.82	32259.33 ± 9310.66	57686.50± 9877.41	0.65 ± 0.06	0.35 ± 0.06
SAK(+)	60024.84± 14427.00	17993.50 ± 7871.65	42031.33 ± 7060.40	0.71 ± 0.06	0.28 ± 0.06
SAK(+) 5 mg melatonin	85348.29 ± 21490.73	27486.86± 13729.92	57861.43± 13565.26	0.70 ± 0.10	0.30 ± 0.10
SAK(-) Serum fizyolojik	61210.67 ± 21872.04	19201.17 ± 7439.88	42009.50± 16422.82	0.69±0.06	0.31 ± 0.06

Tablo 8. Tüm grupların TA, İA, DA, DA-TA oranı ve İA-TA oranı yönünden Kruskal Wallis varyans analizi ile değerlendirilmesi

TA	0.006 (*)
İA	0.041(*)
DA	0.016(*)
DA-TA oranı	0.507
İA-TA oranı	0.507

(*) $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı

Tablo 9. Tüm grupların TAS, TOS ve OSİ yönünden Kruskal Wallis varyans analizi ile değerlendirilmesi

TAS	0.38
LOOH	0.491
TOS	0.381
OSİ	0.32

Tablo 10. Mann-withney U testi ile gruplar arası TA, İA ve DA açısından karşılaştırmada elde edilen p değerleri

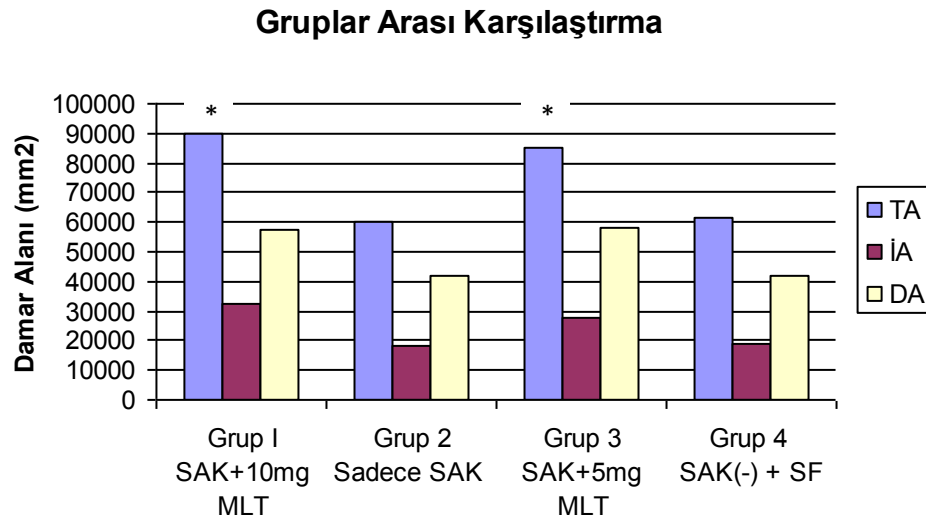
Karşılaştırılan gruplar	TA	IA	DA
1-2	0.010(*) 1>2	0.025(*) 1>2	0.010(*) 1>2
1-3	0.337	0.749	0.423
1-4	0.037(*) 1>4	0.037(*) 1>4	0.055
2-3	0.010(*) 2<3	0.055	0.025(*) 2<3
2-4	0.873	0.631	1.0
3-4	0.016(*) 3>4	0.109	0.037(*) 3>4

(*) $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı

Tablo 11. Mann-withney U testi ile gruplar arası TA, İA, DA karşılaştırılması

Karşılaştırılan Gruplar	TA	IA	DA
1-2	1>2	1>2	1>2
1-3	-	-	-
1-4	1>4	1>4	1>4
2-3	2<3	2<3	2<3
2-4	-	-	-
3-4	3>4	-	3>4

Şekil 9. Tüm grupların DA, İA ve TA açısından karşılaştırılması.



$p < 0.05$

5.TARTIŞMA

Serebral vazospazm, multifaktoriyel bir fenomen olarak, günümüz nörolojik cerrahi pratiğinin ve özellikle de serebrovasküler cerrahinin temel sorunlarından birini oluşturmaktadır. Vazospazm sonrası ortama salınan çeşitli vazoaktif maddeler proinflamatuvar, proapopitotik, vazokonstriktör ve daha bilinmeyen birçok etki ile hastalığın seyrini belirlemektedir. Bu konuda yayınlanmış çok sayıda deneysel ve klinik çalışmanın varlığı, serebral vazospazm sorununun hala aydınlanmamış pek çok yönü olduğunu anlatan en iyi göstergedir. Tanımlandığı günden bu güne geçen yaklaşık 40 yılda geliştirilen ve yaygın olarak kullanıma giren ve hala kullanmakta olduğumuz tedavi yöntemlerine rağmen serebral vazospazm, subaraknoid kanama sonrası hastaneye kabul edilen hastalarda nörolojik sekel ve ölümün en önde gelen sebebi olmaya devam etmektedir (105).

