



**T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI**

**RATLARDA DENEYSEL SUBARAKNOİD KANAMA İLE
OLUŞTURULAN SEREBRAL VAZOSPAZM
ETYOPATOGENEZİNDE ROL OYNAYAN APOPİTOZİS VE LİPİD
PEROKSİDASYONUNUN ÖNLENMESİNDE SİLDENAFİL'İN ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Emre Cemal GÖKCE

Ankara, 2007



**T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRGİ ANABİLİM DALI**

**RATLARDA DENEYSEL SUBARAKNOİD KANAMA İLE
OLUŞTURULAN SEREBRAL VAZOSPAZM
ETYOPATOGENEZİNDE ROL OYNAYAN APOPTOZİS VE LİPİD
PEROKSİDASYONUNUN ÖNLENMESİNDE SİLDENAFİL'İN ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Emre Cemal GÖKCE

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hakan CANER

Ankara, 2007

28.02.2007 tarih ve DA 07/09-2007-AP-222 sayı

Bu tez çalışması Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimleriyle her türlü desteği sunan başta üniversitemizin rektörü Sayın hocamız Prof. Dr. Mehmet Haberal'a, fakültemizin dekanı Prof. Dr. Faik Sarioğlu'na, bilgi ve tecrübeleriyle öğrenimim süresince desteklerini esirgemeyen çok değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Nur Altınörs ve Prof. Dr. Hakan Caner başta olmak üzere, sayın Doç. Dr. Başar Atalay ve bir dönem birlikte çalışma fırsatını bulduğum Sayın Doç. Dr. Murad Bavbek'e,

Deneyimlerinden ve bilgilerinden yararlanabildiğim Sayın Prof. Dr. Selçuk Palaoğlu'na,

Projenin Biyokimyasal çalışmalarında değerli katkıları olan Hacettepe Üniversitesi Biyokimya AnaBilim Dalı hocalarından Sayın Prof. Dr. Kamer Kılınç'a, histopatolojik verilerin elde edilmesinde ve değerlendirilmesinde desteklerinden dolayı Başkent Üniversitesi Patoloji AnaBilim Dalından Sayın Prof. Dr. Bülent Celasun'a, Yrd. Doç. Dr. Özlem Özen'e ve Arş. Gör. Dr. Gülnur Güven'e;

Araştırmamın deney aşamasında destek ve yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Hale Tufan ve laboratuvar ekibine,

Tezimin yürütülmesinde ve her aşamasında her türlü desteğini ve bilgisini esirgemeyen Uzm. Dr. Salih Gülşen'e,

Başkent Üniversitesi Adana Hastanesinden Doç. Dr. Bülent Erdoğan, Yrd. Doç. Dr. Orhan Şen'e, Başkent Üniversitesi Konya Hastanesi doktorlarından Yrd. Doç. Dr. Tarkan Çalışaneller ve Uzm. Dr. Özgür Özdemir'e,

Her zaman ve her konuda yardım ve desteklerini gördüğüm Uzm. Dr. Cem Yılmaz'a, yoğun asistanlık sürecinde sevinç ve sıkıntılarını paylaşan çalışma arkadaşlarım Uzm. Dr. Melih Çekinmez, Uzm. Dr. Aşkın Hastürk, Uzm. Dr. Özkan Özger, Dr. Eralp Çetinalp, Dr. Erkin Sönmez, Dr. İlker Çöven, Dr. Fatih Aydemir, Dr. Aydın Gerilmez, Dr. Berkay Köksoy ve Dr. Aykan Akar'a,

Cerrahi eğitimimin o zor sürecinde yanımda olan, desteğini esirgemeyen çok sevgili değerli eşim Aysun Gökce'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Emre Cemal GÖKCE

ÖZET

Subaraknoid kanama sonrası gelişen vazospazmın meydana gelişi ve oluşum mekanizmaları ile ilgili yapılan klinik ve laboratuvar çalışmalar neticesinde, bu patolojik durumun multifaktöriyel ve içiçe girmiş bir çok biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda oluştuğu düşünülmektedir.

Ancak anevrizma rüptürü neticesinde subaraknoid alana olan kanamada eritrositlerin hemolizi sonucunda ortaya çıkan oksihemoglobinin, vasküler ve nöronal yapılarda patolojik süreci başlatan bir çok reaksiyonda rol alması nedeniyle vazospazmın oluşumuna neden olan en önemli faktörlerden biri olduğu kabul edilmektedir. Bununla beraber hemoglobine olan affinitesi oksijenden 1000 kat daha fazla olduğu tespit edilen Nitrik oksid adlı moleküler yapının keşfiyle beraber, SAK sonrası miktarının azalmasının, vazospazm gelişiminde çok önemli bir faktör olduğu ileri sürülmektedir(1). Oksihemoglobinin ve diğer kan hücrelerinin kanama sahasında başlattığı inflamasyon, serbest radikal üretimi, lipid peroksidasyonu ve apoptoz, vasküler yapılarda vazospazma neden olarak damarsal yapıların konstrikte olmasına ve nöronal ve vasküler yapıların iskemiye girmesine neden olmaktadır. Vasküler endotelial hücrelerde olan bu hasar ve serbest radikal üretimi nedeniyle NO'nin hem yapımı azalmakta hemde varolan NO tüketilerek damarlar konstrikte olmaktadır. Bu amaçla vazodilatatör, antienflamatuar, antioksidan ve serebral kan akımı regülasyon özellikleri olan NO'nin miktarının artırılmasının vazospazmda iyi bir tedavi seçeneği olacağını düşündük. Bu amaçla fosfodiesteraz V inhibitör etkisi ile NO-cGMP yolağının artımına neden olan, klinikte erektil disfonksiyon ve pulmoner hipertansiyon tedavisinde kullanılan sildenafil sitratın vazospazm tedavisindeki etkilerini araştırmak amacıyla deneysel çalışmamızı gerçekleştirdik.

Bu çalışmada 7 adet Sprague-Dawley cinsi ağırlıkları 245-550 gr arası olan erkek ratlardan oluşan 4 grup oluşturuldu. Grup 1'de yer alan ratlara hiç bir işlem uygulanmadan sakrifikasyon uygulandı. Grup 2'de yer alan ratların sisterna magnalarına 0.4 cc/kg'a otolog arteriyel kan verilerek deneysel subaraknoid kanama oluşturuldu. Grup 3'te yer alan ratlara aynı şekilde subaraknoid kanama oluşturularak kanamadan hemen sonra 5 mg/kg/gün sildenafil oral olarak verildi. Grup 4'te yer alan ratlarada aynı usulde deneysel

subaraknoid kanama oluşturularak kanamadan hemen sonra 15 mg/kg/gün sildenafil oral verildi. Deneyde, östrojenin iskemide eksitoksisiteyi, glutamat reseptör etkinliğini ve immun enflamasyonu azaltarak akson myelinizasyonunu sinaptogenezisi ve dendritik dallanmayı arttırarak nöroprotektif etki göstermesi nedeniyle erkek rat kullanıldı(2).

Subaraknoid kanama yapılan tüm ratlar 48.saatte sakrifiye edildi. Tüm ratların baziller arterlerinden 3'er kesit alınarak baziller arterin çapı freeware imaj analiz sistemleri (ImageJ, version 1.341; National Institutes of Health, Bethesda, MD) bilgisayar programı ile ölçüldü. Lipid peroksidasyon değerleri için baziller arterin beslediği serebellumdan örnekler alındı ve tiyo barbitürik asit yöntemi ile nmolTBA/g yaş doku olarak hesaplandı. Gruplardaki baziller arter kesitlerindeki apoptozu göstermek amacıyla In Situ Cell Detection Kit, POD (Roche, Germany) kullanıldı. Apoptotik indeks immünreaktif nukleusların total endotel hücre sayısına oranı ile hesaplandı. Sonuçlar yüzde olarak ifade edildi. Buna göre boyanma saptanmayan kesitler Grade 0, %0-24 oranında apoptoz Grade 1, %25-49 arasındakiler Grade 2, %50-74 arasındakiler Grade 3 ve %75-100 oranında arteriyal apoptotik hücre boyanması gösterenler Grade 4 olarak ifade edildi. In Situ Cell Detection Kit ile yapılan çalışmalarda apoptotik hücrelerle beraber nekrotik hücrelerde de TUNEL reaksiyonunun yanlış pozitif reaksiyona neden olmasından dolayı kaspaz 3, kaspaz 8, p53 ve sitokrom c adlı apoptotik markerlarda çalışılmıştır(3). Çalışmamızda sitokrom c'yi apoptotik mitokondriyal yolağı, kaspaz 8'i kaspaz bağımlı yolağı, kaspaz 3'ü kaspaz bağımlı ve bağımsız yolun ortak ürünü, p53'ü ise tüm apoptotik sürecin en önemli markerı olduğu için kullandık(100,101).

Buna göre SAK grubundaki ratların baziller arterler kesit alanlarının kontrol grubuna göre %57 oranında daraldığı, sildenafil 5mg/kg/gün verilen grupta ise daralmanın kontrol grubu olan grup 1'e göre %16.8 olduğu tespit edildi. Sildenafil 15 mg/kg/gün verilen grupta ise bu daralmanın %7.1 olduğu görüldü. Elde edilen kesit alanları istatistiksel açıdan Post Hoc Tukey testi ile karşılaştırıldığında sildenafilin vazospazma karşı koruyucu etkisinin olduğu saptandı ($p<0.0001$). Lipid peroksid değerlerine bakıldığında SAK oluşturulan Grup 2'deki lipid peroksid değerinin kontrol grubu olan grup 1'e göre belirgin olarak arttığı görüldü. Tedavi gruplarındaki lipid peroksid miktarlarının grup 2'deki değerlere göre anlamlı derecede azaldığı tespit edildi ($p<0.0001$). Gruplardaki In Situ Cell Detection Kit (POD (Roche, Germany) ile yapılan immunohistokimyasal boyama yöntemi ile apoptotik hücre oranlarına baktığımızda grup 2, 3 ve 4'teki apoptotik hücre yüzdelerinin sırasıyla %88, %83 ve %81 olduğu, kontrol grubundaki apoptotik hücre

yüzdesinin %0 olduğu saptandı. Kaspaz 3, kaspaz 8, sitokrom c ve p53 ile yapılan incelemede herhangi bir işlem yapılmayan kontrol grubu grup 1de endotelyal hücrelerde apoptotik bir boyanma saptanmazken, tedavi grupları ile SAK grubu arasında apoptotik endotelyal hücreler incelendiğinde herhangi bir fark saptanmadı. Tedavi gruplarının apoptoz üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı görüldü.

Sonuçlar dahilinde sildenafilin vazospastik damarlar üzerindeki iyileştirici etkisi ve lipid peroksidasyonunu önlemedeki anlamlı sonuçları nedeniyle yakın gelecekte vazospazm tedavisinde yer alabilecek bir ilaç olduğuna inanıyoruz. Apoptozu engellemenin vazospazm oluşumunu engellemeyeceğini, vasküler ve nöronal hücreleri canlı tutmada yeterli olmadığını, tedavinin amacının ve asıl önem verilmesi gereken konunun kan pıhtısının kimyasal reaksiyonlarını engellemek, lipid peroksidasyon oluşumunu önlemek ve NO miktarını arttırmak olduğunu düşünüyoruz.

Anahtar kelimeler: Subaraknoid kanama, Vazospazm, apoptoz, lipid peroksidasyonu, sildenafil.

ABSTRACT

After fulfilling many clinical and experimental studies about the mechanism of cerebral vasospasm following subarachnoidal hemorrhage, it is thought that this pathologic disease to become after many connecting reactions and it is multifactorial.

It is widely accepted that oxyhemoglobine, appearing following hemolysis of erythrocytes in the subarachnoidal space as a result of bleeding after rupture of an aneurysm, is the most important factor in the pathogenesis of vasospasm because of acting in many reactions causing the pathological process against the vascular and neuronal tissues. However since the discovery that nitric oxide, an endothelial derived relaxing factor has 1000 times higher affinity for hemoglobin than oxygen, it is put forward that decreased NO availability following SAH is one of the most important factor in vasospasm(1). Vasoconstriction, vasospasm of the vessels and ischemia in the neurons and vascular tissue cells is the cause of inflammation, free radical production, lipid peroxidation and apoptosis developing after oxyhemoglobin and other blood products. Because of the damage in the vascular endothelial cells and production of free radicals, either decreasing NO availability or running out of the present NO, cause of conctriction of the vessels. As we take into consideration of decreased levels of NO and antiinflamatuar, vasodilatation, antioxidan and cerebral blood flow regulation effect of NO; we thought that increasing the amount of NO availability would be a good option in the treatment of vasospasm. We carried out our experimental study aiming at searching out the effect of sildenafil citrate PDE V inhibitor on cerebral vasospasm, which are currently approved for the treatment of erectil dysfunction and pulmonary hypertension by increasing NO-cGMP pathway.

In this study 7 male Sprague-Dawley rats weighting between 245-550 grams were grouped into 4 groups. In group 2 ,3 and 4 the cisterna magna was aseptically punctured with a needle and 0.5 ml/kg of autologous arterial blood obtained by directly puncturing the femoral artery was slowly injected intracisternally. Group 1 (Control) rats were sacrificed and submitted to biochemical study without surgical manipulation. Group 3 and group 4 after administering the blood intracisternally, received 5 mg/kg and 15 mg/kg sildenafil respectively for 2 days, respectively. Estrogen has a neuroprotective effect by decreasing excitotoxicity, glutamate receptor activity and immun inflammation and by

increasing axonal myelinization, synaptogenesis and dendritic branch so that we used male rats in the experiment.

All rats were decapitated following sacrifice using high dose anesthetic agent on the second day. The rat basillary artery was sectioned from three separate zones and three sections were obtained from each rat. Basillary artery luminal sectional areas were measured using freeware computerized image-analyse systems (ImageJ, version 1.341; National Institutes of Health, Bethesda, MD). For lipid peroxidation study cerebellum section samples from the rats fed by basillary artery were taken. The concentration of lipid peroxides was measured by thiobarbituric acid test. Immunohistology using the ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Cell Detection Kit, POD (Roche, Germany) was used to demonstrate apoptosis in a cross section of basillary artery. Apoptotic index was calculated as the number of the immunoreactive nuclei per total number of endothelial cells, expressed as a percentage. No positive staining of endothelial cells with the ApopTag have been expressed as Grade 0, 0-24% immunostaining of endothelial cells as Grade 1, 25-49% as Grade 2, 50-74% as Grade 3, 75-100% immunostaining of endothelial cells have been expressed by Grade 4. Considering possible false positive results in TUNEL reaction in necrotic cells, each section was immunostained using for p53 (Clone Pab 240, mouse monoclonal antibody, NeoMarkers), caspase 3 (CPP32, NeoMarkers), caspase 8 (FLICE, NeoMarkers) and cytochrome c (Clone 7H8.2C12, mouse monoclonal antibody, NeoMarkers). Under light microscope examination, the positivity for all of these antibodies was calculated as positive and negative in the endothelial cells of basillary artery. In our study we used cytochrome c, representing the apoptotic mitochondrial pathway; caspase 8 representing the caspase dependent pathway, caspase 3 representing the both caspase dependent and independent pathway and p53 playing the essential role in the whole apoptotic cascade.

In the SAH group (Group 2) the basillary artery circumference constriction rate was 61.7% compared with the control group (Group 1). In the SC (5mg/kg)-treated SAH group, the basillary artery circumference constriction rate was 16.8% and in the SC-treated 15mg/kg SAH group this rate was 7.1% compared with the control group (Group 1). For the comparison of the effect of SC treatment after SAH, a Post Hoc Tukey test was performed between the groups. P value was less than 0.05 was considered significant. The results of group 1 between group 2, group 1 between group 3 and group 1 between group 4

was regarded as statistically significant ($p < 0.0001$). As we take a look at the lipid peroxide results, lipid peroxide values in SAH group (group 2) was significantly higher compared with group 1 ($p < 0.0001$). The lipid peroxide values in the treatment groups (group 3 and group 4) was significantly decreased compared with group 2 ($p < 0.0001$). We observed that sildenafil has prevented lipid peroxidation. The apoptotic cells rate, the immunostaining with In Situ Cell Detection Kit (POD (Roche, Germany)) in the groups were 0%, 88%, 83% and 81%, respectively. With the immunostaining using for p53, caspase 3, caspase 8 and cytochrome c, there was no actual apoptotic nuclei in group 1. In group 2, 3 and 4 there was no significant difference in the number of apoptotic nuclei among these groups. In conclusion no preventing effect of sildenafil has been detected against apoptosis.

In conclusion, we believe sildenafil will take a part in the treatment of vasospasm in the future because of improving effect on the vessels and preventing effect of lipid peroxidation. We think that impeding apoptosis is not enough to cure vasospasm and not enough to keep the cells alive; the main aim of the treatment and the most important issue is to hinder the chemical reactions of the blood cells in the subarachnoid region and lipid peroxidation and to increase NO availability.

Key Words: Subarachnoidal hemorrhage, Vasospasm, apoptosis, lipid peroxidation, sildenafil.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	x
TABLolar ve RESİMLER	xii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. SUBARAKNOİD KANAMA	3
2.2. KLİNİK VAZOSPAZM	4
2.3. VAZOSPAZMIN EPİDEMİYOLOJİSİ	6
2.4. VAZOSPAZM FİZYOLOGENEZİ	7
2.4.1 Vasküler düz kasların kasılma mekanizması	7
2.4.2 İnflamasyon	8
2.4.3 Serbest Radikal Reaksiyonu, Lipid Peroksidasyonu	10
2.4.4 Endotelin	14
2.4.5. Nitrik Oksid	16
2.4.6. Nitrik Oksid'in Serebral Vasküler Yapıya Olan Etkileri	17
2.4.7. Subaraknoid kanama sonrası Serebral Kan Akımı	19
2.4.8. Apoptoz	20
2.4.9 Sildenafil	22
3. GEREÇ ve YÖNTEM	24
3.1 Sildenafil Sitratin Hazırlanması	24
3.2 Anestezi	24
3.3 Gruplar	25
3.4 Verilerin Toplanması	29

3.4.1 Patolojik Verilerin Değerlendirilmesi	29
3.4.1.1 Arterial Lümen çapının Ölçümü.....	29
3.4.2 İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemleri.....	29
3.4.3 Biyokimyasal Verilerin Değerlendirilmesi.....	31
3.4.4 İstatiksel verilerin değerlendirilmesi	31
4. SONUÇLAR	32
4.1. Baziller arter lümen kesit çap ölçümleri	32
4.2. Serebellar doku lipid peroksid miktarları.....	34
4.3. Gruplardaki apoptoz sonuçları	36
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	57
7. KAYNAKLAR.....	58

TABLÖLAR ve RESİMLER

Tablo 2.1. Subaraknoid kanama sonrası gelişen komplikasyonlar	4
Tablo 2.2. Vazospazm tedavi şeması.....	5
Tablo 2.3. Hidrojen peroksid oluşumu	10
Tablo 2.4. Haber – Weiss Reaksiyonu	11
Tablo 2.5. Fenton Reaksiyonu.....	11
Tablo 2.4.8. Sildenafilin kimyasal yapısı	22
Tablo 3.1. Çalışma gruplarının özeti	24
Tablo 4.1. Vazospazm sonrası baziller arterlerin kesit çap ölçümleri (µm)	32
Tablo 4.2. Tüm gruplar için uygulanan ANOVA test(arter çap ölçümleri).....	33
Tablo 4.3. Gruplar arası karşılaştırmanın yapıldığı Post-Hoc Tukey testi(çap ölçümleri)	34
Tablo 4.4. Serebellar dokuların lipid peroksidasyon değerleri (nmol TBA / g yaş doku).....	34
Tablo 4.5. Tüm gruplar için uygulanan ANOVA testi (Lipid peroksid)	35
Tablo 4.6. Gruplar arası karşılaştırmanın yapıldığı Post-Hoc Tukey testi (Lipid peroksid).....	36
Şekil 3.1. Atlantooksipital membran	27
Şekil 3.2. Sol femoral arter.....	27
Şekil 3.3. ve şekil 3.4. Prepontin sisternlerdeki ve baziller arter etrafındaki subaraknoidal kanama	28
Grafik 4.1. Vazospazmda baziller arter kesit çap ölçümleri (µm).....	37
Grafik 4.2. Vazospazm sonrası serebellar dokuda lipid peroksidasyon değerleri (nmol TBA/g yaş doku).....	38
Grafik 4.3. Gruplardaki apoptotik hücre oranları	38
Resim 4.1. Hemotoksilen-Eozin ile boyalı subaraknoid kanama yapılan gruptan vazospastik baziller arter kesiti	39
Resim 4.2. Subaraknoid kanama yapılmış ve 5mg/kg sildenafil verilmiş gruba ait Hemotoksin Eozin ile boyanmış baziller artere ait damar kesiti	39
Resim 4.3. Normal rat baziller arter kesiti (grup 1).....	40
Resim 4.4. Subaraknoid kanama yapılmış gruba ait apoptozu değerlendirmede TUNEL boyama metodu uygulanmış baziller artere ait damar kesiti. Endotelial hücrelerin nükleuslarının TUNEL ile pozitif boyandığı görülüyor. (20X büyütme)	40

Resim 4.5. Aynı kesitin büyütülmüş görüntüsü. Oklar TUNEL ile pozitif boyanan endotelial hücreleri gösteriyor.....	41
Resim 4.6. Subaraknoid kanama yapılmış ve sildenafil 5 mg/kg verilmiş gruba ait baziller arter kesitin TUNEL boyaması. Kesitte TUNEL pozitif endotelial hücreler görülüyor	41
Resim 4.7. Subaraknoid kanama yapılmış ve 15 mg/kg'a sildenafil verilmiş gruba ait baziller arter kesitin TUNEL boyaması	42
Resim 4.8. Kontrol grubuna ait baziller arter kesitin TUNEL boyaması. Apoptotik hücre bulunmamaktadır	42
Resim 4.9. Kontrol grubuna ait baziller arter kesitin büyütülmüş görüntüsü	43
Resim 4.10. Subaraknoid kanama yapılmış gruba ait baziller arter damar kesitin Kaspaz 3 ile yapılan immunohistokimyasal boyaması. Endotelial hücrelerin sitoplazmalarının Kaspaz 3 ile pozitif boyandığı görülüyor.(Ok ile işaretlenmiş alanlar) (20X büyütme)	43
Resim 4.11. Aynı kesitin büyütülmüş görüntüsü. Oklar apoptotik hücreleri gösteriyor.(X40).....	44
Resim 4.12. SAK uygulanmış ve sildenafil 5 mg/kg verilmiş gruba ait baziller arter damar kesitinde. Kaspaz 3 ile pozitif boyanmış apoptotik endotelial hücreler görülüyor(Oklar)(X20)	44
Resim 4.13. SAK uygulanmış ve 15 mg/kg sildenafil verilmiş gruba ait kesit(X40).....	45
Resim 4.14. Grup 1' ait herhangi bir işlem uygulanmamış baziller arter kesiti. Kaspaz 3 ile herhangi bir apoptotik boyanma olmadığı görülüyor	45
Resim 4.15. Grup 2 baziller arter kesitine ait p53 immunohistokimyasal boyama ile apoptotik hücreler görülüyor.(Oklar apoptotik hücreleri gösteriyor)	46
Resim 4.16. Grup 3 baziller arter kesiti. Tedavi grubunda da apoptotik hücrelerin olduğu görülüyor	46
Resim 4.17-4.18. A) grup 1'e ait baziller arter kesiti. p53 ile herhangi bir pozitif boyanma gösteren endotel hücresi görülüyor.B) Grup 4'e ait kesitte oklar ile apoptotik hücreler gösterilmekte	47
Resim 4.19 SAK grubuna ait baziller arter kesiti. Ok ile işaretli alanlar apoptotik hücreleri işaret etmekte.(X20)(sitokrom c)	47
Resim 4.20 SAK uygulanmış ve sildenafil 5 mg/kg verilen gruba ait baziller arter kesitinde apoptozun olduğu görülüyor.(X20)(sitokrom c).....	48
Resim 4.21 Grup 1'e ait herhangi bir işlem uygulanmamış baziller arterin sitokrom c ile boyanmasında herhangi bir apoptotik hücre olmadığı görülüyor.(X40).....	48
Resim 4.22-23. A) kaspaz 8 ile boyanan grup 2'ye ait baziller arter kesiti B) Grup 3'e ait kaspaz 8 ile boyanmış baziller arter kesiti(X40)	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADMA	:	Asimetrik dimetilarjinin
AT	:	Anjiotensin
Bax	:	Proapopitotik Gen
Bcl Xl	:	Antiapopitotik Gen
Bcl Xs	:	Proapopitotik Gen
Bcl 2	:	Antiapopitotik Gen
Ca ⁺²	:	Kalsiyum
cAMP	:	Cylic Adenosine Monophosphate
cGMP	:	Cyclic Guanosine Monophosphate
CT	:	Bilgisayarlı Tomografi
DAG	:	Diaçil gliserol
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
EDRF	:	Endotelyal Derived Relaksing Factor
ET	:	Endotelin
GC	:	Guanil Siklaz
GTP	:	Guanosine Triphosphate
H ₂ O ₂	:	Hidrojen Peroksid
HT	:	Hipertansiyon
ICAM	:	Intercellular adhesion molecule
IF	:	Interferon
IL	:	Interlökin
IP3	:	phosphatidyl inositol triphosphate
IKB	:	İntrakranial basınç artışı
K ⁺	:	Potasyum
MABP	:	Ortalama Arterial Basınç
MLCF	:	Myosine light chain fosfataz
MLCK	:	Myosine light chain kinase
NFκB	:	Nuclear Factor kappa B
NMDA	:	N-Methyl-D-Aspartate
NO	:	Nitrik oksid

NOO ⁻	:	Peroksinitrit
NOS	:	Nitrik oksid sentetaz
NSCC	:	nonselektif katyonik kanal
O ₂ ⁻	:	Superoksid
OH ⁻	:	Hidroksiradikal
PDE	:	fosfodiesteraz
PG	:	prostoglandin
PKC	:	Fosfokinaz C
PKG	:	Fosfokinaz G
PLC	:	Fosfolipaz C
PRMT-1	:	tip 1 protein arjinin metil transferaz
ROS	:	Reaktif oksijen species
SAK	:	Subaraknoid kanama
SDMA	:	simetrik dimetilarjinin
SKA	:	serebral kan akımı
SOCC	:	store operated kalsiyum kanalları
SOD	:	superoksid dismutaz
SPB	:	serebral perfüzyon basıncı
TBA	:	tiyobarbiturik asid
TCD	:	transkranyal doppler
TNF	:	tumor nekrozis factor
VCAM	:	Vascular cell adhesion molecule

1. GİRİŞ

Bir intrakranial anevrizmanın rüptüre olması subaraknoid mesafeye yaklaşık olarak 150 ml taze kan salınmasına ve arterlerin lokalize olduğu araknoid sisternlerin kan ile dolmasına neden olur. Subaraknoid mesafedeki kan miktarı arttıkça vazospazm gelişme riskide artar. Ortamda bulunan kandaki eritrositlerin parçalanması ile açığa çıkan oksihemoglobin, methemoglobine dönüşümü sırasında serbest radikal oluşumu gözlenir. Serbest radikaller vasküler ve nöronal yapılarda lipid peroksidasyonunu başlatırlar. Lipid peroksidasyonu neticesinde oluşan lipid radikalleri, serbest radikaller ve oksihemoglobin hücre membran yapısının bozulmasına böylece hücre membran potansiyelinin oluşamamasına ve hücre içi kalsiyum birikimi ile hücre ölümüne neden olur. Vasküler endotel hücrelerindeki bu ölüm vasküler permeabilitenin artmasına, endotelial hücrelerin sağlam olduğu zamanda var olan endoteliuma bağımlı vazodilatasyon ve vazokonstriksiyon dengesinin bozulmasına neden olur. Vasküler endotelial hücre hasarı sonrası endoteliumdan üretilen NO miktarında azalma olur. Bununla beraber ortamda yapımı artan superoksitler NO'ı peroksinitrite dönüştürür. Böylece hem oksihemoglobinin üretimini arttırması hemde NO tükenmesi nedeniyle (-) feed-back etkisi gösterememesi sonucu normalde vasküler tonusun düzenlenmesinde önemli faktör olan NO/endotelin dengesi endotelin lehine bozulur. Endotelin (özellikle endotelin-1) bilinen en güçlü vazokonstriktör ajandır. Serebral damarları vazokonstriksiyona uğratır (7,8,28,30).

