



TC

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN ve SİNİR CERRAHİSİ ANA BİLİMDALİ**

**SUBARAKNOİD KANAMA SONRASI SEREBELLAR YARALANMA VE
BAZİLER ARTERDE GELİŞEN VAZOSPAZM ÜZERİNE
PİCEATANNOL'UN ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ömer Serdar AKGÜL

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Ümit Ali MALÇOK

ÇANAKKALE – 2023

ETİK ONAY SAYFASI



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : E-38285931-050.01.04-2000189105
Konu : Hayvan Deneyleri Yerel Etik
Kurul Kararı (Dr. Öğr. Üyesi Ümit
Ali MALÇOK)

17.12.2020

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ümit Ali MALÇOK

"Subaraknoid Kanama Sonrası Serebellar Yaralanma ve Baziler Arterde Gelişen Vazospazm Üzerine Piceatannol'un Etkileri" başlıklı çalışmanızla ilgili Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 27.11.2020 tarih ve 2020/10-06 sayılı kararı ektedir.
Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Ali İŞMEN
Kurul Başkanı

Ek: Dr. Öğr. Üyesi Ümit Ali MALÇOK Etik Kurul Kararı

ÖNSÖZ

Asistanlığımdan uzmanlığıma kadar gelen yolda her daim fedakârlık ve özen ile ilgi ve alakasını esirgemeyip, bugüne kadar beni her alanda destekleyen, başta tez danışman hocam Doç. Dr. Ümit Ali MALÇOK olmak üzere, diğer hocalarım Doç. Dr. Tarık AKMAN ve Dr. Öğr. Üyesi Ali AKAR' a, tez çalışmam süresince biyokimyasal ve histopatolojik incelemelerde katkı ve yardımlarını esirgemeyen ve Doç. Dr. Başak BÜYÜK, Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÖZTOPUZ ve Dr. Mehmet Akif OVALI 'ya teşekkür ederim. Beyin ve Sinir Cerrahisi bölümündeki birlikte geçirdiğimiz 6 yıllık süreç içindeki tüm asistan arkadaşlarıma ve hayatım boyunca her zaman yanımda olan, varlıklarıyla bana güç veren annem, babam, kardeşlerim ve değerli eşime teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Ömer Serdar AĞGÜL
Çanakkale, Ekim 2023

ÖZET

Amaç: Ratlarda oluşturulan deneysel subaraknoid kanama (SAK) modelinde Piceatannol' un serebellum ve baziler arterde vazospazm üzerine etkileri incelendi. Piceatannol'un (PST), temel beyin moleküler sinyallerini hedefleyerek erken beyin hasarı ve basiller arter vazospazmının tedavisinde deneysel bir SAK modelinde terapötik değere sahip olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu konudaki araştırmaların azlığı ve mekanizmaların tam olarak aydınlatılamamış olması nedeniyle PST uygulamasının SAK ve altta yatan mekanizma üzerindeki etkisinin aydınlatılması için kapsamlı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamız deneysel SAK' da PST uygulamasının serebellar dokuda inflamasyon ve apoptoz üzerine etkisini, ayrıca basiller arter vazospazmı etkisini birlikte belirleyen ilk çalışma olup, bu konuda yapılacak araştırmalara katkı sağlayacaktır.

Gereç ve Yöntem: 27 adet erkek Wistar cinsi albino ratlar 9 ar 3 gruba ayrıldı. Grup 1 (sham), grup 2 (Sak), grup 3 (Sak+ Piceatannol uygulaması) olarak planlandı. Grup 1 deki ratlara sak oluşturulmadı, piceatannol uygulanmadı. Sadece prekiyazmatik sisterna alanına girişim yapıldı, madde verilmedi ve intraperitoneal olarak sf verildi. 24 saat sonra sakrifiye edildi. Grup 2 (sak) grubundaki 6 rat a prekiyazmatik sisterna içerisine otolog 150 mikrolitre kuyruk kanı alınıp verildi. 24 saat sonra sakrifiye edildi. Grup 3 teki (sak+piceatannol) 6 rat a ise gene prekiyazmatik sisterna içerisine otolog kan verilerek sak oluşturulup, 60 dk sonra Piceatannol 30 mg/kg dozunda intraperitoneal yolla verildi. 24 saat sonra ise sakrifikasyon işlemi yapıldı. Tüm gruplardaki 3 sıçan beyin ödemi tespiti amacı ile kullanıldı. Baziler arterlerin ve serebellumun lümen alanları ve duvar kalınlıkları stereolojik yöntemle histopatolojik olarak incelendi.

Sakrifiye edilen ratlardan her 3 grupta (kontrol-sak, piceatannol) rastgele seçilen 5 deneğin serebellum dokusundan proinflamatuvar sitokin ve apoptotik bazı marker seviyeleri çalışıldı. (bax, bcl, Tnf alfa, IL-6, kaspaz 3, NF-KB, beta-aktin, p53, tlr4, sirt1)

Histopatolojik incelemenin yanında ek olarak deney öncesi ve sonrasında nörolojik performans muayene testine (rotarod ve garcia testi) sokulan hayvanların performansları saniye cinsinden kayıt altına alındı.

Bulgular: Histopatolojik çalışmada apoptozis varlığını gösteren TUNEL endotel hücre yüzde ortalamalarının her 3 grupta değerlendirildi. Uygulanan Piceatannol' un SAK sonrası gelişen vazospazmı istatistiksel olarak anlamlı şekilde önlediği (gözlemlendi-gözlemlenmedi) her 3 grupta baziler arter duvar kalınlıklarının değerlendirildi. Rotarod ve garcia nörolojik değerlendirme testleri her 3 grupta da deney öncesi ve sonrası şeklinde kayıt altına alındı ve sonuçları değerlendirildi.

Sonuç: Sonuçlarımız, PST' nin, temel beyin moleküler sinyallerini hedefleyerek erken beyin hasarı ve basiller arter vazospazmının tedavisinde deneysel bir SAK modelinde terapötik değere sahip olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu konudaki araştırmaların azlığı ve mekanizmaların tam olarak aydınlatılamamış olması nedeniyle PST uygulamasının SAK ve altta yatan mekanizma üzerindeki etkisinin aydınlatılması için kapsamlı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamız deneysel SAK'da PST uygulamasının serebellar dokuda inflamasyon ve apoptoz üzerine etkisini, ayrıca basiller arter vazospazmına etkisini birlikte belirleyen ilk çalışma olup, bu konuda yapılacak araştırmalara katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Piceatannol, subaraknoid kanama, vazospazm

ABSTRACT

Objective: The effect of Piceatannol on cerebellum and basilar artery vasoplasm was examined in experimental subarachnoid hemorrhage (SAH) model formed in rats. It is considered that Piceatannol (PCT) may have a therapeutic value in an experimental SAH model in the treatment of early brain damage and basilar artery vasospasm through targeting basic brain molecular signals. Since the number of studies is limited on this subject and the mechanisms have not been completely clarified, comprehensive researches are required to clarify the effect of PCT application on SAH and the underlying mechanism. This is the first study determining the effect of PCT application on inflammation and apoptosis in cerebellar tissue in experimental SAH together with its effect on basilar artery vasospasm and contributing to future studies on this subject.

Material and Method: 27 male Wistar type albino rats were separated into three groups with nine rats in each. Group 1 was the sham, group 2 was the Sah and group 3 was the Sah + Piceatannol group. There was no sah formation and piceatannol application for the rats in Group 1. An intervention was made only in the prechiasmatic cistern region, no substance was given and sf was given intraperitoneally. Sacrification was performed after 24 hours. Autologous 150 microliters of tail blood was taken and given inside the prechiasmatic cistern for the six rats in group 2 (sah). Sacrification was performed after 24 hours. For the 6 rats in group 3 (sah+piceatannol), sah was formed through giving autologous blood inside the prechiasmatic cistern again and Piceatannol 30 mg/kg was given intraperitoneally after 60 minutes. Sacrification was performed 24 hours later. Three rats from all groups were used to detect brain edema. Lumen regions and wall thicknesses of basilar arteries and cerebellum were examined histopathologically through stereological method.

Some proinflammatory cytokine and apoptotic marker levels were studied on cerebellum tissue of 5 randomly selected subjects among sacrificed rats in the three groups (control-sah, piceatannol). (bax, bcl, Tnf alpha, IL-6, caspase 3, NF-KB, beta-actin, p53, tlr4, sirt1)

In addition to the histological examination, the performances of the animals exposed to neurological performance inspection test (rotarod and garcia test) before and after the experiment were registered in terms of seconds.

Results: Mean percentages of TUNEL endothelial cells with the presence of apoptosis were evaluated separately for the three groups in the histopathological study. Basilar artery wall thicknesses of the three groups were evaluated to see whether the applied Piceatannol statistically significantly prevented vasoplasm following SAH (observed-unobserved). Rotarod and garcia neurological evaluation tests were registered before and after the experiment in all three groups and the results were evaluated.

Conclusion: Our results show that PCT may have a therapeutical value in an experimental SAH model in the treatment of early brain damage and basilar artery vasospasm through targeting basic brain molecular signals. Since the number of studies is limited on this subject and the mechanisms have not been completely clarified, comprehensive researches are required to clarify the effect of PCT application on SAH and the underlying mechanism. This is the first study determining the effect of PCT application on inflammation and apoptosis in cerebellar tissue in experimental SAH and on basilar artery vasospasm and PCT and it will contribute to future studies on this subject.

Keywords: Piceatannol, subarachnoid hemorrhage, vasospasm



İÇİNDEKİLER

Giriş ve Amaç	11
Genel Bilgiler	13
Gereç ve Yöntem	30
Bulgular	45
Tartışma	57

KISALTMALAR

SAK	Subaraknoid kanama
TNF- α	Tümör nekroz faktör-alfa
IL-1 α	İnterlökin-1 alfa
IL-1 β	İnterlökin-1 beta
IL-6	İnterlökin-6
IL-8	İnterlökin-8
NF- κ B	Nükleer faktör kappa B
ROS	Reaktif oksijen türleri
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
OH ⁻	Hidroksiradikal
O ⁻	Superoksit
SIRT1	Sirtüin 1
p53	Tümör protein 53
EBH	Erken beyin hasarı
PST	Piseatannol
RES	Resveratrol
TLR4	Toll benzeri reseptör 4
Bcl-2	B hücreli lenfoma 2
Bax	Bcl-2 ilişkili protein
IKB	İntrakraniyel basınç
SKA	Serebral kan akımı

TUNEL	Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) dUTP nick uç etiketleme
H-E	Hematoksilen-Eozin
AVM	Arteriovenöz malformasyon
KBB	Kan-beyin bariyeri
TTP	Tristetraprolin
MSS	Merkezi sinir sistemi
NLRP3	NOD benzeri reseptör ailesi pirin domain içeren protein 3
LPS	Lipopolisakkarit
HMGB1	Yüksek mobiliteli grup kutusu 1
ACEA	Kannabinoid tip 1 reseptör agonisti
PT	Pterostilben
HIF-1 α	Hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa
PAMP'ler	Patojenle ilişkili moleküler modeller
MyD88	Miyeloid farklılaşma faktörü 88
AIF	Apoptoz indükleyici faktör

RESİMLER, ŞEKİLLER VE TABLOLAR DİZİNİ	SAYFA NO
Ratlarda Subaraknoid kanama oluşturma	41, 42
3 grupta 24. saatte beynin ventralinden elde edilen örnek birer görüntüler	41, 42
Willis poligonunun şematik olarak gösterimi	21
Deney planının şematik gösterimi	38
Subaraknoid kanamayı takiben nöronal apoptoza giden yolun şematik gösterimi	33
Üç stilbenin kimyasal yapıları: resveratrol, piceatannol, pterostilben	31
Çalışma gruplarının garcia nörolojik skor bulgularının karşılaştırılması	51
Çalışma gruplarının rotarod nörolojik skor bulgularının karşılaştırılması	53
Rotarod cihazı	52
SHAM grubuna ait örnek bir serebellum doku kesiti (H-E, 100x)	56
SHAM grubuna ait örnek bir baziller kesiti (H-E, 100x)	56
SAK grubuna ait örnek bir serebellum doku kesiti (H-E, 100x)	56
SAK grubuna ait örnek bir baziller arter kesiti (H-E, 100x)	56
SAK+PST grubuna ait örnek bir Serebellum doku kesiti (H-E, 100x)	57
Çalışma gruplarından elde edilen H-E boyalı histolojik kesitlerde hücresel ödem kriterine göre yapılan değerlendirme sonuçlarının karşılaştırılması	55
Deney gruplarında TUNEL hücre sayılarının karşılaştırılması	55
SHAM grubuna ait örnek bir serebellum doku kesiti (TUNEL, 200x)	58
SAK grubuna ait örnek bir serebellum doku kesiti (TUNEL, 200x)	59
SAK+PST grubuna ait örnek bir serebellum doku kesiti (TUNEL, 200x)	59
Çalışılan gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin karşılaştırılması	52, 53



GİRİŞ

Subaraknoid kanama (SAK), beyni örten araknoid ve pia mater arasında yer alan subaraknoid boşluk içindeki intrakraniyal kanamayı ifade eder. Spontan (travmatik olmayan) SAK vakalarının çoğu intrakraniyal anevrizmanın yırtılmasından kaynaklanır. Bununla birlikte, SAK vakalarının yaklaşık yüzde 20'si rüptüre intrakranial anevrizmaya bağlı değildir. Anevrizmal olmayan SAK'ın potansiyel nedenleri çok çeşitlidir; bazı durumlarda kanamanın kaynağı belirlenemez (1).

Subaraknoid kanamalar (SAK) insanlarda yaygın olarak görülmekte ve beyin hasarına bağlı fonksiyon kaybı ve ölümlere yol açmaktadır. SAK yaygın görülmesine rağmen halen kesin bir tedavisi yoktur. Bu nedenle SAK'a bağlı ölüm oranlarını azaltmak veya fonksiyon kayıplarını önlemek ve SAK sonrası iyileşme oranlarını artırmaya yönelik deneysel çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir (2).

Erken beyin hasarı ve vazospazm üzerine çalışmalar bu problemin birçok faktöre bağlı fizyopatolojik bir olay olduğunu desteklemektedir. Apoptoz (programlanmış hücre ölümü) erken beyin hasarının başlıca fizyopatolojik bileşenlerinden biri olup serebral vazospazm üzerinde önemli bir rol oynar. Daha önce deneysel beyin kanaması oluşturulmuş hayvanlarda kaspaz inhibitörlerinin endotelial apoptozu ve vazospazmı azalttığı gözlemlenmiştir (3).

SAK sonrası kanamanın olduğu bölgeye kan hücrelerinin göç etmesi ve inflamasyona ait belirtilerin görülmesi 3. saatte başlar. Kanda bulunan diğer hücrelerden granülositler, monositler, lenfositlerde inflamasyon sahasına toplanır ve çeşitli substratların salgılanmaya başlanmasıyla inflamasyonun akut evresi başlamış olur. Bu substratlar TNF α , 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 sitoplasmasında inaktif halde bulunan bir transkripsiyon faktörü Nükleer Faktör kappaB (NF- κ B)dir. İnaktif halde bulunan NF- κ B diğer reaksiyonlarla üretilmeye başlanan serbest radikaller tarafından aktive edilir. Böylece vazospazmın inflamasyon kaskadı resmen başlamış olur. 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 (3).

Çalışmamızda yukarıda belirtilen ve vazospazm mekanizmasında yer alan parametreler baziller arter ve beyincik dokusunda incelenecek olup; vazospazmın ölçülmesinin yanısıra, apoptotik vasküler endotelial hücre sayısı incelenmesi, beyincik dokusunda apoptozu değerlendirmede yukarıdaki markerların incelenmesi ve TUNEL boyama metodu da kullanılarak tespiti amaçlanmıştır. Apoptoz'un temel ve klinik bilimlerde daha iyi anlaşılmasıyla yeni ilaç ve tedavi modalitelerinin gelişmesinde insan sağlığını tehdit eden hastalıkların çözüme ulaştırılmasına katkıda bulunacaktır.



1. GENEL BİLGİLER

1.1 Subaraknoid Kanama

2.1.1.Tanım

Giriş kısmında da belirtildiği gibi subaraknoid kanama (SAK), beyni örten araknoid ve pia mater arasında yer alan subaraknoid boşluk içindeki intrakraniyal kanamayı ifade eder. Spontan (travmatik olmayan) SAK vakalarının çoğu intrakraniyal anevrizmanın yırtılmasından kaynaklanır. (4).

2.1.2 Epidemiyoloji

Sistemik bir gözden geçirme ve meta-analizde, tüm çalışma dönemleri boyunca anevrizmal subaraknoid kanamanın (aSAK) genel küresel insidansı ortalama yıl başına 100.000 kişide 7.9'dur. Zaman eğilimlerine göre, 1980'de 100.000 kişide 10.2 olduğu saptanmıştır, 2010 yılında ise bu oran 100.000 kişide 6,1 olarak saptanmıştır (5).

Anevrizmal SAK insidansı coğrafi bölgeye göre değişmektedir (5). 2010 yılı için Kuzey Amerika'daki insidans 100.000 kişi-yılda 6,9 idi ve oran Avustralya/Yeni Zelanda'da benzerdi (7,4). Japonya'da (28) çok daha yüksek bir oran bildirilirken, Japonya hariç Asya'da (3,7) ve Güney ve Orta Amerika'da (5,1) daha düşük oranlar bildirilmiştir. 2009 ve 2014 yılları arasında kabul edilen hastaların İsviçre ulusal veritabanında, SAK insidansı 100.000 kişi-yılda 3.7 idi (6).

Anevrizma rüptürünün ortalama yaşı 50 ila 55 yaş aralığındadır (7). Çoğu anevrizmal SAK 40 ila 60 yaşları arasında ortaya çıkarken, küçük çocuklar ve yaşlı yetişkinler etkilenebilir (8-10). Siyah Amerikalılar, Beyaz Amerikalılardan daha yüksek risk altında görünmektedir (11, 12). Kadınlarda biraz daha yüksek anevrizmal SAK insidansı vardır ve bu hormonal durumla ilişkili olabileceği bildirilmektedir (8, 13).

2.1.3 Subaraknoid Kanama İçin Risk Faktörleri

2.1.4 Etiyolojik Faktörler

Erişkinlerde travmatik olmayan SAK'ın yaklaşık olarak %85 nedeni sakküler nevrizmaların rüptüre olmasıdır. Yaklaşık %10'luk kısım non-anevrizmatik perimezensefalik SAK olup, %5 oranında ise nadir sebepler karşımıza çıkmaktadır (14).

Perimezensefalik SAK, bilgisayarlı tomografide (BT) belirli bir lokalize kan modeli ile tanımlanan ve genellikle bu hastaları yalnızca anevrizmal SAK'dan değil, aynı zamanda diğer hastalıklardan da ayıran iyi huylu bir seyir ile karakterize edilen bir SAK alt tipidir (1, 15, 16).

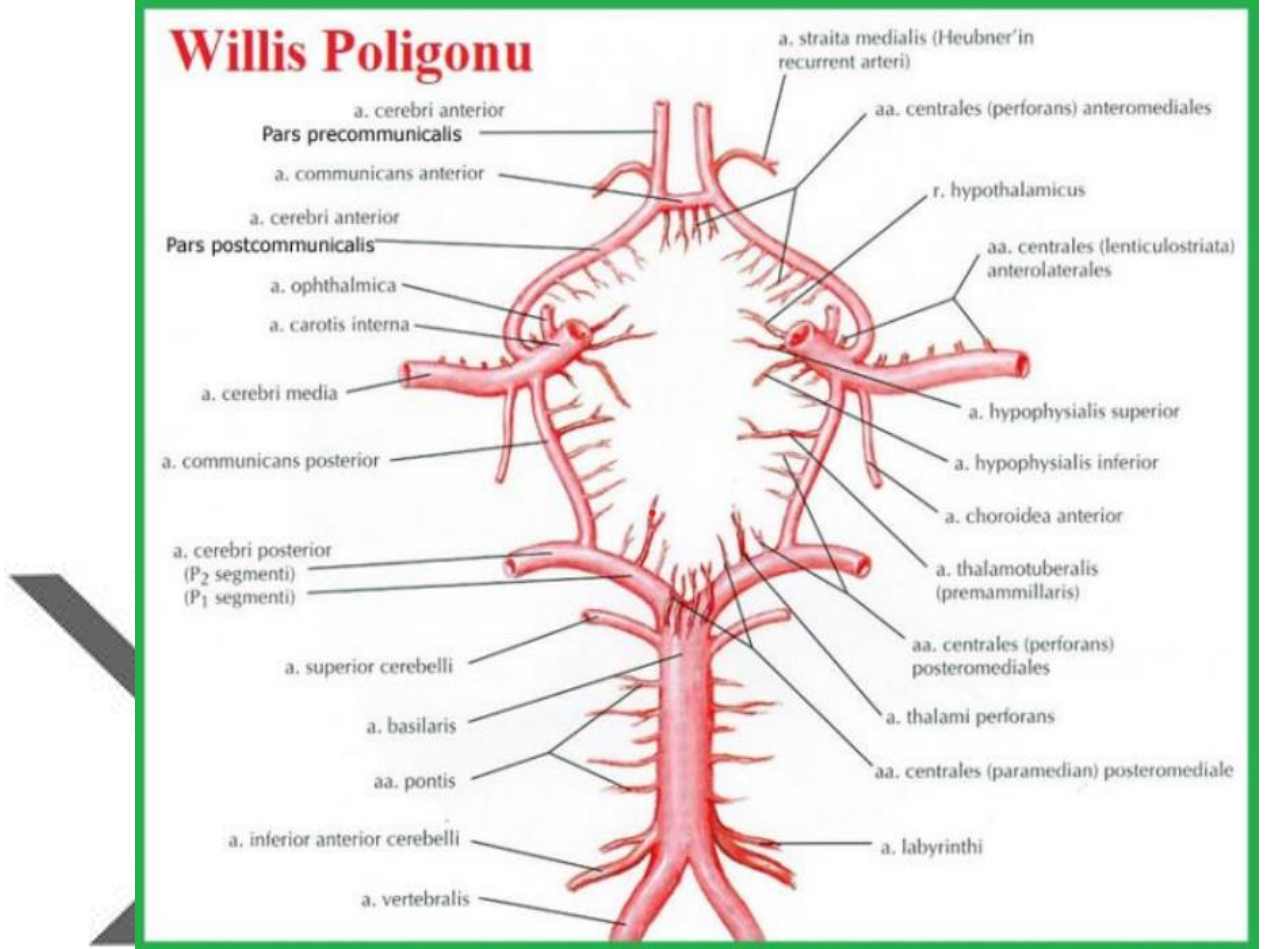
Perimezensefalik SAK'ı tanımlayan kafa BT bulguları, beyin sapının önündeki perimezensefalik sarnıçlarda izole edilen kanı; çevre sarnıçlara veya Sylvian fissürlerinin bazal kısımlarına uzanım olabilir ancak lateral Sylvian fissürüne, anterior interhemisferik fissüre veya lateral ventriküllere doğru genişleme olmayabilir şeklindedir (16, 17).

Perimezensefalik SAK, beyin sapının yüzeyinde küçük bir perforan arter veya venin spontan rüptüründen kaynaklanabilir. Bununla birlikte, çoğu durumda, teşhis testleri, perimezensefalik SAK'da kanamanın nedenini kesin olarak belirleyemez. Bazı vaka serilerinde, perimezensefalik SAK, hastaların üçte ikisine kadar sorumludur (17) .

SAK'ın etyolojik nedenleri tablo 1'de verilmiştir (18).