Subaraknoid kanama geçiren hastalarda asıl sonuç intrakranial arterlerdeki kalıcı vazospazm sonucu 3. ve 14. günler arasındaki subakut dönemdeki semptomatik beyin iskemisidir. Birçok deneysel ve klinik çalışmaya rağmen etkin bir tedavisi ve önleme yöntemi bulunamamıştır (106). Subaraknoid kanamadan birkaç gün sonra fagosite olmuş eritrositlerden salınan oksihemoglobin, reaktif oksijen metabolitleri ve bilirubin oksidasyon ürünlerinin doğrudan ve dolaylı olarak serebral vazospazma yol açtığı artık günümüzde kabul edilmektedir (107). Persistan vazospazm sırasında BOS'da ET, TxA₂, serotonin seviyeleri de yüksek bulunmuş olup ayrıca spazm halindeki serebral arterlerde ET ve serotonin reseptörlerinin arttığı gösterilmiştir (108,109). Bunun sonucu olarak ET-1 ve serotonin vasküler yatakta artmış kontraktıl cevaba neden olmaktadır. Hemoglobin metabolizmasıyla da birçok toksik mediatörler salınır. Bunlardan özellikle oksihemoglobin'in methemoglobine oto-oksidasyonu sırasında oluşan superoksit anyon radikali (O₂⁻) ve hemoglobinin yıkımı sırasında ortama yayılan demir bileşikleri Haber-Weiss reaksiyonunu katalize ederek en reaktif radikallerden hidroksil radikalinin (OH⁻) ortaya çıkmasına neden olur. Ortaya çıkan bu süperoksit

anyonları ve hidroksil radikalleri oksidatif stres ve hücre membranında lipid peroksidasyonuna neden olurlar. Hidroksil radikalleri ayrıca vazokonstriktör etkili olup yapılan çalışmalarda subaraknoid kanama sonrası ratların baziller arterinde hidroksil radikallerine karşı hipersensitivite olduğu bildirilmiştir (110).

Oksidatif stres süreçleri damar endotelini etkileyerek PGH₂, TxA₂ ve isoprostan gibi vazokonstriktör ajanların salınımını sağlar (111). Süperoksid anyonları ise; endotelyal düz kas ve adventisyal hücrelerinden iNOS varlığında subakut dönem vazospazm sırasında toksik miktarlarda üretilir ve nitrik oksid'e bağlanarak etkileri oluşturur. Bu son reaksiyonun bir ürünü olan peroksinitrit çok güçlü bir oksidan madde olup subaraknoid kanama sonrası subakut vazospazmda rol oynadığı kanıtlanmıştır (112). Ayrıca süperoksid anyonları endotel hücrelerinden endotelin salınmasını da uyarak vazospazmı her iki yoldan (peroksinitrit ve endotelin) da stimüle eder.

Deneyssel subaraknoid kanama yapılan ratlar üzerindeki bir başka çalışmada süperoksid dismutaz'ın fazla salındığı gruplarda, iNOS indikasyonu görülmemiş, endotelyal hasarın diğer gruplara göre daha zayıf olduğu görülmüştür (113). Dolayısıyla iNOS varlığı vazospazmda bir kavşak rolü oynamaktadır.

Başka bir sınıf güçlü spazmojende oksihb metabolizmasından üretilen bilirubin oksidasyon ürünleri (BOXes)'dir. Bilirubin ve biliverdin metabolizması sırasında üretilen bu ürünler subaraknoid kanama sonrası vazospazmlı hastalarda BOS'ta tespit edilmiş ve klinik vazospazm bulgularıyla uygun olarak konsantrasyonlarının arttığı gözlenmiştir (114).

SAK sonrası vazospazm oluşturan maddelerin hepsi de intrasellüler Ca konsantrasyonunu artırarak ve/veya düz kaslardaki kontraktil proteinlerin kalsiyuma sensitizasyonunu artırarak etki göstermektedir (115,116).

Serebral vazospazm için günümüzdeki tedavilerin amacı etkilenen damarları doğrudan veya dolaylı olarak dilate ederek serebral kan akımını artırmaktır. Hipervolemik-hipertansif-hemodilasyon tedavisi hala sorgulanmaktadır ve yeni çalışmalar yüksek oranda görülen komplikasyonları nedeni ile artık bu tedaviyi önermemektedir. Ayrıca yaşlı ve hemodinamik olarak stabil olmayan hastalar bu üçlü tedaviyi iyi tolere edememektedirler. Sonrasında

kalsiyum kanal blokerleri gündeme gelmiş fakat bu ilaçların da etkilenen arterlerde vazodilatasyona yol açmaması ve hipotansif etkisi nedeni ile kullanımı sınırlanmıştır. Vazodilatörler subakut serebral vazospazmın tedavisinde önemli bir yere sahip olmakla birlikte zararlı etkileri de olabilir. Serebral arteriyollerde dilatasyona yol açıp, serebral kan akımını artırarak çalma fenomenine yol açabilirler (117).

Transluminal serebral anjiyoplasti ve vazodilatörlerin intraarteriyel enjeksiyonu rezistan vasospazm olgularında denenmiş fakat uzun dönemli izlemlerinde nörolojik sekel üzerine klasik üçlü tedaviden farklı etki göstermedikleri saptanmıştır (118).

Gecikmiş iskemik defisite ait istenmeyen sonuçların önlenmesi için son yıllarda geliştirilen ilaç tedavileri arasında magnezyum sulfat, statin ajanları (simvastatin, pravastatin), L-arginine, mexiletine, adenozin A1 reseptör agonistleri, clazosentan ve son yıllarda popüler olan serbest radikal yakalayıcıları (edaravone, human eritropoetin ve melatonin) öne çıkmaktadır (119-122).

Bu çalışmaların çoğunda anjiyografik vazopazm anlamlı ölçüde azalmış, ancak hastaların klinik sonuçlarında anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Bu durum vazospazm etyopatogenezinde gözden kaçan başka faktörlerin de olabileceğini ortaya koymuştur.