Normal şartlar altında vasküler endoteliumdan salınan NO guanil siklazı aktive ederek GTP'den cGMP oluşumuna yol açar. cGMP'de K^+ kanallarını aktive ederek hücrenin hiperpolarize olmasına sağlayarak vede fosfokinaz G yolu ile vasküler dilatasyona neden olur. NO'nın aynı zamanda özellikle SAK sonrası düz kas hücrelerinde ve adventisyal fibroblastlarda yapımı artan ve superoksit oluşumunda rol alan NADPH oksidaz adlı enzim üzerine inhibe edici etkisi vardır. NO'nın lökosit adhezyonunu sağlayan ICAM-1, VCAM-1 ve P-selektin gibi adhezyon moleküllerinin salınımını azalttığıda bilinmektedir. NO düzeyinin azalması var olan inflamasyonun dahada şiddetlenmesine neden olacaktır. Tüm bu süreç sonunda inflamasyon, serbest radikal üretimi, lipid peroksidasyonu, NO miktarının azalması, vasküler yapılarda apoptotik değişim

vazospazmın kliniğinin oluşmasına neden olmakta SAK sonrası morbiditeyi ve mortaliteyi büyük oranda arttırmaktadır (5,15,91).

Sildenafil sitrat yapısal olarak bronkodilatör olan zaprinasta benzeyen bir pirazolomidion derivativesidir. Klinikte rutin olarak erektil disfonksiyon ve pulmoner hipertansiyon tedavisinde kullanılan selektif bir tip V fosfodiesteraz inhibitörüdür. Sildenafil sitratın aç karnına oral alındığında emilimi oldukça hızlıdır. Sildenafilin yarılanma ömrü insanlarda 2.4 saat, erkek ratlarda 0.3 saattir (6).

Tüm bu süreç sonunda inflamasyon, serbest radikal üretimi, lipid peroksidasyonu, NO miktarının azalması, vasküler yapılarda apoptotik değişim vazospazmın kliniğinin oluşmasına neden olmakta SAK sonrası morbiditeyi ve mortaliteyi büyük oranda arttırmaktadır.

SAK sonrası meydana gelen vasküler endotelial zedelenme sonrası kan düzeyi düşen NO'ı arttırmak amacıyla fosfodiesteraz V'i inhibe ederek NO-cGMP yolağını arttıran klinikte bu amaçla erektil disfonksiyon ve pulmoner hipertansiyon tedavisinde kullanılan sildenafil sitratın deneysel subaraknoid kanama sonrasında serebral arterlerde oluşan vazospazm, lipid peroksidasyonu ve apoptoza karşı koruyucu ve tedavi edici etkisi incelenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. SUBARAKNOİD KANAMA

Subaraknoid kanama vakalarının %85’de kanamanın kaynağı intrakranial rüptüre anevrizmalardır ve 10/100000 kişide görülmektedir. En sık görülen anevrizma tipi sakküler anevrizmalardır ve oluşmasında multifaktöriyel nedenler yer alır. Arteryel bifurkasyondaki hemodinamik stres, konjenital medial defektler, dejeneratif arteryel duvar değişiklikleri, hipertansiyon, sigara içme, ateroskleroz, alkol alımı gibi nedenler anevrizma gelişiminde ve rüptüründe rol alır. Subaraknoid kanama genellikle 50’li yaşlardaki insanlarda görülür ve kadınlarda erkeklere oranla 1.5 kat daha sıktır. Herhangi ani başlangıçlı baş ağrısına (şiddetli veya hiç beklenemedik) aksi kanıtlanmadığı sürece SAK ön tanısıyla yaklaşılmalıdır (114,115,116,117).

Bulantı, kusma, bilinç kaybı veya BOS’daki kan ürünlerinin neden olduğu irritasyona bağlı meningismus gelişimi (ense sertliği, fotofobi, brudzinski ve kernig bulguları) SAK kliniğinde görülebilir, ancak sadece ani başlangıçlı baş ağrısında SAK kliniğinde görülen tek bulgu olabilir (114,115).

Yanlış teşhis ciddi sonuçlarla beraber büyük problemlere neden olur. Anevrizmadan tekrar kanama olması ilk kanamadan sonra görülen klinikten daha kötü prognoza sahiptir.

SAK’ın teşhisinde önerilen ilk tetkik kontrastsız kranial tomografidir. CT’de hastaların %95’de anevrizma rüptürü sonrası ilk 24 saatte subaraknoid sisternlerdeki yüksek dansiteli kan pıhtısı görülür (118).

CT’de teşhis edilmiş SAKlı hastada bir sonraki tetkik CT anjio olmalıdır. CT scan sonrası çoğu anevrizmayı teşhis etmede nispeten non invaze, hızlı bir methodtur. Ancak SAK’lı hastada E. Moniz tarafından 1927 yılında geliştirilen serebral arteriogram anevrizmal SAK teşhisinde altın standart methodtur. Hızlı ve başarılı bir anevrizma cerrahisi

tekrar kanamayı önlemede vazospazm ve apopitoz gelişme riskini azaltmada ve kliniğin daha iyi bir prognoza sahip olmasında anahtar bir rol oynar (119).

Tablo 2.1. Subaraknoid kanama sonrası gelişen komplikasyonlar

1. Erken ve geç dönemde hidrosefali gelişmesi

Rüptüre anevrizmal hastaların %15-20'sinde subaraknoid mesafedeki kan ile ilişkili hidrosefali görülebilir.

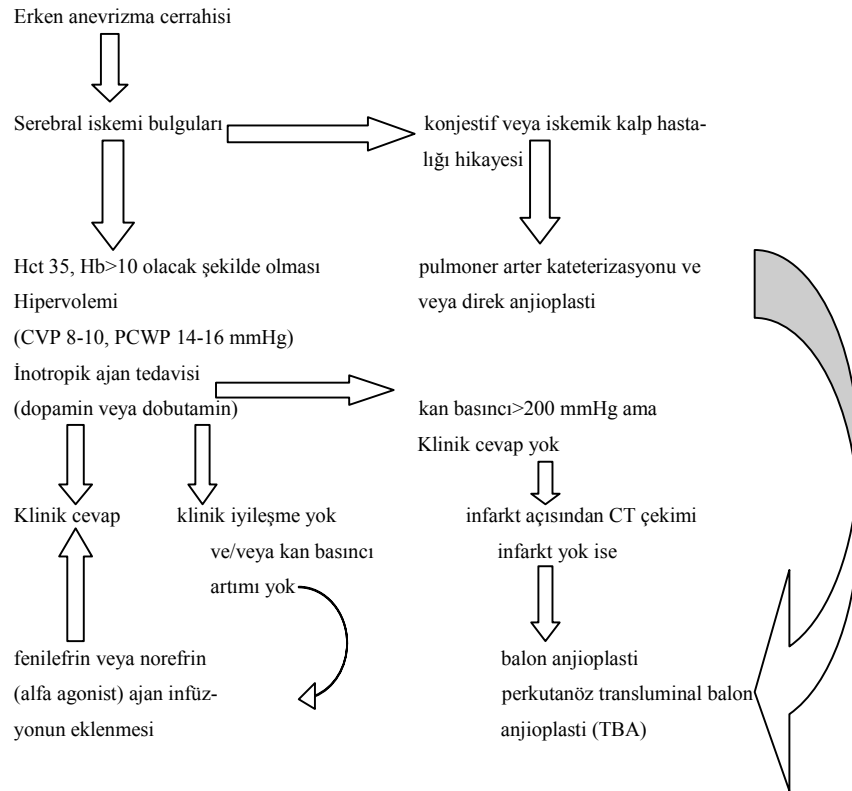
2. Nöbet (%3-26)
3. EKG değişiklikleri (QT uzaması, ST depresyon)
4. Hiponatremi
5. Serebral ödem
6. Vazospazm

2.2. KLİNİK VAZOSPAZM

Serebral arterlerin vazospazmı, SAK sonrası morbidite ve mortalitenin major nedenlerinden birisidir. Rebleeding anevrizmal rüptürün en korkulan komplikasyonu olmasına rağmen vazospazm ölüm ve nörolojik sekellerin primer potansiyel reversible nedenidir. Serebral vazospazm SAK sonrası genellikle 4.-12. günler arasında gelişir, 6.-8. günler arasında pik yapar ve ikinci haftada çözülür. Vazospazm gelişmesinde risk faktörleri; CT'de tespit edilen sisternlerdeki kan (kalınlığı 5mm. den fazla ise vazospazm gelişme riski %96'dır.), kötü nörolojik seviye, önceden varolan hipertansiyon, sigara içme hikayesidir. Anevrizmal kanama sonrası hastanın kliniğinin kötüleşmesini vazospazma bağlı olduğunu, kliniğini bozan diğer nedenleri elendikten sonra söyleyebiliriz. Bu nedenler hiponatremi, sepsis, hipoksi, hidrosefali ve postiktal paralizi ile birlikte olan nöbetlerdir. Vazospazm gelişme riskini azaltmak için hipovolemiden kaçınmak, hipotansiyon ve hiponatremiye karşı önlem almak gerekmektedir. Çeşitli non randomize klinik çalışmalarda intraoperatif veya postoperatif kataterle verilen fibrinolitik ajanların

(rTPA,urokinaz) vazospazmın gelişimini azattığı gösterilmiştir. Cerrahi sonrası semptomatik serebral vazospazm gelişen hastalara uygulanacak tedavide öncelikle intravenöz sıvı replasmanını arttırmak vardır. Sıvı replasmanı ile tansiyon artar, kardiyak output artar ve serebral perfüzyon basıncı artar. Semptomatik vazospazmın tedavisinde oldukça yaygın görülen 3H tedavisinin (hipervolemi, hemodilüsyon, hipertansiyon) yararı henüz tam olarak teyit edilememiştir. Ancak mevcut literatürde bu tarz tedaviyle bildirilen başarılı sonuçlar alınan vaka serileri bulunmaktadır. Ancak bu yayınlar vazospazm tedavisinde rehber olacak yeterli kanıt barındırmamaktadır (120,121).

Bu bilgiler ışığında önerilen tedavi şekli şematik olarak anlatılmıştır.



Tablo 2.2. Vazospazm tedavi şeması

SAK sonucu oluşan injurynin altta yatan mekanizmalarını aydınlatmaya yönelik çalışmalar devam etmesine rağmen, klinik durum iyi tarif edilmiş ve dökümanite edilmiştir. Anjiyografik olarak spazm saptanan hastaların yaklaşık yarısında iskemik nörolojik sekel gelişir. Anjiyografik ve klinik vazospazmın ilk 3 gün içerisinde görülmesi oldukça nadirdir. Serebral vazospazmın teşhisinde klinik ve radyolojik olarak korelasyon gerekir. Anjiyografi vazospazmı saptamada gold standart tanı yöntemi olmasına rağmen, transkranyal doppler

ultrasonografide tanıda kullanılabilir. TCD serebral vasküler akım hızını ölçebilen güvenli ve non-invaziv tanı yöntemidir. Middle serebral arter akım hızının 20 cm/sn.'den büyük olduğu hastalar yüksek klinik spazm riskine sahiptirler. Kanama sonrası vazospazm gelişimi basal sisternlerdeki kan miktarına bağlıdır. Pasqualin ve arkadaşlarının 309 vakalık seri çalışmalarında yetişkin anevrizma hastalarının yapılan kranial tomografilerinde kalın sisternal kan tabakasına sahip olanlarda vazospazm gelişme riski %51 iken, çok ince kan tabakaları olan hastalarda vazospazm gelişme riskinin %2 olduğunu yayınlamışlardır (122,123,124).

2.3. VAZOSPAZMIN EPİDEMİYOLOJİSİ

SAK sonrası hastaların %70'de serebral vazospazm görülmektedir. Bunların %36'da beyin iskemisi ve enfarktı gelişir. (Biller ve ark.)

Fischer ve ark. göre %33-50 oranında vazospazm görülür. Weir ve ark. 1978'de serebral vazospazmın SAK'tan sonraki 4.-12. günler arasında geliştiğini, 6.-8. Günler arasında pik yaptığını ve 2. hafta içerisinde çözüldüğünü yayınladılar.

SAK sonrası 3.-12. günler arası yapılan anjiyoda radyolojik olarak vazospazm görülme oranı %16-66'dır. Bununla birlikte Mayberg SAK'tan sonraki 40. günden itibaren gecikmiş vazospazm görülebileceğini bildirmiştir. Kan miktarı arttıkça vazospazm gelişme riskide artar. CT'de tespit edilen sisternlerdeki kan kalınlığı 5 mm.den fazla ise vazospazm gelişme ihtimali %96'dır.

Vazospazm gelişme ihtimali ile ateroskleroz, diabet, HT, cinsiyet ve yaş arasında bir ilişki gösterilememiştir.

2.4. VAZOSPAZM FİZYOPATOGENEZİ

2.4.1 Vasküler düz kasların kasılma mekanizması

Vasküler düz kaslar yavaş, tonik ve uzun süreli kasılırlar. Kasılmalarında mekanik, elektriksel ve kimyasal uyaranlar rol oynar. Mekanik olarak damar duvarında transmural basınç artınca damarda sekonder dilatasyon gelişir. Basınç düşüncü tekrar kasılma olur. Buradaki mekanik etkiye göre düz kasın kendisi tarafından düzenlenen kasılma-gevşeme reaksiyonlarına vasküler düz kasın miyojenik cevabı denmektedir. Vasküler düz kas hücrelerinin elektriksel uyarımı ise L ve T tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanallarından L-tipi kalsiyum kanallarının açılmasına, membranin depolarize olmasına ve hücre içi kalsiyumun artarak damarda kontraksiyon gelişmesine neden olur. Hücre içi kalsiyum artışı hem ekstra sellüler mesafeden kalsiyum kanal yolları ile hemde hücre içi kalsiyum depolarından (sarkoplazmik retikulum) sağlanır. Hücre içi kalsiyum artışı olmasıyla kalsiyum, hücre içinde kalmoduline bağlanır. Kalmodulin özel kalsiyum bağlayan bir protein yapısıdır. Kalsiyum kalmodulin kompleksi MLCK (myosine light chain kinase) adlı enzimi aktive ederek myozin hafif zincirlerinin fosforile olmasını sağlar. Fosforilasyon sonrası miyozin başı ve aktin filamentlerinin arasında gerçekleşen çapraz bağ oluşumu vasküler düz kas hücrelerinin kasılmasına neden olur (8,30).

Ayrıca vasküler düz kas hücrelerinde potasyum (K^+) kanalları mevcuttur. Bu kanallar K_{ir} , K_{ATP} , K_v ve BK kanallarıdır. Vasküler tonusun düzenlenmesinde özellikle BK ve K_v kanalları görev alır. K_v kanalları istirahat halindeki membran potansiyelinin oluşturulmasında ve artmış luminal basınca miyojenik cevaptan sorumludur. Membran depolarize olup kalsiyum artışı olduğu zaman BK kanalları açılır, hücre içindeki (+) yüklü K^+ dışarı çıkar, hücre hiperpolarize olur. Böylece L-tipi kalsiyum kanalları kapanır ve vazodilatasyon gerçekleşir (10,11,12,125).

Hücre içindeki kalsiyum dengesi ve vasküler tonusun oluşturulmasında 3 temel sistem vardır.

- 1) Fosfoinozitol yolu
- 2) G-protein ile etkileşim yol
- 3) NO-cGMP yolu

Fosfoinozitol yolu: Çeşitli substratların reseptörleri ile etkileşimi sonucu bu yolak aktive olur. Bu basamakta fosfolipaz C (PLC) aktive olur. Fosfatidil inozitol 4,5'i hidrolize eder ve diaçilgliserol (DAG) ve IP3 oluşumuna neden olur. DAG protein kinaz C (PKC)'yi aktive eder ve vasküler kasın devamlı (sustained) kasılmasından sorumludur. IP3 ise hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyum salınmasını sağlar (13,14).

G-protein ile ilişkili yol: Bu yolda iki tip G proteini bulunmaktadır. G_s ve G_i . Bu G proteinleri ile etkileşim sonucunda G_s adenilat siklaza aktive olmasına, G_i enzimin inhibe olmasına neden olur. cAMP'nin aktive olması MLCK'nın inhibe olmasına neden olarak kasılmayı inhibe eder. cAMP ve cGMP seviyeleri, siklazlar tarafından sentezlenmesi yoluyla, fosfodiesterazlar (PDE) tarafından yıkımı yolu ile dengede tutulur. 11 farklı PDE tanımlanmıştır. PDE 4 ve 7 cAMP'ye, PDE 5, 6 ve 9 cGMP'ye spesifiktir (15,16).

NO-cGMP yolu: Bu yolda ise L-Arjininden Nitrik oksid sentetaz (NOS) tarafından sentezlenen NO, guanil siklazı (GC) aktive ederek GTP'den cGMP oluşumuna neden olur. Temelde iki farklı guanil siklaz enzimi bulunmaktadır. NO sensitif GC ve membrana lokalize natriüretik activated GC. NO sensitif GC $\alpha_1\beta_1$ izoformu beyin hariç tüm dokularda sentezlenmektedir. $\alpha_2\beta_1$ izoformu ise sinaptik iletiye spesifiktir. Düz kaslarda NO $\alpha_1\beta_1$ GC'a bağlanmasıyla GTP'de cGMP sentezi gerçekleşir. cGMP inozitol reseptörlere etki eder, myoglobulin hafif zincir fosfatazı defosforile eder ve düz kaslarda relaksasyona neden olur. cGMP protein kinaz yoluyla K_v kanallarını aktive eder, voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının kapanmasıyla damar dilatasyonu olur (17).

2.4.2 İnflamasyon

SAK sonrası kanamanın olduğu bölgeye kan hücrelerinin göç etmesi ve inflamasyona ait belirtilerin görülmesi 3. saatte başlar. İnflamasyonun bu akut döneminde lökositlerle vasküler endotelial hücrelerin arasında bir takım etkileşimler başlar. Bu etkileşimde lökositlerin vasküler hücrelere adhezyonunu sağlayan bir takım adhezyon molekülleri bulunmaktadır. Bunlar ICAM-1 (CD54), VCAM-1 (CD106), Mac-1

(CD11b/CD18), LFA ve selektinlerdir. ICAM-1 vasküler endotelial hücrelerden salgılanır. Lökositlerin endotelial boyunca ekstravazyonu ve periadventisyal aralığa geçmesini sağlar. Daha sonra selektinlerden E-selektin, P-selektin ve L-selektin lökositlerin vasküler lümene toplanmasına ve daha sıkı adhezyonuna neden olur. Lökositlerin bu yerleşimi stabil hale getirilirken kemoatraktan ve kemokin adlı moleküllerle dolaşımdaki diğer lökositlerin bu bölgeye birikimi sağlanır. Bu arada lökositlerin transendotelial migrasyonu gerçekleşir. Selektinlerle sağlanan sıkı adhezyonun LFA ve Mac-1 adlı adhezyon molekülleri ile daha kuvvetlenip stabil hale gelmesi sağlanır. Lökositlerin damar duvarı boyunca diapedezi görülür. Kanama sahasında oluşumu iyice kuvvetlenen lökositler aktif oksijen moleküllerini üretilip salgılamaya başlar. Buda endotelial disfonksiyona ve hücre içine kalsiyum geçişine neden olur (21,22,126,127, 128,129).

Kanda bulunan diğer hücrelerden granülositler, monositler, lenfositlerde inflamasyon sahasına toplanır ve çeşitli substratların salgılanmaya başlanmasıyla inflamasyonun akut evresi başlamış olur. Bu substratlar $TNF\alpha$, IL-1 α , IL-1 β , IL-6 ve IL-8'dir. İnflamasyon sahasına toplanmış çeşitli kan hücrelerinden bu inflamatuvar mediatörlerin sentezi ve düzenlenmesi ise normalde hücre stoplamasında inaktif halde bulunan bir transkripsiyon faktörü Nükleer Faktör kappaB (NF- κ B)dir. Bir diğer faktör ise SAPKs'lardır. İnaktif halde bulunan NF- κ B diğer reaksiyonlarla üretilmeye başlanan Reaktif oksijen türleri (ROS), Hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksiradikal ($OH^\cdot$) ve superoksit ($O_2^\cdot$) gibi serbest radikaller tarafından aktive edilir. Böylece vazospazmın inflamasyonel kaskadı resmen başlamış olur (18,19,20,30).

Kanama ve inflamasyon alanında salgılanan substratlardan biri olan $TNF\alpha$ trimerik 17kDA polipeptittir. Monositler ve makrofajlar tarafından üretilir. $TNF\alpha$ çoğu hücre için sitotoksik etkisi olan bir inflamatuvar sitokindir. Hedef hücrede reseptör trimerizasyonuna neden olur ve TNFR-1 sinyal kompleksini aktive eder. Aktive olmuş TNFR-1'de apoptotik kaskadlardan zimojen halde inaktif olarak bulunan prokaspaz 8'i kaspaz 8'e çevirerek kaspaz 8'e bağımlı hücre ölümünü başlatır. $TNF\alpha$ ayrıca hipotalamusu uyarak vücut sıcaklığını artırır. Karaciğerde akut faz reaktanlarının sentezini indükleyerek organizmayı katabolik sürece sokar (23,24,25).

IL-1 ortamda bulunan monositler ve makrofajlar tarafından salgılanır. IL-1 β vasküler endotelial hücrelerde DNA fragmentasyonuna neden olur. Zaten ortamdaki

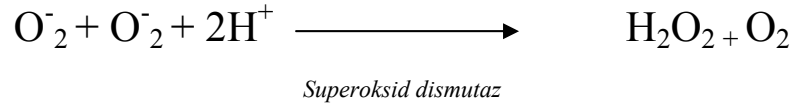
serbest radikaller tarafından aktive olmuş NF- κ B'nin aktive edilmesinde (+) feed-back etkisi vardır (18,26) .

IL-6 vasküler endotelial hücrelere etkiyerek endotelial permeabiliteyi artırır. Yine IL-8'de benzer mekanizmayla endotelial hücrelere bağlanır ve permeabilite artışına neden olur. İnflamatuvar süreçte sahada kan hücrelerinden eritrositler kümeleşip trombus formasyon oluşumuna neden olur. Bu trombüste IL-1 β , TNF α ve If γ gibi akut faz reaktanları üretilir. Kanamanın ilk 24 saati içinde görülmeye başlanan bu süreç, kanamanın 3-4. gününe gelindiğinde sahada artmış fagositoz, salgılanmaya başlanan IL-1, IL-6 ve IL-8'in seviyelerinin iyice artması ve lökositlerin sonradan degranüle olmasıyla endotelin salınımının olduğu görülür (25,26).

İnflamasyon süreci vazospazm oluşumundaki en önemli faktörlerden biridir. Liteartürde inflamatuvar reaksiyonlarını önlemeye yönelik yapılan deneysel çalışmalarda vazospazmı önlemede başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Sills ve ark. ibuprofen implantları kullanarak lökositler ve endotelial hücreler arasındaki etkileşimi engelleyerek vazospazm gelişimini önlediklerini yayınlamışlardır. Pradilla ve ark. benzer bir düşünceyle hareket ederek CD11b/CD18 antikoru vererek nötrofil ve makrofajların adhezyonunu bloke ederek ve peri adventisyal alana migrasyonunu önleyerek vazospazm gelişimini önlediklerini açıklamışlardır (21,27,56).

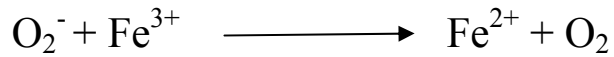
2.4.3 Serbest Radikal Reaksiyonu, Lipid Peroksidasyonu

Subaraknoid kanama sonrası ortama göç eden dolaşımdaki monositlerin, lenfositlerin, lökositlerin, granülositlerin, makrofajların inflamasyona olan etkileri yanında ortamda bulunan eritrositler inflamatuvar reaksiyonlar yanında başka zincirleme reaksiyonlarda aktive etmektedir. Subaraknoid aralıktaki eritrositlerin parçalanmasıyla açığa çıkan oksihemoglobin methmoglobine çevrilirken güçlü bir serbest radikal olan superoksidler (O_2^-) oluşur. Superoksidler superoksid dismutaz (SOD) ile H_2O_2 'e çevrilir (27,28).

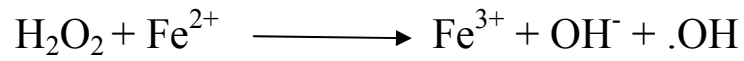


Tablo 2.3. Hidrojen peroksid oluşumu

Oluşan H_2O_2 kanama sonucu ortamda bulunan eritrositlerin parçalanmasıyla açığa çıkan demir ile reaksiyona girer ve hidroksiradikallerin ($\text{OH}^\cdot$) oluşumuna neden olur. Böylece Haber Weiss ve Fanton reaksiyonu adı verilen serbest radikal reaksiyonu başlamış olur (28).



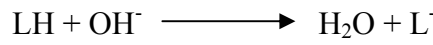
Tablo 2.4. Haber – Weiss Reaksiyonu



Tablo 2.5. Fenton Reaksiyonu

Serbest radikallerin atomik yapılarına bakacak olursak, normalde elektronlar atomik yapıda bir yörüngede bulunurlar. Bir yörüngede en fazla iki adet elektron bulunabilir. Eğer yörüngede bir elektron bulunursa buna eşlenmemiş elektron adı verilir ki, serbest radikaller böyle bir atomik yapıya sahiptirler. Normal biyolojik yapılar iki elektrona sahiptirler ancak

ortamda radikallerin varlığında radikaller eşlenmemiş elektronlarını eşlemeye yönelik normal biyolojik yapılarla etkileşime girerek normal yapının elektronunu almaya yönelir. Böylece kendisini karalı duruma getirirken, normal atomik yapıyı eşlenmemiş elektrona sahip bir radikal haline getirir. Böyle bir reaksiyonun başlaması zincirleme reaksiyon şeklinde diğer yapılara yayılır. Hidrojen atomu bir protonu, bir elektronu olan radikaldir. Bundan dolayı hidrojen atomunun bir biyolojik molekülden çıkarılması biyolojik dokuyu direk karasız hale sokacaktır. İşte hidroksiradikali lipidler dahil bir çok biyolojik molekülle bu şekilde etkir (28,29).



LH: Lipid, OH⁻: Hidroksiradikal

Hidroksiradikal çok güçlü bir reaktiftir. Molekül yapısında bulunan hidrojen atomunu biyolojik molekülün yapısından çıkararak serbest radikal zincir reaksiyonunu tetikler. Oluşan bu serbest radikaller neticesinde gelişen oksidatif stres hücre DNA'sının parçalanmasına, hücre membranı iyon transportunu sağlayan protein yapıların ve diğer protein yapıların yıkımına neden olur.

Bunun neticesinde hasarlanmış hücre içine kalsiyum birikimi olur ve hücre içi yıkım enzimleri etkinleşir. Yine hücre membranının yapısındaki yağ asidinin metilen karbonuna bağlı olan hidrojen atomunu yapıdan çıkararak eşlenmemiş elektrona sahip lipid radikali oluşumuna sebep olur. Lipid radikali moleküler oksijen ile reaksiyona girerek peroksiradikaline dönüşür. Peroksiradikalde lipid hidrokside indirgenir. Bunun neticesinde hücre membranı destabilize olup membran potansiyeli oluşturamaz hale gelir. Vasküler endotelial hücrelerde gelişen lipid peroksidasyonu sonucunda hücre yapısında hasar oluşur, vasküler permeabilite artışı neticesinde hücre içi kalsiyum birikimi olur (29).

O₂⁻ ve H₂O₂ gibi invivo üretilen serbest radikaller OH⁻ 'e göre çok daha az reaktiftirler. Ama bu tamamen zararsız oldukları anlamına gelmez. Özellikle O₂⁻ vasküler endotelial hücreler tarafından üretilen ve vasküler tonusun devamında rol alan ve vazodilatasyon oluşumu açısından çok önemli bir molekül olan NO ile reaksiyona girer.

NO'ı peroksinitrite (NOO⁻)'e indirger. Peroksinitrit toksik bir metabolit değildir ancak OH⁻ oluşturmak üzere ayrışabilir (31,35,36).