Tablo 1. Subaraknoid Kanama Etyolojik Sebepleri

Vasküler malformasyonlar	Serebral anevrizmalar(%80), aterosklerotik anevrizmalar, miyotik anevrizmalar, fuziform anevrizmalar
Arteriovenöz malformasyonlar	Arteriovenöz dural fistüller, kavernomlar, kapiller telenjektiazi, spinal vasküler malformasyonlar
Serebral Hemodinamik değişiklikler	Serebral venöz tromboz, moya moya sendromu, hiperperfüzyon sendromu, posterior ensefalopati sendromu, serebral vazokonstriksiyon sendromu, kritik karotid arter stenozu, orta serebral arter stenozu, sickle cell anemisi
Vasküler hastalıklar	Amiloid anjiopati, fibromusküler displazi, vaskülitler, kollajen hastalıklar, Osler-Rendu-Weber hastalığı
Kan diskrazileri	Konjenital pıhtılaşma bozuklukları, Kazanılmış pıhtılaşma bozuklukları (antikoagülan ve fibronolitik kullanımı), Trombositopeni, Dissemine intravasküler koagülasyon, Lösemi
Enfeksiyonlar	Sepsis, meningoensefalit, bakteriyel endokardit, parazitler
Toksik Etkenler	Uyuşturucu maddeler (kokain, amfetamin) ve ilaçlar (fenilefrin ve sildenafil)
Serebral neoplaziler	Gliomalar, metastazlar, pitüiter apopleksi, hemanjioblastomalar
Cerrahi Müdahaleler	Kranial ve spinal cerrahiler
Perimezensefalik ve idiyomatik kanamalar	
Kafa Travmaları	



Şekil 1: Willis poligonu şematik gösterimi, (Sobotta anatomi atlasından alınmıştır)

2.1.5 Klinik

SAK'ın klinik sunumu, subaraknoid kanamanın yeri ve boyutuna göre değişmektedir. Yaygın SAK, aSAK'ın klinik özelliklerini taklit edebilir. Bu tür hastalar sıklıkla, bazen geçici bilinç kaybı, kusma veya boyun ağrısı ile ilişkili, ani başlayan şiddetli baş ağrısı ile başvururlar. Baş ağrısı genellikle izole bir bulgudur. Bir saat içinde pik yapan şiddetli başlangıçlı baş ağrısı olan nörolojik olarak sağlam toplam 5283 hastayla yapılan üç büyük ardışık çalışmada, 329 hastada (yüzde 6) SAK olduğunu saptanmıştır (19-22).

SAK'daki baş ağrısı başlangıcı her zaman ani olarak kaydedilmez, çünkü hasta bunu o şekilde algılamaz veya klinisyen bu durumdan şüphelenmez. SAK'lı 132 hastayı içeren bir çalışmada, yoğunluğa ulaşma süresi altıda bir saattir (%5) ve

ani başlangıç için hekimler arası gözlemciler arası uyum sadece orta düzeydeydi (19).

Baş ağrısına ek olarak, SAK ile ilişkili yaygın semptomlar arasında kısa süreli bilinç kaybı, kusma ve boyun ağrısı veya sertliği yer aldığı saptanmıştır (10). Yapılan bir çalışmada, bu semptomların hastaların sırasıyla yüzde 9, 61 ve 75'inde görüldüğü ve SAK'ı olmayan hastalara kıyasla SAK'lı hastalarda daha yaygın olduğu saptanmıştır (20).

Genellikle bel ağrısının eşlik ettiği meningismus, aseptik menenjitte yol açan beyin omurilik sıvısı (BOS) içindeki kan ürünlerinin parçalanmasından kaynaklandığı için kanamadan birkaç saat sonra gelişebilir. Birçok hastanın bilinç düzeyi değişmiş olsa da, koma alışılmadık bir durumdur. Nöbetler, hastaların yüzde 10'undan daha azında ilk 24 saat içinde ortaya çıkar, ancak kötü sonucun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (23). SAK ani ölüm olarak da ortaya çıkabilir; yapılan bir çalışmada hastaların yüzde 22'sinin hastaneye ulaşmadan öldüğü saptanmıştır (24).

2.1.6 Tanı ve Ayırıcı Tanı

Ani veya hızlı başlayan şiddetli baş ağrısı şikâyeti, SAK'ın her zaman dikkate alınmasını gerektirecek kadar karakteristik bir bulgudur. Bu şikâyeti olan tüm hastalar, ilk başvuru anında uyanık ve nörolojik olarak sağlam olanlar da dahil olmak üzere, SAK için acil değerlendirmeye tabi tutulmalıdır (19, 25). Preretinal kanamalar, boyun ağrısı veya menenjismus gibi SAK tanısına yönelik ek ipuçları mevcut olabilir veya olmayabilir. Spontan SAK yönünden değerlendirilen acil servis hastalarının olduğu meta-analizde, fizik muayenede menenjismus varlığının pozitif olasılık oranı 6,6 olarak saptanmıştır (26).

SAK tanısında ilk adım kontrastsız kafa BT'dir. Kafa BT'si negatifse lomber ponksiyon yapılmalıdır (25). Her iki testin de negatif olması, SAK tanısını etkili bir şekilde ortadan kaldırır (27, 28). Baş ağrısı başlangıcından itibaren iki haftadan daha uzun süre sonra başvuran vakalarda (ksantokromi bile ortadan kalkmış olabilir), noninvaziv BT anjiyografi (BTA) veya manyetik rezonans anjiyografi (MRA) ile ek testler yapılmalıdır. Klinik yönden tanısal şüphe devam ederse, manyetik rezonans

görüntüleme (MRI), kateter serebral anjiyografi veya serebral venografi gerekli olabilir (25)

Ottawa Subaraknoid Kanama Kuralı; Bir saat içinde maksimum yoğunluğa ulaşan travmatik olmayan akut baş ağrısı ile başvuran nörolojik olarak sağlam hastalarda, aşağıdaki özelliklerden herhangi birini içeren bir klinik karar kuralının (Ottawa Subaraknoid Kanama Kuralı) duyarlılığı yüzde 100 ve özgüllüğü SAK tanısı için yüzde 15'tir (19):

- Yaş ≥ 40 yıl
- Boyun ağrısı veya sertliği
- Muayenede sınırlı boyun fleksiyonu
- Bilinç kaybı
- Egzersiz sırasında başlangıç
- Gök gürültüsü baş ağrısı (anında zirve yapan ağrı)

Çoğu aynı araştırmacılar tarafından yapılan müteakip doğrulama çalışmalarında benzer bulgular bildirilmiştir (20, 29, 30). Ayrıca, bu kuralın uygulanması, hastaların yalnızca yüzde 14'ünde değerlendirme ihtiyacını ortadan kaldırmıştır (31).

Yanlış teşhis ve gecikmiş teşhis; SAK'ın yanlış teşhisi ve geç teşhisi yaygındır ve tedavide gecikmelere ve daha kötü sonuçlara yol açabilir (32, 33). Atlanan veya geciken SAK tanısı genellikle üç hatadan kaynaklanır (Tablo 2) (10, 34):

- SAK ile ilişkili klinik sunum spektrumunun takdir edilememesi.
- Kafa BT taraması elde edememe veya SAK teşhisindeki sınırlamalarını anlayamama.
- Lomber ponksiyon gerçekleştirilmeme veya sonuçları doğru yorumlayamama

Tablo 2. Subaraknoid kanamanın yanlış teşhisinin nedenleri (35)

Subaraknoid Kanamanın Klinik Özelliklerinin Tanınmaması
<ul style="list-style-type: none"> • Olağandışı (hasta için) baş ağrıları olan hastalardan tam öykü alınamaması <ul style="list-style-type: none"> ○ Başlangıç ani mi? ○ Kalite farklı mı ve şiddeti önceki baş ağrılarından daha mı fazla?
<ul style="list-style-type: none"> • Baş ağrısının kendiliğinden veya narkotik olmayan analjeziklerle iyileşebileceğini takdir edememe
<ul style="list-style-type: none"> • Bayılma ve düşme veya motorlu taşıt çarpmasından kaynaklanan ikincil kafa travmasına odaklanmak
<ul style="list-style-type: none"> • EKG anormalliklerine odaklanma
<ul style="list-style-type: none"> • Yüksek kan basıncına odaklanmak
<ul style="list-style-type: none"> • Klasik sunuma aşırı güven
<ul style="list-style-type: none"> • Diğer bozuklukların yanlış teşhisi (örn. viral sendrom, viral menenjit, migren, gerilim tipi baş ağrısı, sinüs ilişkili baş ağrısı, psikiyatrik bozukluk)
Kafa BT taramasının sınırlamalarının anlaşılması
<ul style="list-style-type: none"> • Baş ağrısı başlangıcı arttıkça duyarlılık azalır
<ul style="list-style-type: none"> • Küçük hacimli kanamalarla yanlış negatif sonuçlar
<ul style="list-style-type: none"> • Deneyimsiz doktor tarafından yorumlanan tarama
<ul style="list-style-type: none"> • Hareket artefaktları veya posterior fossa ince kesiklerinin olmaması
<ul style="list-style-type: none"> • %30'dan az hematokrit nedeniyle yanlış negatif sonuçlar
Lomber ponksiyon uygulamama veya BOS bulgularını doğru yorumlamama
<ul style="list-style-type: none"> ▪ CT taramaları negatif veya sonuçsuz olan hastalarda lomber ponksiyon yapılmaması
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Travmatik bir musluğun gerçek subaraknoid kanamadan ayırt edilememesi
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ksantokrominin çok erken (12 saatten az) ve çok geç (2 haftadan fazla) bulunabileceğinin fark edilememesi

Klinik prezentasyonun genişliği, aSAK'lı hastalarda prognozu olumsuz etkileyen bir durumdur. Bundan dolayı prognozu tahmin edebilmek, hastanın kliniği ile ilgili standardizasyonu sağlayabilmek, hekimler arasında konsültasyonu kolaylaştırmak, birden fazla merkezli araştırmaların planlanmasını mümkün kılmak ve bilhassa resüsitasyon veya ventriküler drenaj uygulanmış aSAK'lı vakalarda prognozu önceden tespit etmek amacıyla Botterel, Hunt-Hess, Dünya Nörolojik Cerrahlar Federasyonu (World Federation of Neurological Surgeons-WFNS) ve SAK'ın radyolojik olarak miktarını tayin etmek amacıyla Fisher tarafından kategorize edilmiş evrelemeler kullanılmaktadır (36, 37).

Tablo 3. aSAK Evrelemeleri

Botterel Klinik Sınıflaması	Evre 1: Şuur açık, menenjal irritasyon belirtileri var veya yok
	Evre 2: Uykuya eğilimli, nörolojik defisit yok.
	Evre 3: Uykuya eğilimli, nörolojik defisit ve bazen intraserebral hematoma var.
	Evre 4: Şuur kapalı ve nörolojik defisit var.
	Evre 5: Derin Koma ve deserebrasyon rijiditesi var.
Hunt-Hess Klinik Sınıflaması	Evre 1: Asemptomatik, hafif baş ağrısı ve ense sertliği var.
	Evre 2: Orta ve şiddetli baş ağrısı, ense sertliği, kranial sinir felci var.
	Evre 3: Uykuya eğilimli, hafif derecede fokal nörolojik defisit
	Evre 4: Stupor, orta ve ağır hemiparezi, rijidite, vejetatif bozukluk var.
	Evre 5: Derin koma ve deserebrasyon rijiditesi var.
WFNS Klinik Sınıflaması	Evre 1: GKS 15 Motor defisit yok
	Evre 2: GKS 13-14 Motor defisit yok
	Evre 3: GKS 13-14 Motor defisit var
	Evre 4: GKS 7-12 Motor defisit var veya yok
	Evre 5: GKS 3-6 Motor defisit var veya yok
Fischer Radyolojik Sınıflaması	1.Derece: Saptanabilen subaraknoid kanama yok
	2.Derece: 1 mm kalınlıktan daha ince diffüz ya da vertikal tabakalar*
	3.Derece: 1 mm pıhtı ve/veya 1mm vertikal tabaka*
	4.Derece: Diffüz SAK ile ya da SAK olmaksızın intraserebral veya intraventriküler pıhtı

*Vertikal tabaka: İnterhemisferik fissür, insular sisterna ve ambient sisternayı içeren subaraknoid mesafelerdeki kanamayı ifade eder

2.1.7 Subaraknoid Kanamanın Komplikasyonları

Medikal ve nörolojik komplikasyonlar SAK sonrası sık görülür ve genel morbidite ve mortaliteye önemli ölçüde katkıda bulunur. SAK'lı hastalar hemodinamik instabilite ve nörolojik bozulma açısından risk altındadır. Bir çalışmada, hastaların yüzde 35'inde yatıştan sonraki ilk 24 saat içinde klinik olarak nörolojik kötüleşme meydana geldiği saptanmıştır (38).

Yeniden kanama; Anevrizmal SAK'tan sonra, hasta önemli ölçüde erken yeniden kanama riski altındadır (ilk 24 saatte yüzde 4 ila 14, ilk 2 ila 12 saatte maksimum riskle). Rüptür yüksek mortalite ile ilişkilidir. Yeniden kanamanın görülebileceği durumlar şunları içerir (39-43).

- Anevrizma tedavisi için daha uzun süre
- Başvuruda daha kötü nörolojik durum
- Daha büyük anevrizma boyutu
- Yüksek sistolik kan basıncı
- İntraserebral veya intraventricüler kan varlığı
- Akut hidrosefali

Tekrar kanamaların çoğu subaraknoid boşluğa olurken, intraparaknoidal, intraventricüler veya subdural kompartmanlarda da kanama olabilir. Yeniden kanama tanısı genellikle beyin bilgisayarlı tomografi (BT) taramasında yeni kanamanın ortaya çıkmasıyla birlikte nörolojik durumdaki akut kötüleşmeye dayanarak teşhis edilir. Lomber ponksiyonun değerlendirilmesi daha zordur çünkü ilk kanamadan kaynaklanan ksantokromi iki hafta veya daha uzun süre devam edebilir (44).

Vazospazm ve gecikmiş serebral iskemi; Gecikmiş serebral iskemi, SAK'ın sık görülen komplikasyonudur; SAK sonrası morbidite ve mortaliteye önemli ölçüde arttırdığı saptanmıştır (45, 46).

Gecikmiş serebral iskemi, anevrizmal SAK'lı hastaların yaklaşık yüzde 30'unda, tipik olarak semptomların başlamasından 4 ila 14 gün sonra ortaya çıkar (47, 48). Gecikmiş serebral iskeminin tanımı, fokal nörolojik bozukluğun (hemiparezi, afazi, apraksi, hemianopi veya ihmal gibi) oluşması veya Glasgow

Koma Skalasında en az bir saat süren en az iki puanlık bir düşüşün oluşmasıdır. Anevrizma tıkanmasından hemen sonra görülür ve uygun klinik değerlendirme, beyin görüntüleme ve laboratuvar çalışmalarından sonra başka nedenlere bağlanamaz (49). Bununla birlikte, klinik derecesi kötü olan hastalarda (stupor veya koma), gecikmiş serebral iskemi klinik olarak fark edilemeyebilir (50).

SAK sonrası gecikmiş serebral iskeminin en yaygın nedeninin vazospazm olduğu varsayılmaktadır (51). Semptomların şiddeti, etkilenen artere ve kollateral dolaşımın derecesine bağlıdır. Vazospazm tipik olarak kanamadan sonraki 3. günden daha erken başlamaz ve 7 ila 8. günlerde zirveye ulaşır. Bununla birlikte, vazospazm daha erken, hastaneye yatış sırasında bile ortaya çıkabilir (52-55).

Vazospazmın, endotel hasarına ve düz kas kasılmasına neden olan subaraknoid kan pıhtılarının parçalanması sırasında üretilen spazmojenik maddeler tarafından üretildiğine inanılmaktadır (56). Vasküler endotel, serebral damar sistemini tonik olarak genişleten nitrik oksit üretir; endotel hasarı, nitrik oksit üretimini etkileyerek vazokonstriksiyona ve vazodilatörlere bozulmuş yanıtı yol açabilir (57). Ek olarak, güçlü vazokonstriktör endotelinin artan salınımı, SAK'dan sonra serebral vazospazmın uyarılmasında önemli bir rol oynayabilir (56). Vazospazm ise bölgesel serebral hipoperfüzyona ve gecikmiş serebral iskemi ve enfarktüse neden olabilir (58).

Vazospazm için risk faktörleri, kanamanın ciddiyetini ve ana intraserebral kan damarlarına yakınlığını içerir. BT taramasında kanın yeri ve kapsamı, komplike serebral vazospazmı tahmin etmeye yardımcı olabilir (59, 60). Fisher ve Claassen (Tablo 3) dahil olmak üzere radyolojik derecelendirme ölçekleri genellikle vazospazm ve serebral iskemi olasılığını tahmin etmek için kullanılır.

Vazospazm riskini artırabilen diğer faktörler arasında 50 yaşın altında olmak ve hiperglisemi sayılabilir (61, 62). Çoğu çalışmada, kötü klinik derecenin (örneğin, Hunt ve Hess derece 4 veya 5 veya Glasgow Koma Skalası skoru <14) artmış vazospazm riski ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (63-65). Anevrizma tedavisi tipinin (cerrahi kliplleme veya endovasküler sarmal) vazospazm riskini etkileyip etkilemediği açık değildir. Çeşitli çalışmalardan elde edilen gözlemsel veriler, endovasküler koillemenin azalmış vazospazm riski ile ilişkili olduğunu (66-69) öne sürerken, diğer çalışmalar klipsleme ve koillemenin benzer bir riske sahip olduğunu

öne sürmektedir (70, 71) ve hala diğerleri sarmallaşmanın daha ciddi vazospazm ile ilişkili olduğunu ileri sürmektedir (72).

Vazospazm dışındaki mekanizmalar gecikmiş serebral iskemiye katkıda bulunabilir. Bunlar, oteregülasyon kaybı, mikrotromboz, kortikal yayılan depresyon ve gecikmiş hücrel apoptozu içeren mikrodolaşım bozukluğunu içerir (73, 74). Ayrıca, anevrizma rüptürü zamanında başlayan ve glial aktivasyona, endotel disfonksiyonuna, yaygın nöroinflamasyona ve müteakip iskemiye yol açan artmış kafa içi basınç (ICP) ve global hipoperfüzyon tarafından tetiklenen erken beyin hasarına işaret eden deneysel kanıtlar da vardır (75).

Artmış intrakraniyal basınç; SAK'lı hastalarda, kanama hacmi, akut hidrosefali, kanama ve/veya iskemi sonrası reaktif hiperemi ve distal serebral arteriolar vazodilatasyon gibi bir dizi faktöre bağlı olarak yüksek kafa içi basıncı (KİBAS) gelişebilir. (10, 76-79). 234 SAK hastasının (Hunt ve Hess derece I ila III) takibinden oluşan bir çalışmada, hastaların %49'unda artmış kafaiçi basıncı tespit edilmiştir (80).

Hidrosefali; SAK'lı hastaların yüzde 20 ila 30'unu etkiler. Genellikle SAK'tan sonraki ilk birkaç dakika ila saat içinde ortaya çıkar (81). Daha sonraki bir komplikasyon da olabilir. SAK sonrası hidrosefalinin, beyin omurilik sıvısı (BOS) akışının kan ürünleri veya yapışıklıklar tarafından engellenmesi veya araknoid granülasyonlarda BOS absorpsiyonunun azalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (82).

Hidrosefali klinik sunumu, kafa BT taramasında ventriküler dilatasyonun eşlik ettiği bilinç düzeyinde ilerleyici bozulma şeklindedir. Artmış kafaiçi basıncının oküler belirtileri (miyozis, aşağı göz kayması veya sınırlı yukarı bakış) tüm hastalarda olmasa da birçok hastada görülmektedir (83). Akut hidrosefali ve bilinç bozukluğu olan hastaların yaklaşık yüzde 30'unda, genellikle 24 saat içinde spontan iyileşme görülebilir (81, 84). Geri kalanıda, akut hidrosefali yeniden kanama ve serebral enfarktüse sekonder artmış morbidite ve mortalite ile ilişkilidir (85).

Hidrosefali riskinin artmasıyla ilişkili faktörler arasında ileri yaş, intraventriküler kanama, arka sirkülasyon anevrizmaları, antifibrinolitik ajanlarla

tedavi ve başvuruda düşük Glasgow Koma Skalası skoru yer alır. Hiponatremisi olan veya hipertansiyon öyküsü olan hastalarda insidansın arttığı da bildirilmiştir (86, 87).

Hiponatremi; SAK'lı hastaların %30'a kadarında gelişebileceği bildirilmiştir (39, 88) ve muhtemelen hipotalamik hasarın aracılık ettiği öngörülmüştür. SAK'ı takiben hiponatremiye yol açan su tutulması, antidiüretik hormonun (SIADH) uygunsuz salgılanması sendromundan veya serebral tuz kaybından kaynaklanabilir (81).

Nöbetler; SAK'lı hastaların yüzde 6 ila 18'inde görülür (39). Risk faktörleri arasında kalın subaraknoid pıhtı, intraserebral kanama, gecikmiş enfarktüs ve orta serebral arterde anevrizma yer alır. Anevrizma tedavisinden önce meydana gelen nöbetler sıklıkla erken kanamanın bir işaretidir (81).

SAK sonrası akut nöbet geçiren hastalar, tekrarını önlemek için nöbet önleyici ilaçlarla tedavi edilir. Tipik olarak levetirasetam gibi uygun yan etki profiline sahip ajanlar kullanılır. Fenitoinen kaçınılması tavsiye edilir, çünkü kullanımı anevrizmal SAK'lı hastalarda daha kötü kognitif sonuçlarla ilişkilendirilmiştir (89).

Anemi; Yapılan bir çalışmada hastaların %18'inde hastanede kaldıkları süre boyunca ortaya çıkan aneminin SAK'tan sonra yaygın olduğu saptanmıştır (90). Çoğu çalışma, aneminin daha kötü sonuçlarla ilişkili olduğunu, daha yüksek hemoglobin düzeylerinin ise daha az serebral enfarktüs ve daha iyi sonuçlarla ilişkili olduğunu ileri sürmektedir (91-94). SAK'lı hastalarda transfüzyon için bir hedef hemoglobin tanımlanmamıştır (39); bazı uzmanlar 8 ila 10 g/dL'nin üzerinde bir hedef önermektedir (95) ve bir randomize çalışma, daha yüksek bir transfüzyon hedefinin (10 - 11,5 g/dL) güvenli görüldüğünü bulmuştur (96). Yine de, kırmızı kan hücresi transfüzyonu, özellikle gecikmiş serebral iskemisi olmayan hastalarda, SAK'lı hastalarla ilgili gözlemsel çalışmalarda bağımsız olarak daha kötü sonuçlarla ilişkilendirilmiştir (97, 98). Bu nedenle, SAK'da optimal transfüzyon stratejisini belirlemek için daha büyük randomize çalışmalar gerekmektedir (99).

Kardiyopulmoner komplikasyonlar; Pulmoner ödem ve kardiyak aritmiler SAK vakalarının sırasıyla yüzde 23 ve 35'ini komplike hale getirdiği bildirilmiştir

(100) SAK sonrası elektrokardiyografi (EKG) değişiklikleri, ekokardiyografide yapısal değişiklikler ve akut troponin yükselmeleri gibi bir dizi kardiyak değişiklik meydana gelir. Bunlar daha şiddetli SAK'ı olanlarda daha yaygın ve daha şiddetli görünmektedir. Bazen, bu bulgulara odaklanmak yanlış teşhisle sonuçlanabilir (101, 102).

2.1.8. Prognoz

Anevrizmal SAK tedavisinden sonraki süreç, beyin cerrahisi ile ilgili risklerin yanı sıra SAK'tan kaynaklanan potansiyel beyin hasarından ve müteakip komplikasyonlardan etkilenir. SAK, yüksek bir erken ölüm oranı ile ilişkilidir (103). 2017'de yayınlanan popülasyona dayalı bir çalışmada, SAK'lı hastaların yaklaşık yüzde 18'inin bir hastanede değerlendirilmeden önce aniden öldüğü saptanmıştır (24). Hastaneye canlı olarak ulaşan hastalar arasında, sonraki erken ölümlerin çoğu, anevrizmal SAK'ın ilk kanama, yeniden kanama, vazospazm ve gecikmiş serebral iskemi, hidrosefali, artmış kafa içi basınç, nöbetler ve kardiyak komplikasyonlarla ilişkili yaygın komplikasyonlarından kaynaklanmaktadır (104-106).

SAK'a bağlı erken mortalite yüksek olmakla birlikte, zamanla azalmaktadır (107-111). Zaman içinde artan teşhis doğruluğu ve nörokritik bakımdaki terapötik ilerlemeler, mortalitede azalma için makul ancak kanıtlanmamış nedenlerdir (81, 112).