Bu çalışmada güçlü antioksidan özelliği ile lipid peroksidasyonunu inhibe ederek vazospazmı azalttığı söylenen melatoninin (123) deneysel SAK oluşturulan ratların baziller arterinde düşük (5 mg) ve yüksek (10 mg) dozlarda yani doz bağımlı olarak damar duvarı, damar lümeni ve total antioksidan düzeyine etkisini biyokimyasal ve morfometrik açıdan araştırdık.

Turjanski tarafından (124) 1993 yılında serbest hidroksil radikallerini etkisizleştirdiği rapor edilen melatonin hakkında daha sonraki yıllarda serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu üzerine etkilerini araştıran birçok çalışmalar yapılmıştır. Bu

alışmalar melatoninin yapısındaki pirol halkasından dolayı serbest radikalleri direkt detoksifiye ettiği, lipid peroksidasyonunu sonlandırdığı ve diğer antioksidan enzimlerin gen aktivitelerini artırdığını göstermiştir.

Melatonin hem lipid fazda hem de suda znebildiğinden dolayı vücuttaki tüm bariyerleri rahatlıkla geçebilir ve tüm intrasellüler komponentlere kolaylıkla ulaşabilir. Bu özelliğinden dolayı DNA'yı oksidatif hasara karşı koruması ona üstünlük sağlar. Melatonin varlığında mitokondriyal solunum zincirinden kaynaklanan H₂O₂ ve HO gibi radikallerin üretimi azalır (124).

Melatoninin multifonksiyonel indolamin olup uzun süre ve yüksek ve dozda kullanıldığında toksik etkisinin olmadığı görülmüştür.

Süperoksid dismtaz ve GSH-Px gibi intrasellüler antioksidan enzimleri aktive ederek intrasellüler antioksidan seviyesini artırır. Bu özelliğinden dolayı klasik antioksidanlara göre prooksidatif etkileri yoktur (125,126).

Melatonin ayrıca intrasellüler olarak Ca kalmodulin kompleksine bağlanarak miyozin fosforilasyonunu ve sonuç olarak vasküler düz kas kontraksiyonunu önleyen bir kalmodulin antagonistidir (127).

Melatoninin etkisini SSS'de daha iyi anlayabilmek için öncelikle bağlandığı ve afinite gösterdiği bölgeleri bilmek gerekir. Dubocovich ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada melatonin hem beyin parankimindeki hem vasküler yataktaki bağlandığı reseptörlerinin varlığını vurgulamışlardır (128). Bu ve buna benzer çalışmalarda memelilerde melatoninin tanımlanabilmiş iki reseptör subtipinin olduğu belirtilmiştir. Bunlar MT1(1a) ve MT2(1b) olup ilk önce rodentlerin kuyruk arterlerinde tespit edilmişlerdir (129). Burada yapılan çalışmalar da MT2 reseptörlerinin vasküler lümende relaksasyon MT1 reseptör subtipinin ise konstrüksiyon yaptığı tespit edilmiştir (130).

Bu arada beyin parenkimi ve vasküler yatağı içeren bir çalışmada da 2- I¹²⁵ iyodomelatonin isimli radyoligand kullanılarak tüm bu alanlarda melatoninin reseptör

dağılımı yada melatonin bağlayıcı bölgeler açısından incelenmiştir (130). Bu çalışma sonucunda MT1'in özellikle SCN, PT ve paraventricüler talamus dokularında bulunduğu, MT2'ninde yine SCN, hipokampus, retina gibi dokularda daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Bahsi geçen bu reseptörler 7- transmembran –G-protein bağlı ailesinin özelliklerini taşımaktadır (130). Melatoninin serebral vasküler yatak üzerine olan etkileri araştırıldığında bifazik yapıda bir konsantrasyon-cevap eğrisini gösteriyor olması bu ortamda birden fazla reseptör olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla MT1 ve MT2 reseptörleri açısından olaya bakıldığında melatonine karşı alınan yanıtın kontraktıl ve relaksasyon yapan komponentlerin bir karışımı olduğu söylenebilecektir (131).

Bu reseptörlerin etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için her biri için geliştirilmiş özgün antagonistlerin kullanılması çok faydalı olacaktır. Örneğin Luzindole isimli bir madde hem MT1 hem de MT2 reseptörlerine ayırt etmeden bağlandığı için o bölgedeki toplam cevap gözlenebilmektedir. Bundan dolayı selektif olarak melatonin subtip antagonistleri kullanılarak yapılan araştırmalar bize özellikle vasküler yataktaki reseptör subtip heterojeniteleri hakkında bilgi verecektir (132).

Biz bu çalışmada melatoninin doz bağımlı etkilerini de ortaya koymak amacıyla literatürde faydalı olduğu bildirilen 5 ve 10 mg/kg dozlarını tedavi gruplarında uyguladık. Denekler oksidatif metabolizma açısından değerlendirildiğinde istatistiki olarak TAS, TOS yada OSI değerlerinde anlamlı değişiklik saptanamamıştır. ($p>0.05$). TAS ve TOS değerleri ölçülürken Erel ve arkadaşlarının (133,134) kullandığı ve kabul gören niceliksel ölçüm yöntemi kullanılmıştır. Ölçümlerin daha sağlıklı olması için çift kör (deney yapan ve ölçen) teknik ve deneklerin randomizasyonu yöntemi kullanılmıştır. Çalışmamızda beyin dokusunun tamamı (serebellum ve beyin sapı hariç) homojenize edilerek bu homojenatlardan TAS ve TOS seviyeleri ölçüldü. Bu seviyelerin anlamlı olarak çıkmamış olması reseptör yoğunluğunun beyin parankimindeki PT ve SCN gibi çok küçük alan yada volüm içeren bölgelerde lokalize olması ve bu alanların tüm beyin homojenatı içinde küçük bir volümde olmasıyla açıklanabilecektir.