O₂⁻ invivo olarak kimyasal reaksiyonlar sırasında örneğin otooksidasyon esnasında istenmeden oluşabilir. Ancak aerobik mekanizmaların bu durumlara karşı savunma sistemleri vardır. O₂⁻ SOD ile H₂O₂'e, H₂O₂'te glutatyon peroksidaz ve katalazlarla zararsız bileşiklere dönüştürülür. SAK sonrası gelişen bir çok reaksiyon neticesinde oluşan vazospazm sürecinde dokuların SOD, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi savunma mekanizmaları yeterince fonksiyon yapamaz hale gelir ve vazospazmın gelişiminde en önemli faktörlerden biri olan serbest radikaller etkisiz hale getirilememiş olur. Böylelikle dokular oksidatif strese maruz kalırlar. Oksidatif stres hücre metabolizmasında bir takım bozukluklara neden olur (32,33,34,38). Bunlar:

- DNA yapısının bozulması
- intrasellüler serbest Ca⁺² miktarında yükselme
- hücre membranı iyon transportunun zarar görmesi
- lipid peroksidasyonu (38,39).

Intrasellüler kalsiyum artışı ise hücre içinde nükleaz, proteaz, protein kinaz C, fosfolipazların aktive olmasına hücrenin nekrotik ve apoptotik bir sürece girerek ölümüne neden olmaktadır. Tüm bu veriler göz önüne alındığında lipid peroksidasyonu nöronal yapılara, vasküler dokulara oluşan hasarda çok büyük bir rol almaktadır (40,41).

SAK sonrası ortamdaki eritrositlerin hidrolizi ile açığa çıkan oksihemoglobinin serbest radikallerin oluşumu ve lipid peroksidasyonu üzerinden vasküler ve nöronal dokularda oluşturduğu hasar dışında daha bir çok reaksiyonu başlatarak vazospazma yol açan süreçte yer alır. Bunlardan biride oksihemoglobinin farklı mekanizmalarla vasküler düz kaslarda kalsiyum artışına ve vazokonstriksiyona neden olmasıdır. Oksihemoglobin, IP3 salınımını arttırarak hücre içi depolardan kalsiyumun hücre içine salınımında rol alır. Ayrıca voltaj bağımsız kalsiyum kanallarını etkileyerek hücre içi kalsiyum artışına neden olur ve bunun neticesinde vasküler dokuda kasılmaya yol açar. Hücre içi kalsiyum artışında oksihemoglobinin aktive ettiği bir başka mekanizma ise, tirozin kinaz ve protein kinaz C enzimleri üzerinden vasküler dokudaki K⁺ kanallarından K_v kanalının inhibe

edilmesi ile membran depolarizasyonu ve voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının aktive edilmesi sonucu hücre içi kalsiyum miktarının artırılması reaksiyonlarıdır. Bu tür bir reaksiyon neticesinde vasküler düz kaslarda uzun süreli kontraksiyon gelişmektedir (43,45,46,47).

Watanabe ve ark. yaptıkları hayvan deney çalışmasında tirozin kinazı farmakolojik olarak bloke etmiş ve vazodilatasyon geliştiğini bildirmiştir (48).

Oksihemoglobin $TNF\alpha$, IL-1, IL-6 gibi sitokinlerin salınımını attırmaktadır. Bununla beraber oksihemoglobin NO etki mekanizmasında yer alan sGC adlı enzimin heme kısmına bağlanarak enzimi inaktive etmektedir, serbest radikal üretimi yoluyla NO'ı peroksinitrite çevirerek NO miktarını azaltmaktadır (49,50)

Bu yönde gelişen tüm reaksiyonlar neticesinde normal serebral vasküler tonusun dengelenmesinde endotelyal kaynaklı gevşetici faktör NO ile bilinen en güçlü konstriktörlerden endotelin arasındaki denge endotelin lehine olacak şekilde bozulur. Bununla beraber endotelin gen ekspresyonunu arttırarak dokulardaki endotelin hakimiyetini arttırır (30,51)

2.4.4 Endotelin

Normalde serebral damarlardaki vasküler tonusun düzenlenmesinde Endotelyal Kaynaklı Vazorelaksan Faktörler (EDRF) ile endotelyal kaynaklı vazokonstriktör maddeler vardır. EDRF'ler; NO, Ach, bradikinin, histamin, substans P, nörokinin A, nörokinin B, $PGF\alpha$; Vazokonstriktör maddeler ise serotonin, PGE_2 , Trombaksan A_2 , norepinefrindir. Ancak çeşitli mekanizmalarla EDRF'lerin özellikle NO'nin miktarının azalmasına paralel olarak serebral vazospazmda bilinen en güçlü vazokonstriktör maddelerden endotelin sorumludur. (51,52,53).

Endotelinin 4 izopeptid formu tarif edilmiştir. Bunlar ET-1, ET-2, ET-3 ve ET-4. Endotelinler 21 aminoasite sahip vazoaktif peptidlerdir. Bunlardan ET-1'in SAK sonrası vazospazmda esas rol alan endotelin tipi olduğu bilinmektedir. Endotelinler farklı

reseptörler yoluyla etkinliklerini gerçekleştirirler. ET-A reseptörlerine ET-1 ve 2'nin yüksek affinitesi vardır. Bu reseptörler vasküler düz kas hücrelerine lokalizedir. ET-B₁ reseptörleri vasküler endotelyumda, ETB₂ reseptörleride düz kas hücrelerine lokalizedir (52,54).

ET-1 ekstrasellüler mesafedeki kalsiyumun intrasellüler alana girmesi ve intrasellüler kalsiyum artışı sağlamasıyla kontraksiyona neden olur. Ancak intrasellüler kalsiyum artışını voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını etkileyerek değil, 3 tip voltaj bağımsız kalsiyum kanallarını etkileyerek başarır. Bu voltaj bağımsız kalsiyum kanalları NSCC-1, 2 (nonselektif katyonik kanal) ve SOCC'lerdir (store operated kalsiyum kanalları) (55). Endotelinin bu bağımsız kalsiyum kanallarını aktive etmesiyle G_q, PLC ve IP3 (fosfoinozitol yol) kaskadı aktive ederek vazokonstriksiyon oluşumunu sağlar (56). Genel olarak kalsiyumun hücre içine girmesi dört yolla olmaktadır.

- 1- Voltaj bağımlı kalsiyum kanalları
- 2- Reseptör bağımlı kalsiyum kanalları
- 3- Voltaj bağımsız kalsiyum kanalları
- 4- Kalsiyum sızması

Hücre membranı depolarize olduğu zaman voltaj bağımlı kalsiyum kanalları açılır ve kalsiyum hücre içine girer. İki tip voltaj bağımlı kalsiyum kanalı vardır. Bunlar L ve T tipi kalsiyum kanallarıdır. L tipi kalsiyum kanalları düz kas kontraksiyonunda başlatıcı ve düzenleyici rol oynamaktadır. T tipi kalsiyum kanalı ise düşük depolarizasyonda açılır ve kısa sürede kapanır. Reseptör bağımlı kalsiyum kanalları ise G proteini ile eşleşik işlev görürler. Kalsiyum sızmasında ise kalsiyum kimyasal gradientine göre hücre içine girer ancak hücre içersinde membran potansiyel değişikliğine neden olmaz, düz kas kontraksiyonu görülmez (8,30).

Voltaj bağımsız kalsiyum kanallarından ise NSCC-1've SOCC'de G_q/PLC yolağı, NSCC-2'de ise G_q ve G₁₂ ile bağlantılı yollar aktive olur. Bundan dolayı endotelin etkilerini bloke etmede bu üç tip farklı voltaj bağımsız kalsiyum kanalını bloke etmek amacıyla SK&F 96365 ve LOE908 adlı iki blokör kullanılmıştır. SK&F 96365 NSCC-2 ve SOCC'ya etkinken, LOE908 NSCC-1 ve 2'ye etkindir (56,57).

Endotelin bu kalsiyum kanalları yoluyla vasküler dokularda kontraksiyon ile birlikte farklı fonksiyonlara neden olur. Bunlar prolin rich tirozin kinaz (PYK2), EGRF reseptör protein tirozin kinaz (EGRF PTK) stimülasyonu, araşidonik asit salınımı, hücre proliferasyonu, mitojen activated protein kinaz (MAPK) stimülasyonu gibi fonksiyonlardır (58,59,60).

Araşidonik asit salınımı ve onun biyolojik aktif metabolitleri olan lökotrienler, trombaksanlar ve PG'ler vasküler kontraksiyonda önemli rol alırlar. Yapılan çalışmalarda endotelinin araşidonik asit salınımını sitozolik fosfolipaz A₂ enzimi ile gerçekleştirdiğini, bu enzimin ise yine endotelin salınımına neden olduğu MAPK ve protein kinaz C ile fosforilasyonu neticesinde aktif olduğu bildirilmiştir (61,62).

Endotelinin tüm bu reaksiyonları gerçekleştiren vazospazmdaki patolojik süreçte yer alması ekstrasellüler kalsiyum varlığına bağlıdır. Kalsiyum olmadan sadece NO miktarının azalmasına sekonder olarak veya oksihemoglobin tarafından sentezinin indüklenmesi neticesinde miktarının artmış olması bu tür reaksiyonları gerçekleştirmesi açısından mümkün değildir. Bununla beraber ET-1'in ET-A reseptörleri üzerinden voltaj bağımsız kalsiyum kanallarını aktive etmesiyle farklı kalsiyum kanallarının farklı G proteinlerinden oluşan G proteini/PLC ve IP3 kaskadlarını harekete geçirerek yukarıda sözü edilen fonksiyonları gerçekleştirmesinden dolayı bu mekanizmalara yönelik bloke edici ajanlar tedavi seçenekleri açısından önemli yer almaktadır (79, 80).

2.4.5. Nitrik Oksid

NO, L-Arjiinden NOS enziminin katalize ettiği bir reaksiyonla invivo olarak sentezlenir. Daha sonra NO sGC adlı enzimi aktive ederek, GTP'den cGMP oluşumuna neden olur. İki farklı GC vardır. NO-sensitif GC ve natriüretik peptid (NP)-activated GC. Tüm dokularda bu enzimin $\alpha_1\beta_1$ formu bulunur. Beyinde ise $\alpha_2\beta_1$ izoformu bulunur (63).

cGMP'de myoglobulin hafif zincir fosfatı (MLCF) defosforile ederek düz kaslarda relaksasyona neden olur. Aynı zamanda cGMP, fosfokinaz G yoluyla K_{Ca} ve K_V

adlı K^+ kanallarını aktive ederek düz kas hücrelerinin hiperpolarize olmasına, voltaj bağımlı kalsiyum kanallarında kapanmasına neden olur. cGMP'lerin inaktive edilmeleri fosfodiesterazlar yoluyla olur. Bugüne kadar 30 farklı izoenzimi tespit edilmiştir. Bunlardan PDE 1, 2, 3, 4, 5, 7 vasküler endotelial hücreler tarafından sentezlenir. PDE 5 özellikle düz kaslarda cGMP'nin hidrolizinden sorumlu major fosfodiesterazdır. Sildenafil ile yapılan deneysel çalışmalarda PDE 5 inhibisyonu yolu ile devamlı yüksek bir NO platosu elde edilmiştir (64,65,66).

NO'nin invivo olarak üretilmeleri, NO ile NOS arasındaki (-) feed-back ve PRMT-1 (tip 1 protein arjinin metil transferaz)'ın L-Arjinini metilasyonu ile düzenlenir. PRMT-1 ile metilasyonu sonrasında L-Arjinin tekrar metilasyonu SDMA (simetrik dimetilarjinin) ve ADMA (asimetrik dimetil arjinin) oluşumuna neden olur. ADMA'nın hipertansiyonda, renal disfonksiyonda, aterosklerozda, stroke'da ve serebral vazospazmda oluşan endotelial disfonksiyonda kompetatif endojen NOS inhibitörü olduğu bildirilmiştir (67,68,70).

2.4.6. Nitrik Oksid'in Serebral Vasküler Yapıya Olan Etkileri

Serebral arterlerde ve beyinde nNOS tespiti serebral kan akımında NO'nin rolü olduğu olgusunun ortaya konmasına neden olmuştur. Aynı damarlarda eNOS ve nNOS'ın birlikte mevcudiyeti SKA'nın otoregülasyon ve kemoregülasyon mekanizmaları ile sıkı bir şekilde kontrol altında tutulduğunu göstermektedir (70).

Tüm dokular içinde SSS'i en fazla kan akımına sahip olan yapıdır. Kan akımı sıkı kontrol edilir, metabolik ihtiyaca göre kan akımı hızlı bir şekilde ayarlanır. Bu çok önemli bir durumdur çünkü beynin enerji deposu yoktur ve nöronal aktivasyon için gerekli olan oksijen ve glukoz sürekli dolaşım ile sağlanır. Bu gibi özel şartlardan dolayı NO'nin SKA regülasyonundaki önemi çok fazladır. Beyine sağlanan kan miktarı sadece beynin ihtiyacına göre değil aynı zamanda MABP'a göre de ayarlanır. MABP'daki değişikliklerden İKB-SPB, pH, pCO₂ gibi mekanizmalar sorumludur. Bu mekanizmalar ise beyin sapındaki vazomotor merkezler, nöronal ganglia, genel nöronal aktivite ve beyin metabolizması gibi yapı ve faktörlerle düzenlenir. SSS'deki tüm damarlar göz önünde bulundurulduğunda NO'nin iletici, rezistans arterlerde ve venöz sistemde etkin rol aldığı

görülür. NO'nin damarlar üzerinde olduğu kadar ET-1, prostosiklinin seviyelerinde değişikliğe yol açarakta etkinlik gösterdiği bilinmektedir (71,72,73,74).

SKA'nın otoregülasyonu SPB/MAPB değişikliklerine karşı koruyucu hemostatik bir mekanizmadır. Bu otoregülasyonun oluşmasında vasküler endotelyum, düz kas hücreleri ve adventisyada bulunan nöronal yapılar yer alır. Bu yapılar kan basıncına, CO₂ ve pH değişikliklerine olduğu gibi otokrin, parakrin ve endokrin stimuluslara duyarlıdır ve gelen stimuluslara göre damarsal yapının çapında değişikliklere yol açarak cevap verirler. Bu cevap mekanizmasının oluşabilmesi için damarsal yapının adventisyasında sempatik ve parasempatik innervasyonlar vardır (75,76).

Düz kas tabakası artmış kan basıncına spazm geliştirerek cevap verir. Düz kas kontraksiyonunda iki farklı moleküler mekanizma olduğunu görürüz.

- 1- Mekanik bir stimulasyon olduğu zaman intrasellüler kalsiyum mobilize olur ve kalmodulin ve MLCK'nin aktive olması myozin hafif zincirinin fosforilasyonu ile sonuçlanır ve düz kas kontraksiyonu olur.
- 2- Fosfokinaz C'nin aktivasyonu yoluyla myozinin, kaldesmonin ve kalpoininin fosforilasyonu ve sonrasında MLCK'nin fosforilasyonu mekanizmasıdır (77,78).

Media tabakasında kimyasal, oto-, para-, ve endokrin stimulusa voltaj bağımlı ve bağımsız kanallar yoluyla intrasellüler kalsiyum seviyesinde değişiklikler oluşarak cevap gelişir (79).

İntima tabakası ise (endotelyal tabaka) shear strese ve dolaşımda bulunan hormonlara EDRF ve EDKF (ET-1, AT-II, PF_{2a}) salınımı yoluyla cevap verir (80).

NO çok kısa yarı ömre, hızlı ve güçlü vazodilatör etkiye sahiptir.

2.4.7. Subaraknoid kanama sonrası Serebral Kan Akımı

SAK'tan sonra hemen erken dönemde, bu sıkı SKA kontrolü bozulur. Bu çoğunlukla İKB'a sekonder olarak akım azalmasına bağlıdır. Aynı zamanda SAK'tan sonra serebral metabolizma 'uyku' moduna geçer. Ancak bu durum geçicidir. Vazospazm geliştiğinde ise kemoregülasyon bozulur, serebral kan hacmi artar, serebral kan akımı azalır. Bunun nedeni proksimal arterlerin konstrikte olması, distal damarların dilatasyonuna yol açar. SAK'ın erken döneminde bozulmuş olan SKA otoregülasyonu bu dönemde iyice bozulur. Bunun nedeni ise normal şartlar altında kemoregülasyonun eNOS'lar tarafından düzenlenmesi ve vazospazmda bu fonksiyonun bozulması ve damarların nöronal kontrolünün kaybolmasıdır. Görünen o ki, NO-bağımlı regülatör sistemlerin hasar görmesi otoregülasyonun kaybolmasına neden olur (81,82,83).

NO'nin vazospazm fizyopatolojisindeki rolü ise kesin değildir. Arteriyal duvar boyunca artmış tüketimi, endotelial hasar sonrası azalmış üretimi, inflamatuvar reaksiyonlarda yer alıyor olması veya bunların hepsi olabilir. Ancak en çok kabul edilen görüş, NO'nin oksihemoglobinler tarafından tüketilmesi, yok edilmesi görüşüdür. Bu hipotezin temelinde yatan nokta NO'nin sGC'ın heme kısmına olan yüksek affinite özelliğinin olmasıdır. Hemoglobininde heme kısmına olan yüksek affinitesi nedeniyle NO eritrositler tarafından yıkılır. Bu durum oksihemoglobinin methemoglobine dönüşümüne neden olur. Bir başka teori ise Hb'nin sGC'ın heme kısmındaki demirin oksidasyonuna neden olarak sGC'ı inaktive etmesidir. Buda cGMP üretiminin azalmasına yol açmaktadır. Serebral vazospazm gelişmesinde NO'e bağımlı hipotezlerden bir başkasıda SAK sonrası eNOS'ın ADMA tarafından inhibisyonudur. Başlangıçta oksihemoglobin tarafından gerçekleştirilen NO eliminasyonu, sonradan perivasküler alanda artan ADMA seviyeleri ile eNOS'ın inhibe edilmesi NO seviyelerinin düşmesine neden olmaktadır (70,74,85,86).

Oluşan bu reaksiyonlar sonucunda NO azalması lökosit ve plateletlerin adhezyonunun artmasına ve var olan inflamasyonun dahada şiddetlenmesine neden olmaktadır. NO adhezyon moleküllerinin salınımını inhibe etmektedir. Bunla beraber NO'nin azalması miyozin fosfatı inhibe eden Rho kinazın artışı ile sonuçlanır ki bu durumda uzun süren düz kas kontraksiyonu ile sonuçlanır (87).

NO, NADPH oksidaz adlı ROS yapımında esas rol oynayan vasküler endotelial hücrelerde, düz kas hücrelerinde ve adventisyal fibroblastlarda sentezlenen enzimi, enzimin sitozolik komponentlerinden gp91^{phox} sentezini azaltarak veya p47^{phox} adlı sitozolik komponentinin membrana transloke olmasını azaltarak inhibe etmektedir. NO azalması NADPH oksidazın sentezinin artmasıyla sonuçlanarak daha fazla superoksit üretimi ile sonuçlanmasına neden olacaktır (88,89,90,91,92).

2.4.8. Apoptoz

İntrakranial anevrizmanın rüptürü ve subaraknoid alan olan kanama neticesinde kanın yaptığı mekanik basınç yanında trombositlerin, lökositlerin, granülositlerin, monositlerin, makrofajların ve eritrositlerin gerçekleştirdiği çok çeşitli reaksiyonlarla ve ortama salınan vazoaktif maddelerle inflamasyon, serebral kan akımının otoregülasyonunun bozulması, vasküler endotelial hücre harabiyeti, endotelin/NO oranının artması vasküler morfolojik değişiklik ve vazokonstriksiyon gibi daha bir çok mekanizmayla nöronlarda ve vasküler dokuda iskemi sürecine girilmiş olur. İskemik sürece girilmesiyle beraber zaten hasarlanmış olan iyonik pompalar ATP yetmezliği sonucu fonksiyonlarını yapamaz hale gelir. ATP'nin tükenmesi sonucu Na/K, ATPaz, 3Na/Ca ve Na/H transport pompaları fonksiyon göremez hale gelir. Na konsantrasyonu hücre içinde artmaya başlar buda L tipi voltaj duyarlı kalsiyum pompalarını açarak hücre içine kalsiyum girişine neden olur. Buda glutamat gibi eksitator aminoasitlerin sinaptik aralığa salınmasına neden olur. Böylece NMDA reseptörleri aktive olarak kalsiyumun hücre içine girişini hızlandırır. Hücre içi kalsiyum seviyesinin artmasıda lipaz, fosfolipaz, proteaz, endonükleaz gibi yıkıcı enzimlerin artışına neden olur. Bu durum apoptoza yol açan etmenlerin aktivasyonuna yol açar. Netice itibariyle oksihemoglobin, trombin, sitokinler, proteazlar, endonükleazlar, metHb, bilirubin, serbest radikaller apoptoz mekanizmasını harekete geçirirler (94,95,96,97).

Apoptoz ilk kez Kerr ve ark. tarafından tanımlanmıştır (101). Normal gelişim sürecinin bir sonucudur. Nekrozisten farklılıkları vardır. Nekroze uğramış bir hücrenin histolojik özellikleri arasında sitoplazmanın ve hücre içi organellerin şişmesi, membranın disrptürü ve hücresel yapının bölünüp parçalanması vardır. Apoptozun bulgularına

baktığımızda nukleustaki kromatin yapının yoğunlaştığını ve ayrılmalar gösterdiğini, sitoplazmanın yoğunlaştığını, nükleer yapının bütünlüğünün bozulduğunu görürüz (98,99).

Apopitozun oluşmasında 3 farklı yolak tanımlanmıştır.

- 1- Kaspaz bağımlı yolak (kaspaz 8)
- 2- Kaspaz bağımsız yolak (AIF)
- 3- Mitokondriyal yolak (sitokrom c, kaspaz 3) (100).

Bu 3 ana kaskadın başlatılmasında ve düzenlenmesinde p53 başrolü almaktadır. p53 bir transkripsiyon faktörüdür. Özellikle sitokinlerden TNF α 'nın başlattığı apopitozda rol alır. Fosforilasyonu ve sonrasında sitoplazmada stable olmasıyla Bax adlı proteinin sentezini ve mitokondriyal translokasyonunu stimüle eder. Bax ve Bcl-Xs proapopitotik proteinler, Bcl-2 ve Bcl-xL ise antiapopitotik protein yapılarıdır. p53'ün Bax'ın mitokondriyal translokasyonuna neden olması sitokrom c'nin salınımına neden olur. p53 bunun dışında mitokondriden AIF salınımına da neden olur, buda kaspaz bağımsız yolları da etkilediğini gösterir. Culmsee ve ark. p53 inhibitörü (pifithrin- α) vererek Bax'ın sentezini azaltmışlar ve kaspaz 3'ü inaktive ettiklerini bildirmişlerdir (101,102,103).

Sitokrom c normalde mitokondrinin iç ve dış membranları arasında yer alır. Solunum zincirinde kompleks III ve IV proteinleri arasındadır. p53'ün etkisiyle mitokondriden sitozole salınımı solunum zincirinin durmasına ve mitokondriyal ATP sentezinin azalmasına neden olur. Bu durumda superoksit formasyonunun oluşumunu kolaylaştırıcı etmenlerden biridir. Sitokrom c'nin sitozole salınması proenzim olarak bulunan prokaspaz 3'ün kaspaz 3'e dönüşümüne neden olur (104,105,106,107).

Kaspaz protein familyasının 3 adet subtip vardır.

- 1- İnterlökin 1-B konverting enzim (ICE) familyası (kaspaz 1, 4, 5)
- 2- CED-3/CPP-32 familyası (kaspaz 3, 6, 7, 8, 9, 10)
- 3- ICH-1/Nedd2 familyası (kaspaz 2) (108).

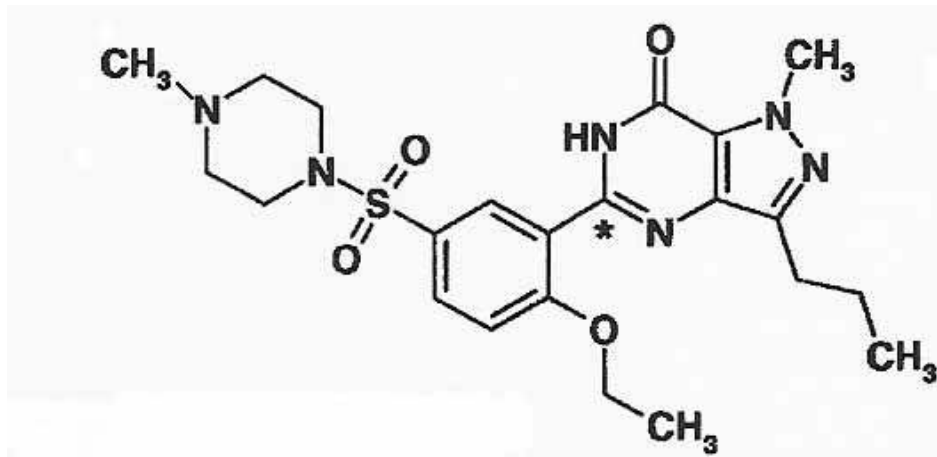
ICE familyası apopitozda rol almaz. Sitokinlerle olan reaksiyonlarda görev yaparlar. Kaspaz-1, IL-1 β adlı proinflatuar sitokinlerin hücrel taşımasını

düzenleyerek inflamasyonda yer alır. Kaspazlardan özellikle kaspaz-3 PARP, laminin, aktin, histonH1 gibi hücre iskeletini oluşturan protein yapılarını parçalar, hücre yapılarını ayırıştırarak hücreleri apoptotik hale getirir (3). Kaspaz 8 kaspaz 3'e direk olarak etki ederek apoptotik süreçte yer alır. Kaspaz bağımlı yolu temsil eder. Kaspaz 8 spesifik ligandların Fas veya TNF gibi ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla oligomerize olur ve apoptotik süreçte dahil olur (108,109).

Apoptotik sürecin sonunda gelişen endotelial apoptozis endotelial yapının vasküler yapıdan kopmasına internal elastik laminanın kollajen yapısının kanla temasına neden olur. Buda plateletlerin bu alan yapışmasına ve trombus formasyonunu oluşturmaya, düz kas hücrelerinde kan dolaşımındaki vazodilatör ajanlarla direk temasına neden olarak damarların konstrikt olmasıyla sonuçlanır (108).

2.4.9. Sildenafil

Sildenafil klinikte rutin olarak erektil disfonksiyon tedavisinde kullanılan selektif bir tip V fosfodiesteraz inhibitörüdür. Sildenafil sitrat yapısal olarak bronkodilatör olan zaprinasta benzeyen bir pirazolomidion derivativesidir, ancak mevcut vazodilatörlerle ilişkili değildir. Zaprinast ve sildenafil fosfodiesteraz (PDE) tip V'in selektif inhibitörleridir. Sildenafilin pirazolopirimidion nükleosu PDE tip V izoenziminin endojen ligandı olan cGMP'nin guanozin bazına çok benzer. Sildenafilin pirazoloprimidion nükleosundaki propil, metil ve etoksil grupları molekülün PDE tip V spesifitesini sağlar.



Tablo 2.4.8 Sildenafilin kimyasal yapısı

PDE tip V enzimi ayrıca akciğerler, trombositler, böbrek, dalak ve değişik vasküler ve visseral düz kaslarda izole edilmiş ancak kalp kasında saptanmamıştır. PDE tip V inhibisyonu ile sildenafil değişik dokularda cGMP akumülasyonuna neden olur. cGMP'nin rolü sinyal iletimi işlemlerinde cAMP modülasyonudur. cGMP ayrıca nitrik oksid ve atrial natriüretik ile düzenlenen tonusun G protein bağlantılı reseptörlerine ikincil mesajcıdır. Vasküler endotelde nitrik oksid sentezi ve salınımı ve non- adrenerjik, non-kolinerjik sinirler periferik dokuda vazodilatör tonustan sorumludur. Nitrik oksid aynı zamanda trombosit agregasyonu ve kan akımının düzenlenmesinde rol oynar. Sildenafil cGMP hidrolizini inhibe ederek NO miktarını artırır (110,111,112,113).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmanın bütünü Başkent Üniversitesi Etik kurulu tarafından deneysel araştırmalar için belirlenen kurallar ve prosedürler doğrultusunda, gerekli onay (22/02/2007 tarih DA07/09 sayı) alındıktan sonra yürütülmüştür. Çalışmada ağırlıkları 245 ile 510 gram arasında Sprague-Dawley türü erkek toplam 28 adet rat kullanıldı. Ratların genel sağlığı çalışma öncesi kontrol edilmiş ve her rat yer aldığı gruba göre uygun yöntemle işaretlenmiştir. Deney süresince ratlar 14 saat aydınlık, 10 saat karanlık ortamda kafeslerde tutuldu. Standart labaratuvar yemi ile beslendi.