SAK sonrası akut prognoz için en önemli prediktif faktörler şunları içerir (45, 113-115):

- Başvuru sırasındaki bilinç düzeyi ve nörolojik derece
- Hasta yaşı (negatif korelasyon)
- İlk kafa bilgisayarlı tomografi taramasındaki kan miktarı (negatif korelasyon)

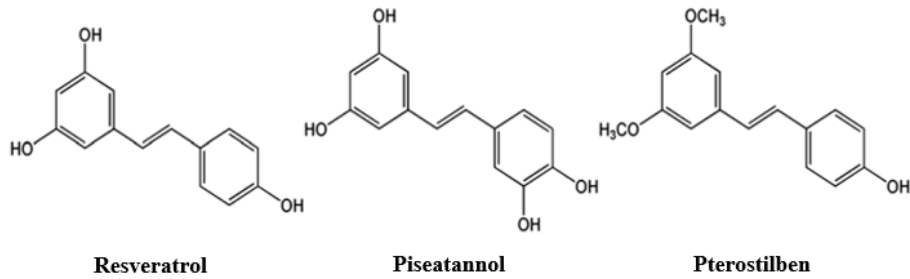
Diğer çalışmalar, SAK'dan sonra hipoksemi, hiperglisemi, böbrek yetmezliği, ateş ve aneminin de yaygın olduğunu ve kötü sonuçlarla ilişkili olduğunu belirtmiştir (100, 116-118). SAK hastalarında bu fizyolojik düzensizliklerin düzeltilmesi önerilmektedir (119), ancak bu tür tedavilerin yararını hiçbir çalışma

doğrulamamıştır. SAK başlangıcındaki nöbetler, geç nöbetler (epilepsi) için bağımsız bir risk faktörü ve kötü sonucun bir göstergesi gibi görünmektedir (23, 120, 121).

2.2. Piseatannol

Son yıllarda yapılan birçok çalışma, özellikle bitki özlerinden elde edilenler olmak üzere, nörodejeneratif hastalıklar için çok sayıda doğal bileşiğin terapötik potansiyelinin araştırılmasına odaklanmıştır (122). Tarih boyunca, bazı bitkilerin tıbbi kullanımına ilişkin atalara dayanan geleneksel yaklaşım, bitkilerden izole edilen sayısız züt ve bileşiğin etki mekanizması ve güvenliği üzerine yapılan çalışmaların temeli olmuştur (123). Doğal bileşiklerin kullanımının farmakolojik çekiciliği ve sınırlı yan etkileri, nörodejenerasyona sebep olanlar gibi çok faktörlü hastalıkların önlenmesi veya tedavisi için özellikle yararlı olan çoklu hedef etki mekanizmaları etrafında döner (123).

Stilbenler, başlıca RES, PST ve pterostilben (PT) olmak üzere üzüm gibi bazı meyvelerde bulunan türevleri ile temsil edilen bir dizi gıda kaynaklı biyoaktif doğal üründür (124).



Şekil 1. Üç stilbenin kimyasal yapıları (resveratrol, piseatannol, pterostilben (125)).

Tüm stilbenler arasında en yaygın ilgiyi RES almıştır. RES'in, Huntington hastalığı ve felçler dahil olmak üzere nörolojik bozuklukları düzenlediği ve ayrıca nöronları Alzheimer hastalığının önemli patolojik semptomları olarak kabul edilen apoptoza karşı koruduğu kanıtlanmıştır (126). Ancak diğer stilbenlerin, PST ve PT gibi, RES'den daha üstün nöroprotektif aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. PST (3,3',4,5'-trans-tetrahidroksistilben) çilek, yer fıstığı, üzüm ve beyaz çayda bulunan

ve doğal olarak oluşan bir stilbendir (127). Modern farmakolojik çalışmalar, PST'nin antioksidan, anti-inflamatuar, anti-mutajenik ve anti-diyabetik etkilerini araştırmaktadır (128). RES fenil halkalarındaki hidroksil gruplarının sayısının artırılması, suda çözünürlüğünü ve farmakolojik aktivitesini arttırmak için ilginç bir stratejidir (129, 130).

Genel olarak, stilben kısmında üçten az hidroksil grubu içeren polihidroksillenmiş türevler, çok düşük oral biyoyararlanım sergiler (131). Ancak oksiresveratrol ve piseatannol gibi dört hidroksil grubuna sahip bileşikler (PST; 3,3',4,5'-transtetrahidroksistilben) RES'den daha iyi suda çözünürlük, daha hızlı absorpsiyon ve daha yüksek biyoyararlanım gösterir (132, 133).

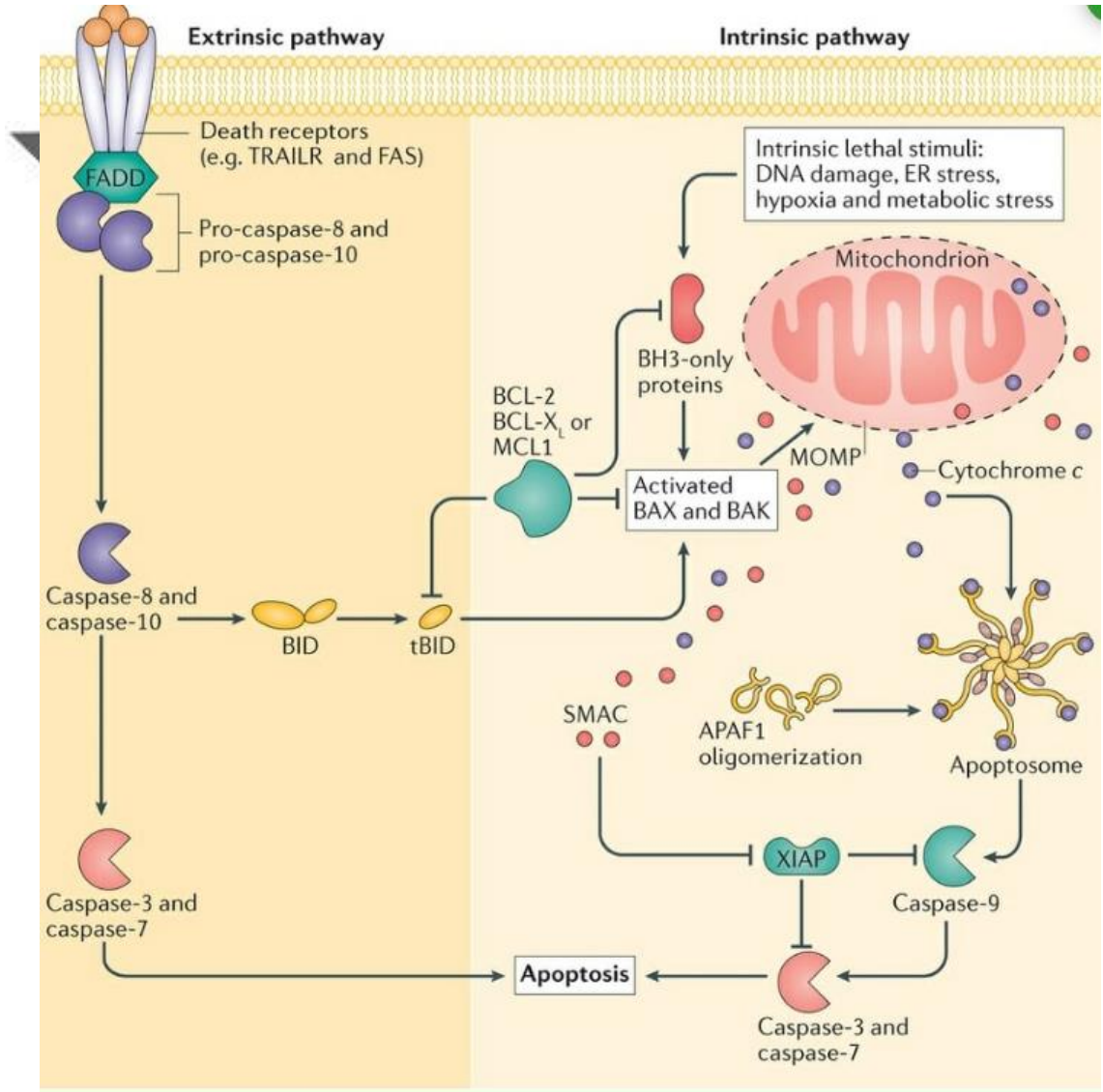
Setoguchi vd. intragastrik uygulamadan sonra PST'nin sıçanlarda RES'den 2 kat daha yüksek seviyelerde emildiğini göstermiştir. Bu çalışma ayrıca PST'nin, PST için en iyi biyolojik aktiviteyi öngören RES'den daha yüksek bir metabolik stabilite sunduğunu gösterir (133).

En çok çalışılan hidroksillenmiş RES analoglarından biri PST'dir. Zhang vd. bu bileşiğin farelerde D-galaktoz kaynaklı yaşlanma üzerindeki etkilerini değerlendirmiştir. Sonuçlar, PST tedavisinin spontan motor aktiviteyi koruduğunu ve uzamsal öğrenme ve hafıza becerilerini geliştirmesinin yanı sıra nöronal kaybı önlediğini, oksidatif stresi azalttığını ve hipokampus ve kortekste hücre çoğalmasını desteklediğini göstermiştir (134).

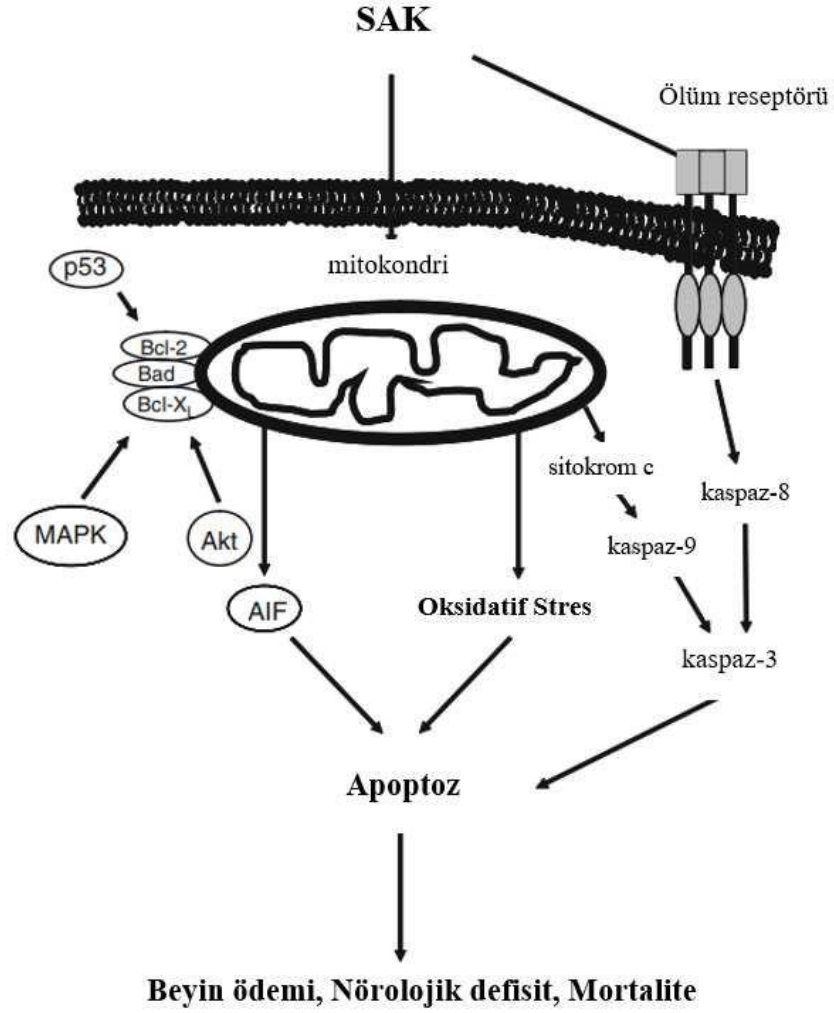
2.2.1. Apoptoz

Hücrel yaşam döngüsü apoptoz ile nekroz arasında bir denge halindedir. Programlanmış hücre ölümü apoptozun uyarılması ekstrinsik ve intrinsik yolla olmaktadır. Apoptozun düzenlenmesinde bazı moleküller; kalsiyum, seramid, p53, kaspazlar, sitokrom-c, Bcl-2 ailesi gibi moleküller görev alır (Igney ve Krammer, 2002; Martinvalet vd., 2005). Apoptozda kaspaz aktivasyonu iki yolla uyarılır. Ekstrinsik yol, TNF- α , TRAIL ve CD95 ligand dâhil olmak üzere çeşitli apoptoz indükleyici sitokinlerin kaspaz-8'in aktivasyonunu sağlayan ilgili reseptörlerine bağlanması ile aktive olur (Peter ve Krammer, 2003). İntrinsik (mitokondriyal) yol, sitokrom-c ve mitokondriyal zarlar arası boşluk proteinlerinin, sırasıyla kaspaz-9'u

aktive etmesi ve apoptoz proteinlerinin (IAP'ler) sitozole salınması ile etkili hale gelir. Aktive edilmiş kaspaz-8 ve kaspaz-9, bundan sonra ortak son yolda bulunan efektör kaspazları indükler. Bu aktivasyon ise hücrede apoptozun başlaması ile neticelenir (Lindsten vd, 2000; Reed, 2000). Piseatannol'ün apoptozu artırma lehine etki göstermesi, nöronal iyileşme ve vazospazmı önlemede etkili olduğu çalışmamızda düşünülmektedir.



Apoptoz yolları (Robbins Temel Patolojiden alınmıştır)



Subaraknoid kanamayı takiben nöronal apoptoza giden yolun şematik gösterimi (Hasegawa vd., 2011).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'ndan alınan onay (27/11/2020 toplantı tarihli ve 2020/10-06 sayılı karar ile yürütülmüş olup araştırmanın hayvan deneyleri aşaması Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (ÇOMÜDAM)'nde gerçekleştirilmiştir.

3.1. Hayvan Materyali

Çalışmada, ÇOMÜDAM'dan temin edilen toplam 27 adet Wistar Albino ırkı sıçan (200-300 g,; 7-8 haftalık) kullanıldı. Her grupta 9 sıçan olmak üzere SHAM, SAK ve SAK+PST grupları oluşturuldu. SAK modeli oluşturmak için sıçanların kuyruk arterinden 120 ml kan alınarak prekiazmatik sisternaya enjekte edildi. SAK+PST grubunda SAK modeli oluşturulduktan sonra 30 mg/kg dozda PST uygulandı. Sıçanlar davranış, solunum ve kardiyovasküler sistem yönünden klinik muayeneden geçirilmiş olup herhangi bir olumsuzluk tespit edilmemiştir. Hayvanlar, deney süresince yaklaşık olarak 22°C'lik oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık-karanlık döngüsünde ve havalandırması mevcut bir ortamda muhafaza edildi ve ad-libitum olarak beslendi.

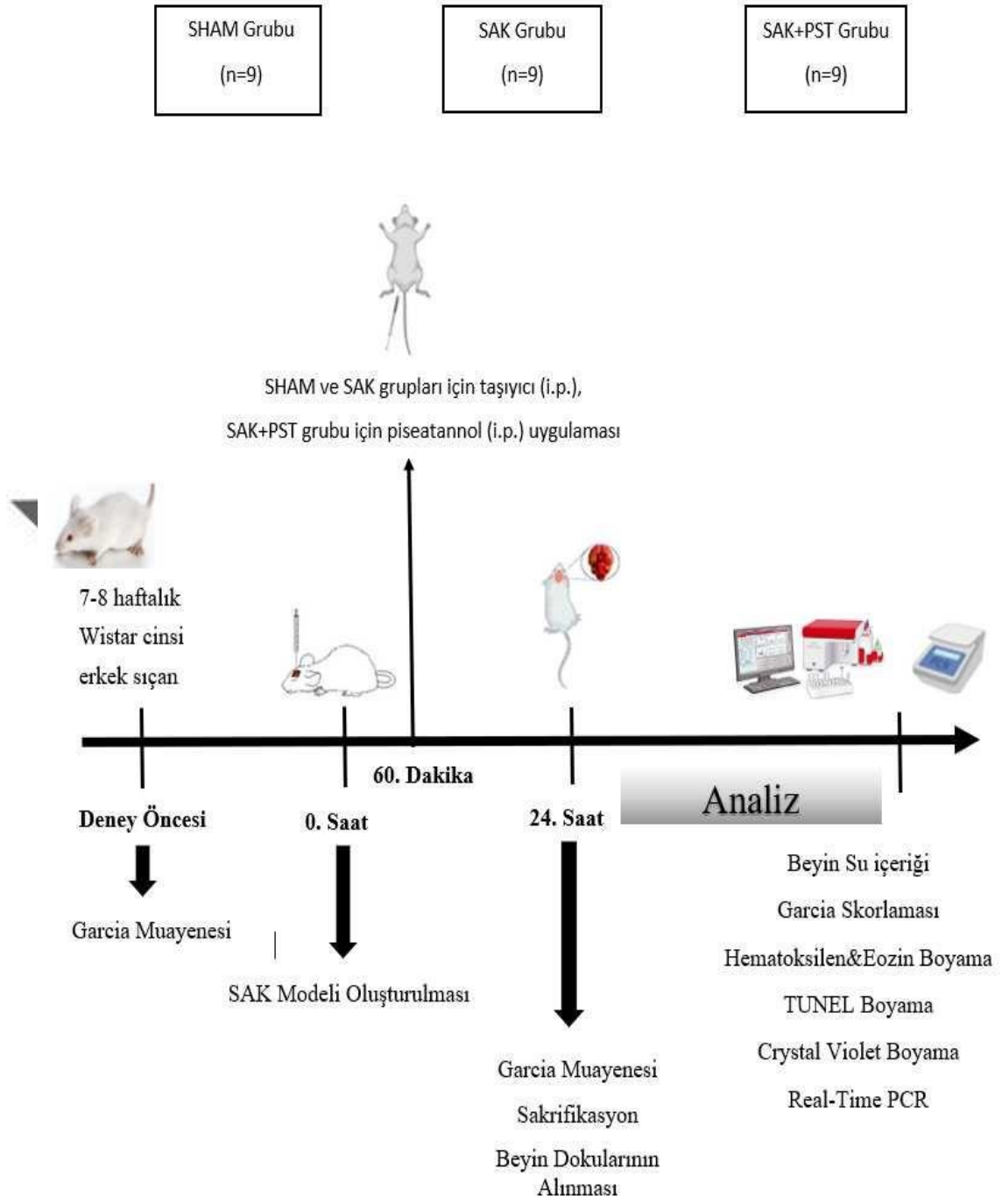
3.1.1. Grupların Oluşturulması

27 adet erkek Wistar cinsi albino ratlar 9 ar 3 gruba ayrıldı. Grup 1 (sham), grup 2 (Sak), grup 3 (Sak+ Piceatannol uygulaması) olarak planlandı. Grup 1'deki ratlara sak oluşturulmadı, piceatannol uygulanmadı. Sadece prekiyazmatik sisterna alanına girişim yapıldı, madde verilmedi ve intraperitoneal olarak sf verildi. 24 saat sonra sakrifiye edildi. Grup 2 (sak) grubundaki 9 rat a prekiyazmatik sisterna içerisine otolog 150 mikrolitre kuyruk kanı alınıp verildi. 24 saat sonra sakrifiye edildi. Grup 3 teki (sak+piceatannol) 9 rat a ise gene prekiyazmatik sisterna içerisine otolog kan verilerek sak oluşturulup, 60 dk sonra Piceatannol (DMSO) içerisinde çözülmüş 25 mg/kg dozunda intraperitoneal yolla verildi. 24 saat sonra ise sakrifikasyon işlemi yapıldı.

Baziler arterlerin ve serebellumun lümen alanları ve duvar kalınlıkları stereolojik yöntemle histopatolojik olarak incelendi.

Sakrifiye edilen ratlardan her 3 grupta (kontrol-sak, piceatannol) rastgele seçilen 5 deneğin serebellum dokusundan proinflamatuvar sitokin ve apoptotik bazı marker seviyeleri çalışıldı. (bax, bel, Tnf alfa, IL-6, kaspaz 3, NF-KB, beta-aktin, p53, tlr4, sirt1)

Histopatolojik incelemenin yanında ek olarak deney öncesi ve sonrasında nörolojik performans muayene testine (rotarod ve garcia testi) sokulan hayvanların performansları saniye cinsinden kayıt altına alındı.



Deneş planının Şematik gösterimi

3.2. Anestezi İşlemi

SAK modeli oluşturulması için sıçanlara öncelikle kas içi ketamin hidroklorür (60-80 mg/kg; Ketazol-Richter Pharma AG) ve ksilazin hidroklorür (5 mg/kg; Xylazin Bio %2-Bioveta) kullanılarak anestezi uygulandı.

3.3. Piseatanol Çözeltisinin Hazırlanması ve Uygulanması

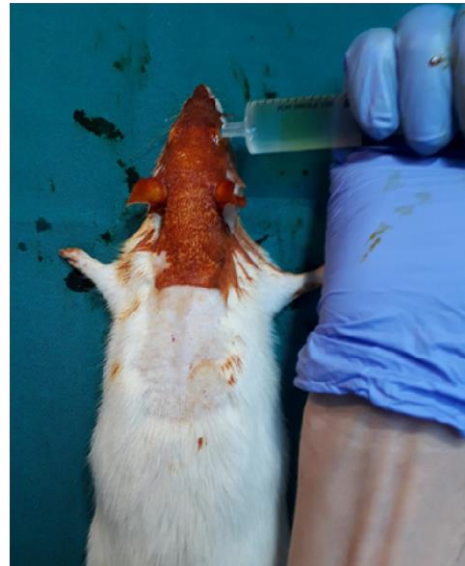
Belirlenen miktar PST (Cayman Chemical; Cat. No: 10083-24-6) hassas terazide tartıldı. Tartılan kimyasal her bir hayvan için ayrı hazırlanan ependorf tüplere konuldu. Doz ayarlaması sıçan ağırlıkları göz önünde bulundurularak yapıldı. Ardından tüplerin üzerine absölüt etanol ilave edildi ve distile su ile seyreltildi. Bu gruptaki hayvanlar için 30 mg/kg dozunda PST, %2'lik etanol içerisinde vorteks yardımıyla çözündürölüp uygulamaya hazır hale getirildi. PST belirtilen dozlarda deney sırasınca taze olarak hazırlandı ve hemen uygulandı. Hazırlanan çözelti SAK modeli oluşturulduktan 60 dakika sonra SAK+PST grubuna intraperitoneal olarak uygulandı.

3.4. Yöntem

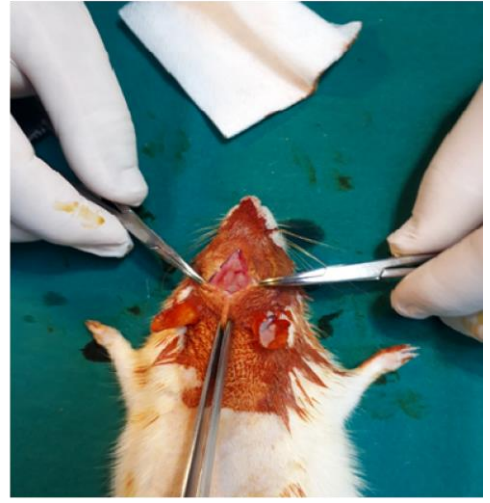
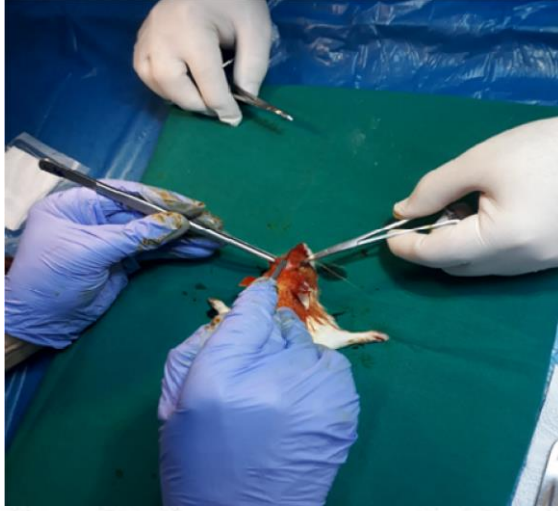
Çalışmamız boyunca uygulanan basamakların ayrıntıları aşağıda belirtilmiştir.