Dolayısıyla sadece bu küçük alanlardaki reseptörlerin aktivasyonu oksidatif stresin şiddetini azaltamamış olabilir. Bunun üstesinden gelebilmek için melatonin 200

mg/kg'a gibi yüksek dozlara çıkılarak terapötik doz aralığının zorlanması melatoninin etkilerinin gözlenmesi açısından faydalı olabilecektir.

Bu çalışmaya vasküler lümenin morfometrisi açısından bakıldığında ise 5 ve 10 mg/kg melatonin verilen SAK gruplarında kontrol gruplarına kıyasla anlamlı olarak damar alanlarında artış (yani vazodilatasyon) ($p<0.05$) gözlenmiştir. Ayrıca kontrol gruplarının (yalnız SAK yapılan tedavisiz grup ile hem SAK yapılmayıp hemde tedavi verilmeyen gruplar) arasındaki kıyaslarda da morfometrik ölçümler açısından istatistiki fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Buna rağmen SAK yapılan grupta SAK oluşturulmayan kontrol grubuna göre damar toplam alanı ve iç lümen alanında istatistiki anlam taşımaya da daralma gözlenmiştir. Dolayısıyla melatonin tedavisi verilen SAK gruplarında melatonin etki göstererek vazodilatasyon yaptığı görülmüştür ($p<0.05$). Bununla ilgili literatür çalışmalarında melatoninin olumlu etkisini ifade eden yayınların (135) yanı sıra melatoninin vasküler spazm üzerine hiçbir olumlu etkisinin olmadığını savunan yayınlar da vardır (136). Her ne kadar literatürde Willis poligonunda melatonin reseptörlerinin tespit edildiği söylene de MCA, ACA ve PCA damarları dışındaki bir damar için afinite çalışması yapılmamıştır (137).

Bizim çalışmamızda morfometrik sonuçlar baziler arterde de bu reseptörlerin olabileceğini göstermiştir. Bundan sonraki çalışmalarda baziler arterde izole I¹²⁵ bağlı iyodomelatonin uygulamaları ile bu hipotez doğrulanabilecektir.

Sonuç olarak; melatonin iyi bilinen antioksidan etkileri nedeniyle literatürde sık vurgulanan bir moleküldür. Fakat bizim çalışmamız mevcut literatürü bütün yönleriyle desteklememektedir. Bu paradoksu çözebilmek için öncelikle melatoninin serebral vasküler yatak ve serebral parenkimdeki dağılım ve konsantrasyonuna yönelik çalışmalar yapmanın gerekliliğine inanmaktayız.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- 1) Bölgesel olarak melatoninin SSS'e olan afinitesi bilinmekle beraber global etkileri sorgulanmalıdır.
- 2) Melatoninin henüz SSS ve vasküler yataktaki reseptör dağılımına ilişkin yeterli sayıda çalışma yoktur.
- 3) Vazospazmdaki etkileri literatürdeki çelişkiler nedeniyle sorgulanabilir düzeydedir.
- 4) Melatonin ile ilgili doz bağımlı çalışmaların ikiden fazla ve geniş doz aralıklarında yapılması terapötik doz aralığının saptanması açısından yararlı olacaktır.
- 5) Mevcut SAK ve buna bağlı vazospazm modellerinin gerçek hayattakine en yakın olan şekillerine göre revize edilmelidir.
- 6) TAS düzeyi oksidatif dengenin genel bir göstergesidir. Dolayısıyla yerel değişikliklerin gözden kaçabilmesi ihtimal dahilindedir.

7. KAYNAKLAR

- 1.Ratsep T, Asser T. Cerebral hemodynamic impairment after aneurysmal subarachnoid hemorrhage as evaluated using transcranial doppler ultrasonography: relationship to delayed cerebral ischemia and clinical outcome. J Neurosurg. 2001;95:400-408.
- 2.Ecker A, Reimenschneider PA. Arteriographic demonstration of spasm of the intracranial arteries with special references to saccular aneurysms. J Neurosurgery. 1951;8:660-667.
- 3.Adnan I, Qureshi M, Fareed K, Suri AM, Yahia JL, Suarez LR. et al. Risk factors for Subarachnoid hemorrhage. Neurosurgery. 2001;49:607-610.
- 4.Ayajiki K, Fujioka H, Okamura T, Toda N. Relatively selective neuronal nitric oxide synthase inhibition by 7-nitroindazole in monkey isolated cerebral arteries. Eur J Pharmacol. 2001;423:179-83.
- 5.Nakagomi Tadayoshi, Kenta Yamakawa, Tomio Sasaki, Isamu Saito and Kintomo Takakura Effect of edaravone on cerebral vasospasm following experimental subarachnoid hemorrhage. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2003;12:17-21.
- 6.Ingall TJ, Whisnant JP. Epidemiology of subarachnoid hemorrhage. Yanagihara T. Piepgras DG, Atkinson JLD (eds): Subarachnoid Hemorrhage. New York, Marcel Dekker 1998; pp:63-78.
- 7.Övül İ. Subaraknoid Kanamalar. Temel Nöroşirürji. Türk Nöroşirürji Yayını, Ankara 1997; ss: 441-448.
- 8.Mayberg MR, Batjer EH, Dacey R. Guidelines for the management to aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Stroke. 1994;25:2315-2328.
- 9.Linn FH, Rinkel GJ, Algra A, Gijin J. Incidence of subarachnoid hemorrhage: Role of region, year, and rate of computed tomography-meta analysis. Stroke. 1996;27:625-629.