3.1 Sildenafil Sitratın Hazırlanması

Çalışma için sildenafil nitrat solusyonu Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Bilim dalında hazırlandı. Normal sildenafil sitrat (Viagra^R Pfizer) tabletleri manuel olarak toz haline getirildi. Toz haline getirilmiş 100 mg.lık tabletlerden hassas tartıda gruplara göre 5 mg/kg.lık ve 15 mg/kg.lık ilaç paketleri hazırlandı. Bu paketler ratlara saline solusyonu ile beraber oral olarak verildi.

3.2 Anestezi

Bir gece önceden aç bırakılan ratlarda genel anestezi Ketamin (60 mg/kg) (Ketalar Parke Davis) ve Xylazine (10mg/kg) (Rompun-%2 Bayer) karışımının intraperitoneal enjeksiyonu ile sağlanmıştır (111). Anestezi ratlar ağrıya yanıtız olacak ve deney sırasında spontan solunumlarına devam edecek şekilde ayarlanmış, gerektiğinde ek doz verilmiştir. Deney sırasında ratların vücut ısısı rektal ısı probu ile kontrol edilerek 37 C° sabit tutulmuştur. İşlem sırasında nasal maske ile 1.5 lt/dk. dan O₂ verilmiştir.

Çalışma sonrası ratlar normal oda ısısında (20-22 C°) tutulmuşlardır.

İşlemden 48 saat sonra tüm gruplardaki ratlara yüksek doz pentobarbital sodyum (120 mg/kg) verilerek dekapitasyon yapılmıştır.

3.3. Gruplar

Tablo 3.1. Çalışma gruplarının özeti

GRUPLAR	RAT SAYISI	TEDAVİ PROTOKOLÜ
Grup 1 (kontrol)	7	SAK ve tedavi yok
Grup 2 (SAK)	7	SAK sonrası tedavi yok
Grup 3 (SAK + oral sildenafil 5 mg/kg)	7	SAK sonrası 48 saat 5 mg/kg sildenafil
Grup 4 (SAK + oral sildenafil 15mg/kg)	7	SAK sonrası 48 saat 15 mg/kg sildenafil

Grup 1 (Kontrol) (n:7)

SAK oluşturulmayan bu gruptaki ratlar, genel anestezi sağlandıktan sonra torakotomi yapılarak sol ventrikülleri kanüle edildi ve %10 formaldehid ile beyin dokusunun perfüzyonu sağlandı. Daha sonra ratlar dekapite edilerek normal baziller arterlerin çapını belirlemek için baziller arter beyin sapı ile çıkarıldı. Patolojik inceleme için formol solusyonu içine alındı. Histolojik inceleme için baziller arterin %5'lik bölümü %2 gluteraldehid içine, normal nöronal dokudaki lipid peroksidasyon değerlerinin tayini için beyin sapından ve serebellumdan 0.5 cm³'lük örnekler alındı ve -80 derecede saklandı.

Grup 2 (SAK) (n:7)

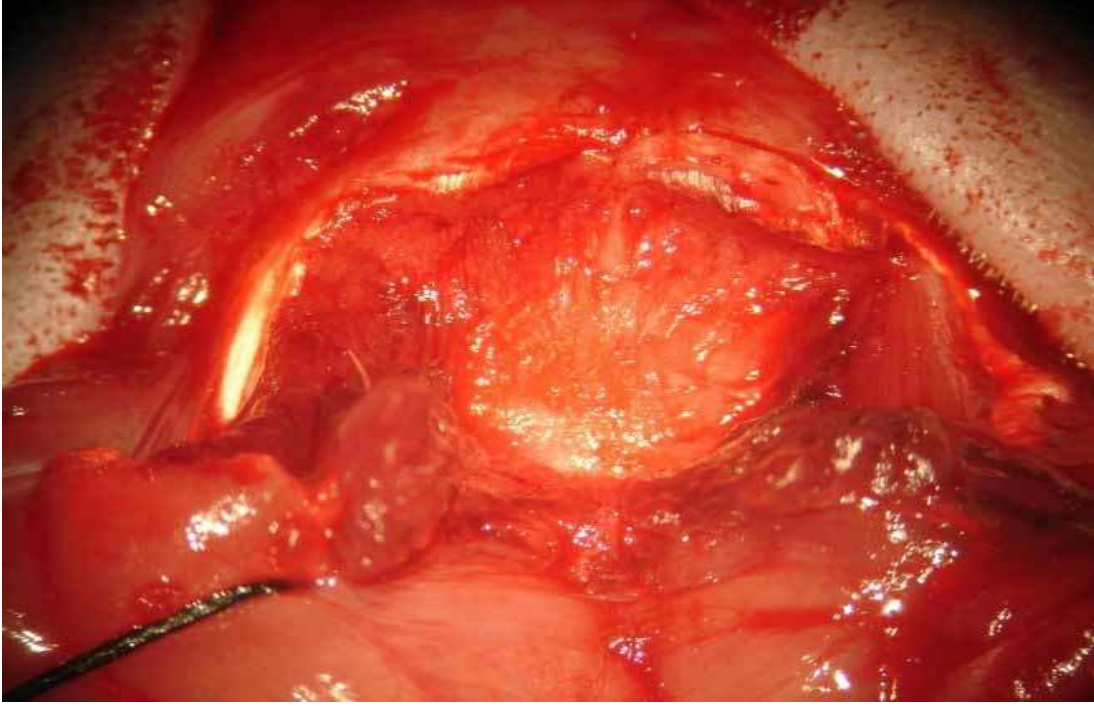
Genel anestezi sağlandıktan sonra, ratların inion ile atlas arası traş edildi. Batticon® ile saha temizliği yapıldıktan sonra ratın başı 45 derece fleksiyonda olmasını sağlamak için spanç rulo haline getirildi ve anterior servikal bölgeye yerleştirildi. İnion ile atlas arasına yaklaşık 2 cm.lik cilt insizyonu yapıldı. Cilt geçildi, oksipital adale oksipital kemikten künt olarak disseke edildi. Ardından posterior servikal adaleler disseke edilerek atlantookspital membran ortaya kondu (şekil 3.1). Sonrasında rata prone pozisyon verildi. Sol inguinal bölgenin batticon ile saha temizliği yapıldı ve cilt insizyonunun ardından sol femoral arter ortaya kondu (şekil 3.2). Femoral arter kateterize edildi, 0.4 ml/kg'a nonheparinize arteriyal kan alındı ve sisterna magnaya, eşit miktarda BOS boşaltılmasını takiben 30 saniye sürede enjekte edildi. Kanın geriye sızmasını önlemek amacıyla 5 dakika boyunca kanın verildiği insulin iğnesi atlantookspital membranın girdiği noktada tutuldu. Bu işlemi takiben ratlar 15 dakika süreyle trendelenburg pozisyonunda tutularak kanın prefontin sisternaya yayılması sağlandı (şekil 3.3 ve 3.4). Ratlar tamamen uyandıktan sonra kafeslerine alındı. 48 saat sonra ratlara kontrol grubundaki işlemler uygulanarak baziller arterler beyin sapı ile birlikte çıkarıldı.

Grup 3 (SAK + 5 mg/kg oral sildenafil) (n:7)

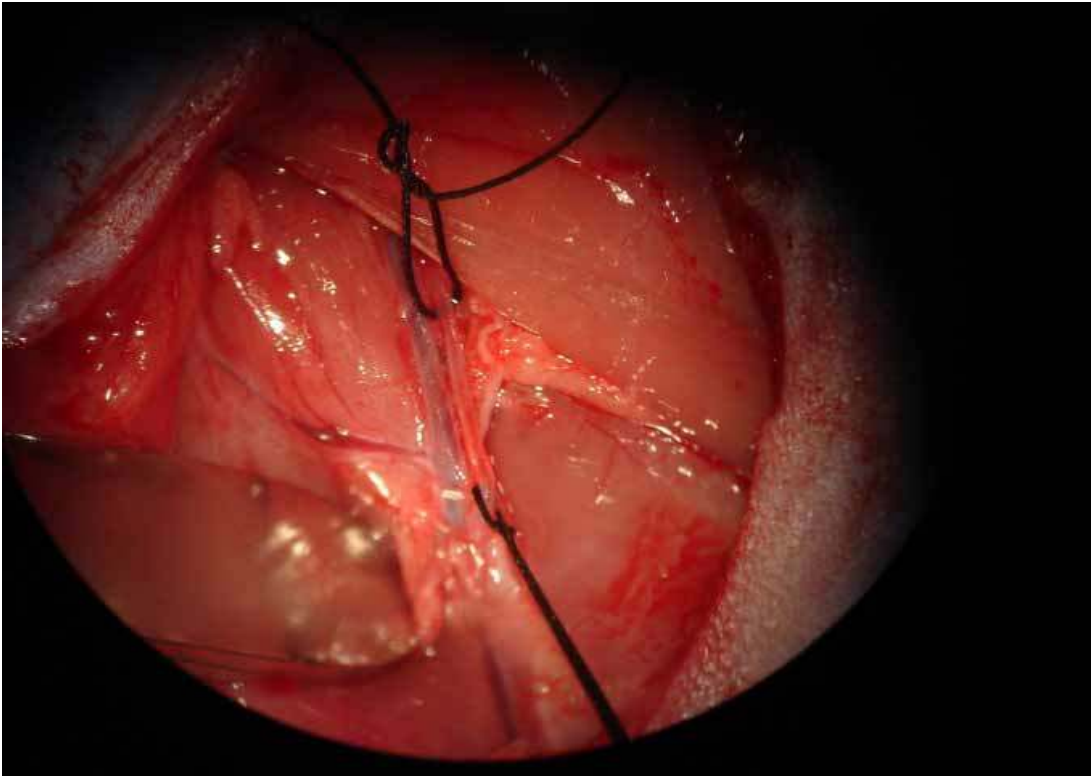
Aynı yöntemle ratlara SAK oluşturulduktan 2 saat sonra oral olarak 5 mg/kg'a toz haline getirilmiş sildenafil verildi. İkinci gün tekrar oral olarak 5 mg/kg'a sildenafil verildi. 48. saatin sonunda ratlara kontrol grubundaki işlemler uygulandı.

Grup 4 (SAK + 15 mg/kg oral sildenafil) (n:7)

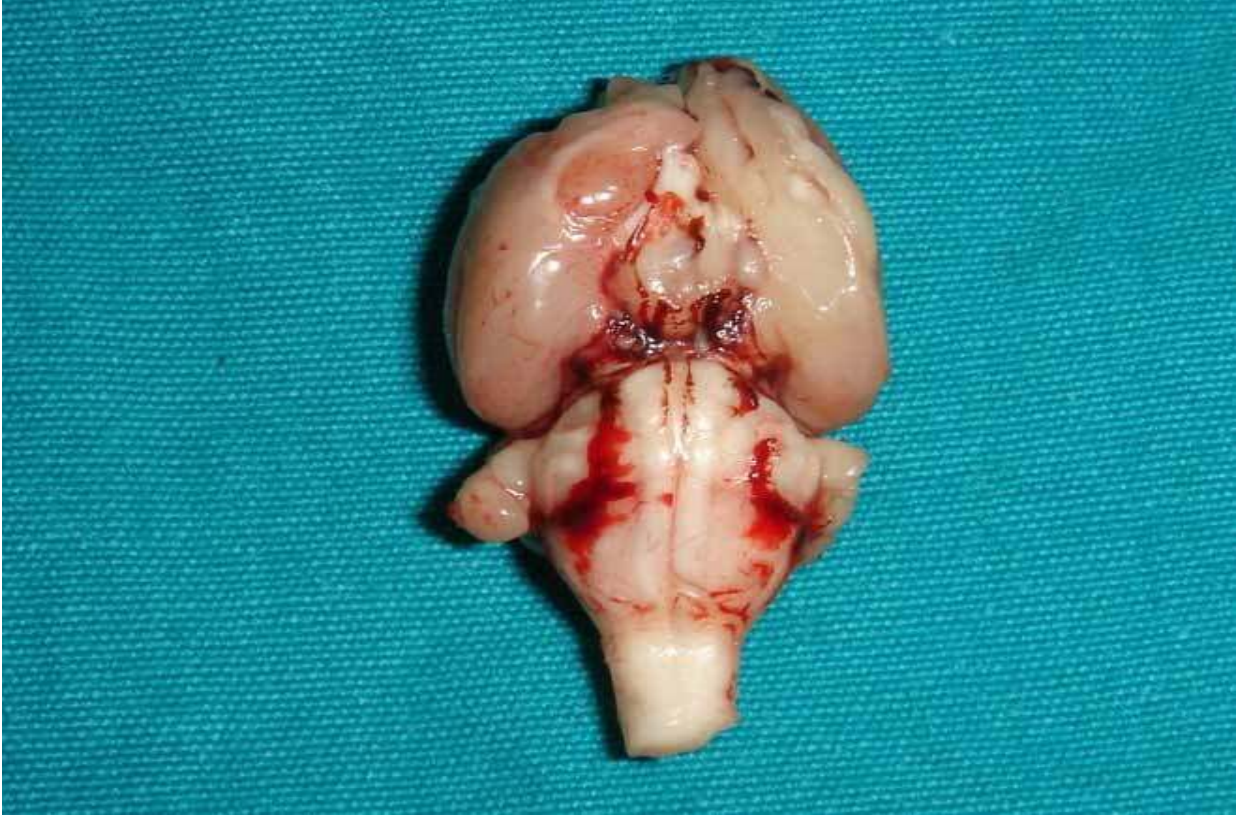
Aynı yöntemle ratlara SAK oluşturulduktan 2 saat sonra oral olarak 15 mg/kg'a toz haline getirilmiş sildenafil verildi. İkinci gün tekrar oral olarak 15 mg/kg'a sildenafil verildi. 48. saatin sonunda ratlara kontrol grubundaki işlemler uygulandı.



Şekil 3.1. Atlantooksipital membran



Şekil 3.2. sol femoral arter



Şekil 3.3. ve şekil 3.4. Prepontin sisternlerdeki ve baziller arter etrafındaki subaraknoidal kanama

3.4 Verilerin Toplanması

3.4.1 Patolojik Verilerin Değerlendirilmesi

Ratlar sakrifiye edildikten sonra beyin sapı ve serebellum doku örnekleri histolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal çalışmalara alınmıştır. Işık mikroskopi çalışması için alınan beyin sapına ait doku örnekleri %10'luk formalin solusyonu içinde en az 24 saat tespit edilmiştir. Doku takip işleminde, doku %96'lık alkol ile dehidrate edilip ksilol ile şeffaflandırılarak parafin aşamalarından geçirilmiştir. Doku parafine gömülerek parafin blok elde edilmiştir. Parafin bloktan 0.5 µm kalınlığında kesitler Hemotoksilen&Eozin (H&E) ile boyanmış, hazırlanan boyalı kesitler ışık mikroskobu (Olympus U-DO3®, Tokyo, Japonya) ile incelenmiştir.

3.4.1.1 Arterial Lümen çapının Ölçümü

BÜTF Patoloji AD'da her bir baziller arterin üst, orta ve alt bölümlerinden birer kesit alındı. Her grubun baziller arterleri ışık mikroskobunda en uygun kesiti temin etmek için incenlendi. Seri kesitler arasında en uygun olan hemotoksilen eozin boyalı baziller arter histolojik kesitleri digitalize edildi ve luminal kesitlerin çevre uzunluklarının taslakları oluşturuldu ve her baziller arterin çapı freeware imaj analiz sistemleri (ImageJ, version 1.341; National Institutes of Health, Bethesda, MD) bilgisayar programı ile ölçüldü. Resim 4.1-4.3 da her gruba ait Hemotoksilen Eozin ile boyalı baziller arter alanları görülmektedir.

3.4.2 İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemleri

Baziller arter kesitlerindeki apoptozu göstermek amacıyla In Situ Cell Detection Kit, POD (Roche, Germany) kullanılmıştır. Parafine gömülmüş dokular azalan konsantrasyonlarda alkol ile deparafinize ve rehidrate edilmiştir. Daha sonra örneklerin permeabilitesini arttırmak amacıyla, doku örnekleri ilk olarak proteinaz K (20 mg/ml) ile oda ısısında 15 dakika boyunca muamele edildi. Endojen preoksidaz aktivitesini bloke etmek amacıyla oda ısısında 5 dakika %3'lük hidrojen peroksit uygulanmasının ardından

75 ul equilibration tamponu (buffer) uygulandı. Dokular daha sonra nükleotidlerin 3'OH serbest ucuna polimerizasyonunu katalize ederek DNA kırılmış kenarlarının işaretlenmesi için TUNEL reaksiyon karışımıyla muamele edildi. Kestiler daha sonra 30 dakika boyunca Converter-POD ile inkübe edildi, daha sonra renk gelişimi için 12 dakika 3-Amino-9-etilkarbozol uygulandı. Sonrasında kesitler metil yeşil ile boyandı ve lam üzerine yerleştirildi. Her basamak arasında lamlar PBS ile yıkandı. Böylece kesitlerde arterlerin endotelial hücrelerinin nükleuslarında boyanma gösterildi. Apoptotik indeks immünreaktif nükleusların total endotel hücre sayısına oranı ile hesaplandı. Sonuçlar yüzde olarak ifade edildi. Buna göre boyanma saptanmayan kesitler Grade 0, %0-24 oranında apoptoz Grade 1, %25-49 arasındakiler Grade 2, %50-74 arasındakiler Grade 3 ve %75-100 oranında arteriyal apoptotik hücre boyanması gösterenler Grade 4 olarak ifade edildi.

Formaldehit ile fiks edilmiş ve parafine gömülü dokular kesildi. Deparafinizasyon ve rehidrasyondan sonra her kesit p53 (klon Pab240, fare monoklonal antibody, Neomarkers), kaspas 3 (CPP32, tavşan monoklonal antibody, NeoMarkers), kaspas 8 (FLICE, tavşan poliklonal antibody, NeoMarkers) ve sitokrom c (Klon 7H8.2C12, fare monoklonal antibody, NeoMarkers) kullanılarak immün boyama yapıldı. İmmünohistokimya prosedürleri aşağıdaki prosedüre göre standart avidin-biotin kompleks methodu kullanılarak gerçekleştirildi.

Bütün antibadiler için antijen tekrar kazanma işlemi 20 dakika 700W ta 10Mm sitrat tampon (Ph 6.0) da mikrodalga fırında gerçekleştirildi. Sonra endojen peroksidaz aktivite 30 dakikada %0.3 H₂O₂ ile bloke edildi. 10 dakika nonspesifik tespit blokajı için TBS (50 Mm TRIS-HCl, 150 Mm NaCl, Ph 7.4) de %5 bovine serum albümin ile inkubasyondan sonra kesitler oda sıcaklığında nemlendirilmiş özel bir odada 2 saat primer antibadiler ile inkübe edildi. AEC+ substrat kromojen solusyonu uygulanmasını takiben kesitler 15 dakika peroksidaz işaretli polimerler ile inkube edildi. Sonra hemotoksilen ile boyandı. Basamaklar arasında lamlar TBS' de 2 kez yıkandı.

Negatif kontroller için primer antibodyler atlandı ve non-immün serumlar yerine kullanıldı. Pozitif kontroller için boyanan doku kesitleri imalat prosedürüne uygun bir şekilde değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak p53 için kolonik adenokarsinoma, kaspas 3 için tonsil, kaspas 8 için mide, sitokrom c için kardiyak kas dokusu kullanıldı.

p53 immünreaktivitesi için yalnızca nükleer boyanma diğer antibodyler için ise sitoplazmik boyanma pozitif olarak değerlendirildi. Işık mikroskopu altında basiller arterin endotelyal hücrelerinde bu antibodylerin hepsi için pozitif yada negatif olarak pozitivite değerlendirilmesi gerçekleştirildi.

3.4.3 Biyokimyasal Verilerin Değerlendirilmesi

Baziller arterin beslediği serebellar dokudan alınan örneklerin lipid peroksidasyon değerleri, HÜTF biyokimya AD'da Uchiyama ve Mihara'nın tiyobütürik asit yöntemi kullanılarak hesaplandı. Doku örnekleri tartıldıktan sonra %10'luk homojenatları elde edilecek şekilde 25 mM Tris-HCl (pH:7) tamponu içeren 150 mM KCl ile cam-teflon homojenizatör kullanılarak buz banyosunda homojenize edildiler. Elde edilen %10'luk homojenatların 0.5'er mililitresi, 3 ml %1'lik H_3PO_4 ve 1ml % 0.67'lik TBA ile karıştırılarak kaynar su banyosunda 45 dakika bekletildiler. Daha sonra tüpler soğutuldu ve üzerlerine dörder ml n-butanol eklenerek çalkalandı. Tüpler santrifüj edilerek su ve n-butanol fazlarının ayrılması sağlandı. N-butanol fazına geçen rengin şiddeti 532 nm'de spektrofotometrik (Shimadzu UV-120-02 Spectrophotometry) olarak okundu. Malondialdehidin TBA ile oluşturduğu rengin molar absorbtivitesinden ($M:1.56 \times 10^5$) yararlanılarak lipid peroksit değerleri gram yaş doku başına nmol TBA/gram yaş doku olarak hesaplandı (tablo 4.4 ve grafik 2)

3.4.4 İstatiksel verilerin değerlendirilmesi

Toplam 4 grubun baziller arter kesit alanları, lipid peroksidasyon değerleri ve apoptotik vasküler endotelyal hücre sayısı verilerinin normal dağılım gösterip göstermediğini saptamak amacıyla ANOVA testi, gruplar arası farklılık ise Post Hoc Tukey testi ile değerlendirildi.

4. SONUÇLAR

4.1. Baziller arter lümen kesit çap ölçümleri

Deney süresince yapılan işlemler ratlar tarafından iyi tolere edildi. Grup 2’den 2, grup 3’ten ve Grup 4’ten 1 ‘er rat kanamadan sonraki 1. ünde kaybedildi. Çalışmaya toplam 28 adet rat dahil edildi. Tüm gruplardan elde olunan baziller arterlerden 3 adet kesit alınmıştır. Kesitler Hemotoksilen-Eozin ile boyanmıştır. Dört gruba ait Hemotoksilen-Eozin ile boyanmış kesit örnekleri Resim 4.1-4.3’de gösterilmektedir. Toplam 28 adet ratın lümen kesit alanı freeware imaj analiz sistemleri (ImageJ, version 1.341; National Institutes of Health, Bethesda, MD) bilgisayar programı ile ölçülmüştür. Sonuçlar standart sapmalarıyla tablo 4.1 ve grafik 4.1’de sunulmuştur.

Tablo 4.1 : Vazospazm sonrası baziller arterlerin kesit çap ölçümleri (µm)

	Ort±SD (µm)	Azalma (%)
Grup 1 (kontrol)	2342±386	-
Grup 2 (SAK)	1008±109	%57
Grup 3 (SAK+sildenafil 5mg/kg)	1972±118	%16.8
Grup 4 (SAK+sildenafil 15mg/kg)	2201±132	%7.1

Dört gruba ait veriler ANOVA testi ile değerlendirildi (Tablo 4.2.). Sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0.0001$).

Tablo 4.2. Tüm gruplar için uygulanan ANOVA test

ARTER ÇAP ÖLÇÜMLERİ

	Değişkenlerin karelerinin toplamı	df	Değişken karelerinin ortalaması	F	Anlamlılık
Gruplar arası	2212429,9	3	737476,619	15,624	0 ,0001
Grup içi	1132866,6	24	47202,774		
Toplam	3345296,4	27			

p<0.05 değerleri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Subaraknoid kanama oluşturulan ve tedavi verilmeyen Grup 2’de baziller arterlerin kesit çap ölçümleri kontrol grubuna göre (grup 1) %57 oranında azalmaktayken, subaraknoid kanama oluşturulan ve 5mg/kg’a sildenafil uygulanan grupta (grup3) %16.8 oranında saptandı. Subaraknoid kanama oluşturulan ve 15 mg/kg’a sildenafil verilen grupta ise (grup 4) azalma oranı %7.1 olarak belirlendi. (tablo 4.1 ve grafik 4.1) (Resim 4.1-4.3)

Elde edilen kesit çap ölçümleri Post Hoc Tukey testi ile karşılaştırıldı. p<0.05 istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi. Buna göre kontrol grubu olan grup 1 ile subaraknoid kanama oluşturulan ve tedavi verilmeyen grup 2’nin karşılaştırılmasında p<0.0001 değeri elde edildi. Subaraknoid kanama oluşturulan ve tedavi verilmeyen grup 2 ile subaraknoid kanama oluşturulan ve 5 mg/kg’a sildenafil verilen grup 3 karşılaştırıldığında p<0.0001 değeri elde edildi. Yine grup 2 ile subaraknoid kanama oluşturulan ve 15 mg/kg’a sildenafil verilen grup 4 baziller arter kesitleri karşılaştırıldığında p<0.018 saptandı. Ancak grup 3 ile grup 4 sonuçları karşılaştırıldığında p>0.228 değeri saptandı. Elde olunan bu sonuçlara göre sildenafilin vazospazmı önemli derecede engellediği, ancak doz miktarı ile tedavinin etkinliğinin artmadığı gösterildi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Gruplar arası karşılaştırmanın yapıldığı Post-Hoc Tukey testi

Bağımlı Değişken: ÇAP ÖLÇÜMLERİ

(I) Grupları (J) Grupları	Ortalama fark (I-J)	Standart Hata	Anlamlılık	%95 güvenlik aralığı	
				Alt sınır	Üst sınır
SAK Kontrol Kontrol grubu	-743,5714	116,1314	0,0001	-1063,9362	-423,2066
SAK+5mg sildenafil	-602,2857	116,1314	0,0001	-922,6505	-281,9209
SAK+15mg sildenafil	-373,8571	116,1314	0,018	-694,2219	-53,4924
SAK+5mg sild SAK+15mgsildenafil	228,4286	116,1314	0.228	-91,9362	548,7934

p<0.05 değerleri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4.2. Serebellar doku lipid peroksid miktarları

48. saatte dört gruba ait serebellar dokulardan elde edilen lipid peroksidasyon değerleri tablo 4.4 ve grafi 4.2 'de sunulmaktadır.