3.4.1. Subaraknoid Kanama Modeli Oluşturulması

Çalışmamızda, SAK ve SAK+PST gruplarında bulunan toplam 18 hayvanda SAK modeli oluşturuldu. Anesteziden sonra hayvanların operasyon bölgesi olan kafataslarının ön bölgeleri traş edildi ve bölgenin asepsisi sağlandı. Kuyruk vertikal insizyon ile açıldı ve kuyruktan 120 µl arteriyel kan alındı. Frontal bölgeden vertikal insizyon ile deri ve kaslar açılarak bregma kemik bileşkesine ulaşıldı. Stereotaksi cihazı kullanılarak iğne sagittal düzlemin 2 mm sağına 30 derece yatırıldı ve 1.5 mm çapındaki burr deliği ile orta hatta bregmanın 7 mm. önüne yerleştirildi. 120 µl heparinize olmayan taze otolog arteriyel kan, 30G'lik bir iğne ile prekiyazmatik sisternaya 10 saniyede enjekte edildi. SHAM grubu için 30G iğne ucu ile prekiyazmatik sisternaya ulaşıldı ve iğne çıkarılmadan önce 10 saniye bekletildi. Yara bölgesi dikildi ve kapatıldı.



SAK operasyonu basamaklarını gösteren resimler

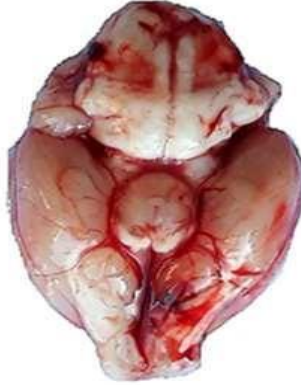


SAK operasyonu basamaklarını gösteren resimler

SHAM



SAK



SAK+PST



Resim 2. Tüm gruplardan 24. saatte beynin ventralinden elde edilen örnek birer görüntü

SAK ve SAK+PST gruplarında kanama odakları görülmektedir

3.4.2. Nörodavranışsal Değerlendirme

Nörolojik skor, Garcia puanlama sistemi kullanılarak SAK'tan 24 saat önce ve sonra hangi sıçanın hangi deney grubunda olduğunu bilmeyen iki gözlemci tarafından değerlendirildi (135). Her gruptaki sıçanların nörolojik fonksiyonlarını ölçmek için, 0-3 veya 1-3 olarak puanlanan ve toplam puanları 3 ila 18 arasında değişen altı test uygulandı. Bu testler ile sıçanlarda:

- Egzersizin fonksiyonel incelemesi,
- Koordinasyon,
- Fiziksel aktivite ve somatik duyarlılık değerlendirildi.

Yapılan değerlendirmede daha düşük bir puan, nörolojik disfonksiyonun daha şiddetli olduğunu gösterir.

3.4.3. Ötenazi ve Örneklerin Alınması

Çalışmanın sonunda genel anestezi altında hayvanların yaşamına servikal omur dislokasyonu ile son verildi ve beyinleri çıkarıldı. Alınan total beyin dokusundan hipokampus elde edildi. İşlemler hızlı bir şekilde ve soğuk bir tabaka

üzerinde Stemi 305 Zeiss model mikroskop altında yapıldı. Her grupta bulunan 9 hayvandan 6'sı genetik ve histopatolojik değerlendirme için kullanıldı. Serebellum ve baziller arter dokusu genetik analizlere kadar -80 °C'de saklanırken, histopatolojik analiz için % 4 paraformaldehit ile sabitlendi.

3.5. Histopatolojik Analizler

Histopatolojik değerlendirme için alınan hipokampus örnekleri ilk olarak % 4'lük paraformaldehit solüsyonunda tespit edildi. Tespit işleminin ardından doku örnekleri kasetlere konularak musluk suyu altında 2 saat süresince yıkandı. Suyun uzaklaştırılması için dokular artan derecelerde alkol serilerinden (% 60, % 70, % 80, % 90, % 96 ve % 100) geçirildi. Sonrasında dokular parlatılmaları amacıyla ksilolden geçirildi ve ardından parafine gömüldü. Elde edilen parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler lamalar üzerine yayıldı. Hazırlanan doku örnekleri H-E ile boyandı. Kesitler, ödem ve piknoz parametreleri açısından Olympus CX43 model LED floresan ataçmanlı mikroskop altında (x100) aşağıda verilen kriterlere göre skorlandı (Tablo 2).

Tablo 2.

H-E boyama verilerinin değerlendirilmesinde kullanılan skorlama kriterleri.

Derece 0	Yok
Derece 1	Hafif
Derece 2	Orta
Derece 3	Şiddetli
Derece 4	En ciddi

3.5.1. Hemotoksilen-Eozin Boyama Prosedürü

Çalışma gruplarından alınan Serebellum doku kesitleri; 60 °C'ye ayarlanmış etüvde 60 dakika bekletildikten sonra 3x5 dakika ksilole alınarak parafinden arındırılmaları sağlandı. Daha sonra lamlar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip (% 100, % 96, % 90 ve %

70) 1 dakika akar suda yıkandıktan sonra, Harris hematoksilende 2 dakika boyandı ve 2x2 dakika akar suda yıkandı. Kesitler % 1 amonyak-su karışımına batırılıp tekrar 1 dakika akar suda yıkandı. Lamlar 2 dakika eozinde bekletilip artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek (% 70, % 80, % 96 ve % 100), 2x1 dakika ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı.

3.5.2. Kristal Viyole Boyama Prosedürü

Şişanlardan alınan Serebellum doku kesitleri 60 °C etüvde 60 dakika bekletildikten sonra, 3x10 dakika ksilole alınarak parafinden arındırılmaları sağlandı. Daha sonra lamlar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip (% 100, % 96, % 90 ve % 70) 1 dakika akar suda yıkandıktan sonra, kristal viyole (Abcam ab246816) ile 2 dakika boyandı ve tekrar 1 dakika akar suda yıkandı. Ardından % 100 N-Butanol alkolde 2x1 dakika bekletilerek ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı.

3.5.3 TUNEL Boyama Prosedürü

Parafin bloklarından lamlara 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler 60 °C etüvde 1 saat bekletildikten sonra 3x5 dakika ksilole alınarak deparafinizasyonları sağlandı. Daha sonra lamlar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip rehidrate (% 100, % 96, % 80, % 70) edildi. Kesitler alkolden arındırılmak amacıyla iki kez 1'er

dakika distile sudan geçirildi. Proteinaz K enzim (37 derece etuv içinde) 15 dk uygulandı. Beş dakika % 3'lük hidrojen peroksit (TA-125-HP ThermoScientific) ile endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi ve ardından fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı. Üç dk Equilibration Buffer ile muamele edildi. TdT enzim çalışma solüsyonunda, 37 °C'ye ayarlanmış etuv içinde 60 dk bekletildi. Working Stop/Wash buffer solüsyonunda 10 dakika yıkandı. Digoxigenin peroksidaz ile 30 dakika muamele edildi ve PBS ile yıkandı. Pozitif hücreleri belirleyebilmek için DAB kromojen ile boyama yapıldı. Zemin boyaması için 1 dakika süreyle Vector Methyl Green (H-3402-500) uygulandı. Distile su ile 2x1 dakika yıkandı. Lamlar artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek (% 70, % 80, % 96 ve % 100) 2x1 dakika ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı.

3.6. Genetik Analizler

Genetik analizler serebellum doku örneklerinde gerçekleştirildi. Ötanazi sonrası hızlıca alınan doku örnekleri işlem yapılincaya kadar -80 °C'de bekletildi ve saklanan dokular çıkarıldıktan sonra buz aküsü üzerine konularak hazırlıklar gerçekleştirildi. Analizler 3 basamakta tamamlandı. İlk aşamada total RNA izolasyonu, ikinci aşamada cDNA eldesi, son aşamada ise Real-Time PCR uygulaması yapılarak süreç sonlandırıldı.

3.6.1. Total RNA İzolasyonu

Serebellum dokusundan yaklaşık 25-30 mg alınarak 2 ml' lik steril tüplere aktarıldı ve ependorf tüpler 10 sn sıvı azotta bekletildi. Her birine birer adet steril çelik bilye konulduktan sonra homejanizatör cihazında (Retsch MM400) dokular homojenize edildi. Elde edilen homejenatlardan total RNA izolasyonu için PURE Link RNA MiniKit (CatNo. 12183018A) kullanıldı. Elde edilen RNA örneklerinde konsantrasyon ve saflık tayini NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Saflık oranı 260/280 nm'de ölçüldü ve 1.8-2.1 arası değerler sonraki adımlar için kullanılabilir kabul edildi (Ovalı ve Uzun, 2015).

3.6.2. cDNA Eldesi

Total RNA izolasyonundan sonra izole edilen RNA'lar cDNA eldesi işlemine kadar -80 °C'de saklandı. İşleme başlamadan önce örneklerin RNA yoğunlukları spektrofotometrik olarak belirlendi ve tüplere aktarıldı. Kit prosedürü adımları esas alınarak cDNA eldesi yapıldı (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, ABD). cDNA eldesi için izlenen basamaklar aşağıda gösterilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3.

cDNA sentez protokolü (Ovalı ve Uzun, 2017)

Bileşenler	Örnek Başına Hacim
10 x RT Buffer	2 µl
dNTP	0,8 µl
Random Primer	2 µl
Enzim	1 µl
Su	4,2 µl
RNA	10 µl
Toplam	20 µl

Yukarıda bileşimi belirtilen karışım PCR tüplerine dağıtıldı ve belirlenen şartlar altında PCR cihazında çalışıldı (The Applied Biosystems®, 2720 Thermal Cycler 96-Well PCR). Örneklerde cDNA eldesi için Tablo 4'teki prosedür izlendi.

Tablo 4.

PCR koşulları (Ovali ve Uzun, 2017)

Sıcaklık	Zaman
25 °C	10 dk
37 °C	120 dk
85 °C	5 dk

3.9.3. Real-Time PCR (qRT-PCR) Uygulaması

cDNA örnekleri çoğaltıldı ve akabinde quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR, StepOnePlus™ Real-Time PCR System) çalışması için kullanıldı. TaqMan (TaqMan™ Fast Advanced Master Mix, Ampliqon, Litvanya) kullanılarak gen ekspresyon miktarları analiz edildi.

qRT-PCR yönteminde gen ifade düzeylerine bakılan TNF- α , IL-6, IL-1 β , NF- κ B TLR4, p53, kaspaz-3, Bcl-2, Bax ve SIRT1 genleri için normalizasyon yapıldı. Bu amaçla β -actin (hamarat gen) kullanıldı. Bu çalışmada, kısmi miktarlara dayalı PCR yönteminde bulunan sonuçları doğrulamak için Real-Time PCR yöntemi kullanıldı ve qRT-PCR cihazından yararlanıldı.

Tablo 5.

Real Time PCR bileşen miktarları (Ovali ve Uzun, 2017)

Bileşenler	Örnek Başına Hacim
SyberGreen Master Mix	5 μ l
Forward Primer	0,75 μ l
Reverse Primer	0,75 μ l
RNAse Free Su	2,5 μ l
cDNA	1 μ l
Toplam	10 μl

3.5. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS for mac versiyon 26 yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemlerle (Kolmogorov- Smirnov/ Shapiro-Wilk testleri) incelenmiştir. Tanımlayıcı analizler normal dağılan değişkenler için ortalama ve standart sapmalar kullanılarak verilmiştir. Normal dağılım gösteren numerik veriler bağımsız gruplar *One Way Anova (post hoc bonferoni)*, Normal dağılım göstermeyen bağımsız gruplar için *Kruskall Wallis Testi (post hoc Mann Whitney U Testi)*, bağımlı gruplar için *Wilcoxin Testi* yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Yapmış olduğumuz çalışmaya toplamda 27 adet erkek Wistar cinsi albino ratlar dahil edilmiştir. Çalışmaya katılan ratlar metodolojik olarak 3 gruba ayrılmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Grupların Dağılımı

No	Grup Özelliği	N
Grup 1	Kontrol	9
Grup 2	SAK	9
Grup 3	SAK+Piseatannol	9

Çalışmaya dahil edilen hayvanların deney öncesi ve deney sonrası nörolojik fonksiyonları Garcia skorlaması kullanılarak belirlenmiştir. Deney öncesi veriler 0. Gün, deney sonrası veriler ise 1. Gün olarak kaydedilmiştir. Deney öncesi (0. Gün) yapılan değerlendirmelerde her 3 grubunda ortalama değerleri 18 ± 0 olarak saptanmıştır. Deney öncesinde her 3 grupta benzerdir. Ancak deney sonrasında Garcia Skoru yönünden grupların arasında görülen fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır ($p\leq 0,001$). Bu farklılığın sebebi olarak Grup 1'in (18 ± 0), Grup 2 ($15,33\pm 0,816$) ve Grup 3 ($16,33\pm 0,516$)'ten daha büyük ortalamaya sahip olması

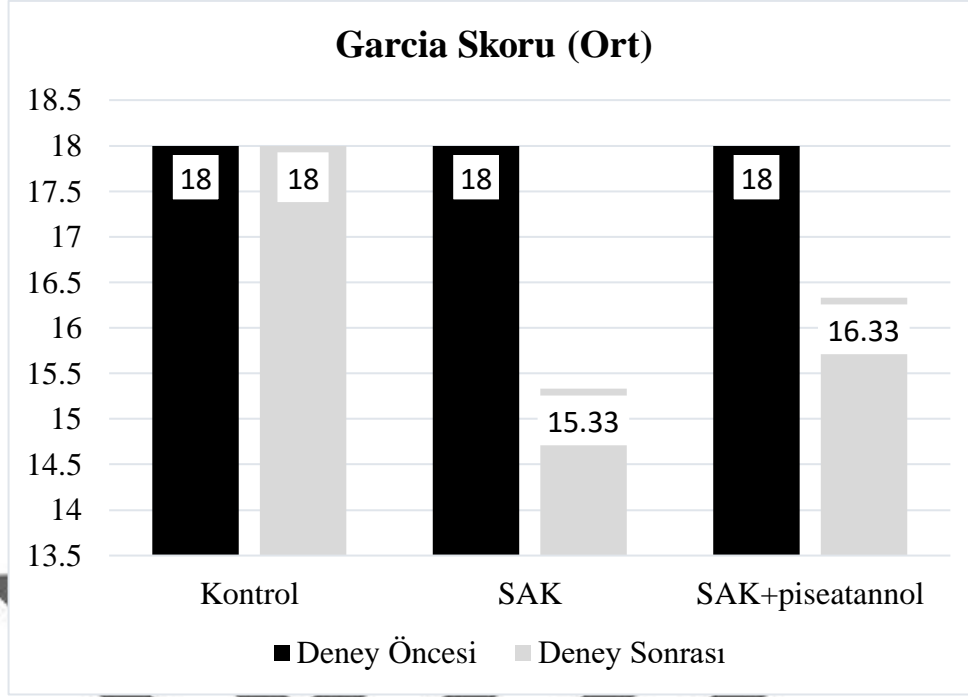
saptanmıştır ($p=0,001$, $p=0,002$). Grup 2 ile Grup 3 arasında görülen fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır (Tablo 2) (Şekil 1).

Gruplar kendi içinde deney öncesi ve deney sonrası skor değişimleri yönünden değerlendirilmiştir. Grup 2 ($p=0,026$) ve grup 3 ($p=0,023$)' skorunun deney öncesine göre azalması istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır (Tablo 2) (Şekil 1).

Tablo 2. Garcia Skoru Yönünden Grupların Kıyaslanması

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	p^*	Post Hoc
Garcia Skoru	ORT±SS	ORT±SS	ORT±SS		
Deney Öncesi	18±0	18±0	18±0	1	
Deney Sonrası	18±0	15,33±0,816	16,33±0,516	$\leq 0,001$	G1>G2 G1>G3
p^{**}	1	0,026	0,023		

*One Way Anova Testi, **Wilcoxon Testi



Şekil 1. Garcia Skoru Dağılımı

Gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin kıyaslanmasını tablo x’de detaylı şekilde verilmiştir. Tüm değişkenler yönünden gruplar arasında görülen farklar istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 3).

Tablo 3. Gen Ekspresyon Düzeylerindeki Değişimlerin Kıyaslanması

		N	ORT	\pm SS	Min	Max	P^*
TNF α	Kontrol	5	35,06	0,99	33,74	35,98	0,247
	SAK	5	33,58	0,99	31,84	34,16	
	SAK+PST	5	34,13	1,81	32,45	36,23	
BCL	Kontrol	5	31,27	1,29	29,26	32,42	0,79
	SAK	5	30,58	1,39	28,86	32,4	
	SAK+ PST	5	31,31	2,62	29,1	35,12	
BAX	Kontrol	5	27,35	0,86	26,01	28,29	0,878**
	SAK	5	28,35	3,2	25,91	33,9	
	SAK+ PST	5	27,12	1,37	25,9	28,96	

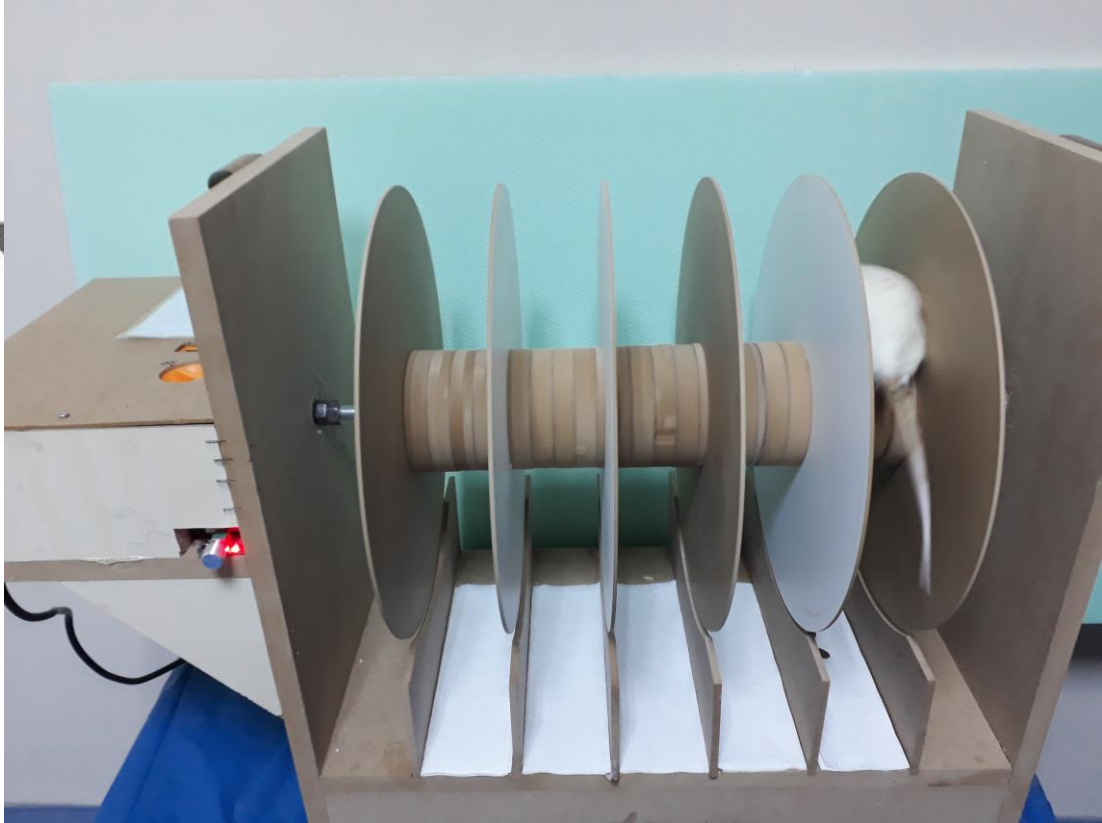
Beta Aktin	Kontrol	5	23,67	0,99	22,1	24,74	0,678
	SAK	5	22,94	0,82	21,87	23,97	
	SAK+ PST	5	23,86	2,66	21,79	27,99	
NF KB	Kontrol	5	29,14	0,59	28,1	29,57	0,291
	SAK	5	28,52	0,58	27,69	29,07	
	SAK+ PST	5	28,42	0,98	27,38	29,5	
IL 6	Kontrol	5	33,23	0,52	32,69	33,95	0,764
	SAK	5	33,37	0,73	32,56	34,47	
	SAK+ PST	5	32,95	1,3	31,79	34,95	
KASPAZ 3	Kontrol	5	27,74	0,15	27,61	27,95	0,472
	SAK	5	27,61	0,49	27,02	28,19	
	SAK+ PST	5	26,79	2,17	24,66	29,95	
SIRT 1	Kontrol	5	25,9	2,33	21,88	27,9	0,102**
	SAK	5	27,78	0,16	27,51	27,94	
	SAK+ PST	5	27,57	0,52	26,97	28,33	
TLR 4	Kontrol	5	30,71	0,56	29,78	31,3	0,13
	SAK	5	28,13	1,42	26,61	29,99	
	SAK+ PST	5	28,88	2,92	26,39	32,97	
P53	Kontrol	5	27	0,74	26,2	27,97	0,152
	SAK	5	27,86	0,68	26,95	28,75	
	SAK+ PST	5	27,48	0,47	26,97	28,25	

*One Way Anova Testi, **Kruskal Wallis Testi, PST= piseatannol

Tablo 4. Rotarod Testi Analizleri

Rotarod testi ile ilgili gruplar arası ve grup içi değerlendirilmesi tablo 4'te detaylı şekilde verilmiştir. Gruplar arasında 15 RPM ($p=0,035$), 20 RPM ($p=0,033$) ve 30 RPM'de ($p=0,031$) SAK (G2) grubunda görülen ölçüm değerlerindeki düşüklük istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır ($G2<G1$, $G2<G3$). Kontrol grubu (G1) ile SAK+PST (G3) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır ($p>0,05$).

Gruplar kendi içindeki 10, 15, 20, 30 RPM yönünden oluşan farklılıkları değerlendirmiştir. Tespit edilen farklar istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4).



Rotarod performans testi cihazı

	Sham(G1)	SAK (G2)	SAK+PST (G3)		
	ORT±SS	ORT±SS	ORT±SS		
Rotarod	(Median)	(Median)	Median	<i>P*</i>	<i>Post Hoc</i>
SAK Öncesi	158,83±51,848	180 ±12,47	180±0		
10 RPM	(180)	(180)	(180)	0,368	
SAK Sonrası	180±0	153,67±90,74	180±0		
10 RPM	(180)	(180)	(180)	0,368	

<i>P**</i>	<i>0,317</i>	<i>0,317</i>	<i>1</i>		
SAK Öncesi	169,5±25,72	175±57,55	180±0		
15 RPM	(180)	(180)	(180)	<i>0,586</i>	
SAK Sonrası		97,67 ±95,51	180±0		<i>G2<G1</i>
15 RPM	180±0 (180)	(101)	(180)	<i>0,035</i>	<i>G2<G3</i>
<i>P**</i>	<i>0,317</i>	<i>0,109</i>	<i>1</i>		
SAK Öncesi	179,17±2,041	156,67±72,96	180±0		
20 RPM	(180)	(180)	(180)	<i>0,586</i>	
SAK Sonrası	180±0	92,5±70,04	180±0		<i>G2<G1</i>
20 RPM	(180)	(92,5)	(180)	<i>0,033</i>	<i>G2<G3</i>
<i>P**</i>	<i>0,317</i>	<i>0,102</i>	<i>1</i>		
SAK Öncesi	164,33±38,375	123,33±64,03	137,83±68,29		
30 RPM	(180)	(145)	(180)	<i>0,536</i>	
SAK Sonrası	157,83±54,297	50,33±70,304	149,5±51,27		<i>G2<G1</i>
30 RPM	(180)	(27,5)	(180)	<i>0,031</i>	<i>G2<G3</i>
<i>P**</i>	<i>0,317</i>	<i>0,068</i>	<i>0,157</i>		

**Kruskal Wallis Testi, **Wilcoxon Testi, PST= piseatannol*

Grupların hücresele özellikler yönünden değerlendirilmesi tablo 5'te detaylı şekilde verilmiştir;

Hücresele büzüşme ve ödem yönünden median değerler sıralaması $G1 < G3 < G2$ şeklinde bulunmuştur. Gruplar arasında tespit edilen farklar istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır ($p \leq 0,001$) (Tablo 5).