10. Pakarinen S. Incidence, etiology, and prognosis primary subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurol Stand. Suppl.* 1967;29:1-138.
11. Hop JW, Rinkel GJ, Algra A, van Gijn J. Case fatality rates and functional outcome after subarachnoid hemorrhage: a systematic review. *Stroke.* 1997;28:660-664.
12. Lazino G, Kassel NF, Germanson TP. Age and outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: why the older patients fare worse. *J Neurosurg.* 1996;85:410-418.
13. Weir B. Aneurysms affecting the nervous system. Baltimore: Williams&Wilkins. 1994;43:28-56.
14. Broderick DB, Brott T, Tomsck T, Huster G, Miller R. The risk of subarachnoid and intracerebral hemorrhage in blacks as compared with whites. *N Engl J Med.* 1992;326:733-736.
15. Chyatte D, Chen TL, Bronstein K, Brass LM. Seasonal fluctuation in the incidence of intracranial aneurysm rupture and its relationship to changing climatic conditions. *J Neurosurg.* 1994;81:525-530.
16. Schievink WI. Genetics of intracranial aneurysms. (Review) *Neurosurg.* 1997;40:651-662.
17. Bromberg JEC, Rinkel GJE, Algra A, Greebe P, VanDuyn CM, Hasan D. et al. Subarachnoid hemorrhage in first and second degree relatives of patients with subarachnoid hemorrhage. *BMJ* 1995;311:288-289.
18. De braekeleer M, Penise L, Cantin L. A study of embedding and kind ship in intracranial aneurysm in the Saguenay Lac-Seant-Jean region (Quebeck, Canada). *Ann Hum Genet.* 1996;60:99-104.
19. Gaist D, Vaeth M, Tsiropoulus I, Cristensen K. Risk of subarachnoid hemorrhage in the first degree relatives of patients with subarachnoid hemorrhage: follovv up study based on national registries in Denmark. 2000;320:141-145.
20. Schievink WI, Schaid DJ, Michels W, Piepgras DG. Familial aneurysmal subarachnoid hemorrhage a community based study. *J Neurosurg.* 1995;83:426-429.

21. Schievink WI, Torres VE, Piepgras DG, Wiebers DO. Saccular intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 1992;3:88-95.
22. Schievink WI, Michels W, Piepgras LX. Neurovascular manifestations of heritable connective tissue disorders. A review. *Stroke*. 1994;25:9-90.
23. Van den Berg JS, Limburg M, Hennekam RC. Is Marfan syndrome associated with symptomatic intracranial aneurysms? *Stroke*. 1996;27:10-12.
24. Kawachi I, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Manson JE, Rosner B. et al. Smoking cessation and decreased risk of stroke in women. *JAMA* 1993; 269: 232-236
25. Kopitnik TA, Samson DS. Management of subarachnoid hemorrhage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1993;56:947-959.
26. Thorogud M, Mann L, Murphy M, Vcssey M. Fatal stroke and use of oral contraceptives: finding from a case-control study. *Am J Epidemiol*. 1992;136:35-45.
27. Kelly MA, Gorelick PB, Mirza D. The role of drug in the etiology of stroke (review). *Clin Neuropharmacol*. 1992;15:249-275.
28. Konzen JP, Levine SR, Garcia JH. Vasospasm and thrombus formation as possible mechanisms of stroke related to alkaloidal cocaine. *Stroke*. 1995;26:1114-1148.
29. Brown E, Prager J, Lee HY, Ramsey RG. CNS complication of cocaine abuse: prevalence, pathophysiology, and neuroradiology. Review. *AJR* 1992;159:137-147.
30. Daras M, Tuchman AJ, Koppel BS, Samkoff LM, Weitzner I, Marc J. et al. Neurovascular complication of cocaine. *Acta Neurol Scand*. 1994;90:124-129.
31. Mayberg M. Cerebral Vasospasm. *Neurosurg Clin N Am*. 1998;9:615-627.
32. Giannotta SL, McGillicuddy JE, Kint GW. Diagnosis and treatment of cerebral vasospasm. *Surg Neurol*. 1977;8:286-290.
33. Niizuma H, Kwak R, Otabe K, Suzuki J. Angiography study of cerebral vasospasm following the rupture of intracranial aneurysms: Part II. Relation between the site of aneurysm and the occurrence of the vasospasm. *Surg Neurol*. 1979;2:263-267.