Tablo 4.4 : Serebellar dokuların lipid peroksidasyon değerleri (nmol TBA / g yaş doku)

	Ort±SD (nmol TBA/yaş doku)	Artış (%)
Grup 1 (kontrol)	113.6±5.1	-
Grup 2 (SAK)	200.1±5.5	%76.9
Grup 3 (SAK+sildenafil 5mg/kg)	137.7±4.5	%21.2
Grup 4 (SAK+sildenafil 15mg/kg)	130.8±4.0	%15

Dört grubun lipid peroksidasyon değerleri ANOVA testi kullanılarak değerlendirildi. Sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (Tablo 4.5) (grafik 4.2)

Tablo 4.5. Tüm gruplar için uygulanan ANOVA testi

Lipid peroksid

	Değişkenlerin karelerinin toplamı	df	Değişken karelerinin ortalaması	F	Anlamlılık
Gruplar arası	29927,964	3	9975,988	422,513	0,0001
Grup içi	566,666	24	23,611		
Toplam	30494,630	27			

p<0.05 değerleri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Subaraknoid kanama oluşturulan ve tedavi verilmeyen grup 2’de lipid peroksid miktarı kontrol grubuna göre (grup 1) %76.9 oranında artmaktayken, sildenafil 5mg/kg’a verilen gruba ait lipid peroksid miktarı, kontrol grubuna göre (grup 1)%21.2 oranında arttığı saptandı. Subaraknoid kanama oluşturulan ve 15 mg/kg’a sildenafil verilen grupta ise (grup 4) lipid peroksid miktarında artma oranı %15 olarak belirlendi. (tablo 4.4 ve grafik 4.1)

Elde edilen lipid peroksid miktarları Post Hoc Tukey testi ile karşılaştırıldı. p<0.05 istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi. Buna göre kontrol grubu olan grup 1 ile subaraknoid kanama oluşturulan ve tedavi verilmeyen grup 2’nin karşılaştırılmasında p<0.0001 değeri elde edildi. Subaraknoid kanama oluşturulan ve tedavi verilmeyen grup 2 ile subaraknoid kanama oluşturulan ve 5 mg/kg’a sildenafil verilen grup 3 karşılaştırıldığında p<0.0001 değeri elde edildi. Yine grup 2 ile subaraknoid kanama oluşturulan ve 15 mg/kg’a sildenafil verilen grup 4 baziller arter kesitleri karşılaştırıldığında p<0.0001 saptandı. Ancak grup 3 ile grup 4 sonuçları karşılaştırıldığında p>0.062 değeri saptandı. Elde olunan bu sonuçlara göre sildenafilin lipid peroksidasyonunu önemli derecede azalttığı, ancak doz miktarı ile tedavinin etkinliğinin artmadığı gösterildi (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Gruplar arası karşılaştırmanın yapıldığı Post-Hoc Tukey testi

Bağımlı Değişken: Lipid peroksid

(I) Grupları (J) Grupları	Ortalama fark (I-J)	Standart Hata	Anlamlılık	%95 güvenlik aralığı	
				Alt sınır	Üst sınır
SAK Kontrol Kontrol grubu	86,4857	2,5973	0,0001	79,3207	-93,6508
SAK+5mg sildenafil	-62,4143	2,5973	0,0001	55,2492	69,5793
SAK+15mg sildenafil	69,3143	2,5973	0,0001	62,1492	76,4793
SAK+5mg sild		2,5973		-0,2650	
SAK+15mgsildenafil	6,9000		0,062		14,0650

p<0.05 değerleri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

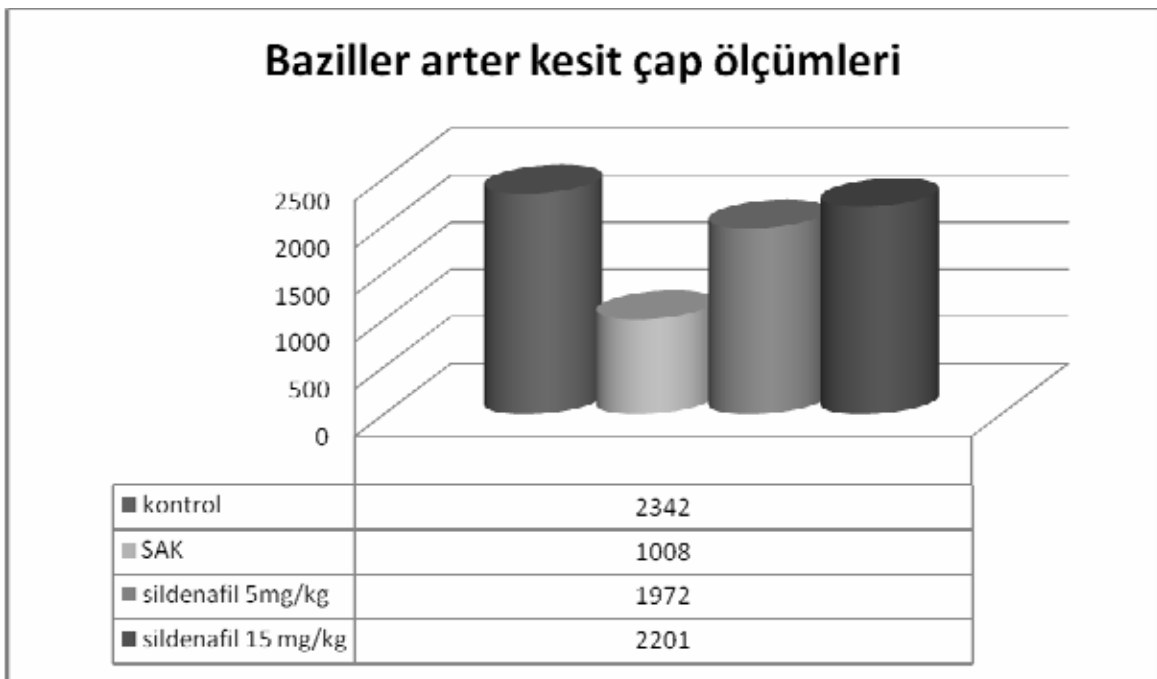
4.3. Gruplardaki apoptoz sonuçları

Kontrol grubunda (grup 1) In Situ Cell Death Detection kit, POD (Roche, Germany) kiti ile immunohistokimyasal boyamada endotelial hücrelerin hiçbirinde pozitif boyanma saptanmadı (Resim 4.4 ve 4.5). Grup 2 ile subaraknoid kanama oluşturulan ve sildenafil 5mg/kg'a verilen grup 3 ve SAK oluşturulan ve sildenafil 15 mg/kg verilen grup 4'teki apoptotik endotelial hücre sayıları Grafik 4.3'te verilmiştir. Grupların elde edilen apoptotik hücre sayıları Post Hoc Tukey testi ile karşılaştırıldı. p<0.05 anlamlı kabul edildi. Grup 1 ile grup 2'nin karşılaştırılmasında p<0.0001 değeri elde edildi ve istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi. Grup 2 ile grup 3'ün ve grup 2 ile grup 4'ün karşılaştırılmasında p>0.05 değeri elde edildi ve istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı görüldü. (p>0.05) (Resim 4.4-4.9).

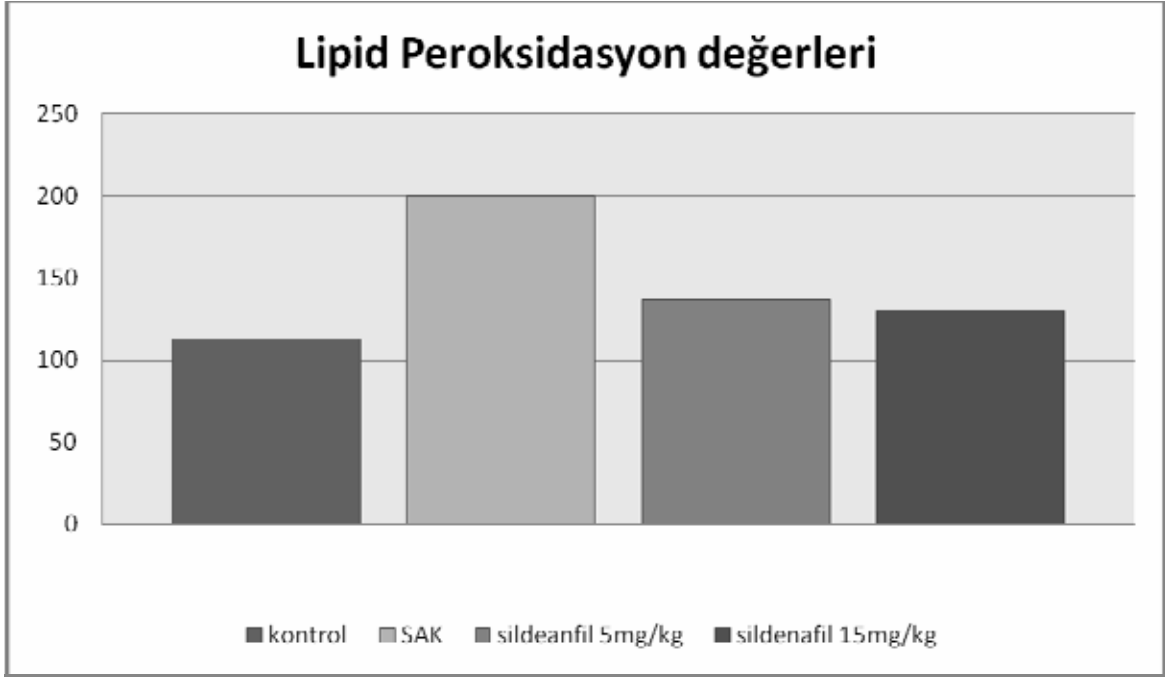
Elde edilen sonuçlara göre kontrol grubu grup 1'de In Situ Cell Death Detection Kit, POD (Roche, Germany) ile yapılan immunohistokimyasal çalışmada hiçbir vasküler endotelial hücrede boyanma olmadığı saptandı. SAK oluşturulan grup 2 de immunohistokimyasal olarak boyanan vasküler endotelial hücre sayısının tüm endotelial hücre sayısına göre oranın ortalama %88, tedavi grupları grup 3'te bu oranın %83 ve grup 4'te %81 olduğu görüldü. Grup 1 ile grup 2, 3 ve 4 değerlerinin karşılaştırılmasında sonuçların istatistiksel açıdan anlamlı olduğu saptanırken (p<0.0001), grup 2 ile tedavi

grupları olan grup 3 ve grup 4'ün apoptotik hücre oranlarının karşılaştırılmasında sonuçların istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı, sildenafilin SAK sonrası görülen apoptotik hücre sayısını etkilemediği görüldü ($p>0.05$).

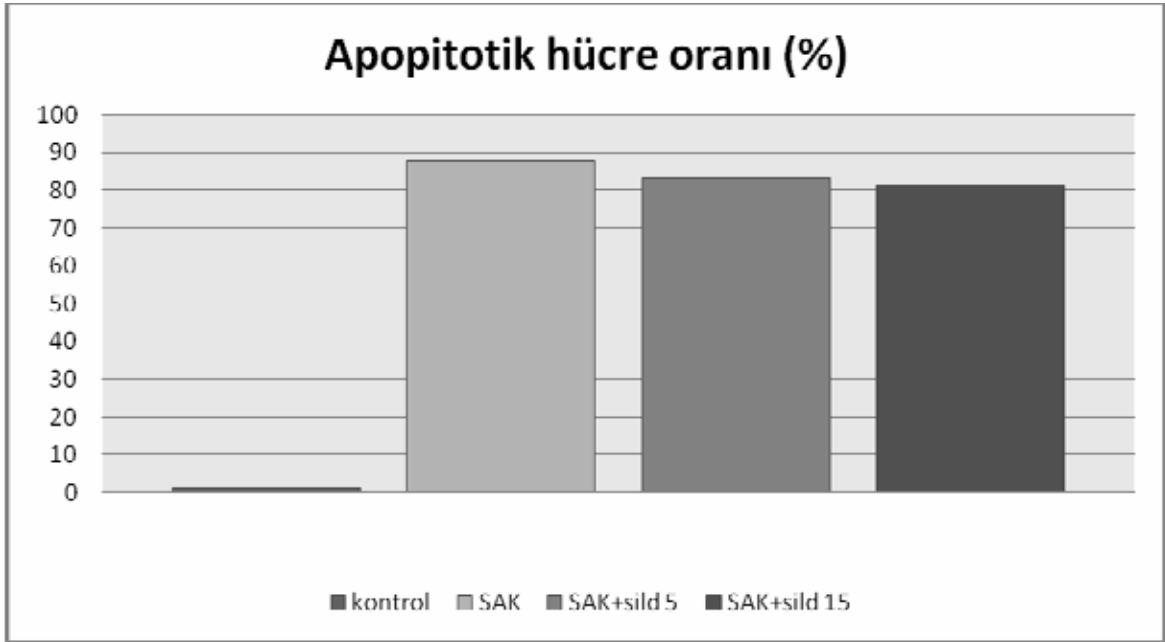
Gruplara kaspaz 3, kaspaz 8, p 53, sitokrom c apoptotik markerları çalışıldı. Grup 1'de vasküler endotelial hücrelerde apoptotik boyanma gözlenmezken, grup 2'de ve tedavi grupları 3 ve 4'te apoptotik hücre pozitifliği saptandı. Tedavi gruplarında ve kontrol grubunda anlamlı farklılık bulunmadı. (Resim 4.10-4.23)



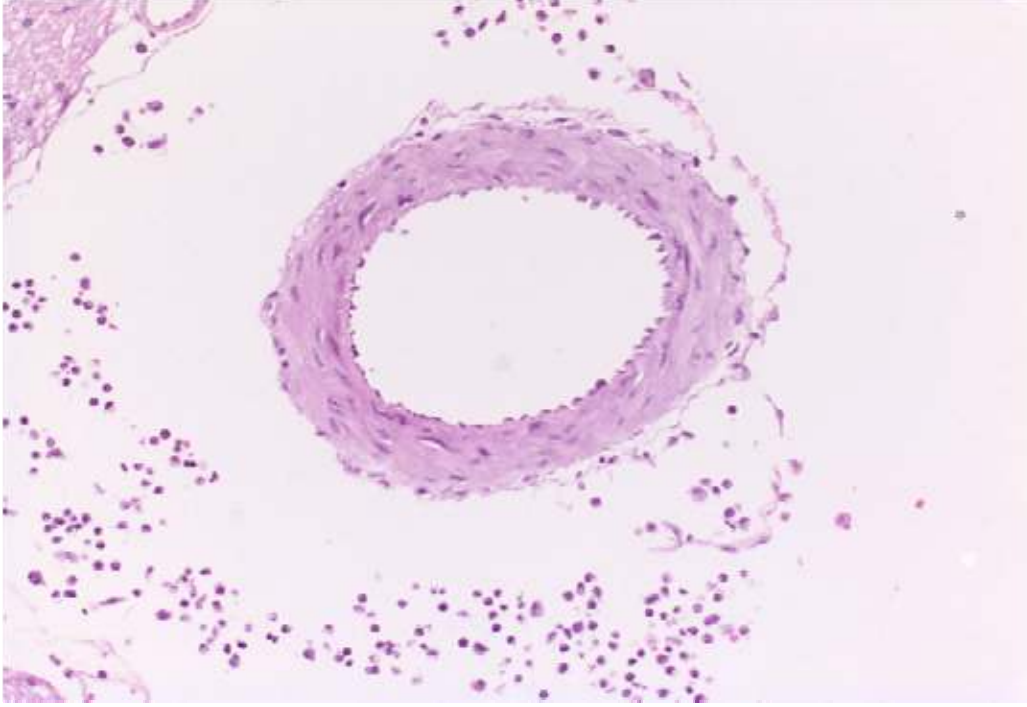
Grafik 4.1. Vazospazmda baziller arter kesit çap ölçümleri (µm)



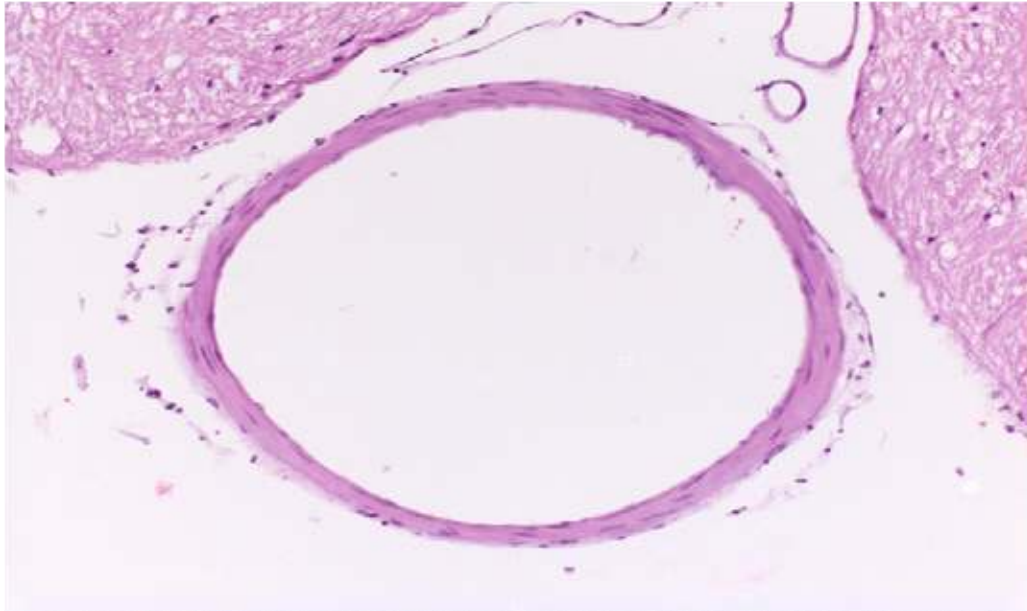
Grafik 4.2. Vazospazm sonrası serebellar dokuda lipid peroksidasyon değerleri (nmol TBA/g yaş doku)



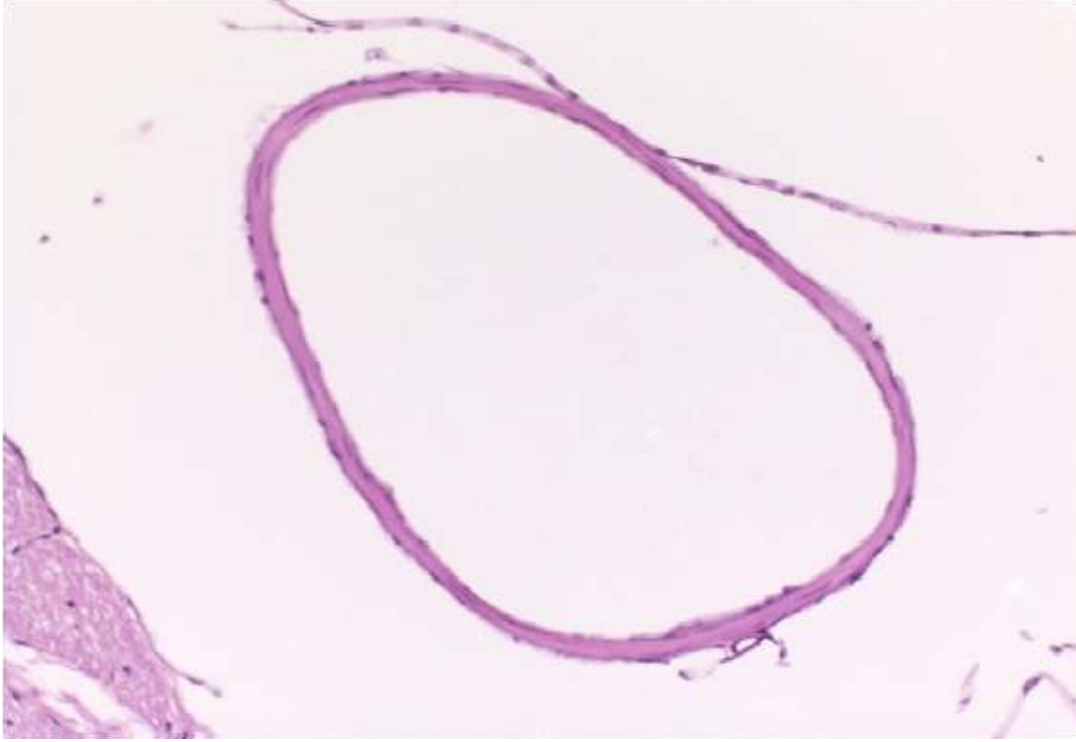
Grafik 4.3. Gruplardaki apoptotik hücre oranları



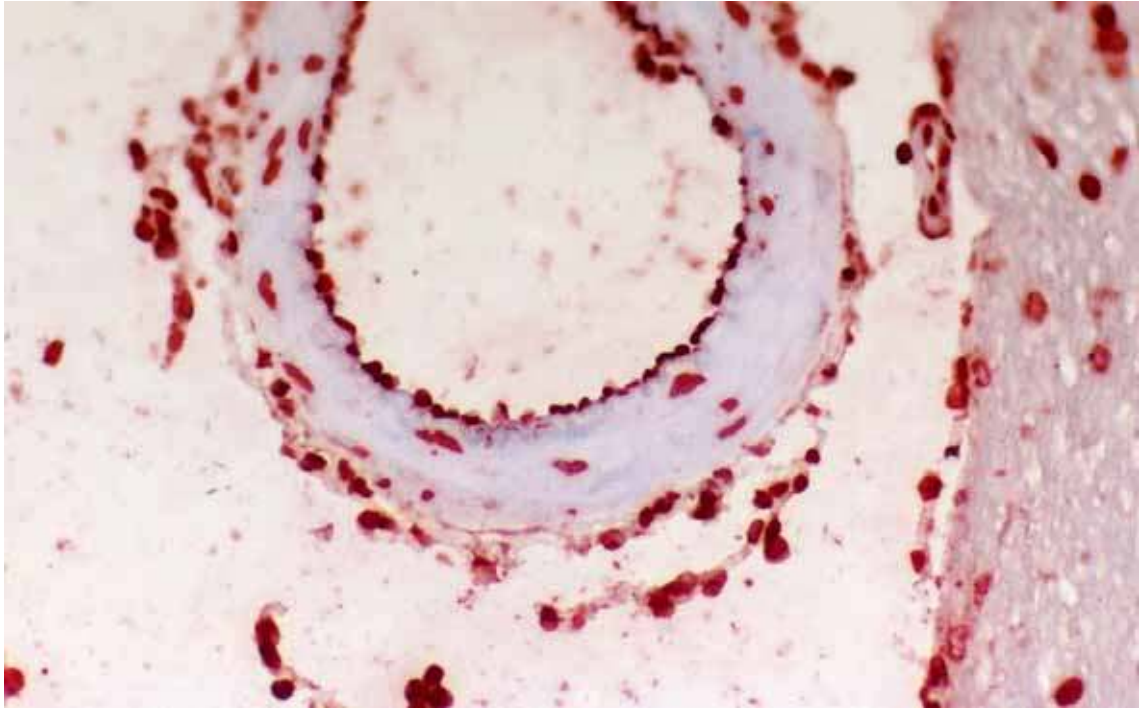
Resim 4.1. Hemotoksilen-Eozin ile boyalı subaraknoid kanama yapılan gruptan vazospastik baziller arter kesiti



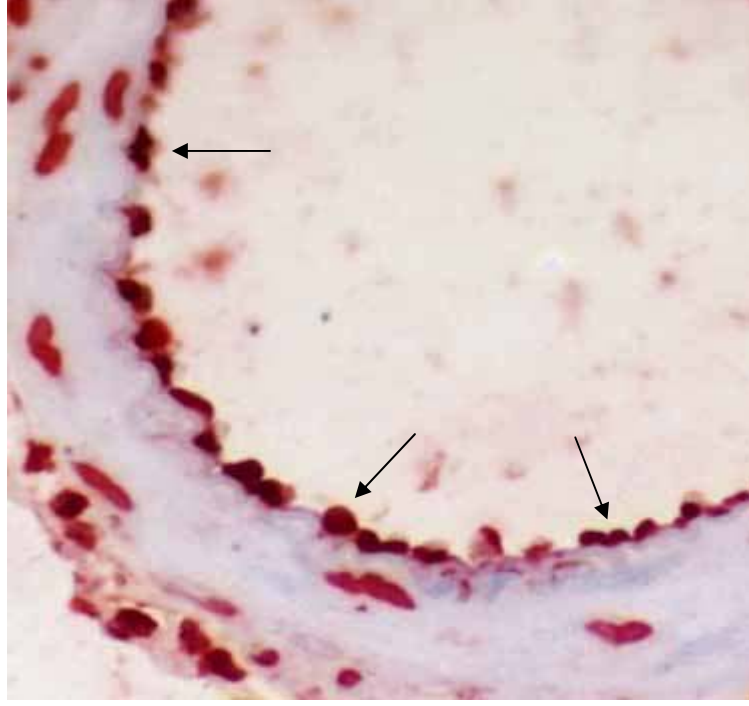
Resim 4.2. Subaraknoid kanama yapılmış ve 5mg/kg sildenafil verilmiş gruba ait Hemotoksin Eozin ile boyanmış baziller artere ait damar kesiti



Resim 4.3. Normal rat baziller arter kesiti (grup 1)



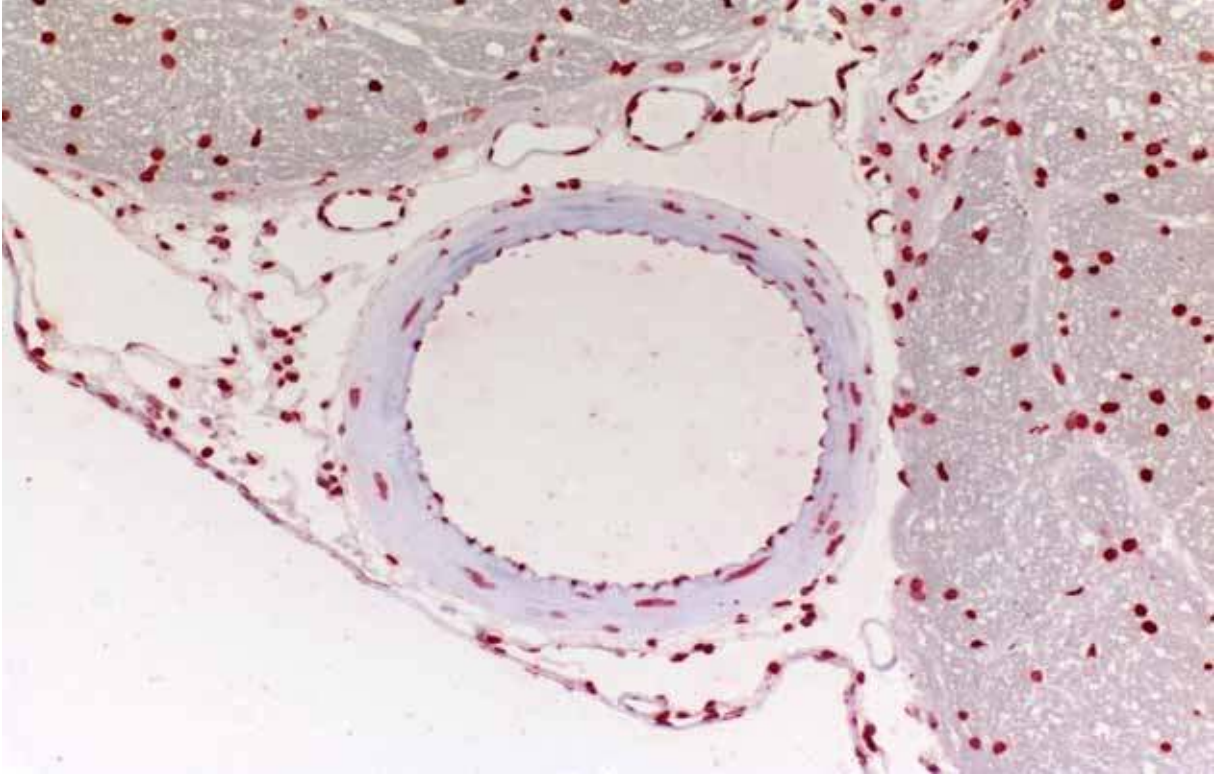
Resim 4.4. Subaraknoid kanama yapılmış gruba ait apopitozu değerlendirmede TUNEL boyama metodu uygulanmış baziller artere ait damar kesiti. Endotelyal hücrelerin nukleuslarının TUNEL ile pozitif boyandığı görülüyor. (20X büyütme)



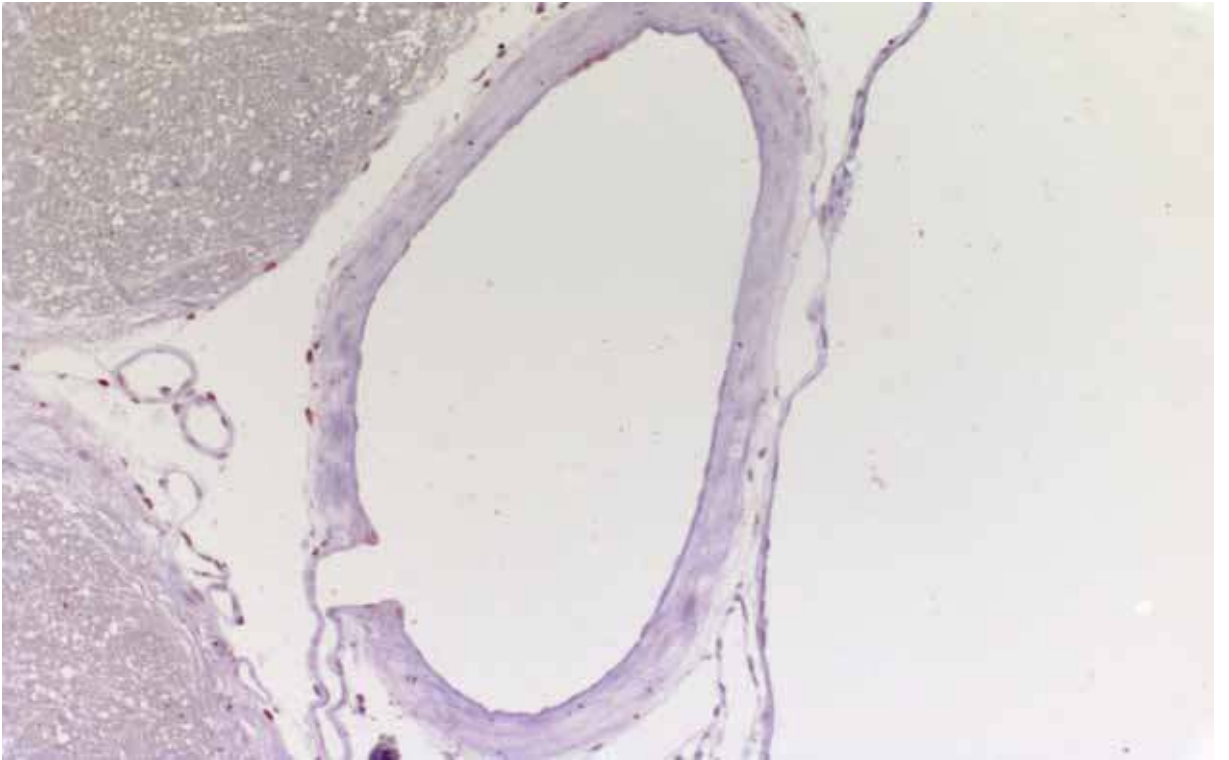
Resim 4.5. Aynı kesitin büyütülmüş görüntüsü. Oklar TUNEL ile pozitif boyanan endotelial hücreleri gösteriyor.