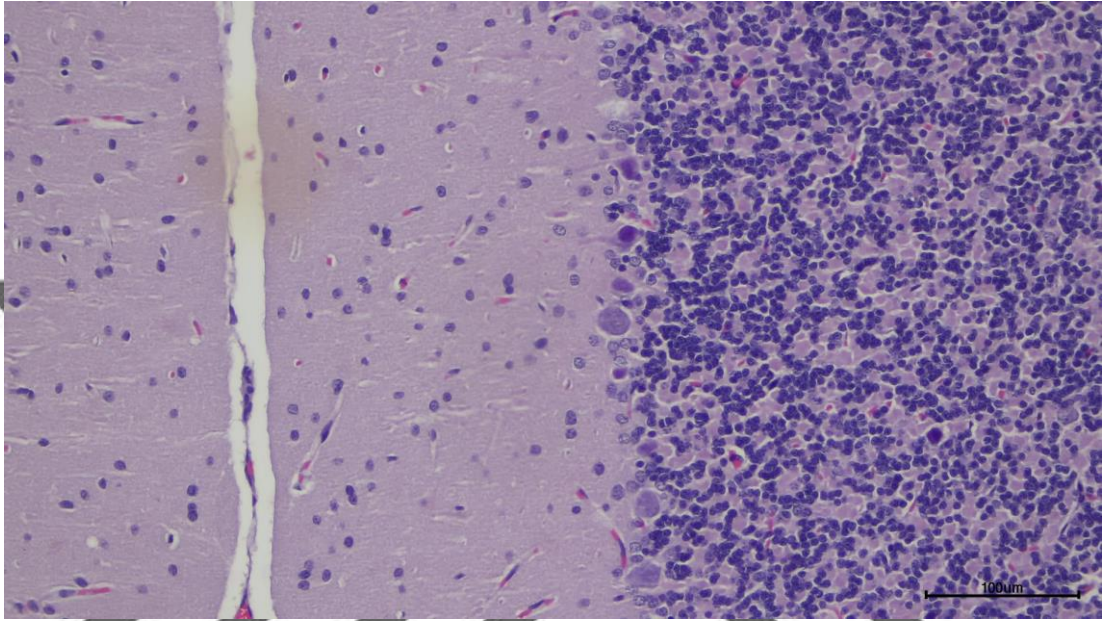
Nissl ($p=0,009$), vazospazm ($p=0,047$) ve tunica mediada ödem ($p=0,046$) değişkenleri yönünden bulunan farklar istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $G1 < G2$ şeklinde görülmüştür. $G3$ ile $G2$ ve $G1$ arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 5).

Tablo 5. Grupların Hücresele Özellikler Yönünden Değerlendirilmesi

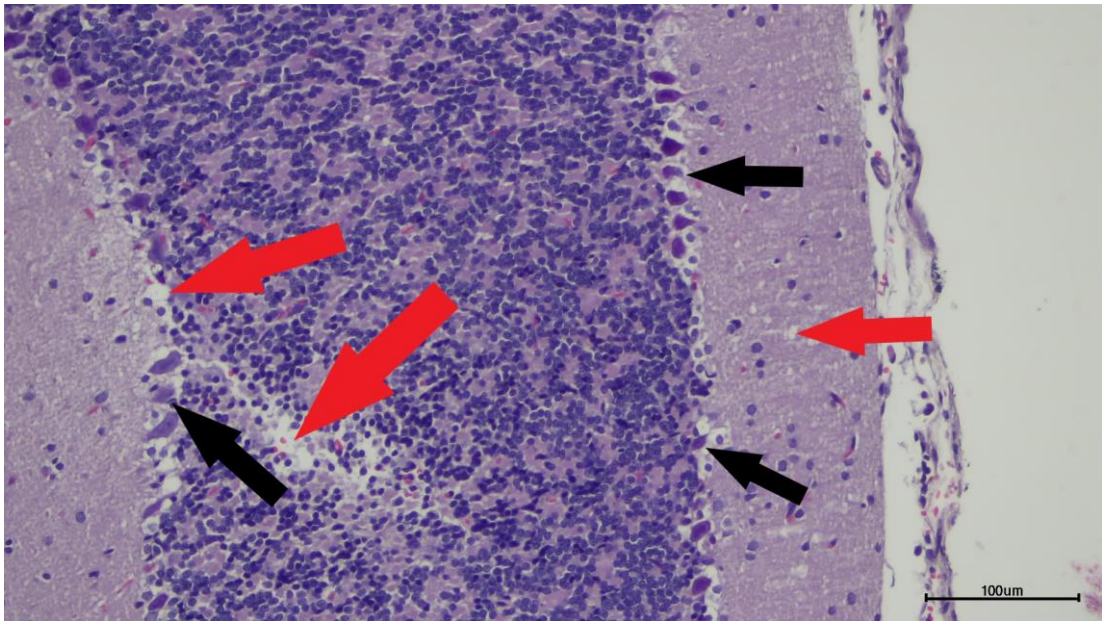
Grup	Sham (G1)	SAK (G2)	SAK+PST (G3)	P**	Post Hoc
	ORT±SS (Median)	ORT±SS (Median)	ORT±SS (Median)		
Hücresele Büzüşme	0,25±0,46 (0)	2,25±0,707 (2)	1±0,535 (1)	≤0,001	G1<G3<G2
Ödem	0,5±0,535 (0,5)	2,63±0,518 (3)	1,75±0,463 (2)	≤0,001	G1<G3<G2
Nissl	7,25±3,01 (7)	25,13±13,88 (22,5)	17,25±11,196 (14,5)	0,009*	G1<G2
Tunel	3,38±1,84 (3,5)	6,25±3,808 (6)	5,5±3,703 (4,5)	0,209	
Vazospazm	0,25±0,5 (0)	1,86±0,9 (2)	1,38±1,188 (1)	0,047	G1<G2
T. Media	0,25±0,5	1,86±0,69	1,63±1,188	0,046	G1<G2

Ödem	(0)	(2)	(2)
------	-----	-----	-----

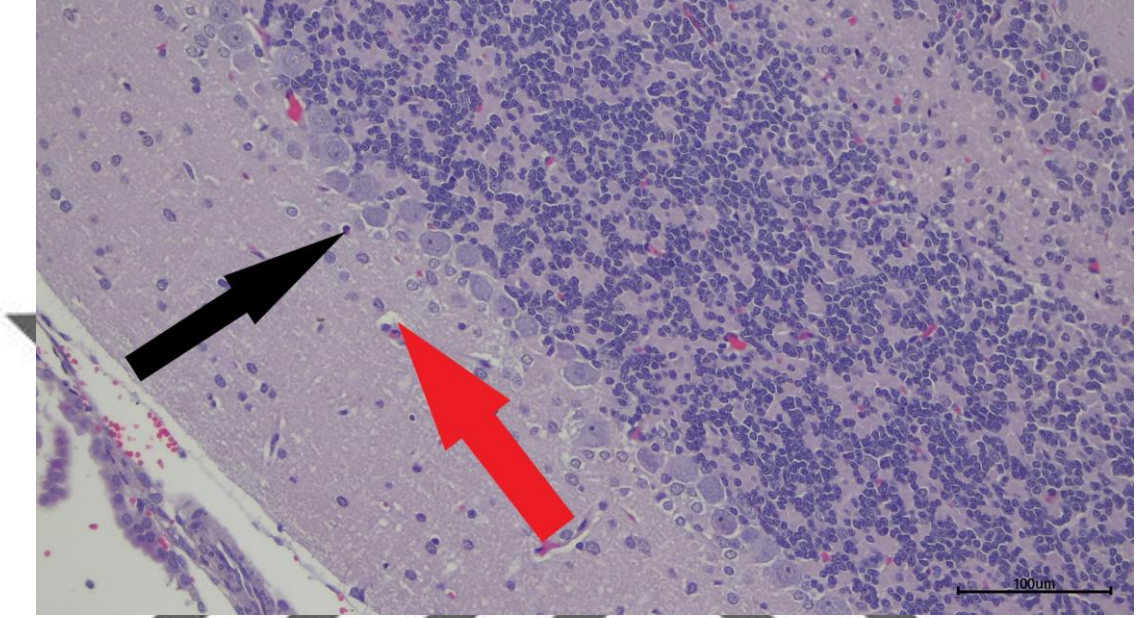
**One Way Anova Testi, **Kruskal Wallis Testi, PST= piseatannol*



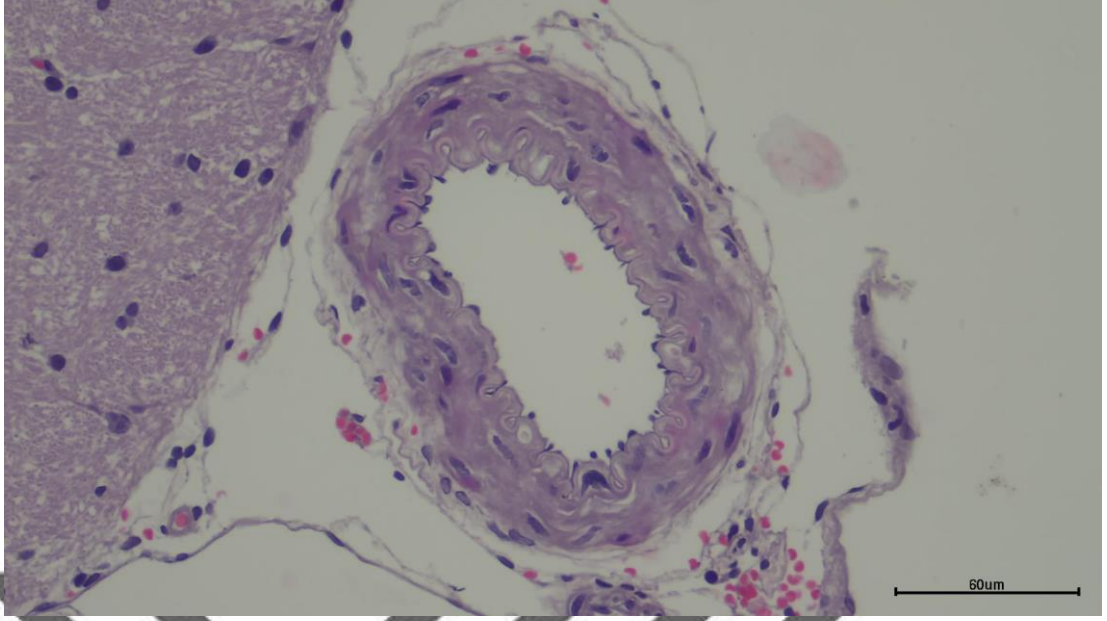
SHAM grubuna ait örnek bir serebellum doku kesiti (H-E, 100x).



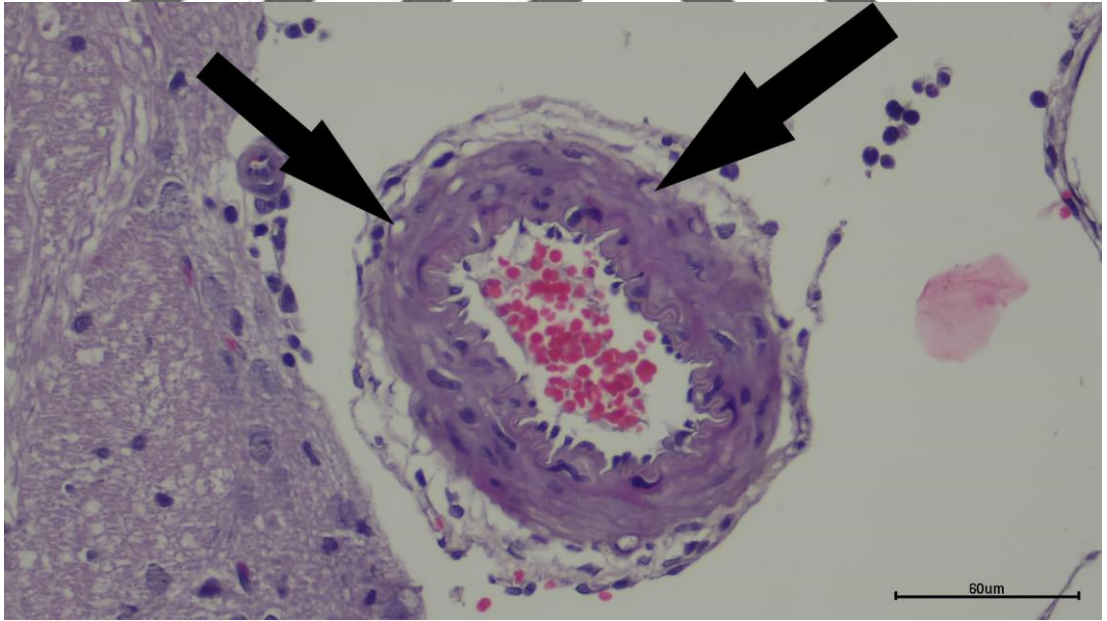
SAK grubuna ait örnek bir serebellum doku kesiti (H-E, 100x). Siyah oklar hücresel piknozu, kırmızı oklar ise ödem alanlarını göstermektedir.



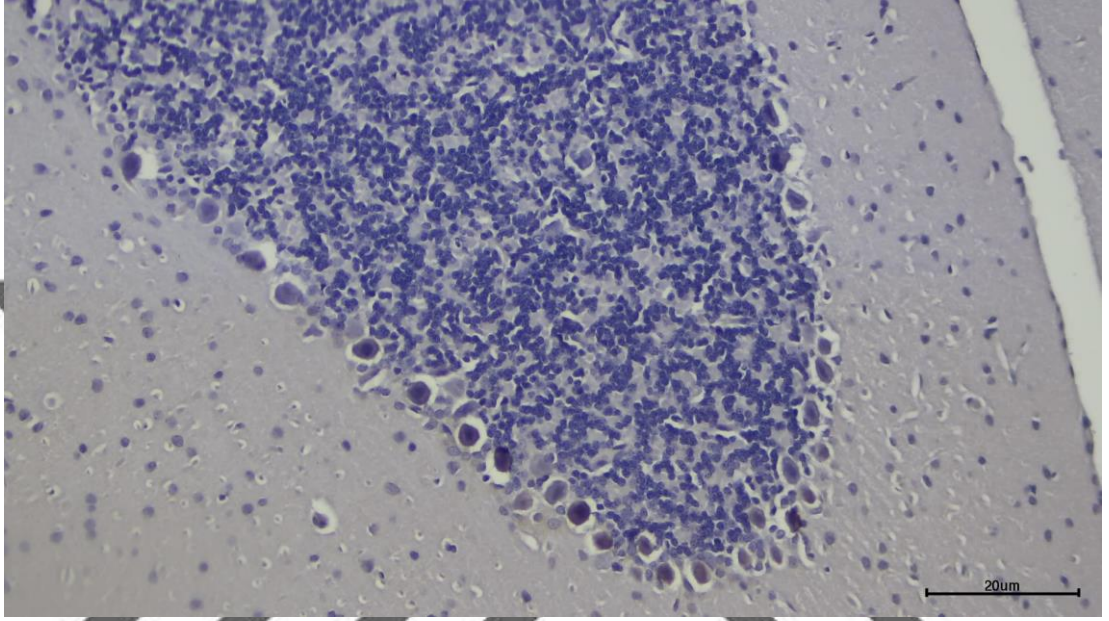
SAK+PST grubuna ait örnek bir serebellum doku kesiti (H-E, 100x). Siyah oklar hücresel piknozu, kırmızı oklar ise ödem alanlarını göstermektedir



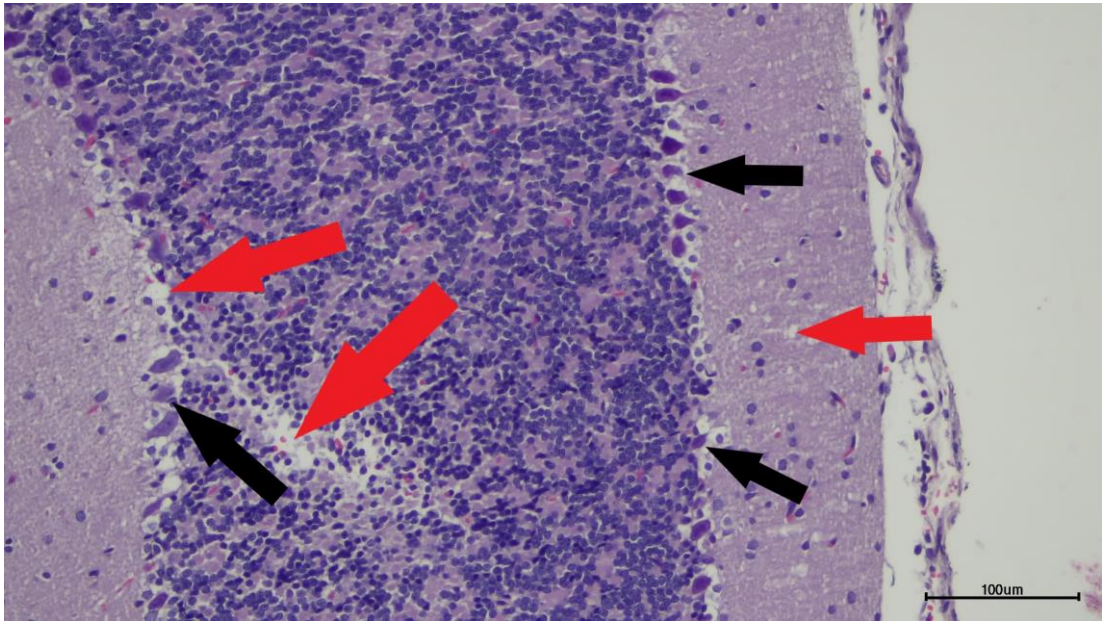
SHAM grubuna ait örnek bir baziller doku kesiti (H-E, 100x).



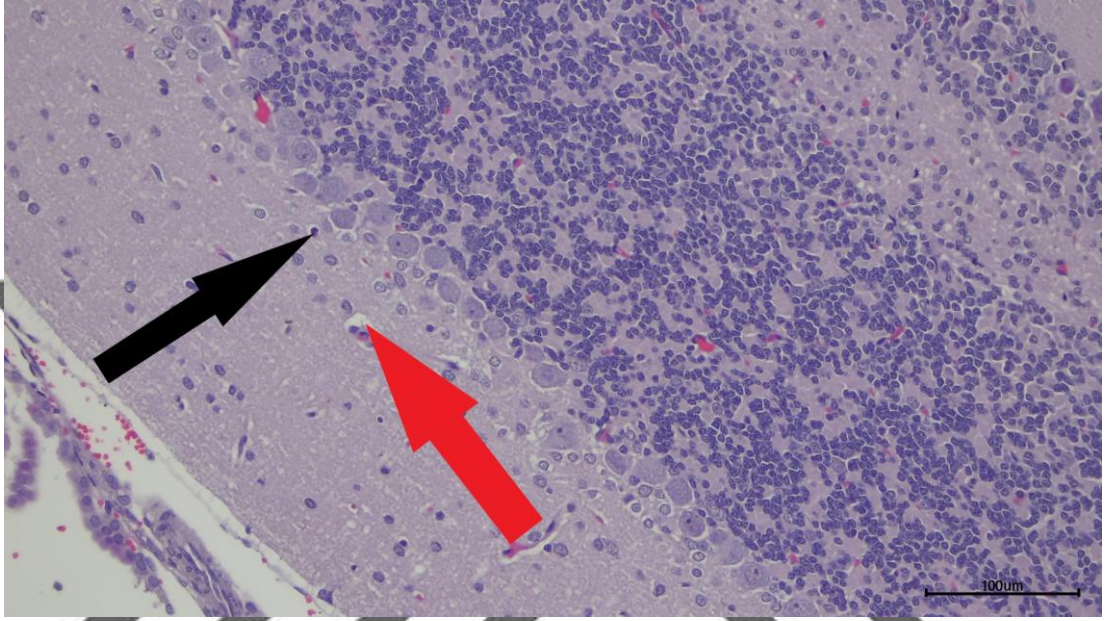
SAK grubuna ait örnek bir baziller doku kesiti (H-E, 100x) -



SHAM grubuna ait örnek bir serebellum doku kesiti (TUNEL, 200x)



SAK grubuna ait örnek bir serebellum doku kesiti (TUNEL, 200x). Siyah oklar TUNEL (+) başka bir ifadeyle apoptoza giden hücreleri göstermektedir



SAK+PST grubuna ait örnek bir hipokampus doku kesiti (TUNEL, 200x). Siyah oklar TUNEL (+) başka bir ifadeyle apoptoza giden hücreleri göstermektedir

5. TARTIŞMA

Subaraknoid kanama beyinde BOS'un dolaştığı subaraknoid mesafeye kanın ekstrevaaze olması ile karakterize ciddi mortalite ve morbidite ile seyreden nörolojik acil bir tablodur. Subaraknoid kanama sebepleri travmatik ve nontravmatik olarak gruplandırılır ve % 80 oranında rüptüre olmuş bir anevrizmaya bağlıdır (136).

Vazospazm ilk olarak 1951 yılında Ecker ve Riemenschneider tarafından tanımlanmıştır. Subaraknoid kanamayı takiben oluşan vazospazm, yüksek morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerinden biridir. Bu nedenle SAK sonrası vazospazmın neden olabileceği iskemik hasarlardan kaçınmak için erken tanı ve uygun tedavi büyük önem taşımaktadır (137). SAK sonrası ilk iki hafta içinde serebral vazospazm varlığı mortaliteyi 1,5 kattan 3 kata kadar artırır (138). Vazospazm anevrizmal subaraknoid kanamalı hastaların %70'inde görülürken, %30-40'ında semptomatik serebral iskemi görülür (139, 140). Vazospazmın fizyopatolojisi ve tedavisi uzun süredir araştırılıyor olsa da henüz tam olarak anlaşılammıştır. Fizyopatolojisinden sorumlu olduğu düşünülen patolojik süreçler Ca bağımlı ve bağımsız vazokonstriksiyon, serbest oksijen radikallerinde artma, enflamasyon, endotelin-1 düzeyinde artma, NO miktarında azalma, nörojenik faktörler, endotelial apopitozis ve proliferasyondur (141).

SAK'ın bir komplikasyonu olarak serebral vazospazm, oksihemoglobinin aracılık ettiği uzun süreli düz kas kasılmasının bir sonucu olduğu görünmektedir: bu etkiyi ya kas lifleri üzerindeki doğrudan etkisi yoluyla ya da arter duvarından vazoaktif maddelerin, serbest radikaller ve lipid peroksidlerin lokal olarak salınması gibi dolaylı mekanizmalar yoluyla yaptığı düşünülmektedir (137). Son yapılan çalışmalar vazospazm oluşmasında ve ilerlemesinde en önemli faktör olarak oksidatif stresi göstermektedir. Subaraknoid mesafede bulunan hemoglobin vazospazmda başlangıç rolünü üstlenir. Damar düz kaslarında Ca kanallarının aktivasyonunu, vazoaktif proteinlerin aktivasyonunu ve serbest oksijen radikallerinin oluşmasını sağlar (142).

Biz, oluşturduğumuz deneysel SAK modeli çalışmasında tedavi edici etken madde olarak Piseatannolu kullandık. Piseatannol, kırmızı şarap, üzüm, çarkıfelek meyvesi, beyaz çay ve Japon knotweed meyvesinde bulunan bir resveratrol metabolitidir. Bir diyet polifenol olan piseatannol, metabolik bozukluklar, kanserler, kardiyovasküler hastalıklar ve bazı enfeksiyon hastalıkları tedavisinde hayati farmakolojik etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Karaciğer fibrozu, pulmoner emboli, skleroderma gibi hastalıklarda deneysel model çalışmaları sunulmuştur. Biz de çalışmamızda Piseatannolun intraserebral hasar sonrası serebellar hasara ve basiller vazospazmına olan etkisini irdeledik.

Bu çalışmada, deneysel SAK modeli oluşturulan ratlarda serebellum dokusunda meydana gelen patolojik değişikliklere, beraberinde serebellum ve baziler arterde gelişen vazospazma karşı Piseatannol'ün tedavi edici etkileri ilk kez araştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre PST uygulamasının ratlarda SAK modelinde:

a) Nörolojik fonksiyon değerlendirmesinde:

- Garcia skorunu düzelttiği/yükselttiği
- Rotarod testi skorlarını düzelttiği/yükselttiği gösterilmiş,

b) Histopatolojik düzeyde:

- Hücrel büzüşmeyi azalttığı,
- Ödem gelişimini azalttığı,
- Nissl cisimcik formasyonunu azalttığı,
- Vazospazmı azalttığı,
- Tunika media ödemi azalttığı gösterilmiş, ve

c) Moleküler düzeyde:

- TNF- α , BAX, NF- κ B, Kaspaz-3, SIRT-1, TLR 4 ve p53 gen ekspresyon seviyelerini (istatistiksel olarak olmasa da rakamsal düzeyde) azalttığı belirlenmiştir.