34. Grup RL Jr, Raichle ME, Eichling JO. Effects of subarachnoid hemorrhage on cerebral blood volume, blood flow and oxygen utilization in humans. *J Neurosurgery*. 1977;44:446-452.
35. Sasaki T, Wakai S, Asano T, Watanabe T, Kirino T, Şano K. The effect of a lipid hydroperoxide of arachidonic acid on the canine basilar artery. An experimental study on cerebral vasospasm. *J Neurosurgery*. 1981;54:357-365.
36. Fisher CM, Kistler JP, Davis JM. Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualized by computerized tomographic scanning. *Neurosurgery*. 1980;6:1-9.
37. Haley ECJ, Kassell NF, Tomer JC. The International Cooperative Study on the Timing of Aneurysm Surgery. The North American experience. *Stroke*. 1992;23:205-214.
38. Rousseau P, Scherpereel B, Bernard M. Fever and cerebral vasospasm in ruptured intracranial aneurysms. *Surg Neurol*. 1980;1:459-465.
39. Dorsch NWC. Incidence, effects and treatment of ischemia following aneurysm rupture. Şano K, Takakura K, Kassell NF and Sasaki T (eds), *Cerebral vasospasm*, Tokyo: Univ. Of Tokyo Press, 1990:495-498.
40. Kassell NF, Tomer JC, Jane JA, Haley EC, Adams HP. The International Cooperative Study on the Timing of Aneurysm Surgery. Part 1: Overall management results. *J Neurosurgery*. 1990;73:18-37.
41. Sehba FA, Mostafa G, Friedrich V, Bederson JB. Acute microvascular platelet aggregation after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 2005;102:1094-1100.
42. Kasuya H, Shimizu T. Activation of the coagulation system in the subarachnoid space after subarachnoid hemorrhage: serial measurements of fibrinogen peptide A and bradykinin of cerebrospinal fluid and plasma in patients with subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 1988;91:120-125.
43. Phita RM, Afshar JK, Boock RJ, Oldfield EH. Temporal changes in perivascular concentrations of oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, and methemoglobin after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 1998;88:557-561.

- 44.Kistler JP, Crowl RM, Davis KR, Heros R, Ojemann RG. The relation of cerebral vasospasm to the extent and location of subarachnoid blood visualized by CT scan: A prospective study. *Neurology*. 1983;33:424-436.
- 45.Burnett M, Danish S. Pathology and pathophysiology of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. In P Leroux, W.Winn & D. Newell (Eds.), *Management of Cerebral Aneurysms*. Philadelphia, PA: Elsevier, 2004:127-137.
- 46.Pluta MR, Delayed cerebral vasospasm and nitric oxide: review, new hypothesis, and proposed treatment. *Pharmacol Ther*. 2005;105:23-56.
- 47.Asano T. Oxyhemoglobin as the principal cause of cerebral vasospasm. A holistic view of its actions. *Clin Neurol Neurosurg*. 1999;9:303-318.
- 48.Chehraz BB, Giri S, Joy RM. Prostaglandins and vasoactive amines in cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 1989;20:217-24.
- 49.Nosko M, Schulz R, Weir B, Cook DA, Grace M. Effects of vasospasm on levels of prostacyclin and thromboxane A₂ in cerebral arteries of the monkey. *Neurosurgery*. 1988;22:45-50.
- 50.Jkeda Y, Long DM. The molecular basis of brain injury and brain edema: The role of oxygen free radicals. *Neurosurgery*. 1990;27:1-11.
51. Sakaki S, Kuwabara H, Ohta S. Biological defence mechanism in the pathogenesis of prolonged cerebral vasospasm in the patients with ruptured intracranial aneurysms. *Stroke*. 1986;17:196-202.
- 52.Şano K, Asano T, Tanishima T, Sasaki T. Lipid peroxidation as a cause of cerebral vasospasm. *Neurol Res*. 1980;2:253-272.
- 53.Koźniewska E, Michalik R. Mechanisms of vascular dysfunction after subarachnoid hemorrhage. *J Physiol Pharmacol*. 2006;57(11):145-160.
- 54.Heistad DD, Kontos HA. Cerebral circulation, in Shepherd JT, Abboud FM(eds): *Handbook of Physiology*. Section: Circulation. Bethesda, Am Physiol Soc. 1993;3:137-182.

- 55.Kassell NF, Sasaki T, Colohan AR, Nazar G. Cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 1985;16:562-572.
- 56.Song JK, EUiot JP, Eskridge JM. Neuroradiologic diagnosis and treatment of vasospasm *Neurosurg Clin N Am*. 1997;7:819-835.
- 57.Kassell NF. Helm G, Simmons N. Treatment of cerebral vasospasm with intra-arterial papaverine. *J Neurosurg*. 1992;77:848-852.
- 58.Kassell NF, Peerless SJ. Treatment of ischemic deficit from vasospasm with intravascular volume expansion and induced arterial hypertension. *Neurosurgery*. 1993;11:337-343.
- 59.Ohman J, Heiskanen O. Timing of operation for ruptured supratentorial anerysm: A prospective randomized study. *J Neurosurg*. 1989;70:55-60.
- 60.Muizelaar JP, Becker DP. Induced hypertension for the treatment of cerebral ischemia after SAH. Direct effect on cerebral blood flow. *Surg Neurol*. 1986;25:317-325.
- 61.Flamm ES, Adams HP, Beck DW. Dose-escalation study of intravenous nicardipine in patients with aneurysmal SAH. *J Neurosurg*. 1988;68:393-400.
- 62.H. Bevan J, Bevan RD, Frazee JG. Functional arterial changes in chronic cerebral vasospasm in monkeys: an invitro assessment of contributing to arterial narrowing. *Stroke*. 1987;18:472-481.
- 63.Ohmann J, Heiskanen O. Effect of nimodipine on the outcome of patients after SAH and surgery. *J Neurosurg*. 1988;69:683-686.
- 64.Ohmann J, Servo A, Heiskanen O. Long-term effects of nimodipine on cerebral infarcts and outcome after aneurysmal SAH and surgery. *J Neurosurg*. 1991;71:8-13.
- 65.Bejjani GK, Bank WO, Olan WJ, Sekhar L. The efficacy and safety of angioplasty for cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 1998;42:979-982.
- 66.Milbum JM, Moran CJ, Cross DT, Diringner MN, Pilgram TK, Dacey RG. Increase in diameters of vasospastic intracranial arteries by intraarterial papaverine adnustration. *J Neurosurg*. 1998;88:38-42.