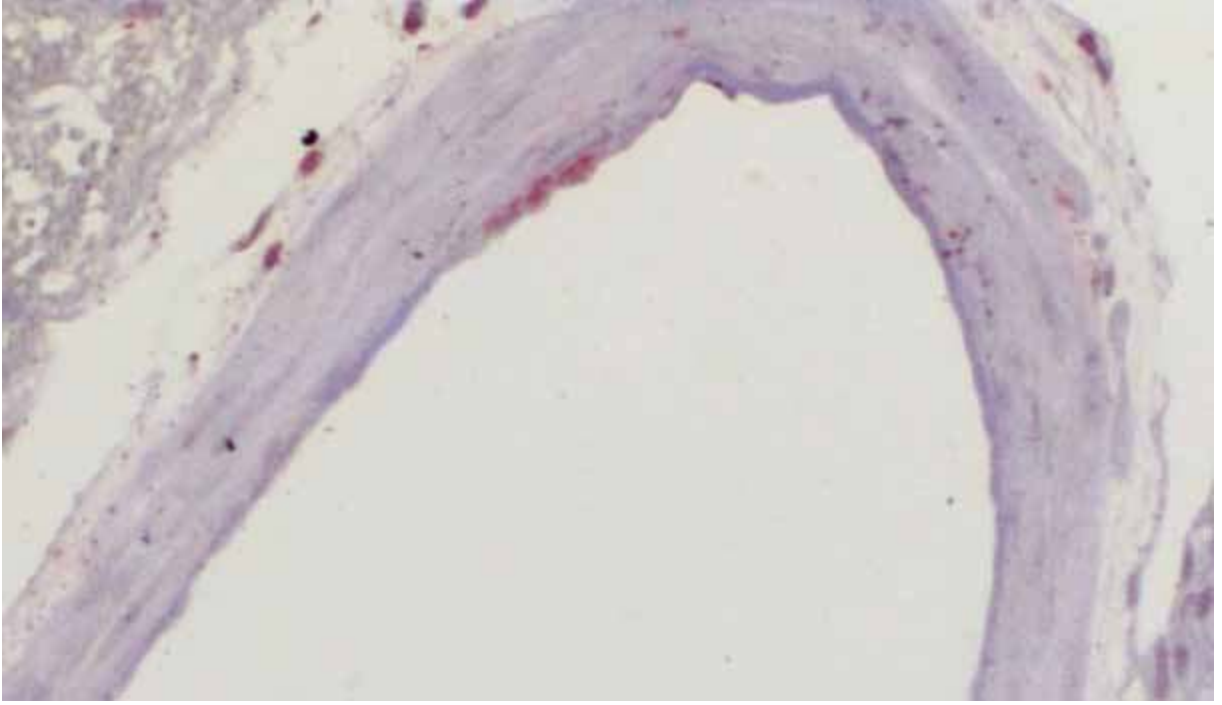
Resim 4.6. Subaraknoid kanama yapılmış ve sildenafil 5 mg/kg verilmiş gruba ait baziller arter kesitinin TUNEL boyaması. Kesitte TUNEL pozitif endotelial hücreler görülüyor.



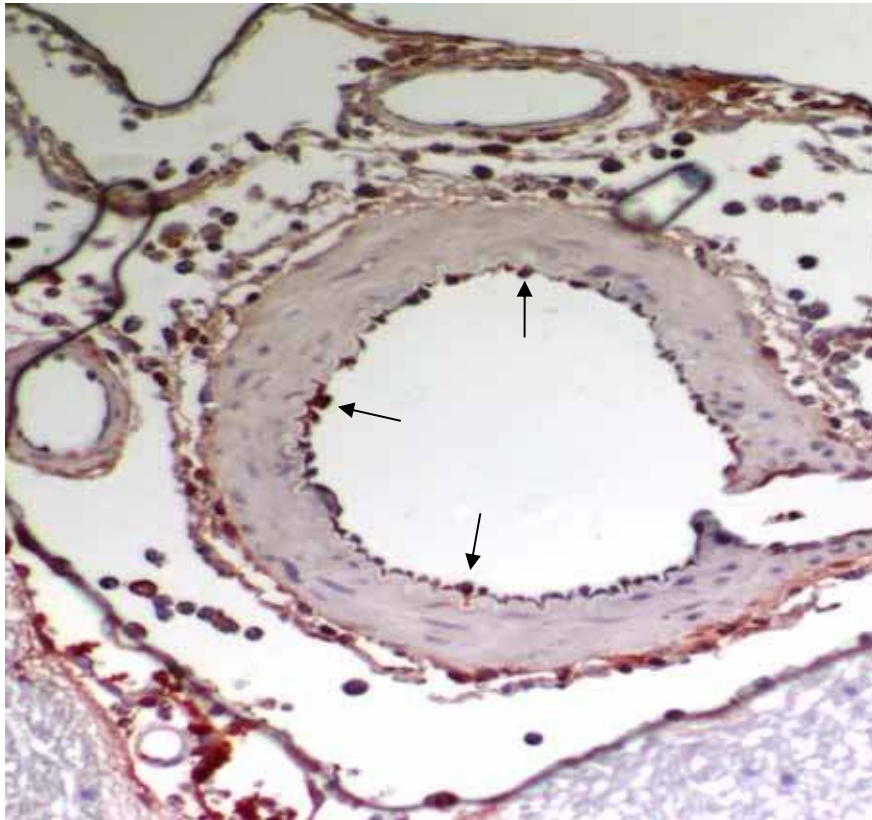
Resim 4.7. Subaraknoid kanama yapılmış ve 15 mg/kg'a sildenafil verilmiş gruba ait baziller arter kesitinin TUNEL boyaması.



Resim 4.8. Kontrol grubuna ait baziller arter kesitinin TUNEL boyaması. Apoptotik hücre bulunmamaktadır.



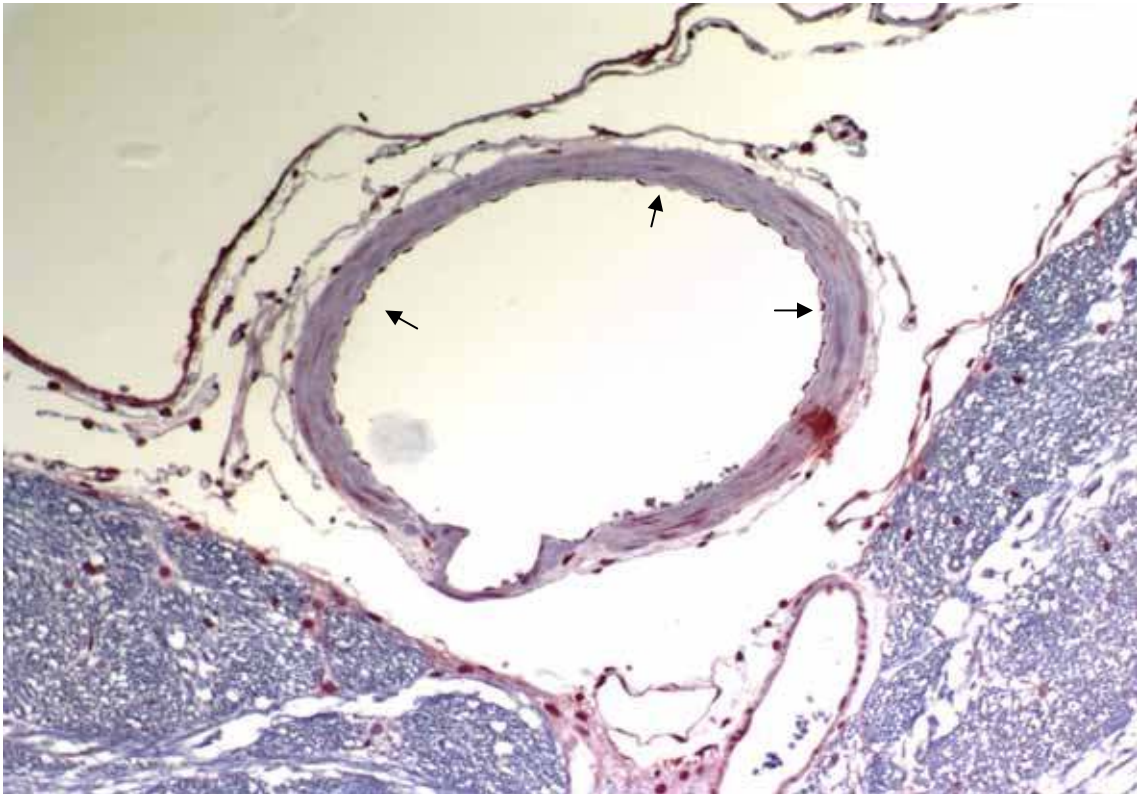
Resim 4.9. Kontrol grubuna ait baziller arter kesitinin büyütülmüş görüntüsü.



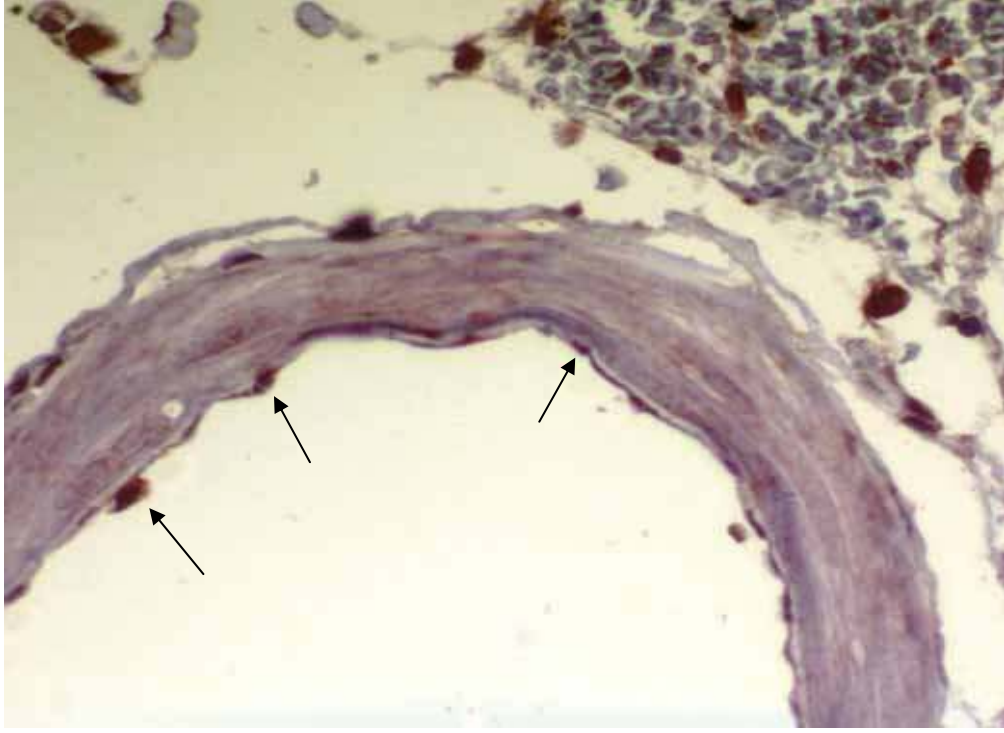
Resim 4.10. Subaraknoid kanama yapılmış gruba ait baziller arter damar kesitinin Kaspaz 3 ile yapılan immunohistokimyasal boyaması. Endotelial hücrelerin sitoplazmalarının Kaspaz 3 ile pozitif boyandığı görülüyor. (Ok ile işaretlenmiş alanlar) (20X büyütme)



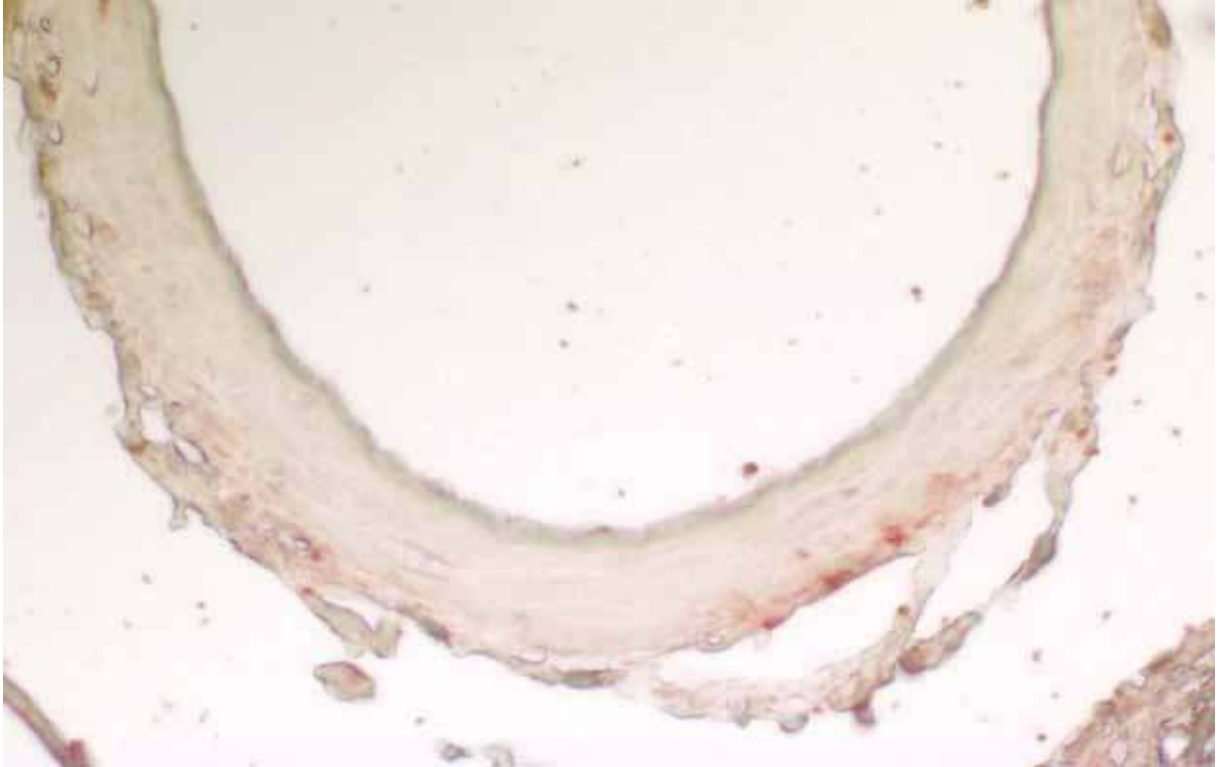
Resim 4.11. Aynı kesitin büyütülmüş görüntüsü. Oklar apoptotik hücreleri gösteriyor. (X40)



Resim 4.12. SAK uygulanmış ve sildenafil 5 mg/kg verilmiş gruba ait baziller arter damar kesitinde. Kaspaz 3 ile pozitif boyanmış apoptotik endotelial hücreler görülüyor (Okular) (X20)



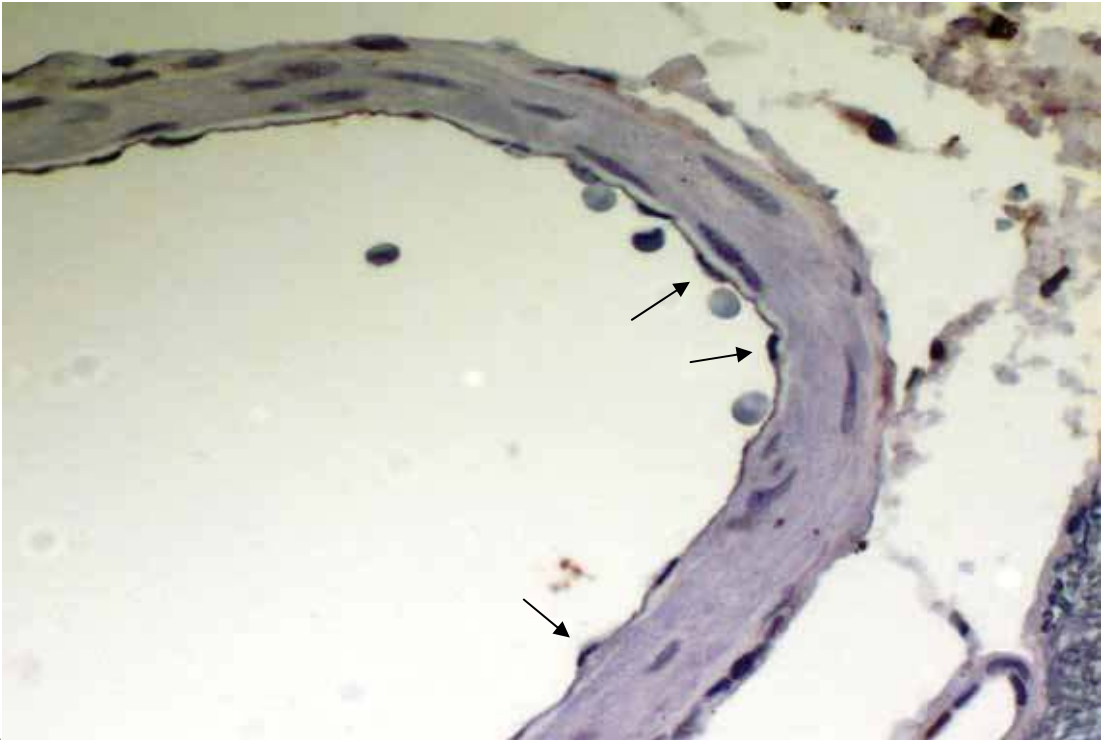
Resim 4.13. SAK uygulanmış ve 15 mg/kg sildenafil verilmiş gruba ait kesit (X40).



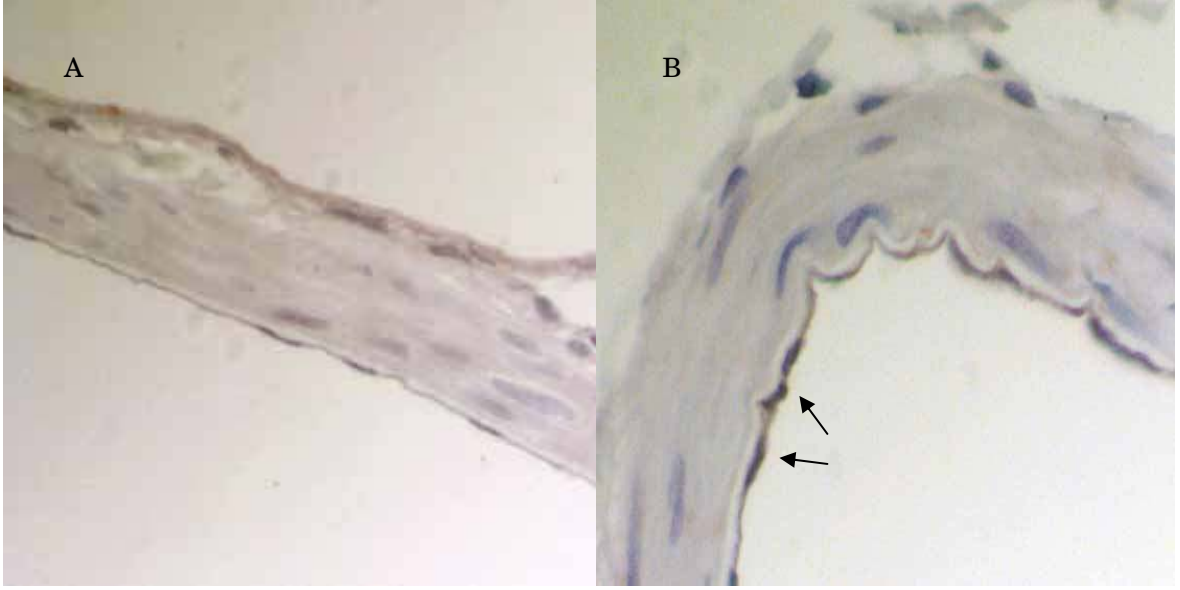
Resim 4.14. Grup 1' ait herhangi bir işlem uygulanmamış baziller arter kesiti. Kaspaz 3 ile herhangi bir apopitotik boyanma olmadığı görülüyor.



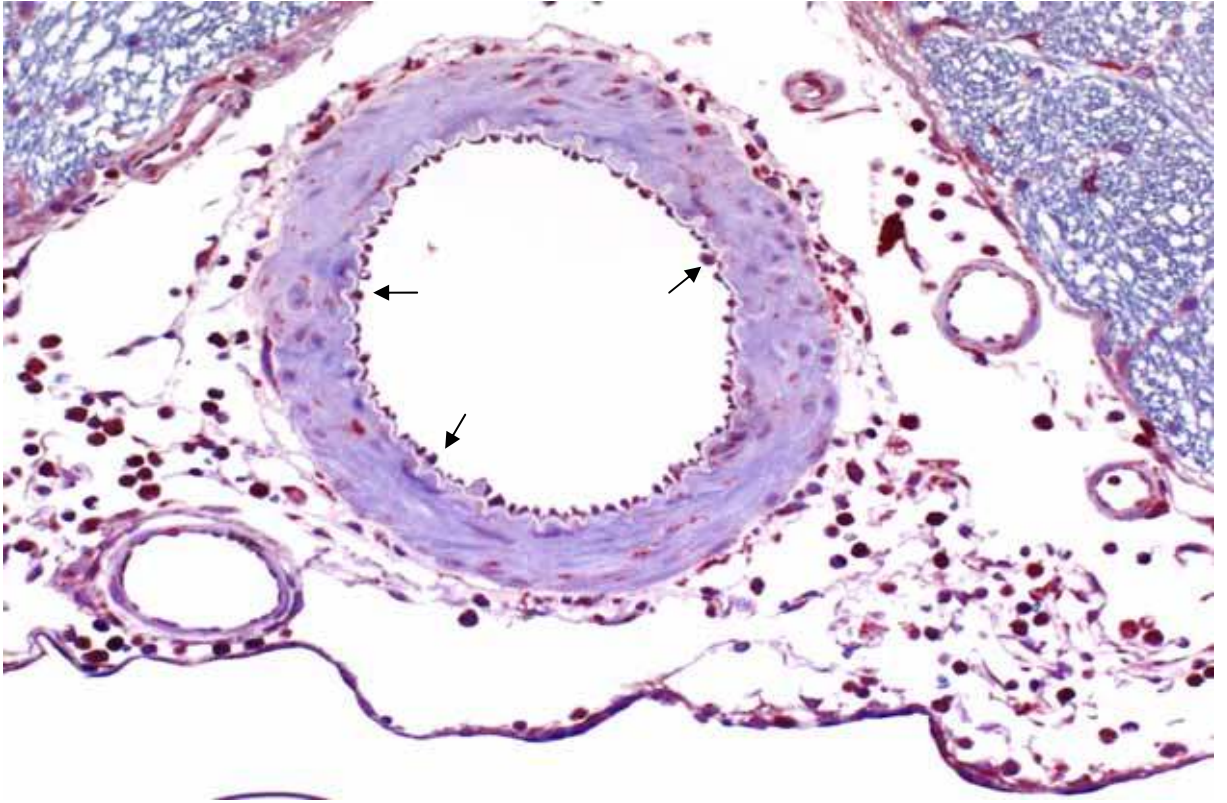
Resim 4.15. Grup 2 baziller arter kesitine ait p53 immunohistokimyasal boyama ile apoptotik hücreler görülüyor. (Oklar apoptotik hücreleri gösteriyor)



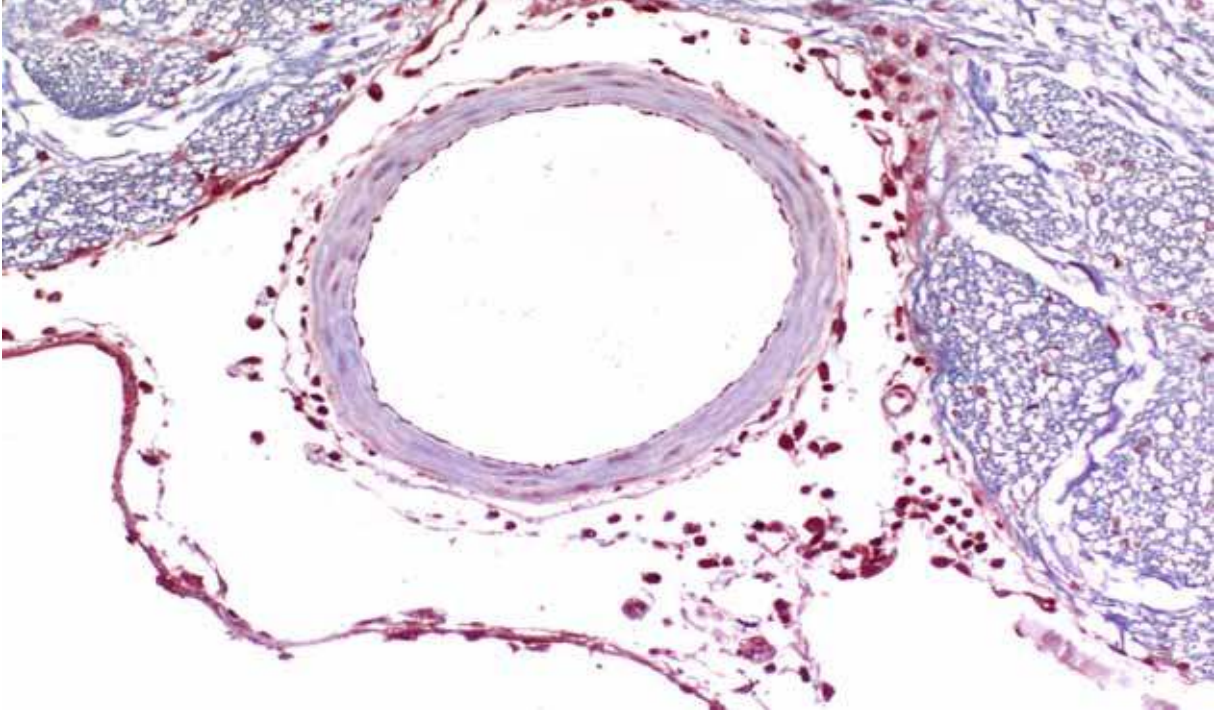
Resim 4.16. Grup 3 baziller arter kesiti. Tedavi grubunda da apoptotik hücrelerin olduğu görülüyor.



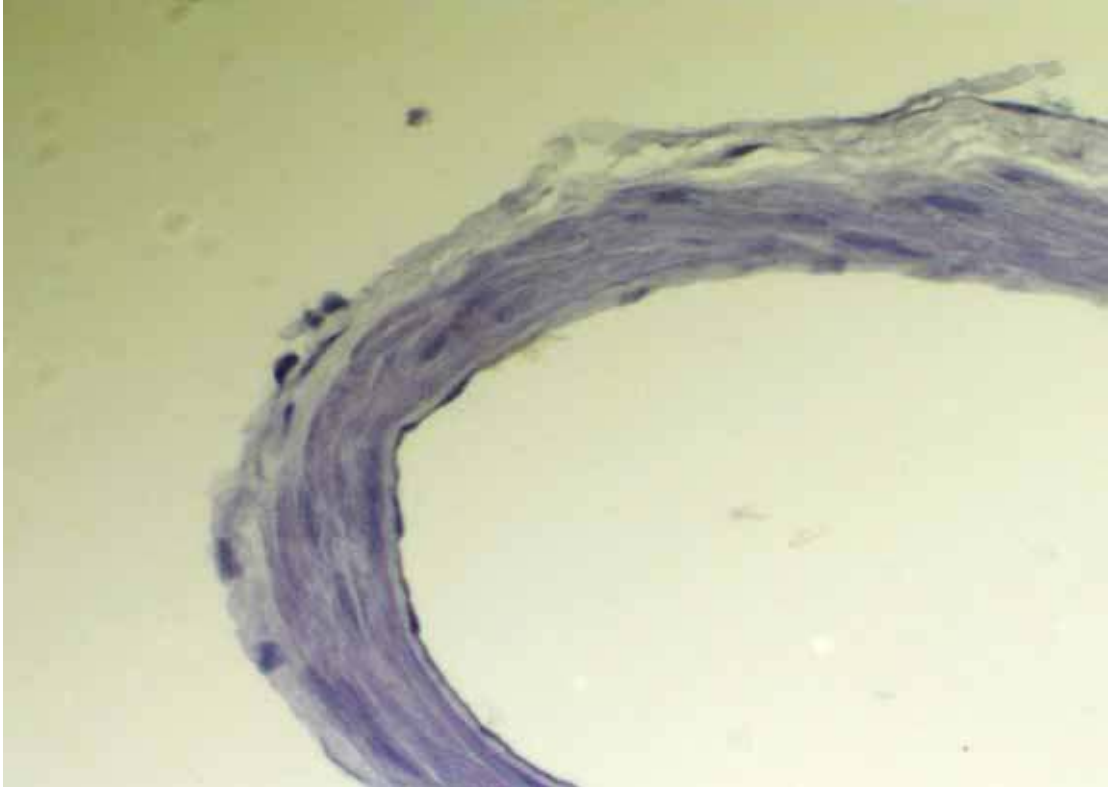
Resim 4.17-4.18. A) Grup 1'e ait baziller arter kesiti. p53 ile herhangi bir pozitif boyanma gösteren endotel hücresi görülüyor. B) Grup 4'e ait kesitte oklar ile apoptotik hücreler gösterilmekte.