Bu sonuçlar PST'nin SAK sonrası ortaya çıkan beyin hasarında ve oluşan vazospazmında klasik tedavi yöntemlerine ilave olarak kullanılabilir bir molekül olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular, Piceatannol'un ratlarda SAK sonrası vazospazmın etkilerinin azaltılmasında etkili olduğu, inflamatuvar süreçte yer alan sitokinlere (henüz anlamlılık düzeyinde gösterilemese de) etkili olduğu, apoptozisi azalttığı ve nöroprotektif etkilerinin bulunmadığını göstermiş olduk. SAK sonrası ortaya çıkan nörolojik hasara karşı, beyincik hasarında ve basiller arter vazospazmına yönelik klasik tedavi yöntemlerine ilave olarak kullanılabilir bir alternatif molekül olan Piceatannol'un ileri deneysel ve klinik çalışmalar hakketmektedir.

Beyin dokusu kanamaları iki ana inme tipine neden olur: intraserebral ventriküler kanamalar ve subaraknoid kanamalar. Her iki kanama ile ilişkili yüksek morbidite ve mortalite insidansı bildirilmiştir. Hayvan çalışmalarına dayanan subaraknoid kanama modelleri, insanlarda subaraknoid kanamaları modellemek için yaygın olarak kullanılmaktadır ve birkaç yöntem ile oluşturulmaktadır. Bunlardan başlıcaları baziler arterin delinerek SAK oluşturulması modelidir (143, 144), ve günümüzde bilinen, en çok uygulanan sisterna magnaya başka bir bölgeden alınan kanın enjekte edilmesiyle kanın arter etrafında toplanmasını sağlayan yöntemlerdir (145). Sunduğumuz çalışmada ise, bu iki yönteme alternatif olarak Prunell ve ark. tarafından geliştirilen SAH modeli kullanılmıştır (146). Bu yöntemi tercih etmemizin nedeni, insanlarda gözlenen SAK kliniğini en iyi temsil eden yöntemi temsil etmesidir. Ayrıca, düşük maliyetli ve kolay uygulanabilir olmasının yanı sıra hayvanların takibi için de oldukça uygundur.

İnsanlarda SAK sonrası mortalite ve morbidite gelişimi birçok faktör ile ilişkili olmakla birlikte en çok etki eden faktörün kanama miktarı ve şiddetidir. Genel olarak kanama miktarı daha az olan insanlar daha çok hayatta kalmakta şansına sahip ve daha az işlev kaybına maruz kalmaktadır (136). Çalışmamızda, oluşturduğumuz deneysel SAK modelinde, orijinal yöntemden farklı olarak subaraknoid bölgeye 200

µl değil 150 µl kan verilmiştir. Şiddetli SAK'tan kaçınan ölüm olasılığını azaltmayı hedefledik. Böylelikle ölüm oranlarını en aza indirmeyi hatta mümkünse ortadan kaldırmayı amaçladık. Prunell vd.'nin uyguladığı orijinal yöntemde 200 µl kan uygulaması ile hayvanların % 25'i ölmüştür (146). Jeong ve ark.'nın ise 250 µl kan uyguladıkları çalışmalarında % 16'lık bir ölüm oranı belirlemişler ancak hayatta kalanlarda yüksek oranda nörolojik hasara rastladıklarını belirtmişlerdir (147). Bizim çalışmamızda denekler arasında ölümün gelişmemesinin nedeninin uyguladığımız kan miktarının 150 µl ile sınırlanmamız olduğunu düşünüyoruz.

5.1 Deneysel SAK oluşumunun değerlendirilmesi

Çalışmamızda SAK sonrası 24. saatte çıkarılan beyin örneklerinde kanama bölgeleri tespit edilmiş ve kan biriken alanlar çıplak gözle incelenmiştir, hedeflediğimiz gibi SAK'ın geliştiğini gözlemlemiş olduk. Deneysel beyin kanamalı hasarı çalışmalarında nörolojik hasarın gözlenmesi ancak ölüm oranlarının azaltılması tercih edilen bir sonuçtur. Bizim çalışmamızda da deneysel SAK sonrası deneklerde nörolojik motor hasarının oluşmuş olması, morfolojik hasarın oluşmuş olması modelimizin başarılı kurulduğunun göstergesi idi. Ayrıca, çalışma sürecinde denekler arasında ölümün gelişmemiş olması 150 µl kan uygulaması mortalite ortaya çıkmadan, ama yine de değerlendirme yapabilecek düzeyde de nörolojik hasar oluşmasını sağladığımız optimal bir kanama miktarı olduğunu göstermektedir.

5.2 Deneysel SAK sonrası nörolojik değerlendirme

Oluşturulan deneysel SAK modelimizde deneklere deney öncesi ve deney sonrası nörolojik fonksiyon değerlendirmesi için Garcia nörolojik muayenesi yapılmıştır. Tüm deneklerde çalışma öncesi Garcia nörolojik skoru eşit saptanmıştır.

Deneysel SAK sonrası 24. saatte aynı sıçanların nörolojik skorları kaydedilerek veriler karşılaştırılmıştır. Elde edilen verilere göre SAK, deneklerde anlamlı düzeyde Garcia nörolojik skorlarında düşüşe neden olmuştur. Aynı zamanda PST kullanımının bozulan Garcia nörolojik skorlarımızda anlamlı düzeyde yükselmeye neden olduğu görülmüştür. Kontrol grubu deneklerde Garcia nörolojik skoru aynı kalmış: deney öncesi 18, deney sonrası 18 puan. Deneysel SAK oluşturulan ve tedavi

uygulanmayan Grup 2 deneklerinde Garcia nörolojik skorları deney sonrası anlamlı düzeyde düşmüştür: deney öncesi 18'den deney sonrası 15,33 puan olmak üzere; bu değişim hem kendi grup içinde hem de kontrol grupla karşılaştırıldığında anlamlıydı. Deneysel SAK oluşturulan ve PST verilen Grup 3 deneklerinde Garcia nörolojik skorlarında anlamlı düzeyde düşme saptanmış: deney öncesi 18'den deney sonrası 16,33 puan olmak üzere; bu değişim hem kendi grup içinde hem de kontrol grupla karşılaştırıldığında anlamlıydı. SAK oluşturulan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise Grup 2 ve Grup 3 deneklerin Garcia skorlarının anlamlı fark oluşturmadığını, bununla beraber Grup 3 deneklerinin skorları rakamsal olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu sonuç, Deneyimizde etkisi araştırılması hedeflenen PST'nin SAK sonrası nörolojik defisiti iyileştirmeye etkili olduğu ve bu gerçeğin daha geniş denek sayısı ile tekrar edilmesi ve doğrulanması gerektiğini göstermektedir.

Garcia skoru hemen hemen tüm çalışmalarda uygulanan yöntemle bakılmaksızın SAK sonrası nörolojik sistemi değerlendirmede kullanılmaktadır. Cao vd. internal karotid arterin perforasyonu ile SAK modeli oluşturmuşlar, Oluşturulan SAK modelinde farelerde anlamlı olarak nörolojik değerlendirme skorunda düşme göstermişler ve Garcia skorunun 11'e kadar düştüğünü belirlemişlerdir. Tedavi amaçlı verdikleri liprostatin-1'in Garcia skorunu 14'e kadar yükselttiğini ve yüksekliğinin tedavi verilmeyen deneklere göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (8).

Ieong ve ark. oluşturduğu bir deneysel SAK modelinde yüksek mobiliteli grup kutusu 1 (HMGB1) inhibitörü olarak glisirizinin etkisini araştırmışlardır. 250 µl otolog arteriyel kan uygulaması ile yapılan SAK modelinde 24 saat sonraki Garcia skoru 14'e kadar düşmüş, glisirizin uygulaması ile bu değer 16 puana kadar yükseldiğini ve düzelmenin anlamlı bir fark gösterdiğini bildirmişlerdir (147).

FoxO1 molekülünün SAK modelinde beyin hasarını otfajiyi engellemeye mekanizması ile azaltma etkinliğinin incelendiği bir başka araştırmada, 300 µl gibi yüksek miktarda kan ile oluşturan SAK modelinde deneklerde Garcia skorunun 8'e

kadar azaldığını, yüksek doz FoxO1 uygulamasının bu değeri 15'lere kadar yükselttiğini belirlemiştir (148).

Sunulan verilere göre, SAK sonrası Garcia skorunun düştüğü ve bu düşüşün infüze edilen kan miktarına bağlı olduğu açıktır. Koruyucu veya iyileştirici ajanların, Garcia skorlarını arttırdığı görülmüş, ancak henüz hiçbir ajan kontrol grubundaki seviyelere kadar çıkarmamıştır. Çalışmamız, SAK'tan 24 saat sonra Garcia skorunun anlamlı olarak düştüğünü ve PST tedavisinin Garcia skorunda anlamlı bir azalma ile sonuçlandığını ortaya koymuştur. Bu çalışma, PST'nin Garcia skoru verilerine dayanarak, SAK sonrası nörolojik hasarı önemli ölçüde iyileştirdiğini gösteren ilk çalışmalardan biridir.

5.3 Deneysel SAK sonrası motor koordinasyon değerlendirme

Motor fonksiyondaki bozuklukları travmatik beyin hasarının (TBH) yaygın bir sekeli. TBH'yi takiben motor işlevi değerlendirmek için çeşitli testler kullanılmış olsa da, en yaygın teknikler ışın dengesi ve ışın yürüyüşü testleri ile değerlendirilmiştir (149). Işın dengesi testi, basit, kaba vestibülomotor işlevi değerlendirmek için kullanılmıştır. Kirişte yürüme testinde ise, kirişin ucundaki bir kale kutusuna girmek için farelerin asılı, dar bir kirişi geçmesi beklenmektedir. Bu görevdeki performans, hayvanın kirişin sonundaki kale kutusuna girme gecikmesi ölçülerek değerlendirilir. Işın dengesi ve ışın yürüyüşü görevleriyle motor fonksiyonun değerlendirilmesi, TBH'nin nörofarmakolojik mekanizmalarının incelenmesi ve TBH için potansiyel tedavilerin geliştirilmesi ve test edilmesi için birincil bağımlı değişken olmuştur (150, 151). Sonuç olarak, TBH'yi takiben motor fonksiyonun doğru değerlendirilmesi bu alandaki araştırmalar için kritik öneme sahiptir.

İlk olarak Dunham ve Miya (1957) tarafından geliştirilen Rotarod Task Analizi, çeşitli ilaçların nörolojik etkilerini değerlendirmek için sıklıkla kullanılan bir tarama testidir (152). Başlangıçta kullanıldığı gibi, prosedür, sıçanın sabit bir hızla dönen bir çubuk üzerinde dengesini korumasını gerektiriyordu. Jones ve Roberts (1968), hayvan çubuk üzerinde yürürken çubuğun dönme hızını kademeli olarak artırarak bu testin duyarlılığını arttırdı. Birkaç çalışma, santaral sinir sistemi

depresanlarının rotarod performansı üzerindeki etkilerini araştırmış ve cihazın motor fonksiyonu değerlendirmek için yararlı olduğunu bulmuştur (153). Bununla birlikte, Rotarod Task testini TBH'ı takiben motor efisitleri belirlemek adına kullanımı ilk defa 1994 yılında Robert Hamm ve ark. tarafınan denemiştir (154). Biz de çalışmamızda, deneysel SAK sonrası sıçanlarda oluşan motor defisitini değerlendirmek adına Rotarod Task testini uyguladık.

Çalışmamızda, deneysel SAK sonrası deneklerimizde gözlemlediğimiz sonuçlar şöyle idi: Rotarod testinin SAK öncesi 10-15-20 ve 30 rpm dönüşlerinde her üç gruptaki deneklerin istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmadıklarını gördük.

Rotarod testi skorlarının SAK oluşturulmuş hayvanlarda değişim göstermeye başlamıştı: Rotarod testinin SAK sonrası 10 rpm dönüş hızında her üç grup arasında anlamlı fark oluşmaz iken, yine de rakamsal olarak (SAK sonrası PST uygulana denekler olan) Grup 3 deneklerinde hep (SAK sonrası tedavi almayan grup olan) Grup 2 deneklerine göre daha yüksekti.

Ardından, Rotarod testi 15-20 ve 30 rpm dönüş hızlarında SAK sonrası PST uygulana denekler olan) Grup 3 deneklerinde hep (SAK sonrası tedavi almayan grup olan) Grup 2 deneklerine göre anlamlı düzeyde daha yüksek tespit edilmiştir. Grup 2 in yansıttığı motor defisit skorlarının ise grup 1 ve grup 3 ye göre anlamlı olarak fark ettiği saptanmıştır.

Elde edilen bilgiler ışığında deneysel SAK modeli sonrası PST tedavisinin deneklerde motor fonksiyonları üzerine anlamlı koruyucu/düzeltici etkisi olduğu söylenebilir.

5.4 Deneysel subaraknoid kanamada hücre hasarının histopatolojik değerlendirilmesi

5.4.1 Deneysel subaraknoid kanamada hücre ödeminin değerlendirmesi

Ödem, SAK sonrası beyin dokusunda gelişen komplikasyonlar arasındadır. Doku ödeminin histopatolojik olarak değerlendirebileceğimiz gibi total beyin dokusunun yaş ve kuru ağırlığının değerlendirilmesi yolu ile de yapılabilir.

Çalışmamızda serebellum ödemi değerlendirmesi için her iki tekniği de kullandık. Serebellum dokusunu histopatolojik olarak değerlendirildiğimizde denekler arasında deney sonunda ödem skorlu en düşük olan denek grubu Grup 1 (ödem skoru 0,5), ardından Grup 3 (ödem skoru 1,75) ve en yüksek skor Grup 2’de (ödem skoru 2,63) olduğu saptanmıştır. Gruplar arasındaki bu fark aynı zamanda istatistiksel olarak anlamlıydı. SAK sonrası 24. saatte hücresel ödem skorunda hem kontrol grubuna göre hem de her iki SAK grubu arasında anlamlı artışlar belirlenmiştir. PST uygulaması SAK grubundaki bu artışlar izole SAK grubuna göre anlamlı düzeyde azaltmıştır. Görüldüğü üzere serebellum dokusunda histopatolojik ödem skorlarında, SAK grubunda kontrol grubuna göre bir artış ortaya çıkmış, PST uygulaması ise bu artışları azaltmıştır. Bu bulgular SAK uygulamasının ödeme sebep olduğunu açıkça göstermektedir. Çalışmamız verileri deneyin ilk 24 saat içindeki değişimleri yansıtması nedeni ile PST’nin ödem çözücü etkinliğinin ilk 24 saat içinde etkili olduğu yorumunu getirebiliriz. SAK sonrası 48. ve 72. saatlerde örnek almadığımız için EBH’nin ilerleyen saatlerinde PST’nin düzeltici bir etkisi olup olmadığını söyleyemeyiz. Bu konuda yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

DeneySEL SAK modelimizde, serebellum parankim ödeminin yanı sıra basiller arterlerin değerlendirmesinde **tinea media tabakasında ödem** gelişip gelişmediğinin incelenmesi yapılmıştır. T. Media ödem skorlarının, tıpkı parankim dokusunda olduğu gibi, artış olduğu gösterilmiştir. Kontrol grup deneklerinde T. Media ödem skoru değeri 0,25 iken Grup 2 deneklerinde bu değer 1,86’ya kadar yükselmiştir: SAK, basiller arter T media tabakasında anlamlı düzeyde bir ödeme neden olmuştur. SAK sonrası PST verilen Grup 3’te ise T. media ödem skoru 1,63 olarak tespit edilmiştir: rakamsal olarak bir düzelme tespit edilse de istatistiksel olarak anlamlı değildi.

5.4.2 DeneySEL subaraknoid kanama sonrası hücreSEL büzüşme ve Nissl cisimciklerinin değerlendirilmesi

Serebellum dokusunda nöronal hücre hasarını belirlemek için histolojik çalışmalar yapılmıştır.

Deneysel SAK oluşumudan 24 saat sonra alınan serebellum dokularında hücresele büzüşmenin Grup 2'de Grup 1 ve Grup 2'ye göre anlamlı düzeyde fazla olduğu, patolojik Nissl cisimciklerinin Grup 2' de Grup 1'e göre anlamlı düzeyde fazla olduğunu tespit ettik.

Beraberinde, PST uygulanmasının hasarlı ve büzüşen nöron sayısında anlamlı düzeyde azalma ortaya kondu. PST uygulanan deneklerde Nissl cisimcikleri sayısında da ciddi bir düşüş görünmesine rağmen fark anlamlı düzeyde değildi.

Bütün bu bulgular, PST uygulamasının hasarlı nöron sayılarını anlamlı düzeyde azaltması PST'nin SAK patogeneğine karşı koruyucu etki gösterdiğini ortaya koymuştur.

SAK sonrası sinir ölümünü azaltan ilaçların geliştirilmesi ve kullanılması SAK'ın olumsuz sonuçlarının ortadan kaldırılmasında büyük önem taşımaktadır. Ancak bir ajanın tedavisini ve Nissl cisimcikleri üzerindeki terapötik etkisini tek başına değerlendirmek SAK sonrası kesin sonuçlar vermeyebilir. Bu nedenle birçok çalışma apoptotik ve inflamatuvar yollar ve Nissl cisimcikleri başta olmak üzere çeşitli yolaklardaki değişiklikleri incelemiştir. Çalışmalarımız da aynı yolu izledi. Wang ve ark. çalışmalarından birinde SAK sonrası tiyoredoksin etkilerini araştırmışlardır. Tiyoredoksin protein sentezini uyaran gruptaki korunmuş nöron sayısının SAK grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu belirlediler (155). Başka bir çalışmada da, bir kanabinoid tip 1 reseptör agonistinin SAK ile tedavi edilen sıçanlarda hipokampal hücre ölümü üzerindeki etkisini inceledi. kanabinoid tip 1 reseptör agonistinin hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir (156, 157). SAK sonrası hücre ölümünü azaltmak için Apelin kullanılan bir diğer çalışmada, Apelinin hücre ölümünü önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur (158). Görüldüğü gibi, Nissl cisimciklerinin varlığı, SAH sonrası hücre ölümünü belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. SAK sonrası kullanılan ajanların restoratif etkilerinin büyük ölçüde bu ajanların antioksidan özelliklerinden kaynaklandığı görülmektedir. Çalışmamızda kullanılan PST de güçlü antioksidan özelliklere sahip bir moleküldür. Dolayısıyla SAK sonrası nöronal hasarı azaltıcı etkisinin PST'nin bu özelliğinden kaynaklandığı söylenebilir.

5.4.3 Deneysel subaraknoid kanama sonrası TUNEL boyama değerlendirilmesi

Morfolojik çalışmalarda vazospazm sürecinde serebral arterlerin endotelinde hücre ölümü gerçekleştiği görülmüştür. Hücre ölümünün sebebi tam açıklanamasa da hemoglobinin toksik etkisi, hücre içi Ca⁺⁺ seviyesinin artması ve serbest oksijen radikallerinin açığa çıkması ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Ogihara ve ark. yaptıkları çalışmada, vazospazm sürecinde oluşan SOR'un mitokondriyal membran stabilitesini bozup kaspaz yolağını aktive ederek hücreyi apoptoza yönlendirdiğini ve hücrede DNA hasarı oluşturduğunu göstermişlerdir (159). Bu çalışmada endotelial apoptozu ve DNA hasarını göstermek için immünohistokimyasal incelemeler yaptık. Apoptozu tespit etmek için en çok kullanılan yöntemler; TUNEL boyası ve anti-kaspaz 3 antikoruna ile boyanmadır (160). Kaspaz aktivitesi apoptotik sürecin en önemli göstergesidir, kaspaz aktivitesinin boyanarak gösterilmesi apoptozu tespit etmekte kullanılacak çok güçlü yoldur. Duan ve ark. yaptıkları çalışmada, anti-kaspaz 3 antikoruna apoptozu TUNEL boyasına göre 3 kat daha iyi tespit etmiştir (160). Çalışmamızda da TUNEL boyamasını cerebellar dokuda hücre hasarı ve apoptozu göstermek için kullandık.

Deneklerden elde ettiğimiz normal basiller arter örneklerinde (Grup I) endotelial tabakanın düzenli olduğunu, T. media ödem skorunun 0 olduğunu ve Tunel boyaması skorunun 3,5 olduğunu gösterdik. Subaraknoid kanama sonrası damar çapı artar ve esnekliği azalır. Bizim çalışmamızda da basiller arter düzensizliği görülmüş, T. media ödem skoru 2 olarak tespit edilmiş ve TUNEL boyaması skorunun 6 olduğunu gösterilmiştir. Tüm bu farklar istatistiksel olarak anlamlı düzeydeydi. SAK sonrası PTS uygulanan denekleride ise T. Media ödem skorunun azaldığını, Tunel boyama skorunun da ciddi düzeyde azaldığını (skor 4,5) gösterdik.

Bütün bu bulgular, PST uygulamasının basiller arter endotelin hasarını anlamlı düzeyde azalttığı ve PST'nin SAK patogenezi karşı koruyucu etki gösterdiğini bir kez daha ortaya koymuştur.

5.4.4 Deneysel subaraknoid kanama sonrası basiller arter vazospazmi değerlendirilmesi

Enflamasyon ve oksidatif stres, vazospazmın patofizyolojisinde anahtar rol oynar. Sugawara, SAK sonrası vazospazmı damar duvarındaki MNL infiltrasyonunun inflamatuvar yanıtın önemli bir parçası olduğunu belirtmektedir (161). Bu vasküler düz kas değişiklikleri aynı zamanda damarın kasılma-gevşeme yeteneğini de bozar. Damar duvarındaki bu değişikliklerde inflamasyon ve oksidatif stres anahtar rol oynamaktadır (162). PST'nin yukarıda belirtilen anti-inflamatuvar ve antioksidan etkileri, vazospazmın önlenmesinde veya tedavisinde faydalı olabileceğini düşündürmektedir. Sıçanlarda insanlarda olduğu gibi bifazik vazospazm oluşur. Tekli kanama modelinde vazospazmın ilk tepe noktası kanın dışarı atılmasından dakikalar sonra, ikinci tepe noktası ise 2. günde meydana gelir. Çift kanama modelinde ise ikinci tepe noktası 5-7. günlerde görülmüştür (162). Çift kanama modelindeki vazospazmın zirvesi, insanlarda vazospazmın zamanlaması ile daha tutarlıdır. Kan enjeksiyon modellerinde etkilenen damar olarak baziler arter ve posterior komünikan arterler incelendi ve her iki damarda da benzer oranlarda vazospazm gelişti.

Çalışmamızda basiller arter incelemesini tercih ettik. Bu çalışmada SAK'a bağlı basiller arter vazospazmı ve vazospazmın tedavisi için kullandığımız PST'nin etkilerini görmeye çalıştık. Kontrol grubu deneklerinde vazospazmın gelişmediğini, SAK oluşturulan grupta vazospazm skorunun anlamlı düzeyde yükseldiğini ve 1,86 değerine ulaştığını, SAK sonrası PST uygulanan deneklerde ise bu skorun bir miktar düşüş gösterdiğini ve 1,62 değerine düştüğünü gözlemledik.

Tüm bu bulgular ışığında SAK sonrası PST uygulamasının basiller arter vazospazmına karşı koruyucu etkisi olduğunu söyleyebiliriz.

5.5 Deneysel subaraknoid kanama sonrası gen ekspresyon düzeylerinin değerlendirilmesi

Subaraknoid kanama sonrası beyinde oluşan hasarı değerlendirmek için en sık kullanılan yöntemlerimizden biri de hasar sonrası inflamatuvar cevabı değerlendirmek

ve hasar sonrası oluşan apopitozu değerlendirmektedir. Çalışmamızda da bu maksatla SAK sonrası inflamatuvar belirteçleri olarak TNF- α , IL-6, IL-1 β , NF- κ B, TLR4, p53 molekül seviyelerini ve apopitozu değerlendirmek adına Kaspazlar ve Kaspaz-3, Bcl-2 Ailesi Proteinleri, Bcl-2 ile ilişkili X Proteini (BAX), SIRT 1 ve Beta Aktin protein ekspresyonlarını değerlendirdik.