67. Numaguchi Y, Zoarski GH, Clouston JE, Zagardo MT, Simard JM. Repeat intra-arterial papaverine for recurrent cerebral vasospasm after subarachnoid haemorrhage. *Neuroradiology*. 1997;39:751-759.
68. Cross DR III, Moran CJ, Angtuaco EE, Milburn J, Diringier M, Dacey RG Jr. intracranial pressure monitoring during intraarterial papaverine infusion for cerebral vasospasm. *Am J Neuroradiol*. 1998;19:1319-1323.
69. Haley ECJ, Kassell NF, Alves VM, Weir B. Phase 2 trial of tirilazad in an SAH. A report of the Cooperative Aneurysm Study. *J Neurosurg*. 1995;82:786-790.
70. Munakata A, Ohkuma H, Nakano T, Shimamura N, Asano K. Effect of a free radical scavenger, edaravone, in the treatment of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 2009;64(3):423-8.
71. Parks DA, Granger DN. Ischemia-reperfusion injury: a radical view. *Hepatology*. 1988;8(3):680-2.
72. Pryor WA, Prier DG, Church DF. Electron-spin resonance study of mainstream and sidestream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase smoke and in cigarette tar. *Environ Health Perspect*. 1983;47:345-55.
73. Reed DJ. Status of calcium and thiols in hepatocellular injury by oxidative stress. *Semin Liver Dis*. 1990;10(4):285-92.
74. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc*. 1988;63(4):381-9.
75. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol*. 1996;46(1):115-32.
76. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem Lab Med*. 1995;41(12):1819-1828.
77. Dündar Y, Aslan R: Hücre moleküler statüsünün anlaşılması ve fizyolojik önem açısından radikaller-antioksidanlar. *İnsizyon*. 1999;2:134-142.

- 78.Akkuş I. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları Konya, 1995:75-87.
79. Inci E, Civelek S, Seven A, Inci F, Korkut N, Burcax G. et al. Laryngeal cancer: in relation to oxidative stress. *Tohoku J Exp Med.* 2003;200(1):17-23.
- 80.Abiaka C, Al-Awadi F, Al-Sayer H. Activities of erythrocyte antioxidant enzymes in cancer patients. *J Clin Lab Anal.* 2002;16(4):167-71.
- 81.Spallholz JE. Selenium and glutathione peroxidase: essential nutrient and antioxidant component of the immune system. *Adv Exp Med Biol.* 1990;262:145-58.
- 82.Levy RD, Oosthuizen MM, Degiannis E. Glutathione-linked enzymes in benign and malignant oesophageal tissue. *Br J Cancer.* 1999;80(112):32-37.
- 83.Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, in the pineal gland factor that ligthens melanocytes. *J Am Chem Soc.* 1958;80:2587-2592.
- 84.Macchi MM, Bruce JN. Human physiology and functional significance of melatonin *Front Neuroendocrinol.* 2004;25:177-195.
- 85.Guyton AC, Hall JE. Text Book of Medical Physiology (Tıbbi Fizyoloji). Çavuşoğlu H (Çev. Ed.), 9. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti, İstanbul 1996, ss: 1015-1016.
- 86.Macchi MM, Bruce JN. Human physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol.* 2004;25:177-195.
- 87.Hardeland R, Pandi-Perumal SK, Cardinali DP. Molecules in focus: Melatonin. *Intern J Biochem Cell Biol.* 2006;38:313-316.
- 88.Reiter RJ. Melatonin. The chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol.* 1991;79:153-158.
- 89.Von Gall C, Stehle JH, Weaver DR. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res.* 2002;309(1):151-62.

- 90.Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T, Mahle CD, Kolakowski LF. Cloning of melatonin-related receptor from human pituitary. *FEBS Lett.* 1996;386:219-224.
- 91.Turek FW, Gillette MU. Melatonin sleep and circadian rhythms: rationale for development specific melatonin agonists. *Sleep Medicine.* 2004;5:523-532.
- 92.Reiter RJ. The role of the neurohormone melatonin as a buffer against macromolecular oxidative damage. *Neurochem Int.* 1995;27(6):453-60.
- 93.Benites-King G, Anton-Jay F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effect. *Experientia* 1993;49:635-641.
- 94.Brezezinski A. Melatonin in humans. *N English J Med.* 1997;336:186-195.
- 95.Marshall KA, Reiter RJ, Poeggeler B. Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vivo. *Free Radical Biol Med.* 1996;21:307-315.
- 96.Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC. Melatonin-a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;738:419-420.
- 97.Reiter RJ, Carneiro RG, Oh S. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res.* 1997;29:363-372.
- 98.Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J.* 1993;1:57-60.
- 99.Jacob S, Poeggeler B, Weishaupt JH, Sirén A-L, Hardeland R, Bähr M. Melatonin as a candidate compound for neuroprotection in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): High tolerability of daily oral melatonin administration in ALS patients. *J Pineal Res.* 2002;33:186-187.
- 100.Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci.* 1994;55:271-276.