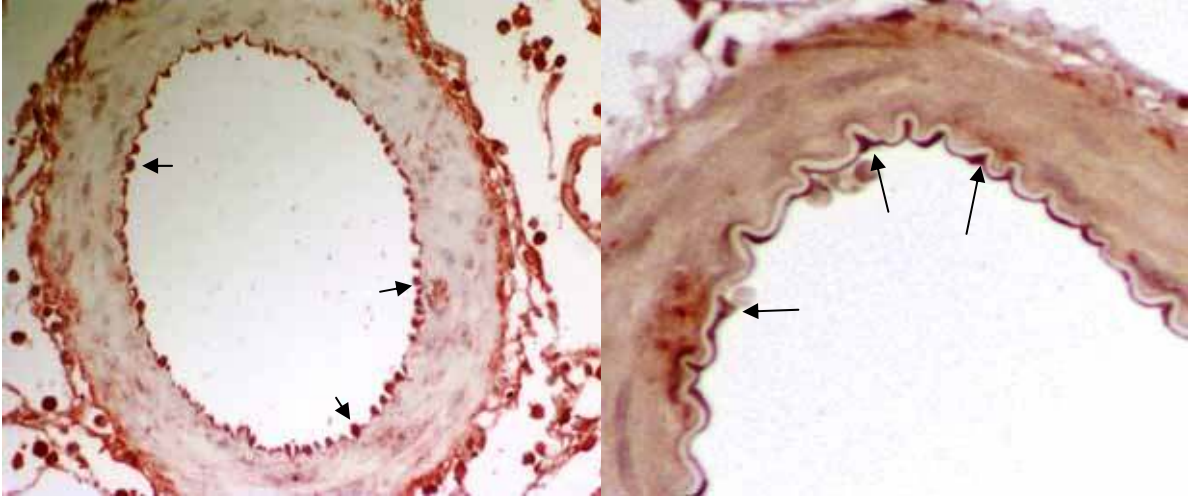
Resim 4.19 SAK grubuna ait baziller arter kesiti. Ok ile işaretli alanlar apoptotik hücreleri işaret etmekte. (X20) (sitokrom c)



Resim 4.20 SAK uygulanmış ve sildenafil 5 mg/kg verilen gruba ait baziller arter kesitinde apoptozun olduğu görülüyor. (X20) (sitokrom c)



Resim 4.21. Grup 1'e ait herhangi bir işlem uygulanmamış baziller arterin sitokrom c ile boyanmasında herhangi bir apoptotik hücre olmadığı görülüyor. (X40)



Resim 4.22-23. A) kaspaz 8 ile boyanan grup 2'ye ait baziller arter kesiti B) Grup 3'e ait kaspaz 8 ile boyanmış baziller arter kesiti (X40)

5. TARTIŞMA

Serebral vazospazm, intrakranial anevrizma rüptürü ve beraberinde subaraknoidal kanama sonrası gelişebilen, morbidite ve mortaliteyi arttıran önemli bir komplikasyondur. Oluşum sebepleri halen net olarak anlaşılamamış olsada, gelişimindeki en önemli faktörün subaraknoidal mesafedeki kan pıhtısı miktarı olduğu artık kabul edilen bir gerçektir. Kanama nedeniyle intrakranial basınç artışı, serebral kan akımı ve serebral perfüzyon basıncında düşme meydana gelir. Bunun neticesinde serebral vasküler dokular ve nöronlarda oksijen desteğinde azalma ve bununla beraber serebral arterlerin beslenmesinin sağlandığı rete vatorium denilen tüm damar tabakasına penetre olan delikçiklerin kan pıhtısı ile kapanması gerçekleşir. Meydana gelen bu olaylar vasküler ve nöronal dokuların iskemik sürece girmelerinde ilk basamaktır (130). Daha sonrasında kan hücrelerinin başlattığı akut inflamasyon, serbest radikal üretimi, lipid peroksidasyonu, vasküler endotelial hücre harabiyeti, NO azalması, endotelin miktarının artması, vasküler hücre membran harabiyeti neticesinde intrasellüler kalsiyum birikimi gibi bir çok iç içe geçmiş reaksiyonlar, serebral damarlarda vazokonstriksiyon ve spazm gelişimiyle beraber serebral kan akımının dahada azalmasına neden olarak iskemik süreci hızlandırır. İskemi gelişmesi dokularda apoptotik ve nekrotik hücre ölümüne neden olarak morbidite ve mortalitenin artmasına sebep olur.

Kanama sonrası eritrositlerin hemolizi ile açığa çıkan oksihemoglobinin methemoglobine dönüşümü sırasında ortamda aşırı reaktif oksijen radikallerinin üretimi olur ve vazospazm gelişim sürecinde oksijen radikallerinin çok önemli rolü vardır. Shishido, Kamii ve ark. deneysel olarak SAK oluşturdıkları farelerde dışardan superoksid dismutaz kullanmışlar ve superoksid radikal oluşumunu önleyerek vazospazmı azalttıklarını bildirmişlerdir (131,132). SAK sonrası vasküler düz kas hücrelerinde ve adventisyal fibroblastlarda serbest radikal üretiminde yer alan NADPH oksidaz adlı enzimin aktivitesinde artış olmaktadır. Zheng ve Shin yaptıkları farklı çalışmalarda SAK sonrası NADPH oksidazın sitozolik komponenti p47^{phox} adlı proteinin plazma membranına transloke olarak enzimin aktivite olduğunu bulmuşlar ve vazospazm patogeneğinde çok bir kritik bir rol oynadığını belirtmişlerdir (89,133). Araştırmacılar apocynin ve

difenileneidonium adlı NADPH oksidaz enzim inhibitörleri ile vazospazma karşı başarılı sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir. Serbest radikal oluşumunun bir önemli etkisinde, NO'ı peroksinitrite çevirerek hem NO miktarını azaltmaları hemde peroksinitritin hidroksiradikale dönüşümüyle ROS üretimini arttırmalarıdır (31). Serbest radikallerin vazospazm sürecindeki en önemli etkisi hücre membranlarındaki yağ asidiyle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonuna neden olmasıdır. Oluşan lipid peroksidasyonu neticesinde vasküler endotelial hücreler hasarlanır ve vasküler tonusun düzenlenmesinde vazodilatatör etkili NO üretilemez hale gelir. Bu bilgiler ışığında SAK'da antioksidan ajanların vazospazm tedavisindeki etkileri ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. 1984 yılında Asona ve ark. antioksidan ajan olan 1,2-bis (nikotinamid) propane'ın vazospazmı azalttığını gösterdiler. 1991 yılında Vollmer ve ark. tavşan modelinde bir antioksidan ajan olan ve lipid peroksidasyonun zincirleme reaksiyonları sırasında gerekli olan Fe²⁺ 'i bağlayan desferoksaminin vazospazmdaki koruyucu etkisini gösterdiler (18).

Serebral vazospazm gelişiminde intrasellüler kalsiyum birikimide patogeneizde çok önemli rol almaktadır. Bunun üzerine SAK sonrası kalsiyum antagonistleri klinikte kullanılmaya başlanmış ancak başarılı sonuçlar elde edilememiştir. Bunun nedeni üzerine yapılan araştırmalarda Yasuo ve ark. köpekler üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarda hücre membranı K⁺ kanallarından BK ve K_V adlı potasyum kanallarının SAK sonrası azaldığını tespit etmişler bunun nedenininde serbest radikal üretimi ile vasküler hücre membranlarının lipid peroksidasyonuna sekonder hasar görmesi olduğunu belirtmişlerdir. Aynı zamanda lipid peroksidasyonuna ek olarak bu kanalların fonksiyon görmelerinin oksihemoglobin tarafından engellendiğini bildirmişlerdir (8). Özellikle oksihemoglobin voltaj bağımsız kalsiyum kanallarını etkileyerek hücre içi kalsiyum artışına neden olur. Aynı zamanda protein kinaz C ve tirozin kinaz adlı enzimlerin aktivasyonlarına yol açarak hücre içinde kadesmonun fosforile olmasına böylece myozin ve aktin arasında çok daha güçlü bir bağ oluşumuna neden olarak vasküler dokunun uzun süreli kasılmasına neden olur (30).

İnflamatuvar reaksiyonlar, serbest radikal oluşumu, lipid peroksidasyonu gibi reaksiyonlar neticesinde serebral kan akımının düzenlenmesinde önemli etkileri olan NO miktarının azalması vazospazm oluşum sürecindeki en önemli basamaklardan birini teşkil etmektedir. Suzuki ve Pluta yaptıkları araştırmalarda SAK geçiren hastaların beyin omurilik sıvılarını incelemişler. Neticede NO'in metaboliti olan nitritin normalden çok daha düşük olduğunu saptamışlar, NO miktarının azalmasının vazospazmda çok önemli ve

çok kritik rolü olduğunu bildirmişlerdir (70,72). Jung ve ark. maymunlar üzerinde yaptıkları deneysel araştırmada SAK oluşturdukları maymunların beyin omurilik sıvılarında ADMA miktarlarında artış tespit etmişler ve bu durumun NO azalmasına bağlı vazospazm olduğunu yayınlamışlardır (85). Egemen, Thomas ve Frazee SAK oluşturdukları gruplara NO ve NO donörlerini intratekal olarak uygulamışlar ve vazospazmı azalttıklarını yayınlamışlardır (134,135,136). Yine Shibuya ve ark. NO miktarının azalmasının Rhokinazın artışına neden olduğu konusunda uzun süreli düz kas kontraksiyonu ile ilişkili olduğunu bildirerek AT877 adlı Rhokinaz inhibitörü kullanarak anlamlı antivazospastik aktivite elde etmişlerdir (87). Sobey ve ark. ise vazospazmın sadece azalmış NO miktarı ile değil aynı zamanda artmış PDE salınımı ve azalmış cGMP ile ilişkili olduğunu belirtmiştir (137).

NO miktarının azalmasının vazospazm oluşumunda bu kadar önemli yer almasının nedeni vazodilatatör etkilerinin yanında antiinflamatuvar ve antioksidan etkilerinde olmasıdır. Jeremy NO'nun SAK sonrası inflamatuvar süreçte lökositlerin adhezyonunu sağlayan adhezyon moleküllerinin salınımını inhibe ettiğini, NO miktarının azalmasının lökosit ve plateletlerin artmış adhezyonu ile sonuçlanmasına bunda inflamasyon sürecini hızlandıracağını bildirmektedir (5). Tüm bu süreçler vasküler ve nöronal hücrelerde apoptotik ve nekrotik hücre ölüm sürecini başlatır.

Vazospazm gelişiminin multifaktöriyal ve multiseviyeyi ilgilendiren bir hastalık süreci olması nedeniyle oluşturulacak tedavi stratejisinin tüm bu basamakları engelleyebilecek bir şekilde oluşturulması gerekmektedir. Bu düşünceden yola çıkarak deneysel çalışmamızda sildenafil sitrat kullandık. Sildenafil sitratın SAK sonrası vazospazm, lipid peroksidasyonu ve apoptoza olan etkilerini inceledik.

Sildenafil fosfodiesteraz tip 5'in selektif inhibitörüdür ve klinikte erektil disfonksiyon ve pulmoner hipertansiyon tedavisinde kullanılmaktadır. PDE5 enzimi plateletlerde, vasküler düz kas hücrelerinde ve korpus kavernozumda bulunmaktadır. Sildenafil fosfodiesteraz tip 5 enzimini inhibe ederek cGMP yıkımını engeller ve NO-cGMP yolağının etkilerini artırır (113).

Ratlarda akut vazospazm 48. saatte maksimuma ulaşmaktadır. Bu sebepten dolayı ratların baziller arterleri SAK oluşturulduktan sonra 48. saatte çıkarılarak incelenmiştir. Çalışmamızda yer alan 4 grubu ANOVA testi ile değerlendirdik. Baziller arter çap

ölçümleri arasında tüm gruplar göz önüne alındığında anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0.0001$). Baziller arterlerin çap ölçümleri, SAK oluşturulan grupta kontrol grubuna göre %57 oranında daralmaktayken, SAK'tan sonra 48 saat boyunca günde 5mg/kg'a sildenafil alan grupta kontrol grubuna göre %16.8 oranında tespit edildi. SAK'tan sonra 48 saat boyunca günde 15 mg/kg'a sildenafil alan grupta kontrol grubuna göre %7.1 oranında tespit edildi. Çalışmadaki tüm tedavi grupları Post Hoc Tukey testi kullanılarak SAK kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Bu sonuçlar dahilinde tedavi grupları ile grup 2'nin karşılaştırılmasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulundu ($p<0.0001$). Elde olunan bu sonuçlara göre sildenafilin vazospazmı önemli derecede engellediği, ancak doz miktarı ile tedavinin etkinliğinin artmadığı gösterildi.

Beyin dokusu lipid peroksidasyonu reaksiyonları sonucunda oluşan serbest radikallere karşı, antioksidan savunma mekanizmalarının diğer dokulara oranla daha zayıf olması ve yüksek miktarda demir ve poliansatüre serbest yağ asitleri içermesinden dolayı çok duyarlıdır. Bununla beraber subaraknoid kanama sonrası oluşan patolojik ortamda vücudun serbest radikallere karşı savunma işlevselliğinin azalması neticesinde bol miktarda serbest radikal nöronal ve vasküler yapıların hücresel iskelet yapısı ve DNA'sının parçalanmasına neden olur. Bundan dolayı lipid peroksidasyonun önlenmesi anevrizmal subaraknoid kanama sonrası yüksek olan morbidite ve mortalitenin düşürülmesinde anahtar rol oynamaktadır. Bu deneysel çalışmada serebellar dokudaki lipid peroksidasyon değerleri, en sık kullanılan ve güvenilir olan Uchiyama ve Mihara'nın TBA yöntemi ile ölçülmüştür. Bu yöntemde lipid peroksidasyon değeri spektrofotometrik olarak belirlenmektedir.

Buna göre subaraknoid kanama yapılan ve tedavi verilemeyen grupta lipid peroksid miktarında kontrol grubuna oranla %76.9 oranında artış saptanmıştır. Subaraknoid kanama yapılan ve 5mg/kg'a sildenafil verilen grupta bu oran %21.2 ve subaraknoid kanama yapılan ve sildenafil 15mg/kg'a verilen grupta ise bu oran %15 olarak saptandı. Tüm gruplar ANOVA testi kullanılarak karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.0001$). Mevcut literatür bilgileri dahilinde sildenafilin lipid peroksidasyonuna olan bu etkisinin PDE tip V inhibisyonu ile NO-cGMP yolağının etkilerinin artmasına ve böylece ortamda miktarı artan NO'nin vasküler dokunun adventisiasında üretilen ve superoksid radikalının oluşumuna neden olan NADPH oksidazı inhibe etmesine bağlı olabilir.

Literatürde sildenafilin vazodilatatör etkilerinin yanında serbest radikal üretimine olan etkileri ile ilgili yapılmış çalışmalar vardır. Saima ve ark. Akut respiratuar distress sendromunun etyolojisinde yer alan superoksid üretimi üzerine sildenafilin etkilerini incelemişler ve sildenafilin NO-cGMP yolağının artımı ile superoksid yapımını azalttığını bildirmişlerdir. Yaptıkları araştırmada sildenafilin bu etkisinin NADPH oksidaz enziminin gp91^{phox} adlı protein sentezini azaltarak gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir. Yine Koupparis ve ark. sildenafilin serbest radikal oluşumuna olan etkilerini araştırırken, sildenafilin NADPH oksidazın gp47^{phox} adlı sitozolik komponentinin plazma membranına transloke olmasını inhibe ettiğini yayınlamışlardır (92,138).

SAK sonrası sildenafilin damar lümen çapı, lipid peroksidasyonuna olan etkisi yanında apoptoza olan etkilerini araştırmak amacıyla kesitlerde In Situ Cell Detection kit çalışılmıştır. Buna göre kontrol grubunda TUNEL pozitif hücre saptanmazken, grup 2 de %88 oranında, grup 3'te %83 ve grup 4'te %81 oranında TUNEL pozitif endotelial hücre saptandı. Kontrol grubu grup 2, 3 ve 4 ile karşılaştırıldığında grup 2, 3 ve 4 te anlamlı derecede apoptoz olduğu görüldü ($p<0.0001$). Grup 2 ile grup 3 ve grup 2 ile grup 4 karşılaştırıldığında sildenafilin apoptoz üzerine bir etkisinin olmadığı belirlendi ($p>0.05$) (grafik 3).

In Situ Cell Detection Kit ile yapılan çalışmalarda apoptotik hücrelerle beraber nekrotik hücrelerde de TUNEL ile yanlış pozitif reaksiyon olması nedeniyle kaspaz 3, kaspaz 8, p53 ve sitokrom c adlı apoptotik markerlarda çalışılmıştır (3) Çalışmada sitokrom c apoptotik mitokondriyal yolağı, kaspaz 8 kaspaz bağımlı yolağı, kaspaz 3'te kaspaz bağımlı ve bağımsız yolun ortak ürünü, p53'ü ise tüm apoptotik sürecin en önemli markerı olduğu için kullanıldı (100,101). Yapılan incelemelerde Grup1 deki kesitlerde vasküler endotelial hücrelerde herhangi bir apoptotik marker pozitifliği saptanmazken, SAK grubu olan grup 2 ve tedavi grupları grup 3 ve 4'te kaspaz 3, kaspaz 8, p53 ve sitokrom c apoptotik markerlarıyla pozitif olarak boyandığı tespit edildi. Sonuçlar dahilinde sildenafilin apoptoz üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı belirlendi.

Bunun bir kaç nedeni olabilir. Bunlarda bir tanesi endotelial hücrelerde görülen apoptozun histolojik bulgulara neden olan ancak morbidite ve mortalitede çok etkisi olmayan bir antite olduğu gerçeğidir. Sako ve ark. yaptıkları çalışmada köpeklere intrasisternal forbol ester enjekte ederek protein kinaz C'yi aktive etmişler ve vazospazm

oluşturmuşlar. Ancak apopitoza ait histopatolojik bulgular elde etmedikleri halde vazospazm morbidite ve mortalitesinin olduğunu bildirmişlerdir. Yine Macdonald ve ark. ATPgel ile uzun dönem vazospazm oluşturmuşlar, belirgin apopitotik değişiklik elde etmediklerinin ancak vazospazm oluştuğunu ifade etmişlerdir (108).

Diğer bir ihtimalde, apopitozun vazospazm oluşumunda yer alan onlarca faktörün reaksiyonlar silsilesi ile patolojik olayı başlatması neticesinde, en son aşamada ortaya çıkan bir bulgu olduğu ihtimalidir. Primer faktörler arasında yer almaz. Cahill ve ark. p53 inhibitörleri ile yaptıkları çalışmada apopitoz oluşumunu engellediklerini ancak bunun vazospazm oluşumunu önlemediğini, vazospazmı tedavi etmek için apopitotik süreç öncesi gelişen kaskadların inhibe edilmesinin daha gerekli olduğunu belirtmişlerdir (100). Yine park ve ark. kaspaz inhibitörleri ile yaptıkları deneysel araştırmada, apopitozu engellediklerini, böylece kan beyin bariyerinin bozulmasını, vazojenik ve sitotoksik ödemi azalttıklarını ancak bu bulguların mortaliteye olan etkilerinin anlamlı olmadığını, nöronal ve nörovasküler dokuyu korumada apopitozdan önce apopitoza yol açan iskemik kaskadların, hemoglobin toksisitesinin önlenmesinin çok önemli olduğunu belirtmişler, apopitozu engellemenin vazospazm ve nöronal doku harabiyetini önlemede anlamlı bir etkisinin olmadığını yayınlamışlardır (139). Aoki ve ark. kaspaz inhibitörleri ile gerçekleştirdikleri çalışmada apopitozun sadece histolojik bulgulara neden olduğunu, vazospazmı uzun dönemli vazokonstriksiyonda hiç bir rolünün bulunmadığını ifade etmişlerdir (108). Zhan ve ark. ratların hipokampusündeki CA1 bölgesindeki nöron hasarı ile apopitoz arasındaki ilişkiyi araştırırken total nöron hücre yüzdesinin çok küçük bir bölümünün apopitotik hücre ölümüne bağlı olduğunu bildirmişler, kaspaz inhibitörleri ile iskemik nöronal hasara karşı çok zayıf bir koruma tespit etmişlerdir (149).

Çalışmamızda lipid peroksidasyonu ve vazospazmı önlemede anlamlı sonuçlar elde ettiğimiz halde apopitotik markerların pozitif olmasının diğer bir nedeni ise serebral vazospazm gelişiminde NO'nin antivazospastik ve NADPH oksidaz inhibitör etkilerinin yanında proapopitotik aktivitesinin olması olabilir. Zhou ve ark. 2004'te, Wink & Mitchell 1998'de Estevaz ve ark. 1999 yılında NO'nin nöronlarda ve endotelial hücrelerde özellikle SAK gibi okidatif stres altında apopitoza neden olabileceği, deneysel çalışmalarında bu gelişen apopitotik nöron hücrelerinin ölümünün spesifik kaspaz inhibitörleri ile engellenebildiğini göstermişlerdir (139,140). Beklenenin aksine NO'nin bu proapopitotik aktivitesinin nedeni dokularda belli miktarın üzerindeki konsantrasyonları, proapopitotik aktiviteye sahip olma nedeni olabilir. Nitekim Suzuki ve ark. 1995'te ve

Widenka ve ark. 1999'da aşırı miktarda NO konsantrasyonlarının özellikle geç dönemde vazospazma ve apoptoza neden olduğunu bildirmişlerdir (141,142). 1998 yılında Brune ve ark., yine 1998 yılında Lopez-Farré ve ark. NO'nin p53 akümüleyonunu başlattığını bu akümüleyonunda Bax geninin transkripsiyonunu direk etkilediğini böylece NO'nin apoptotik etkisinin olduğunu yayınlamışlardır (143,144). 2007 yılında Rodriguez ve ark. sığır kromaffin hücre kültürlerine NO donörlerini (SNP, SNAP ve GSNO) vermişler, hücrelerin mitokondriyal membran potansiyellerinde düşme olduğunu saptamışlar. Mitokondriyal membran potansiyelindeki bu değişiklikliğinde sitozolden sitokrom c salınımına neden olduğunu bununda kaspaz 3 aktivasyonuna neden olduğunu bildirmişlerdir. NO donörlerinin antiapoptotik protein grubunda yer alan Bcl-2 ve Bcl-XL salınımını azalttığı, proapoptotik proteinlerden Bax ve Bcl-Xs'in salınımını attırdığı aynı zamanda NO-neden olduğu apoptozda erken fazda NF- κ B'nin nukleusa transloke olmasının p53 salınımının düzenlendiği bu durumunda Bax sentezini ve salınımını arttırdığı böylece NO'nin apoptoza yol açtığı belirtilmiştir (145). Benzer bir çalışmayı Figueroa ve ark. kortikal nöronlar üzerinde yapmışlar ve NO donörlerinden SNAP'ın kortikal nöronlar üzerinde sitokrom c salınımına ve kaspaz 3 ve kaspaz 9 aracılığıyla apoptoza yol açtığını söylemişlerdir (146). Chae ve ark. ratların vasküler düz kasları üzerinde yaptıkları araştırmada NO'nin Bax/Bcl-2 gen ekspresyon oranında artmaya neden olduğunu bulmuşlardır (147). Mori M. de 2007 de yayınlanan araştırmasında NO'nin yüksek konsantrasyonlarda apoptoza yol açtığını ancak düşük konsantrasyonlarda tam tersi apoptozu engellediğini belirtmiştir (148).

Bizim çalışmamızda sildenafil verilen tedavi gruplarında SAK grubuna göre apoptotik hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma elde edememe nedenimiz, uyguladığımız ilacın dozuyla ilgili olabilir. Gelecek çalışmalarda sildenafilin farklı dozlarla ve antiapoptotik ilaçlarla kombine edilmesinin elde olunan sonuçlarla kıyaslanması açısından faydalı olacağını düşünüyoruz.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Deneysel çalışmamızdan elde ettiğimiz verileri gözden geçirdiğimizde SAK sonrası vazospazm oluşmasında oksidasyon, inflamasyon, lipid peroksidasyonu, vasküler dokuda ve nöronal hücrelerdeki apoptoz, vasküler düz kas hücre proliferasyonu ve nekrozis gibi birbiriyle bağlantılı bir çok patolojik olayın yer aldığını görmekteyiz. Böylesine kompleks multifaktöriyel bir patolojik süreç sonucunda gelişen vazospazmın tedavisinde deneysel olarak kullandığımız sildenafilin özellikle vazospastik damarlardaki vazodilatatör etkisinden ve lipid peroksidasyon oluşumunu engellemesinden dolayı vazospazm tedavisinde yer alabilecek ümit verici bir ilaç olduğuna inanıyoruz.

Apoptozun vazospazm sürecinin bir parçası olduğunu ancak kısa dönemli olan etkileri nedeniyle asıl dikkat edilmesi gereken noktanın inflamatuvar reaksiyonlar, kalsiyum metabolizması, serbest radikal oluşumu ve lipid peroksidasyon mekanizmaları olup bu reaksiyonların oluşumunu engellemenin vazospazmı tedavi etmedeki başarıyı arttıracığını düşünüyoruz.