Çalışmamız sonucunda tüm apopitoz belirteçleri ve inflamatuvar belirteçleri seviyeleri gruplar arasında SAK öncesi ve sonrası anlamlı bir değişim göstermemiştir

SAK sonrası beyin hasarını değerlendirmede en sık kullanılan parametre apoptozdur çünkü nöronal apoptoz SAK patogeneğinde önemli rol oynar (163). Kaspaz-3, SAH sonrası apoptozun düzenlenmesinde kilit role sahiptir ve kaspaz-3'ün aktivasyonu geri dönüşümsüz olarak hücrenin apoptozuna neden olmaktadır. He ve ark.'nin sundukları, deneysel SAK'ın oluştuğu ve apoptozla ilişkili faktörler olan kaspaz-3, Bcl-2 ve Bax gibi faktörlerin ekspresyon düzeylerinin beyinde araştırıldığı bir çalışmada, bu faktörlerin SAK oluşan gruplarda arttığı göstermişlerdir (164). Literatürde bunu destekleyen başka deneysel kanama çalışma verileri de mevcut (157, 165). SAK sonrası apoptozun gösterilmesi arkasından apoptozu azaltan birçok ajanın SAK tedavisinde kullanılma potansiyelinin araştırılmasına yol açmıştır.

Bu amaçla çeşitli çalışmalarda puerarin (166), HSP27 (143), sikline bağımlı kinaz-5 (167), apelin-12-13-36 (156, 158, 168) ve Resveratrol (RES) (169-171) araştırılmış ve bu moleküllerin otofaji ve apoptozu düzenleyerek SAK üzerinde nöroprotektif etkiler olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmamızda PST grubunda BAX gen ekspresyon düzeylerinde ve Kaspaz-3 gen ekspresyonlarında SAK grubuna göre (anlamlı düzeyde olmasa da) azalmalar vardı. Literatürün aksine çalışmamızda BCL gen ekspresyonunda (istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte) artış saptandı. Tüm bu sonuçlar, PST'nin SAK sonrası artan apoptotik nöron ölümünü önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Bu nedenle PST'nin yukarıda bahsedilen ajanlarda olduğu gibi SAK'da da apoptozu azalttığını ve nöronal hücreleri koruduğunu söyleyebiliriz.

SAK patogenezinde apoptozu düzenlemede etkinliği ortaya konulmuş bir diğer molekül tümör baskılayıcı bir madde olarak da bilen p53'tür. Beyin hücrelerinde hasar oluşması p53'ün proapoptotik proteinler olan BAX'ın uyarmasına sebep olurken, Bcl-2'yi baskılayarak apoptozu düzenler (172). p53 aynı zamanda kaspaz proteinleri ile de yakından ilişkilidir: iskemik hücre hasarlarında salınır, mitokondriyal hasara yol açar ve kaspaz proteinlerini aktive eder (173). Yapılan çalışmalar p53'ün SAK'ta ortaya çıkan apoptozda kilit moleküllerden birisi olduğunu göstermiştir (174). SAK sonrası p53 genlerinde upregülasyonun 24. veya 72. saatlerde ortaya çıktığı gösterilmiştir (175, 176). Diğer taraftan p53 inhibitörlerinin SAK sonrası artan ödemi ve hücre ölümlerini azalttığı belirlenmiştir (176).

Bizim çalışmamızda da tespit edildiği üzere deneysel SAK oluşturulan ve PST verilen Grup 3 deneklerinde (istatistiksel olarak anlamlı olmasa da) p53 gen ekspresyonunda grup 2 ye göre bir miktar azalma görülmüştür. Aynı durum Kaspaz-3 molekülü için de geçerli olduğunu saptadık: deneysel SAK oluşturulan ve PST verilen Grup 3 deneklerinde (istatistiksel olarak anlamlı olmasa da) Kaspaz-3 gen ekspresyonunda grup 2 ye göre bir miktar azalma görülmüştür. Çalışmamızda SAK sonrası 24. saatte cerebellum örnekleri alınarak p53 gen ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. SAK grubunda p53 değerlerinin kontrol grubuna göre (anlamlı düzeyde olmasa bile) arttığı, PST uygulamasının ise bu değeri kontrol grup deneklerinin değerlerine doğru yaklaştırdığı ortaya çıkmıştır.

Bu sonuçlara dayanarak PST'nin p53'ün ve Kaspaz-3 ekspresyonunu düşürerek SAK sonrası artan hücre ölümlerini azalttığını düşünebiliriz.

SAK'ta beyin hasarı üzerinde PST'nin etkilerini ve PST'nin p53 üzerine olası etkilerini inceleyen ortaya koyan çalışmalar bildiğimiz kadarı ile literatürde çok az miktardadır. Çalışmamız bu konuda literatüre değerli katkılar sunacaktır.

SAK sonrası erken beyin hasarında apoptoz ile birlikte görülen bir diğer önemli bulgu inflamasyondur. Hatta inflamasyonun apoptoz ve diğer süreçleri indükleyen bir faktör olduğu bilinmektedir. Bu nedenle deneysel SAK modellerinde inflamasyon belirteçleri yaygın olarak araştırılmıştır. Literatürde sunulan çalışmalarda en çok incelenen inflamasyon belirteçleri olarak TNF- α , IL-6, NF- κ B

ve TLR4 dikkat çekmektedir. Biz de çalışmamızda bu belirteçlere yer verdik. Çalışmamızda elde edilen verilere bakıldığında SAK sonrası 24. saatte (istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasa da) IL-6 düzeylerine ve NF-κB düzeylerinde Grup 3 deneklerinde Grup 2'den daha düşük olduğunu saptadık. Bu sonuçlar SAK sonrası 24. saatte serebellum dokusunda bir inflamasyon tablosunun ortaya çıktığını ve PST uygulamasının bu inflamasyonu bir miktar azaltmada etkin olduğunu göstermektedir.

TNF-α ve IL-6 proinflamatuvar sitokinler olarak bilinir ve nöroinflamasyondaki rolleri oldukça iyi aydınlatılmıştır. SAK'a maruz kalmış insanlarda ilk 72 saat içerisinde TNF-α, IL-6 ve IL-1β düzeylerinin yükseldiği ve erken beyin hasarının altında yatan inflamatuvar süreçlerde bu artışın rolü olduğu belirtilmiştir (155, 177, 178). Bu sitokinler ile SAK sonrası erken beyin hasarı ilişkisi deneysel çalışmalarda da ortaya konulmuştur. Maddahi ve ark.'nın sıçanlarda üzerinde yaptıkları bir çalışmada serebral arter duvarında her üç sitokin düzeyinde gözlemlenen ve SAK sonrası 6. saatte başlayan artışın 72. saate kadar devam ettiği belirtilmiştir (179). Proinflamatuvar sitokin düzeyleri ile nörolojik işlev kaybı arasında bir korelasyon olduğu bilinmektedir: TNF-α, IL-6 ve IL-1β'nin beyindeki hasarlı bölgede yüksek düzeyde eksprese olduğu veya üretildiği tespit edilmiştir (180).

Bizim çalışmamızda inflamasyon belirteçleri olan IL-6, NF-κB ve p53 düzeylerinin Grup 3'te Grup 2'ye göre (istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasa da) daha düşük olmasının ve TNF-α, TLR4 ve IL-1β düzeylerinin Grup 3'te Grup 2'ye göre (istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasa da) daha yüksek olmasının açıklaması olarak sitokin ekspresyonlarındaki değişimler inme tipine ve inmenin lokalize olduğu beyin bölgesine bağlı olarak da farklılık gösterdiğinin bilinmesi olabilir.

İki farklı SAK modelini karşılaştıran bir çalışma, beyindeki TNF-α, IL-6 ve IL-1β ekspresyonunun SAK'tan 2 ve 7 gün sonra farklı şekilde arttığını ortaya koymuştur. Serebral arter perforasyonu ile indüklenen SAK sonrası inflamatuvar yanıt 7. güne kadar ortaya çıkarken bazal sisterna kaynaklı oluşturulan SAK modelinde SAK'tan 2 gün sonra beyin dokusunda sitokin düzeylerinde artış saptanmıştır (146).

Çalışmamızda SAK'dan 24 gün sonra serebellum doku örnekleri alındı ve bazı sitokin düzeylerinde artış saptadık.

SAK'dan kısa bir süre sonra meydana gelen inflamasyon, nöronal apoptozu tetikleyen önemli bir faktördür. Mikroglia ve astrosit hücreleri bu süreçte yer alır; mikroglia, astrositleri enflamatuar sitokinleri salgılaması için uyarır ve astrositlerin aktivitesi, SAK sonrası sinir hücresi hasarının en temel nedenlerinden biri olarak kabul edilir (181, 182). Astrositlerin etkileri SAK sonrası erken dönemde daha güçlüdür ve ayrıca nöronal apoptoz ile ilişkilidir; bu nedenle astrositik aktivitenin azaltılması SAK patogeneziine karşı uygulanan terapötik yaklaşımlardan biridir (183). Astrositler apoptozu ve enflamasyonu düzenlerken, astrositlere bağlı apoptozu geciktirmek SAK ile ilişkili erken beyin hasarını azaltmak için uygulanan başka bir stratejidir (184). Chung ve ark. SAK sonrası nöronal hasarı azaltmak için minosiklin, anti-inflamatuar ve anti-apoptotik özellikler uygulayarak enflamatuar yanıtı incelediler. Bu çalışmada SAK sonrası 6 saat içinde kandaki TNF- α ve IL-1 β düzeylerinin arttığı, ancak IL-6 düzeylerinin değişmediği belirlendi. Minosiklin uygulamasının TNF- α ve IL-1 β seviyelerindeki artışları önlediğini ve IBD'yi azalttığını ortaya koymuşlardır (183). Bu iyileştirici etkilerin TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gen ekspresyonlarındaki azalmalar ve IL-1 β ile apoptoz arasındaki etkileşimler ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (148).

TNF- α , SAK'tan sonra en hızlı değişen sitokindir. SAK sonrası 1. ve 6. saatlerde bile beyin parankiminde TNF- α gen ekspresyonlarında artış olduğu gösterilmiştir. Bu artışlar, damarların çevresinde bulunan glial hücrelerde ve astrositlerde yoğunlaşmaktadır (179). TNF- α 'nın iskemik beyin hasarında arttığı iyi bilinmektedir. Bir çalışmada beyindeki TNF- α gen ekspresyon seviyeleri iskemiden 1, 3, 6, 12 ve 24 saat sonra incelenmiş ve iskeminin ardından 1. saatte başlayan artışın 12. saatte zirveye ulaştığı belirlenmiştir (157).

Çalışmamızda SAK sonrası PST uygulamasının NF- κ B, IL-6 ve p53 gen ekspresyon düzeylerini azalttığı gözlemlendi (istatistiksel olarak anlamlı değil). Her üç sitokin üzerinden değerlendirildiğinde PST'nin SAK sonrası artan enflamatuar yanıtı azalttığını ve antiinflamatuar etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz.

Çalışmamızda, inflamasyon belirteci olarak değişimini ölçtüğümüz bir molekül de TLR4'tür. TLR4'ün SAK patogenezindeki rolü konusunda bildirimler bulunmaktadır. SAK'ta hemoraji alanına dağılan alyuvarların yıkılması TLR4'ü aktive ettiği (Bulters vd., 2018), TLR4 aktivasyonu NF-kB yolağının uyarılması ile inflamatuvar sürecin başlattığı ve sonuç olarak nöronal hasara doğru gidişi tetiklediği (Hyzak vd., 2011; Pradilla vd., 2010) gösterilmiştir.

Yapılan bir çalışmada SAK sonrası TLR4 gen ekspresyon düzeylerinin arttığı belirlenmiş, aynı çalışmada tedavi edici ajan olarak uygulanan 2-PMAP'nin inflamatuvar sitokinlerle birlikte TLR4 gen ekspresyonlarını da azalttığı görülmüştür. TLR4 gen ekspresyonlarının azaldığı grupta vazospazmın ve apoptozun da azalması TLR4 inhibisyonunun SAK sonrası nöronal hasar için koruyucu bir seçenek olacağını düşündürmüştür (Hanafy, 2013; Wu vd., 2022; Zhou vd., 2015). Nitekim Zhang vd. yaptıkları bir çalışmada TLR4 aktivasyonunu engellemek için RES uygulamışlardır (Zhang vd., 2016a). Benzeri bir çalışmada, RES uygulanan grupta inflamasyon ve apoptozun azaldığını, beyin ödeminin küçüldüğünü ve daha düşük nöronal hasar belirtileri ortaya çıktığını belirlemişlerdir.

Çalışmamızda literatür bildirimine uygun bir sonuç tespit edilememiştir: SAK modeli sonrası TLR4 gen ekspresyonları seviyelerinde düşüş tespit edilmiş ve SAK + PST grubunda (Grup 3) TLR4 gen ekspresyonları seviyeleri Grup 2'ye göre bir miktar daha yüksek tespit edilmiştir

Bu sonuçlar aynı zamanda PST'nin SAK'taki iyileştirici etkilerini TLR4 dışındaki yollar üzerinden gerçekleştirdiğini de düşündürmektedir. Bu sonuçlar SAK'ta PST-TLR4 ilişkisini ortaya koyan öncü bulgulardır. SAK'ta PST-TLR4 ilişkisi hakkında daha net yorumlar yapabilmek için 48. ve 72. saatlerde de beyin dokusunun inceleneceği yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bir diğer inflamatuvar marker olan SIRT-1 gen ekspresyonu açısından değerlendirme yaptığımızda SIRT-1 düzeyinin SAK deneklerinde kontrol grubuna kıyasla azaldığını, Grup 3'te ise bir miktar yükseldiğini saptadık (hiçbir değişim istatistiksel anlamlılık göstermemiştir). Çalışmamızda apoptoz ve inflamasyon üzerine SAK ve PST uygulamasının etkilerini literatür ile uyumlu bulmuş, SIRT1

gen ekspresyonları açısından elde ettiğimiz verilerin literatür ile bir benzerlik gözlemlenmiş ama anlamlılık düzeyine çıkamamıştır. Çalışmamız PST'nin SAK'a bağlı erken beyin hasarı üzerine koruyucu etkilerini inceleyen ilk araştırmalar arasındadır. Bu konuda ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

SIRT1 birçok farklı hücresel fonksiyonda yer almakta, beyin birçok bölgesinde ifade edilmekte ve sinir hücresi hasarına karşı koruyucu etkiye sahiptir (134).

Bir çalışma, SIRT1'in nöroinflamasyonu ve apoptozu inhibe ederek sinir hücrelerini serebral iskemiden koruduğunu göstermiştir (155).

Başka bir çalışmada beyin kanaması sırasında SIRT1 aktivasyonunun mitokondriyal fonksiyonu iyileştirdiği ve ayrıca nöronal hasara karşı koruyucu etkisi olduğu bulunmuştur (170). SIRT1'in bu etkileri, SIRT1'in SAK'ta koruyucu rolünün araştırılmasına yol açtı. Bu konuda yapılan birçok çalışma SIRT1'in SAK üzerindeki etkisini bildirmiştir. SAK sonrası artan SIRT1 ekspresyonunun nöroinflamasyon ve nörodejenerasyona karşı koruyucu etkisi olduğu yapılan bir araştırma ile gösterilmiştir (185).

SIRT1 ayrıca SAK'ta serebrovasküler spazm üzerinde koruyucu etkiye sahiptir (186). Öte yandan PST, SIRT1'in bir aktivatörüdür ve SIRT1 aktivasyonu sağlayarak inflamasyonu azaltır ve hücreleri apoptozdan korur. RES'in iskemiyi veya anoksi durumlarında koruyucu etkisi olduğu iyi bilinmektedir. RES bu etkiyi, SIRT1'in aktivasyonu yoluyla HIF-1 α (hipoksi kaynaklı faktör-1 alfa) geninin ifadesini artırarak elde eder. RES'e benzer yapısı nedeniyle PST'nin de aynı şekilde hareket ettiği düşünülmektedir (178, 185, 186). Çalışmamızda PST uygulaması antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkiler gösterse de SIRT1 gen ekspresyonu üzerinde anlamlı bir etki bulunmadı (sayısal olarak bir miktar artış gözlemlendi). Bu, PST'nin SIRT1'den bağımsız diğer mekanizmalar aracılığıyla SAK'ta koruyucu olabileceğini düşündürmektedir. Bu çelişkili sonucun bir nedeni, az sayıda deney olabilir. Bu nedenle, bu konuda daha büyük ölçekli çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmanın güçlü yönleri

Bilgimiz dahilinde, sunduğumuz çalışma, deneysel subaraknoid kanama modeli oluşturulmuş, sıçanlarda piseatannolün koruyucu etkilerininini inceleyen ikinci, serebellar yaralanma ve baziler arterde gelişen vazospazm üzerine olan koruyucu etkinliğini inceleyen ilk çalışmadır.

Çalışmanın kısıtlılıkları

Etik kurallar çerçevesinde oluşturduğumuz SAK modelleri için istatistik değerlendirme için gerekli olabilecek en kısıtlı denek sayısı alınmıştır. Denek sayısının az olması çalışmanın en büyük kısıtlılığıdır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, erkek SAK modeli Wistar sıçanlarında PST'nin terapötik etkileri histopatolojik ve moleküler düzeyde incelenmiştir. SAK'ı modellemeden önceki ve sonraki nörodavranışsal çalışmamız, PST'nin bozulmuş motor aktivite üzerinde iyileştirici bir etkisi olduğunu ortaya koydu. PST'nin SAK sonrası hücresel düzeyde serebral ödemi azaltarak erken beyin hasarını önemli ölçüde iyileştirdiğini gözlemledik. Ayrıca SAK modelinin oluşturulduğu gruplarda hasar görmüş kasılan nöronal hücre sayısının arttığı, PST uygulaması ile bu sayının azaldığı anlaşıldı. SAK patogenezinde nöronal apoptozun önemli rol oynadığı bilindiğinden çalışmamızda nöronal apoptozu hem TUNEL boyama ile histopatolojik olarak hem de RT-PCR ile moleküler düzeyde değerlendirdik. TUNEL boyama sonuçlarına göre PST ile SAH grubunda TUNEL pozitif hücre sayısının arttığı, apoptotik hücre sayısının azaldığı anlaşıldı. Moleküler düzeyde, hücresel apoptotik yollarda yer alan ve hücre ölümüne yol açan moleküller olan p53, kaspaz-3 ve Bax'ın ekspresyon seviyelerinin PST ile (önemli ölçüde olmasa da) azaldığını gösterdik. Tüm bu sonuçlara dayanarak PST'nin apoptozu azaltıcı bir etkiye sahip olduğu ve SAK'daki nöronları koruduğu söylenebilir.

SAK ile hastalığın prognozu için önemli olan bir inflamatuvar süreç vardır; Bu nedenle, çalışmamızda TNF- α , IL-6, IL-1 β , NF-kB, TLR4 ve SIRT1 gibi inflamatuvar yollarda yer alan birkaç molekülün gen ekspresyon seviyelerini değerlendirdik. SAK sonrası PST kullanımının TNF- α , IL-6 ve NF-kB düzeylerini düşürdüğü anlaşıldı. Bu sonuçlar, PST uygulamasının doğrudan SAK sonrası inflamasyon ve apoptoz yollarını hedeflediği hipotezimizi desteklemektedir.

Sonuçlarımız, PST'nin, temel beyin moleküler sinyallerini hedefleyerek erken beyin hasarı ve basiller arter vazospazmının tedavisinde deneysel bir SAH modelinde terapötik değere sahip olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu konudaki araştırmaların azlığı ve mekanizmaların tam olarak aydınlatılamamış olması nedeniyle PST uygulamasının SAK ve altta yatan mekanizma üzerindeki etkisinin aydınlatılması için kapsamlı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamız deneysel SAK'da PST uygulamasının serebellar dokuda inflamasyon ve apoptoz üzerine etkisini, ayrıca basiller arter vazospazmı ve PTS'ye etkisini birlikte belirleyen ilk çalışma olup, bu konuda yapılacak araştırmalara katkı sağlayacaktır.

Sonuç olarak;

- Deneysel SAK modelinde SAK oluşturulan deneklerde Garcia nörolojik değerlendirme skorlarında anlamlı düzeyde düşüş tespit edilmiştir.
- SAK oluşturulan deneklerde PST uygulanan deneklerin Garcia nörolojik değerlendirme skorları PST uygulanmayan deneklere göre (istatistiksel olarak anlamlı olmasa da) daha yüksek tespit edilmiştir.
- Deneysel SAK modeli sonrasında kullanılan PST, oluşan nöronal hücre hasarına karşı koruyucu etki göstermektedir.
- Deneysel SAK modeli sonrasında kullanılan PST, oluşan basiller arter vazospazmına karşı koruyucu etki göstermektedir.
- Deneysel SAK modeli sonrasında kullanılan PST beyin hasarı göstergeleri olan apoptoz gen ekspresyonları belirteçlerinde (Kaspaz-3, BAX), SAK grubuna göre bir miktar azalmaya neden olmakta ve nöroprotektif etkinlik göstermektedir.
- Deneysel SAK modeli sonrasında kullanılan PST, cerebellum dokusunda oluşan inflamasyon (ve belirteçlerini) azaltmada etkili olabilir

İleri çalışmalar için öneriler

- Oluşturduğumuz deneysel SAK modelinde Piseatannolun ilk 24 saat içindeki etkisini değerlendirdik: Yani akut veya kısa süredeki etkinliği. Santral hasarın sonrası ödemin çözülmesi nispeten hızlı olabiliyorken basının oluşturduğu nörodejenerasyonun geri dönmesi daha yavaş ve zordur. Dolayısı ile PST'nin uzun etkinliğini görebilmek adına, etkinliğini devam edip etmediğini, yükselen veya azalan etkinlik paterni gösterip göstermediğini değerlendirmek adına ve dolayısı ile insan uygulamalarında bizi bekleyenleri öngörmek adına sunduğumuz çalışma modelini SAK sonrası PST etkinliğini 24-48-72 saat etkinliğini de değerlendirmek değerli olacaktır.
- Oluşturduğumuz SAK modeli sonrasında Piseatannolun tek doz etkinliğini inceledik. PST'nin rekürren doz, infüzyon tedavisi ve yüksek doz etkinliğinin çalışılması ayrıca değerli olacaktır.
- Oluşturduğumuz SAK modelini günlük klinik pratiğine daha çok yaklaştırmak adına SAK modellerini hafif şiddette SAK, orta ve yaygın SAK olarak modelize ederek PST'nin etkinliğini yeniden değerlendirmek araştırılmaya değer bir konu olacağını düşünüyoruz.

7.KAYNAKLAR

1. Rinkel GJ, Wijdicks EF, Hasan D, Kienstra GE, Franke CL, Hageman LM, et al. Outcome in patients with subarachnoid haemorrhage and negative angiography according to pattern of haemorrhage on computed tomography. *Lancet*. 1991;338(8773):964-8.
2. Ciurea A, Palade C, Voinescu D, Nica D. Subarachnoid hemorrhage and cerebral vasospasm—literature review. *Journal of medicine and life*. 2013;6(2):120.
3. Pluta RM, Hansen-Schwartz J, Dreier J, Vajkoczy P, Macdonald RL, Nishizawa S, et al. Cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: time for a new world of thought. *Neurological research*. 2009;31(2):151-8.
4. Grasso G, Alafaci C, Macdonald RL. Management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: State of the art and future perspectives. *Surgical neurology international*. 2017;8.
5. Etminan N, Chang HS, Hackenberg K, de Rooij NK, Vergouwen MDI, Rinkel GJE, et al. Worldwide Incidence of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage According to Region, Time Period, Blood Pressure, and Smoking Prevalence in the Population: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol*. 2019;76(5):588-97.
6. Schatlo B, Fung C, Stienen MN, Fathi AR, Fandino J, Smoll NR, et al. Incidence and Outcome of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: The Swiss Study on Subarachnoid Hemorrhage (Swiss SOS). *Stroke*. 2021;52(1):344-7.
7. Shea AM, Reed SD, Curtis LH, Alexander MJ, Villani JJ, Schulman KA. Characteristics of nontraumatic subarachnoid hemorrhage in the United States in 2003. *Neurosurgery*. 2007;61(6):1131-7; discussion 7-8.
8. Rinkel GJ, Djibuti M, Algra A, van Gijn J. Prevalence and risk of rupture of intracranial aneurysms: a systematic review. *Stroke*. 1998;29(1):251-6.
9. Jordan LC, Johnston SC, Wu YW, Sidney S, Fullerton HJ. The importance of cerebral aneurysms in childhood hemorrhagic stroke: a population-based study. *Stroke*. 2009;40(2):400-5.
10. Claassen J, Park S. Spontaneous subarachnoid haemorrhage. *Lancet*. 2022;400(10355):846-62.
11. Broderick JP, Brott T, Tomsick T, Huster G, Miller R. The risk of subarachnoid and intracerebral hemorrhages in blacks as compared with whites. *N Engl J Med*. 1992;326(11):733-6.
12. Labovitz DL, Halim AX, Brent B, Boden-Albala B, Hauser WA, Sacco RL. Subarachnoid hemorrhage incidence among Whites, Blacks and Caribbean Hispanics: the Northern Manhattan Study. *Neuroepidemiology*. 2006;26(3):147-50.
13. Sarti C, Tuomilehto J, Salomaa V, Sivenius J, Kaarsalo E, Narva EV, et al. Epidemiology of subarachnoid hemorrhage in Finland from 1983 to 1985. *Stroke*. 1991;22(7):848-53.
14. Van Gijn J, Kerr RS, Rinkel GJ. Subarachnoid haemorrhage. *The Lancet*. 2007;369(9558):306-18.
15. van Gijn J, van Dongen KJ, Vermeulen M, Hijdra A. Perimesencephalic hemorrhage: a nonaneurysmal and benign form of subarachnoid hemorrhage. *Neurology*. 1985;35(4):493-7.