101. Blanchard B, Pompon D, Ducrocq C. Nitrosation of melatonin by nitric oxide and peroxynitrite. *J Pineal Res.* 2000;29:184-192.
102. Prior RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(11):1173-81.
103. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, et al.: Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med* 2000;29(11):1106-14.
104. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *J Clin Bio.* 2005;47:119-29.
105. Cahil WJ, Calvert JH, Zhang JH. Mechanism of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006;26:1341-1353.
106. Grasso G. An overview of new pharmacological treatments for cerebrovascular dysfunction after experimental subarachnoid hemorrhage. *Brain Res Rev.* 2004;44:49-63.
107. Dietrich H, Dacey R. Molecular keys to the problems of cerebral vasospasm. *Neurosurgery.* 2000;46:517-529.
108. Kessler IM, Pacheco YG, Lozzi SP. Endothelin-1 levels in plasma and cerebrospinal fluid of patients with cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Surg Neurol.* 2005;64(1):2-5.
109. Beg SA, Hansen-Schwartz JA, Vikman PJ, Xu C-B, Edvinsson L. ERK1/2 inhibition attenuates cerebral blood flow reduction and abolishes ETB and 5-HT_{1B} receptor upregulation after subarachnoid hemorrhage in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006;26:846-856.
110. Nishihashi T, Trandafir CC, Wang A. Hypersensitivity to hydroxyl radicals in rat basilar artery after subarachnoid hemorrhage. *J Pharmacol Sci.* 2006;100:234-236.
111. del Zoppo GJ. Microvascular changes during cerebral ischemia and reperfusion. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1994;6:47-96.

- 112.Sayama T, Suzuki S, Fukui M. Expression of inducible nitric oxide synthase in rats following subarachnoid hemorrhage. *Neurol Res.* 1998;20:79-84.
- 113.Saito A, Kamii H, Kato I. Transgenic CuZn-superoxide dismutase inhibits NO synthase induction in experimental subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 2001;32:1652-1657.
- 114.Clark JF, Sharp FR. Bilirubin oxidation products(BOXes) and their role in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006;26:1223-1233.
- 115.Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature.* 1994;372:231-236.
- 116.Lamping KG. Enhanced contractile mechanism in vasospasm. Is endothelial dysfunction the whole story? *Circulation.* 2002;105:1520-1522.
- 117.Dorsh NW, Therapeutic approaches to vasospasm in subarachnoid hemorrhage. *Curr Opin Crit.* 2002;8:128-133.
- 118.Burnett M, Danish S. Pathology and pathophysiology of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. in P.Leroux, W.Winn & D. Newell (Eds.), *Management of Cerebral Aneurysms.* Philadelphia, PA: Elsevier, 2004:127-137.
119. Macdonald RL, Kassell NF, Mayer S, Ruefenacht D, Schmiedek P. Clazosentan to overcome neurological ischemia and infarction occurring after subarachnoid hemorrhage (CONSCIOUS-1): randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 dose-finding trial. ; CONSCIOUS-1 Investigators. *Stroke.* 2008;39(11):3015-21.
120. Munakata A, Ohkuma H, Nakano T, Shimamura N, Asano K. Effect of a free radical scavenger, edaravone, in the treatment of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery.* 2009;64(3):423-8.
121. Lin CL, Su YF, Dumont AS, Shih HC, Lieu AS. N6-cyclopentyladenosine (CPA), The effect of an adenosine A1 receptor agonist in the treatment of experimental subarachnoid hemorrhage-induced cerebrovasospasm. *Acta Neurochir (Wien).* 2006;148(8):873-9.

122. Grasso G. Neuroprotective effect of recombinant human erythropoietin in experimental subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg Sci.* 2001;45(1):7-14.
123. Cheung RTF Mini review. The utility of melatonin in reducing cerebral damage resulting from ischemia and reperfusion. *J Pineal Res.* 2003;34:153-160.
124. Turjanski AG, Rosentain RE. Reaction of melatonin and related indole with free radical: A computational study. *J Med Chem.* 1998;41:3684–3689.
125. Tan DX. Chemical and physical properties and potential mechanism: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Med Chem.* 2002;2:181-97.
126. Reiter RJ, Tan DX, Maldonado MD. Melatonin as an antioxidant: physiology versus pharmacology. *J Pineal Res.* 2005;39:215-6.
127. Huerto-Delgadillo L, Anton-Tay F, Benitez-King G. Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: Role of melatonin as a calmodulin antagonist. *J Pineal Res.* 1994;17:55-62.
128. Doolen S, Krause, Dubocovich, M.L. and Duckles: Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle. *Eur J Pharma.* 1998;345:67-69.
129. Prapapun Chucharoen, Banthit Chetsawang, Anan Srikiatkachorn and Piyarat Govitrapong, Melatonin receptor expression in rat cerebral artery, *Neuroscience letters.* 2003;341:259-261.
130. Charlotte VG, Jörg H, David R. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction *Cell Tissue Res.* 2002;309:151–162.
131. Lew MJ, Flanders S. Mechanisms of melatonin-induced vasoconstriction in the rat tail artery: a paradigm of weak vasoconstriction, *Br J pharmacol.* 1999;126(6):1408-1418.
132. Sumaya IC, Masana MI, Dubocovich ML. The antidepressant-like effect of the melatonin receptor ligand luzindole in mice during forced swimming requires expression of MT2 but not MT1 melatonin receptors. *J Pineal Res.* 2005;39(2):170–7.

133. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions, Received 15 April 2003; received in revised form 11 2003;17:162-168.
134. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clin Biochem. 2004;27:123-127.
135. Ozen O, Çekinmez M, Altınörs N. Effect of melatonin on cerebral vasospasm following experimental subarachnoid hemorrhage. Neurological Research. 2005;27:24-28.
136. Inci S, Joseph M, Zabramski, Robert F. Effect of melatonin on cerebral vasospasm in a Rat model of subarachnoid hemorrhage Barrow neurological institute. Neurological Research. 1999;15:3-7.
137. Mohan V, Jarmo T. Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation, Neurobiology. 1990;87:6200-6203.