7. KAYNAKLAR

1. L. Ignarro, Signal transduction mechanisms involving nitric oxide, *Biochem Pharmacol* 41:485–490, 1991
2. Stein DG. Brain damage, sex hormones and recovery: a new role for progesterone and estrogen? *Trends Neurosci* 24 (7):386-91, 2001
3. Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari Y. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport* 7 (1):61-4, 1995
4. M. Burnett and S. Danish et al., Pathology and pathophysiology of aneurysmal subarachnoid hemorrhage In: P. Leroux, W. Winn and D. Newell, Editors, *Management of Cerebral Aneurysms*, Elsevier, Philadelphia, PA:127–137, 2004
5. Jeremy JY, Rowe D, Emsley AM, Newby AC. Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 1999 43 (3):580-94, 1999
6. Walker DK, Ackland MJ, James GC, Muirhead GJ, Rance DJ, Wastall P, Wright PA. Pharmacokinetics and metabolism of sildenafil in mouse, rat, rabbit, dog and man. *Xenobiotica.* 29 (3):297-310, 1999
7. McGirt MJ, Blessing R, Alexander MJ, Nimjee SM, Woodworth GF, Friedman AH, Graffagnino C, Laskowitz DT, Lynch JR. Risk of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage reduced by statin therapy: A multivariate analysis of an institutional experience. *J Neurosurg.* 105 (5):671-4, 2006
8. Aihara Y, Jahromi BS, Yassari R, Nikitina E, Agbaje-Williams M, Macdonald RL. .Molecular profile of vascular ion channels after experimental subarachnoid hemorrhage.*J Cereb Blood Flow Metab.* 24 (1):75-83, 2004
9. Simard JM, Kent TA. Vascular smooth muscle proliferation as a target for therapeutic intervention. *Stroke.* 34 (8):e108, 2003.
10. Liu P, Xi Q, Ahmed A, Jaggar JH, Dopico AM. Essential role for smooth muscle BK channels in alcohol-induced cerebrovascular constriction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28;101 (52):18217-22, 2004
11. Erdos B, Miller AW, Busija DW. Alterations in KATP and KCa channel function in cerebral arteries of insulin-resistant rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283 (6):H2472-7, 2002

12. Lohn M, Lauterbach B, Haller H, Pongs O, Luft FC, Gollasch M. β (1)-Subunit of BK channels regulates arterial wall $[Ca^{2+}]$ and diameter in mouse cerebral arteries. *J Appl Physiol.* 91 (3):1350-4, 2001
13. Moneer Z, Pino I, Taylor EJ, Broad LM, Liu Y, Tovey SC, Staali L, Taylor CW. Different phospholipase-C-coupled receptors differentially regulate capacitative and non capacitative Ca^{2+} entry in A7r5 cells. *Biochem J.* 389 (Pt 3):821-9, 2005
14. Hisatsune C, Nakamura K, Kuroda Y, Nakamura T, Mikoshiba K. Amplification of Ca^{2+} signaling by diacylglycerol-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *J Biol Chem.* 25;280 (12):11723-30.
15. Cawley SM, Sawyer CL, Brunelle KF, Vliet A, Dostmann WR. Nitric oxide –evoked transient kinetics of cyclic GMP in vascular smooth muscle cells. *Cellular Signalling.* 2006, 1-11.
16. Netherton SJ, Maurice DH. Vascular endothelial cell cyclic nucleotidephosphodiesterases and regulated cell migration: Implications in angiogenesis. *Mol Pharmacol* 67: 263-272, 2005
17. J. Krumenacker and K. Hanafy et al., Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase, *Brain Res Bull* 62: 505–515, 2004
18. Zhou ML, Shi JX, Hang CH, Cheng HL, Qi XP, Mao L, Chen KF, Yin HX. Potential contribution of nuclear factor-kappaB to cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage in rabbits. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007 Feb 7
19. Bowman G, Bonneau RH, Chinchilli VM, Tracey KJ, Cockcroft KM. A novel inhibitor of inflammatory cytokine production (CNI-1493) reduces rodent post-hemorrhagic vasospasm. *Neurocrit Care.* 5 (3):222-9, 2006
20. Gallia GL, Tamargo RJ. Leukocyte-endothelial cell interactions in chronic vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Neurol Res.* 28 (7):750-8, 2006
21. Clatterbuck RE, Gailloud P, Ogata L, Gebremariam A, Dietsch GN, Murphy KJ, Tamargo RJ. Prevention of cerebral vasospasm by a humanized anti-CD11/CD18 monoclonal antibody administered after experimental subarachnoid hemorrhage in nonhuman primates. *J Neurosurg.* 99 (2):376-82, 2003
22. Bavbek M, Polin R, Kwan AL, Arthur AS, Kassell NF, Lee KS. Monoclonal antibodies against ICAM-1 and CD18 attenuate cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage in rabbits. *Stroke.* 29 (9):1930-5, 1998

23. Peterson JW, Kwun BD, Hackett JD, Zervas NT. The role of inflammation in experimental cerebral vasospasm. *J Neurosurg.* 72 (5):767-74, 1990
24. Nam DH, Kim JS, Hong SC, Lee WH, Lee JI, Shin HJ, Park K, Eoh W, Han DH, Kim JH. Expression of interleukin-1 beta in lipopolysaccharide stimulated monocytes derived from patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage is correlated with cerebral vasospasm. *Neurosci Lett.* 312 (1):41-4, 2001
25. Fassbender K, Hodapp B, Rossol S, Bertsch T, Schmeck J, Schutt S, Fritzinger M, Horn P, Vajkoczy P, Kreisel S, Brunner J, Schmiedek P, Hennerici M. Inflammatory cytokines in subarachnoid haemorrhage: association with abnormal blood flow velocities in basal cerebral arteries. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 70 (4):534-7, 2001
26. Hendryk S, Jarzab B, Josko J. Increase of the IL-1 beta and IL-6 levels in CSF in patients with vasospasm following aneurysmal SAH. *Neuro Endocrinol Lett.* 25 (1-2):141-7, 2004
27. Peiro C, Angulo J, Rodriguez-Manas L, Llergo JL, Vallejo S, Cercas E, Sanchez-Ferrer CF. Vascular smooth muscle cell hypertrophy induced by glycosylated human oxyhaemoglobin. *Br J Pharmacol.* 125 (4):637-44, 1998
28. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr.* 57 (suppl):715S-25S, 1993
29. Dr. Servet İnci. Deneysel subaraknoid kanama ile oluşturulan akut ve kronik vazospazma melatonin etkisi: morфометrik, biyokimyasal, histokimyasal ve endokrinolojik çalışma Hacettepe Üniversitesi Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü Nöro-endokrinolojik Doktora Tezi 1998
30. Dr. Salih Gülşen. Ratlarda deneysel subaraknoid kanama ile oluşturulan serebral vazospazma raloksifenin etkisi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilimdalı uzmanlık tezi 2004
31. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem.* 266 (7):4244-50, 1991

32. Ohkuma H, Suzuki S, Ogane K, Fujita S, Shibata S, Ito K, Kimura M. Preventive effect of intracisternal methylprednisolone on symptomatic vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *No Shinkei Geka*. 24 (2):135-42, 1996
33. Yamaguchi M, Zhou C, Heistad DD, Watanabe Y, Zhang JH. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase failed to prevent cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 35 (11):2512-7, 2004
34. Saito A, Kamii H, Kato I, Takasawa S, Kondo T, Chan PH, Okamoto H, Yoshimoto T. Transgenic CuZn-superoxide dismutase inhibits NO synthase induction in experimental subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 32 (7):1652-7, 2001
35. Jewell RP, Saundry CM, Bonev AD, Tranmer BI, Wellman GC. Inhibition of Ca^{++} sparks by oxyhemoglobin in rabbit cerebral arteries. *J Neurosurg*. 100 (2):295-302, 2004
36. Shishido T, Suzuki R, Qian L, Hirakawa K. The role of superoxide anions in the pathogenesis of cerebral vasospasm. *Stroke*. 25 (4):864-8, 1994
37. Macdonald RL, Weir BK, Runzer TD, Grace MG. Malondialdehyde, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase in cerebrospinal fluid during cerebral vasospasm in monkeys. *Can J Neurol Sci*. 19 (3):326-32, 1992
38. Hanggi D, Steiger HJ. Nitric oxide in subarachnoid haemorrhage and its therapeutics implications. *Acta Neurochir (Wien)*. 148 (6):605-13, 2006
39. Hanggi D, Steiger HJ. Nitric oxide in subarachnoid haemorrhage and its therapeutics implications. *Acta Neurochir (Wien)*. 148 (6):605-13, 2006
40. Meguro T, Klett CP, Chen B, Parent AD, Zhang JH. Role of calcium channels in oxyhemoglobin-induced apoptosis in endothelial cells. *J Neurosurg*. 93 (4):640-6, 2000
41. Sen O, Caner H, Aydin MV, Ozen O, Atalay B, Altinors N, Bavbek M. The effect of mexiletine on the level of lipid peroxidation and apoptosis of endothelium following experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurol Res*. 28 (8):859-63, 2006
42. Meguro T, Klett CP, Chen B, Parent AD, Zhang JH. Role of calcium channels in oxyhemoglobin-induced apoptosis in endothelial cells. *J Neurosurg*. 93 (4):640-6, 2000

43. Ishiguro M, Morielli AD, Zvarova K, Tranmer BI, Penar PL, Wellman GC. Oxyhemoglobin-induced suppression of voltage-dependent K⁺ channels in cerebral arteries by enhanced tyrosine kinase activity. *Circ Res.* 99 (11):1252-60, 2006
44. Aiello EA, Clement-Chomienne O, Sontag DP, Walsh MP, Cole WC. Protein kinase C inhibits delayed rectifier K⁺ current in rabbit vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 271 (1 Pt 2):H109-19, 1996
45. Nishizawa S, Laher I. Signaling mechanisms in cerebral vasospasm. *Trends Cardiovasc Med.* 15 (1):24-34, 2005
46. Ishiguro M, Puryear CB, Bisson E, Saundry CM, Nathan DJ, Russell SR, Tranmer BI, Wellman GC. Enhanced myogenic tone in cerebral arteries from a rabbit model of subarachnoid hemorrhage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283 (6):H2217-25, 2002
47. Ishiguro M, Morielli AD, Zvarova K, Tranmer BI, Penar PL, Wellman GC. Oxyhemoglobin-induced suppression of voltage-dependent K⁺ channels in cerebral arteries by enhanced tyrosine kinase activity. *Circ Res.* 99 (11):1252-60, 2006
48. Watanabe M, Doi M, Sasaki K, Ogawa A. Modulatory role of protein tyrosine kinase activation in the receptor-induced contractions of the bovine cerebral artery. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 38 (2):75-81, 1998
49. Yamato S, Nishizawa S, et al. Subarachnoid hemorrhage impairs cerebral blood flow response to nitric oxide but not to cyclic GMP in large cerebral arteries. *Brain Res.* 757:1-9, 1997
50. Sobey C, Heistad D, et al. Effect of subarachnoid hemorrhage on dilatation of basillary artery in vivo. *Am J Physiol* 271:H126-H132, 1996
51. Zimmermann M, Seifert V. Endothelin and subarachnoid hemorrhage: an overview. *Neurosurgery.* 43 (4):863-75, 1998
52. Cirak B, Kiymaz N, Ari HH, Ugras S. The effects of endothelin antagonist BQ-610 on cerebral vascular wall following experimental subarachnoid hemorrhage and cerebral vasospasm. *Clin Auton Res.* 14 (3):197-201, 2004

53. Kastner S, Oertel MF, Scharbrodt W, Krause M, Boker DK, Deinsberger W. Endothelin-1 in plasma, cisternal CSF and microdialysate following aneurysmal SAH. *Acta Neurochir (Wien)*. 147 (12):1271-9, 2005
54. Khimenko PL, Moore TM, Taylor AE. Blocked ETA receptors prevent ischemia and reperfusion injury in rat lungs. *J Appl Physiol*. 80 (1):203-7, 1996
55. Kawanabe Y, Masaki T, Hashimoto N. Involvement of phospholipase-C in endothelin 1-induced stimulation of Ca channels and basillary artery contraction in rabbits. *J Neurosurg* 105:288-293, 2006
56. Kawanabe Y, Nauli SM. Involvement of extracellular Ca²⁺ influx through voltage-independent Ca²⁺ channels in endothelin-1 function. *Cell Signal*. 17 (8):911-6, 2005
57. Y. Kawanabe, Y. Okamoto, T. Enoki, N. Hashimoto and T. Masaki, *Am. J. Physiol., Cell Physiol*. 281:C1676, 2001
58. A. Ishihata, K. Tasaki, Y. Katano. Involvement of p44/42 mitogen-activated protein kinases in regulating angiotensin II- and endothelin-1-induced contraction of rat thoracic aorta. *Eur. J. Pharmacol*. 445:247-256, 2002
59. T. Masaki, S. Miwa, T. Sawamura, H. Ninomiya and Y. Okamoto, Subcellular mechanisms of endothelin action in vascular system. *Eur. J. Pharmacol*. 375:133-138, 1999
60. A. Sorokin, P. Kozlowski, L. Graves and A. Philip, Protein-tyrosine Kinase Pyk2 Mediates Endothelin-induced p38 MAPK Activation in Glomerular Mesangial Cells. *J. Biol. Chem*. 276:21521-21528, 2001
61. L. Trevisi, S. Bova, G. Cargnelli, G. Ceolotto and S. Luciani, Endothelin-1-induced arachidonic acid release by cytosolic phospholipase A₂ activation in rat vascular smooth muscle via extracellular signal-regulated kinases pathway. *Biochem. Pharmacol*. 64:425-431, 2002
62. C.C. Leslie, Properties and Regulation of Cytosolic Phospholipase A₂. *J. Biol. Chem*. 272:16709-16712, 1997
63. M. Gold and K. Wood et al., L-Arginine causes whereas L-argininosuccinic acid inhibits endothelium-dependent vascular smooth muscle relaxation, *Biochem Biophys Res Commun* 161:536–543, 1988

64. Systemic administration of phosphodiesterase V inhibitor, sildenafil citrate, for attenuation of cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 59 (5):1102-7, 2006
65. Cawley SM, Sawyer CL, Brunelle KF, van der Vliet A, Dostmann WR. Nitric oxide-evoked transient kinetics of cyclic GMP in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal*. 19 (5):1023-33, 2007
66. Sadhu K, Hensley K, Florio VA, Wolda SL. 1999. Differential expression of the cyclic GMP-stimulated phosphodiesterase PDE2A in human venous and capillary endothelial cells. *J Histochem Cytochem* 47:895-906, 2000
67. L. Ignarro, Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview, *J Physiol Pharmacol* 53:503–514, 2002
68. R. MacAllister and H. Parry et al., Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase, *Br J Pharmacol* 119:1533–1540, 1996
69. J. Leiper and J. SantaMaria et al., Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distribution and homology with microbial arginine deiminases, *Biochem J* 343:209–214, 1999
70. R. Pluta and B. Thompson et al., Loss of nitric oxide synthase immunoreactivity in cerebral vasospasm, *J Neurosurg* 84:648–654, 1996
71. V. Khurana and J. Friedman et al., Biology of cerebral blood vessels and blood flow In: P. Leroux, W. Winn and D. Newell, Editors, *Management of Cerebral Aneurysms*, Elsevier, Philadelphia, PA:139–168, 2004
72. Pluta RM. Delayed cerebral vasospasm and nitric oxide: review, new hypothesis, and proposed treatment. *Pharmacol Ther*. 105 (1):23-56, 2005
73. K. Nozaki and M.A. Moskowitz et al., Possible origins and distribution of immunoreactive nitric oxide synthase-containing nerve fibers in cerebral arteries, *J Cereb Blood Flow Metab* 13:70–79, 1993
74. A. Sato and A. Trzebski, Local cerebral blood flow responses in rats to hypercapnia and hypoxia in the rostral ventrolateral medulla and in the cortex, *J Auton Nerv Syst* 41:79–86, 1992

75. W. Meng and J. Ma et al., Ach dilates pial arterioles in endothelial and neuronal nitric oxide synthase knockout mice by NO-dependent mechanism, *Am J Physiol* 271:H1145–H1150, 1996
76. R. Cohen and P. Vanhoutte, Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic cGMP, *Circulation* 92:3337–3349, 1995
77. Lugnier C. Calcium-calmodulin and vasomotor activity. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 84 Spec No 1:25-34, 1991
78. H. Dietrich and R. Dacey, Molecular keys to the problems of cerebral vasospasm, *Neurosurgery* 46:517–530, 2000
79. J. Hoffmann and S. Dimmeler et al., Shear stress increases the amount of S-nitrosylated molecules in endothelial cells: important role for signal transduction, *FEBS* 551:153–158, 2003
80. H. Shimokawa and H. Yasutake et al., The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation, *J Cardivasc Pharmacol* 28:703–711, 1996
81. L. Krasznai and E. Grote, Acute vasoparalysis after subarachnoid haemorrhage and cerebral trauma: general reflex phenomenon?, *Neurol Res* 16:40–44, 1994
82. D. Carpenter and R. Grubb Jr. et al., Cerebral oxygen metabolism after subarachnoid hemorrhage, *J Cereb Blood Flow Metab* 11:837–844, 1991
83. J. Shinoda and T. Kimura et al., Acetalozamide reactivity of cerebral blood flow inpatients with subarachnoid hemorrhage, *Act Neurochir (Wien)* 109:102–108, 1991
84. L. Ignarro, Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30:535–560, 1990
85. C.S. Jung and B.A. Iuliano et al., CSF Levels of ADMA, an endogenous inhibitor of endothelial nitric oxide synthase, are associated with cerebral vasospasm in a primate model of subarachnoid hemorrhage, *J Neurosurg* (2004).
86. A. Wennmalm and G. Benthin et al., Dependence of the metabolism of nitric oxide (NO) in healthy human whole blood on the oxygenation of its red cell haemoglobin, *Br J Pharmacol* 106:507–508, 1992

87. M. Shibuya and Y. Suzuki et al., Effect of AT877 on cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. Results of prospective placebo-controlled double-blind trial, *J Neurosurg* 76:571–577, 1992
88. Inhibition of NADPH oxidase attenuates vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke* 36 (5):1059-64, 2005
89. Shin HK, Lee JH, Kim KY, Kim CD, Lee WS, Rhim BY, Hong KW. Impairment of autoregulatory vasodilation by NAD (P)H oxidase-dependent superoxide generation during acute stage of subarachnoid hemorrhage in rat pial artery. *J Cereb Blood Flow Metab* 22 (7):869-77, 2002
90. Shishido T, Suzuki R, Qian L, Hirakawa K. The role of superoxide anions in the pathogenesis of cerebral vasospasm. *Stroke* 25 (4):864-8, 1994
91. Li L, Watts SW, Banes AK, Galligan JJ, Fink GD, Chen AF. NADPH oxidase-derived superoxide augments endothelin-1-induced venoconstriction in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension* 42 (3):316-21, 2003
92. Koupparis AJ, Jeremy JY, Muzaffar S, Persad R, Shukla N. Sildenafil inhibits the formation of superoxide and the expression of gp47 NAD[P]H oxidase induced by the thromboxane A2 mimetic, U46619, in corpus cavernosal smooth muscle cells. *BJU Int* 96 (3):423-7, 2005
93. Muzaffar S, Shukla N, Srivastava A, Angelini GD, Jeremy JY. Sildenafil citrate and sildenafil nitrate (NCX 911) are potent inhibitors of superoxide formation and gp91phox expression in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Br J Pharmacol* 146 (1):109-17, 2005
94. Donovan FM, Pike CJ, Cotman CW, Cunningham DD. Thrombin induces apoptosis in cultured neurons and astrocytes via a pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities. *J Neurosci* 15;17 (14):5316-26, 1997
95. Lindner H, Holler E, Ertl B, Multhoff G, Schreglmann M, Klauke I, Schultz-Hector S, Eissner G. Peripheral blood mononuclear cells induce programmed cell death in human endothelial cells and may prevent repair: role of cytokines. *Blood* 89 (6):1931-8, 1997

96. Schwartz-Bloom RD, Sah R. gamma-Aminobutyric acid (A) neurotransmission and cerebral ischemia. *J Neurochem* 77 (2):353-71, 2001
97. Siesjo BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurg* 77 (3):337-54, 1992
98. Zubkov AY, Ogihara K, Bernanke DH, Parent AD, Zhang J. Apoptosis of endothelial cells in vessels affected by cerebral vasospasm. *Surg Neurol* 53:260-266, 2000
99. Cho A, Courtman DW, Langille BL. Apoptosis (programmed cell death) in arteries of the neonatal lamb. *Circ Res* 76 (2):168-75, 1995
100. Cahill J, Calvert JW, Solaroglu I, Zhang JH. Vasospasm and p53-induced apoptosis in an experimental model of subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 37:1868-1874, 2006
101. Cheung EC, Melanson-Drapeau L, Cregan SP, Vanderluit JL, Ferguson KL, McIntosh WC, Park DS, Bennett SA, Slack RS. Apoptosis-inducing factor is a key factor in neuronal cell death propagated by BAX-dependent and BAX-independent mechanisms. *J Neurosci* 25 (6):1324-34, 2005
102. Zhou C, Yamaguchi M, Colohan RT, Zhang JH. Role of p53 and apoptosis in cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:572-582, 2005
103. Bennett MR, Macdonald K, Chan SW, Boyle JJ, Weissberg PL. Cooperative interactions between RB and p53 regulate cell proliferation, cell senescence, and apoptosis in human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques. *Circ Res* 82 (6):704-12, 1998
104. Paul G. Matz, MD; Miki Fujimura, MD; Anders Lewen, MD, PhD; Yuiko Morita-Fujimura, PhD Pak H. Chan, PhD. Increased Cytochrome c-Mediated DNA Fragmentation and Cell Death in Manganese-Superoxide Dismutase-Deficient Mice After Exposure to Subarachnoid Hemolysate. *Stroke* 32:506-511, 2001
105. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86 (1):147-57, 1996
106. Molecular mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Neurol Res* 28 (4):399-414, 2006

107. Antonsson B, Martinou JC. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 256 (1):50-7, 2000
108. Aoki K, Zubkov AY, Ross IB, Zhang JH. Therapeutic effect of caspase inhibitors in the prevention of apoptosis and reversal of chronic cerebral vasospasm. *Journal of Clinic Neuroscience* 9 (6):672-677, 2002
109. Zubkov AY, Aoki K, Parent AD, Zhang JH. Preliminary study of the effects of caspase inhibitors on vasospasm in dog penetrating arteries. *Life Sciences* (2002) 70, 3007-3018
110. Shukla N, Jones R, Persad R, Angelini AD, Jeremy JY. Effect of sildenafil citrate and a nitric oxide donating sildenafil derivate, NCX911, on cavernosal relaxation and superoxide formation in hypercholesterolaemic rabbits. *Europ J Pharm* 517:224-231, 2005
111. Tsai BM, Turrentine MW, Sheridan BC, Wang M, Fiore AC, Brown JW, Meldrum DR. Differential effects of phosphodiesterase-5 inhibitors on hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary artery cytokine expression. *Ann Thorac Surg* 81:272-288, 2006
112. Wallis RM, Corbin JD, Francis SH, Ellis P. Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro. *Am J Cardiol* 83:3C-12C, 1999
113. Jackson G, Benjamin N, Jackson N, Allen MJ. Effects of sildenafil citrate on human dynamics. *Am J Cardiol* 83:13C-20C, 1999
114. Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: the emerging revolution. *Nat Clin Pract Neurol* 3 (5):256-63, 2007
115. Stapf C, Mohr J. Aneurysm and subarachnoid hemorrhage epidemiology. In H. W. P. D. Le Roux, & D. W. Newell (Eds.), *management of Cerebral Aneurysms*:183-187. Philadelphia, PA: Elsevier, 2004
116. Phillips L II, Whisnant J. The unchanging pattern of subarachnoid hemorrhage in a community. *Neurology* 30:1034-1040, 1980
117. Weir B, Grace M. Time course of vasospasm in man. *J Neurosurg* 48:173-181, 1978

118. Fischer C, Kistler J. Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualised by computerized tomographic scanning. *Neurosurgery* 6:1-6, 1980
119. Pakarinen S. Incidence, aetiology, and prognosis of primary subarachnoid hemorrhage: a study based on 589 cases diagnosed in a defined urban population during a defined period. *Acta Neurochir Scand* 29 (suppl.):1-128, 1967
120. Findlay JM, Weir BKA, Kassel NF. Intracisternal recombinant tissue plasminogen activator after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 75:181-188, 1991
121. Sasahi T, Kawakami M. Urokinase cisternal irrigation therapy for prevention of symptomatic vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. A study of urokinase concentration and the fibrinolytic system. *Stroke* 31:1256-1262, 2000
122. Kassell NF, Shaffrey ME, Shaffrey CI. Cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. In: Appuzzo MLJ, ed. *Brain surgery: complication avoidance and management*. New York: Churchill Livingstone 847-856, 1992
123. Sehhar LN, Weschler LR, Yanas H. Value of TCD examination in the diagnosis of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 22:813-821, 1988
124. Pasqualin A, Bozaan A, Cavazzani P. Intracranial hematomas following aneurysmal rupture: experience with 309 cases. *Surg Neurol* 25:6-17, 1986
125. Aihara Y, Jahromi BS, Yassari R, Nikitina E, Agbaje-Williams M, Macdonald RL. Molecular profile of vascular ion channels after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* Jan;24 (1):75-83, 2004
126. Clatterbuck RE, Oshiro EM, Hoffman PA, Dietsch GN, Pardoll DM, Tamargo RJ. Inhibition of vasospasm with lymphocyte function-associated antigen-1 monoclonal antibody in a femoral artery model in rats. *J Neurosurg* 97 (3):676-82, 2002
127. Oshiro EM, Hoffman PA, Dietsch GN, Watts MC, Pardoll DM, Tamargo RJ. Inhibition of experimental vasospasm with anti-intercellular adhesion molecule-1 monoclonal antibody in rats. *Stroke* 28 (10):2031-7, 1997
128. Sills AK, Clatterbuck RE, Thompson RC, Cohen PL, Tamargo RJ. Endothelial cell expression of intercellular adhesion molecule 1 in experimental posthemorrhagic vasospasm. *Neurosurgery* 41 (2):453-60, 1997

129. Polin RS, Bavbek M, Shaffrey ME, Billups K, Bogaev CA, Kassell NF, Lee KS. Detection of soluble E-selectin, ICAM-1, VCAM-1, and L-selectin in the cerebrospinal fluid of patients after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 89 (4):559-67, 1998
130. Prunell GF, Svendgaard NA, Alkass K, Mathiesen T. Delayed cell death related to acute cerebral flow changes following subarachnoid hemorrhage in the rat brain. *J Neurosurg* 102:1046-1054, 2005
131. Shishido T, Suzuki R, Qian L, Hirakawa K. The role of superoxide anions in the pathogenesis of cerebral vasospasm. *Stroke* 25 (4):864-8, 1994
132. Kamii H, Kato I, Kinouchi H, Chan PH, Epstein CJ, Akabane A, Okamoto H, Yoshimoto T. Amelioration of vasospasm after subarachnoid hemorrhage in transgenic mice overexpressing CuZn-superoxide dismutase. *Stroke* 30 (4):867-71, 1999
133. Zheng JS, Zhan RY, Zheng SS, Zhou YQ, Tong Y, Wan S. Inhibition of NADPH oxidase attenuates vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke* 36 (5):1059-64, 2005
134. N. Egemen and R. Turker et al., The effect of intrathecal sodium nitroprusside on severe chronic vasospasm, *Neurol Res* 15:310–315, 1993
135. J.G. Frazee and S.L. Giannotta et al., Intravenous nitroglycerin for the treatment of chronic cerebral vasoconstriction in the primate, *J Neurosurg* 55:865–868, 1981
136. J. Thomas and A. Nemirovsky et al., Rapid reversal of endothelin-1-induced vasoconstriction by intrathecal administration of nitric oxide donor, *Neurosurgery* 40:1245–1249, 1997
137. C. Sobey, Cerebrovascular dysfunction after subarachnoid hemorrhage: novel mechanisms and directions for therapy, *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28:926–929, 2001
138. Muzaffar S, Shukla N, Srivastava A, Angelini GD, Jeremy JY. Sildenafil citrate and sildenafil nitrate (NCX 911) are potent inhibitors of superoxide formation and gp91phox expression in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Br J Pharmacol* 146 (1):109-17, 2005

139. Park S, Yamaguchi M, Zhou C, Calvert JW, Tang J, Zhang JH. Neurovascular Protection reduces early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 35:2412-2417, 2004
140. A. Estevez and J. Crow et al., Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase, *Science* 286:2498–2500, 1999
141. Suzuki s, Kassell N., et al. hemin activation of an inducible isoform of NO synthase in vascular smooth muscle cells. *J Neurosurg* 83:862-866, 1995
142. Widenka D, Medele R, et al. Inducible nitric oxide synthase: a possible risk factor in the pathogenesis of chronic vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 90:1098-1104, 1999
143. Brune B,von Knethen A,Sandau KB. Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol* 351: 261-272, 1998
144. Lopez-Farre A,Rodríguez-Feo JA,Sánchez de Miguel L,Rico L,Casado S. Role of nitric oxide in the control of apoptosis in the microvascular. *Int J Biochem Cell Biol* 30: 1095-1106, 1998
145. Perez-Rodriguez R, Fuentes MP, Olivan AM, Martinez-Palacian A, Roncero C, Gonzalez MP, Oset-Gasque MJ. Mechanisms of nitric oxide-induced apoptosis in bovine chromaffin cells: Role of mitochondria and apoptotic proteins. *J Neurosci Res*, 2007
146. Figueroa S,Oset-Gasque MJ,Arce C,Martínez-Honduvilla CJ,González MP. Mitochondrial involvement in nitric oxide-induced cellular death in cortical neurons in culture. *J Neurosci Res* 83:441-449, 2006
147. Chae I-H,Park KW,Kim HS,Oh BH. Nitric oxide-induced apoptosis is mediated by Bax/Bcl-2 gene expression, transition of cytochrome c, and activation of caspase-3 in rat vascular smooth muscle cells. *Clin Chim Acta* 341: 83-91, 2004
148. Mori M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J Nutr* 137 (6):1616S-20S, 2007
149. Both caspase-dependent and caspase-independent pathways may be involved in hippocampal CA1 neuronal death because of loss of cytochrome c From mitochondria in a rat forebrain ischemia model. *J Cereb Blood Flow Metab* 21 (5):529-40, 2001.