16. Canhão P, Ferro JM, Pinto AN, Melo TP, Campos JG. Perimesencephalic and nonperimesencephalic subarachnoid haemorrhages with negative angiograms. *Acta Neurochir (Wien)*. 1995;132(1-3):14-9.
17. Schwartz TH, Solomon RA. Perimesencephalic nonaneurysmal subarachnoid hemorrhage: review of the literature. *Neurosurgery*. 1996;39(3):433-40; discussion 40.
18. Vivancos J, Gilo F, Frutos R, Maestre J, García-Pastor A, Quintana F, et al. Clinical management guidelines for subarachnoid haemorrhage. Diagnosis and treatment. *Neurología (English Edition)*. 2014;29(6):353-70.
19. Perry JJ, Stiell IG, Sivilotti ML, Bullard MJ, Hohl CM, Sutherland J, et al. Clinical decision rules to rule out subarachnoid hemorrhage for acute headache. *Jama*. 2013;310(12):1248-55.
20. Perry JJ, Sivilotti MLA, Sutherland J, Hohl CM, Émond M, Calder LA, et al. Validation of the Ottawa Subarachnoid Hemorrhage Rule in patients with acute headache. *Cmaj*. 2017;189(45):E1379-e85.
21. Perry JJ, Stiell IG, Sivilotti ML, Bullard MJ, Lee JS, Eisenhauer M, et al. High risk clinical characteristics for subarachnoid haemorrhage in patients with acute headache: prospective cohort study. *Bmj*. 2010;341:c5204.
22. Perry DC, Bruce C. Evaluating the child who presents with an acute limp. *Bmj*. 2010;341:c4250.
23. Butzkueven H, Evans AH, Pitman A, Leopold C, Jolley DJ, Kaye AH, et al. Onset seizures independently predict poor outcome after subarachnoid hemorrhage. *Neurology*. 2000;55(9):1315-20.
24. Lindbohm JV, Kaprio J, Jousilahti P, Salomaa V, Korja M. Risk Factors of Sudden Death From Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke*. 2017;48(9):2399-404.
25. Edlow JA. Managing Patients With Nontraumatic, Severe, Rapid-Onset Headache. *Ann Emerg Med*. 2018;71(3):400-8.
26. Carpenter CR, Hussain AM, Ward MJ, Zipfel GJ, Fowler S, Pines JM, et al. Spontaneous Subarachnoid Hemorrhage: A Systematic Review and Meta-analysis Describing the Diagnostic Accuracy of History, Physical Examination, Imaging, and Lumbar Puncture With an Exploration of Test Thresholds. *Acad Emerg Med*. 2016;23(9):963-1003.
27. Savitz SI, Levitan EB, Wears R, Edlow JA. Pooled analysis of patients with thunderclap headache evaluated by CT and LP: is angiography necessary in patients with negative evaluations? *J Neurol Sci*. 2009;276(1-2):123-5.
28. Perry JJ, Spacek A, Forbes M, Wells GA, Mortensen M, Symington C, et al. Is the combination of negative computed tomography result and negative lumbar puncture result sufficient to rule out subarachnoid hemorrhage? *Ann Emerg Med*. 2008;51(6):707-13.
29. Perry JJ, Sivilotti MLA, Émond M, Hohl CM, Khan M, Lesiuk H, et al. Prospective Implementation of the Ottawa Subarachnoid Hemorrhage Rule and 6-Hour Computed Tomography Rule. *Stroke*. 2020;51(2):424-30.
30. Bellolio MF, Hess EP, Gilani WI, VanDyck TJ, Ostby SA, Schwarz JA, et al. External validation of the Ottawa subarachnoid hemorrhage clinical decision rule in patients with acute headache. *Am J Emerg Med*. 2015;33(2):244-9.

31. Newman-Toker DE, Edlow JA. High-stakes diagnostic decision rules for serious disorders: the Ottawa subarachnoid hemorrhage rule. *Jama*. 2013;310(12):1237-9.
32. Kowalski RG, Claassen J, Kreiter KT, Bates JE, Ostapkovich ND, Connolly ES, et al. Initial misdiagnosis and outcome after subarachnoid hemorrhage. *Jama*. 2004;291(7):866-9.
33. Ois A, Vivas E, Figueras-Aguirre G, Guimaraens L, Cuadrado-Godia E, Avellaneda C, et al. Misdiagnosis Worsens Prognosis in Subarachnoid Hemorrhage With Good Hunt and Hess Score. *Stroke*. 2019;50(11):3072-6.
34. Edlow JA, Malek AM, Ogilvy CS. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage: update for emergency physicians. *J Emerg Med*. 2008;34(3):237-51.
35. Minn SJSKTVTSM. 2015(21)::1263.
36. Spears J, Macdonald R, Weir B. Perioperative management of subarachnoid hemorrhage. *Youmans neurological surgery*. 2011;6:3772-90.
37. Fisher C, Kistler J, Davis J. Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualized by computerized tomographic scanning. *Neurosurgery*. 1980;6(1):1-9.
38. Helbok R, Kurtz P, Vibbert M, Schmidt MJ, Fernandez L, Lantigua H, et al. Early neurological deterioration after subarachnoid haemorrhage: risk factors and impact on outcome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(3):266-70.
39. Connolly ES, Jr., Rabinstein AA, Carhuapoma JR, Derdeyn CP, Dion J, Higashida RT, et al. Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2012;43(6):1711-37.
40. Hillman J, Fridriksson S, Nilsson O, Yu Z, Saveland H, Jakobsson KE. Immediate administration of tranexamic acid and reduced incidence of early rebleeding after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a prospective randomized study. *J Neurosurg*. 2002;97(4):771-8.
41. Naidech AM, Janjua N, Kreiter KT, Ostapkovich ND, Fitzsimmons BF, Parra A, et al. Predictors and impact of aneurysm rebleeding after subarachnoid hemorrhage. *Arch Neurol*. 2005;62(3):410-6.
42. Ohkuma H, Tsurutani H, Suzuki S. Incidence and significance of early aneurysmal rebleeding before neurosurgical or neurological management. *Stroke*. 2001;32(5):1176-80.
43. Kassell NF, Torner JC. Aneurysmal rebleeding: a preliminary report from the Cooperative Aneurysm Study. *Neurosurgery*. 1983;13(5):479-81.
44. Lord AS, Fernandez L, Schmidt JM, Mayer SA, Claassen J, Lee K, et al. Effect of rebleeding on the course and incidence of vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Neurology*. 2012;78(1):31-7.
45. Rosengart AJ, Schultheiss KE, Tolentino J, Macdonald RL. Prognostic factors for outcome in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2007;38(8):2315-21.
46. Macdonald RL, Hunsche E, Schüler R, Wlodarczyk J, Mayer SA. Quality of life and healthcare resource use associated with angiographic vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2012;43(4):1082-8.

47. Suarez JI. Diagnosis and Management of Subarachnoid Hemorrhage. *Continuum (Minneapolis)*. 2015;21(5 Neurocritical Care):1263-87.
48. Rowland MJ, Hadjipavlou G, Kelly M, Westbrook J, Pattinson KT. Delayed cerebral ischaemia after subarachnoid haemorrhage: looking beyond vasospasm. *Br J Anaesth*. 2012;109(3):315-29.
49. Vergouwen MD, Vermeulen M, van Gijn J, Rinkel GJ, Wijdeveld EF, Muizelaar JP, et al. Definition of delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage as an outcome event in clinical trials and observational studies: proposal of a multidisciplinary research group. *Stroke*. 2010;41(10):2391-5.
50. Schmidt JM, Wartenberg KE, Fernandez A, Claassen J, Rincon F, Ostapovich ND, et al. Frequency and clinical impact of asymptomatic cerebral infarction due to vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 2008;109(6):1052-9.
51. Rabinstein AA, Friedman JA, Weigand SD, McClelland RL, Fulgham JR, Manno EM, et al. Predictors of cerebral infarction in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2004;35(8):1862-6.
52. Wilkins RH. Aneurysm rupture during angiography: does acute vasospasm occur? *Surg Neurol*. 1976;5(5):299-303.
53. Bederson JB, Levy AL, Ding WH, Kahn R, DiPerna CA, Jenkins AL, 3rd, et al. Acute vasoconstriction after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 1998;42(2):352-60; discussion 60-2.
54. Qureshi AI, Sung GY, Suri MA, Straw RN, Guterman LR, Hopkins LN. Prognostic value and determinants of ultraearly angiographic vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 1999;44(5):967-73; discussion 73-4.
55. Baldwin ME, Macdonald RL, Huo D, Novakovic RL, Goldenberg FD, Frank JI, et al. Early vasospasm on admission angiography in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage is a predictor for in-hospital complications and poor outcome. *Stroke*. 2004;35(11):2506-11.
56. Zimmermann M, Seifert V. Endothelin and subarachnoid hemorrhage: an overview. *Neurosurgery*. 1998;43(4):863-75; discussion 75-6.
57. Sobey CG, Faraci FM. Subarachnoid haemorrhage: what happens to the cerebral arteries? *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1998;25(11):867-76.
58. Dhar R, Scalfani MT, Blackburn S, Zazulia AR, Videen T, Diringier M. Relationship between angiographic vasospasm and regional hypoperfusion in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2012;43(7):1788-94.
59. Kistler JP, Crowell RM, Davis KR, Heros R, Ojemann RG, Zervas T, et al. The relation of cerebral vasospasm to the extent and location of subarachnoid blood visualized by CT scan: a prospective study. *Neurology*. 1983;33(4):424-36.
60. Weisberg LA. Computed tomography in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurology*. 1979;29(6):802-8.
61. Charpentier C, Audibert G, Guillemin F, Civit T, Ducrocq X, Bracard S, et al. Multivariate analysis of predictors of cerebral vasospasm occurrence after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 1999;30(7):1402-8.

62. Badjatia N, Topcuoglu MA, Buonanno FS, Smith EE, Nogueira RG, Rordorf GA, et al. Relationship between hyperglycemia and symptomatic vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Crit Care Med*. 2005;33(7):1603-9; quiz 23.
63. Hop JW, Rinkel GJ, Algra A, van Gijn J. Initial loss of consciousness and risk of delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 1999;30(11):2268-71.
64. Qureshi AI, Sung GY, Razumovsky AY, Lane K, Straw RN, Ulatowski JA. Early identification of patients at risk for symptomatic vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Crit Care Med*. 2000;28(4):984-90.
65. Singhal AB, Topcuoglu MA, Dorer DJ, Ogilvy CS, Carter BS, Koroshetz WJ. SSRI and statin use increases the risk for vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Neurology*. 2005;64(6):1008-13.
66. Dumont AS, Crowley RW, Monteith SJ, Ilodigwe D, Kassell NF, Mayer S, et al. Endovascular treatment or neurosurgical clipping of ruptured intracranial aneurysms: effect on angiographic vasospasm, delayed ischemic neurological deficit, cerebral infarction, and clinical outcome. *Stroke*. 2010;41(11):2519-24.
67. Gross BA, Rosalind Lai PM, Frerichs KU, Du R. Treatment modality and vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *World Neurosurg*. 2014;82(6):e725-30.
68. Taha MM, Nakahara I, Higashi T, Iwamuro Y, Iwaasa M, Watanabe Y, et al. Endovascular embolization vs surgical clipping in treatment of cerebral aneurysms: morbidity and mortality with short-term outcome. *Surg Neurol*. 2006;66(3):277-84; discussion 84.
69. Ibrahim GM, Vachhrajani S, Ilodigwe D, Kassell NF, Mayer SA, Ruefenacht D, et al. Method of aneurysm treatment does not affect clot clearance after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 2012;70(1):102-9; discussion 9.
70. Xia ZW, Liu XM, Wang JY, Cao H, Chen FH, Huang J, et al. Coiling Is Not Superior to Clipping in Patients with High-Grade Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: Systematic Review and Meta-Analysis. *World Neurosurg*. 2017;98:411-20.
71. de Oliveira JG, Beck J, Ulrich C, Rathert J, Raabe A, Seifert V. Comparison between clipping and coiling on the incidence of cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review and meta-analysis. *Neurosurg Rev*. 2007;30(1):22-30; discussion -1.
72. Jones J, Sayre J, Chang R, Tian J, Szeder V, Gonzalez N, et al. Cerebral vasospasm patterns following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: an angiographic study comparing coils with clips. *J Neurointerv Surg*. 2015;7(11):803-7.
73. Budohoski KP, Guilfoyle M, Helmy A, Huuskonen T, Czosnyka M, Kirillos R, et al. The pathophysiology and treatment of delayed cerebral ischaemia following subarachnoid haemorrhage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014;85(12):1343-53.
74. Macdonald RL. Delayed neurological deterioration after subarachnoid haemorrhage. *Nat Rev Neurol*. 2014;10(1):44-58.
75. Sehba FA, Hou J, Pluta RM, Zhang JH. The importance of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Prog Neurobiol*. 2012;97(1):14-37.

76. Nornes H, Magnaes B. Intracranial pressure in patients with ruptured saccular aneurysm. *J Neurosurg.* 1972;36(5):537-47.
77. Paré L, Delfino R, Leblanc R. The relationship of ventricular drainage to aneurysmal rebleeding. *J Neurosurg.* 1992;76(3):422-7.
78. Brinker T, Seifert V, Stolke D. Acute changes in the dynamics of the cerebrospinal fluid system during experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery.* 1990;27(3):369-72.
79. Heinsoo M, Eelmäe J, Kuklane M, Tomberg T, Tikk A, Asser T. The possible role of CSF hydrodynamic parameters following in management of SAH patients. *Acta Neurochir Suppl.* 1998;71:13-5.
80. Heuer GG, Smith MJ, Elliott JP, Winn HR, LeRoux PD. Relationship between intracranial pressure and other clinical variables in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg.* 2004;101(3):408-16.
81. Muehlschlegel S. Subarachnoid Hemorrhage. *Continuum (Minneapolis Minn).* 2018;24(6):1623-57.
82. Douglas MR, Daniel M, Lagord C, Akinwunmi J, Jackowski A, Cooper C, et al. High CSF transforming growth factor beta levels after subarachnoid haemorrhage: association with chronic communicating hydrocephalus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009;80(5):545-50.
83. van Gijn J, Hijdra A, Wijndicks EF, Vermeulen M, van Crevel H. Acute hydrocephalus after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg.* 1985;63(3):355-62.
84. Hasan D, Vermeulen M, Wijndicks EF, Hijdra A, van Gijn J. Management problems in acute hydrocephalus after subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 1989;20(6):747-53.
85. Suarez-Rivera O. Acute hydrocephalus after subarachnoid hemorrhage. *Surg Neurol.* 1998;49(5):563-5.
86. Xie Z, Hu X, Zan X, Lin S, Li H, You C. Predictors of Shunt-dependent Hydrocephalus After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage? A Systematic Review and Meta-Analysis. *World Neurosurg.* 2017;106:844-60.e6.
87. Wilson CD, Safavi-Abbasi S, Sun H, Kalani MY, Zhao YD, Levitt MR, et al. Meta-analysis and systematic review of risk factors for shunt dependency after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg.* 2017;126(2):586-95.
88. Ridwan S, Zur B, Kurscheid J, Esche J, Kristof R, Klingmüller D, et al. Hyponatremia After Spontaneous Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage-A Prospective Observational Study. *World Neurosurg.* 2019;129:e538-e44.
89. Naidech AM, Kreiter KT, Janjua N, Ostapkovich N, Parra A, Commichau C, et al. Phenytoin exposure is associated with functional and cognitive disability after subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 2005;36(3):583-7.
90. Giller CA, Wills MJ, Giller AM, Samson D. Distribution of hematocrit values after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neuroimaging.* 1998;8(3):169-70.
91. Naidech AM, Drescher J, Ault ML, Shaibani A, Batjer HH, Alberts MJ. Higher hemoglobin is associated with less cerebral infarction, poor outcome, and death after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery.* 2006;59(4):775-9; discussion 9-80.

92. Naidech AM, Jovanovic B, Wartenberg KE, Parra A, Ostapkovich N, Connolly ES, et al. Higher hemoglobin is associated with improved outcome after subarachnoid hemorrhage. *Crit Care Med.* 2007;35(10):2383-9.
93. Oddo M, Milby A, Chen I, Frangos S, MacMurtrie E, Maloney-Wilensky E, et al. Hemoglobin concentration and cerebral metabolism in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 2009;40(4):1275-81.
94. Broessner G, Lackner P, Hoefer C, Beer R, Helbok R, Grabmer C, et al. Influence of red blood cell transfusion on mortality and long-term functional outcome in 292 patients with spontaneous subarachnoid hemorrhage. *Crit Care Med.* 2009;37(6):1886-92.
95. Diringer MN, Bleck TP, Claude Hemphill J, 3rd, Menon D, Shutter L, Vespa P, et al. Critical care management of patients following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: recommendations from the Neurocritical Care Society's Multidisciplinary Consensus Conference. *Neurocrit Care.* 2011;15(2):211-40.
96. Naidech AM, Shaibani A, Garg RK, Duran IM, Liebling SM, Bassin SL, et al. Prospective, randomized trial of higher goal hemoglobin after subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care.* 2010;13(3):313-20.
97. Kumar MA, Levine J, Faerber J, Elliott JP, Winn HR, Doerfler S, et al. The Effects of Red Blood Cell Transfusion on Functional Outcome after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *World Neurosurg.* 2017;108:807-16.
98. Festic E, Rabinstein AA, Freeman WD, Mauricio EA, Robinson MT, Mandrekar J, et al. Blood transfusion is an important predictor of hospital mortality among patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care.* 2013;18(2):209-15.
99. Le Roux PD. Anemia and transfusion after subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care.* 2011;15(2):342-53.
100. Solenski NJ, Haley EC, Jr., Kassell NF, Kongable G, Germanson T, Truskowski L, et al. Medical complications of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a report of the multicenter, cooperative aneurysm study. Participants of the Multicenter Cooperative Aneurysm Study. *Crit Care Med.* 1995;23(6):1007-17.
101. van der Bilt IA, Hasan D, Vandertop WP, Wilde AA, Algra A, Visser FC, et al. Impact of cardiac complications on outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a meta-analysis. *Neurology.* 2009;72(7):635-42.
102. Hravnak M, Frangiskakis JM, Crago EA, Chang Y, Tanabe M, Gorcsan J, 3rd, et al. Elevated cardiac troponin I and relationship to persistence of electrocardiographic and echocardiographic abnormalities after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 2009;40(11):3478-84.
103. van Gijn J, Kerr RS, Rinkel GJ. Subarachnoid haemorrhage. *Lancet.* 2007;369(9558):306-18.
104. Abulhasan YB, Alabdulraheem N, Simoneau G, Angle MR, Teitelbaum J. Mortality after Spontaneous Subarachnoid Hemorrhage: Causality and Validation of a Prediction Model. *World Neurosurg.* 2018;112:e799-e811.
105. Vergouwen MD, Jong-Tjien-Fa AV, Algra A, Rinkel GJ. Time trends in causes of death after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A hospital-based study. *Neurology.* 2016;86(1):59-63.

106. Roos YB, de Haan RJ, Beenen LF, Groen RJ, Albrecht KW, Vermeulen M. Complications and outcome in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage: a prospective hospital based cohort study in the Netherlands. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2000;68(3):337-41.
107. Mackey J, Khoury JC, Alwell K, Moomaw CJ, Kissela BM, Flaherty ML, et al. Stable incidence but declining case-fatality rates of subarachnoid hemorrhage in a population. *Neurology*. 2016;87(21):2192-7.
108. Truelsen T, Bonita R, Duncan J, Anderson NE, Mee E. Changes in subarachnoid hemorrhage mortality, incidence, and case fatality in New Zealand between 1981-1983 and 1991-1993. *Stroke*. 1998;29(11):2298-303.
109. Stegmayr B, Eriksson M, Asplund K. Declining mortality from subarachnoid hemorrhage: changes in incidence and case fatality from 1985 through 2000. *Stroke*. 2004;35(9):2059-63.
110. Lovelock CE, Rinkel GJ, Rothwell PM. Time trends in outcome of subarachnoid hemorrhage: Population-based study and systematic review. *Neurology*. 2010;74(19):1494-501.
111. Harmsen P, Tsipogianni A, Wilhelmsen L. Stroke incidence rates were unchanged, while fatality rates declined, during 1971-1987 in Göteborg, Sweden. *Stroke*. 1992;23(10):1410-5.
112. Nieuwkamp DJ, Setz LE, Algra A, Linn FH, de Rooij NK, Rinkel GJ. Changes in case fatality of aneurysmal subarachnoid haemorrhage over time, according to age, sex, and region: a meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2009;8(7):635-42.
113. Hijdra A, van Gijn J, Nagelkerke NJ, Vermeulen M, van Crevel H. Prediction of delayed cerebral ischemia, rebleeding, and outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 1988;19(10):1250-6.
114. Steiner T, Juvela S, Unterberg A, Jung C, Forsting M, Rinkel G. European Stroke Organization guidelines for the management of intracranial aneurysms and subarachnoid haemorrhage. *Cerebrovasc Dis*. 2013;35(2):93-112.
115. Ko SB, Choi HA, Carpenter AM, Helbok R, Schmidt JM, Badjatia N, et al. Quantitative analysis of hemorrhage volume for predicting delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2011;42(3):669-74.
116. Claassen J, Vu A, Kreiter KT, Kowalski RG, Du EY, Ostapkovich N, et al. Effect of acute physiologic derangements on outcome after subarachnoid hemorrhage. *Crit Care Med*. 2004;32(3):832-8.
117. Zacharia BE, Ducruet AF, Hickman ZL, Grobelny BT, Fernandez L, Schmidt JM, et al. Renal dysfunction as an independent predictor of outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a single-center cohort study. *Stroke*. 2009;40(7):2375-81.
118. Wartenberg KE, Mayer SA. Medical complications after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurg Clin N Am*. 2010;21(2):325-38.
119. Suarez JJ, Tarr RW, Selman WR. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *N Engl J Med*. 2006;354(4):387-96.
120. Claassen J, Perotte A, Albers D, Kleinberg S, Schmidt JM, Tu B, et al. Nonconvulsive seizures after subarachnoid hemorrhage: Multimodal detection and outcomes. *Ann Neurol*. 2013;74(1):53-64.

121. Claassen J, Peery S, Kreiter KT, Hirsch LJ, Du EY, Connolly ES, et al. Predictors and clinical impact of epilepsy after subarachnoid hemorrhage. *Neurology*. 2003;60(2):208-14.
122. Wąsik A, Antkiewicz-Michaluk L. The mechanism of neuroprotective action of natural compounds. *Pharmacological Reports*. 2017;69(5):851-60.
123. Anton N, Benoit J-P, Saulnier P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—a review. *Journal of controlled release*. 2008;128(3):185-99.
124. Pawlus AD, Sahli R, Bisson J, Rivière Cl, Delaunay J-C, Richard T, et al. Stilbenoid profiles of canes from *Vitis* and *Muscadinia* species. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013;61(3):501-11.
125. Fu Z, Yang J, Wei Y, Li J. Effects of piceatannol and pterostilbene against β -amyloid-induced apoptosis on the PI3K/Akt/Bad signaling pathway in PC12 cells. *Food & function*. 2016;7(2):1014-23.
126. Rivière C, Papastamoulis Y, Fortin P-Y, Delchier N, Andriamanarivo S, Waffo-Teguo P, et al. New stilbene dimers against amyloid fibril formation. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2010;20(11):3441-3.
127. Seyed MA, Jantan I, Bukhari SNA, Vijayaraghavan K. A comprehensive review on the chemotherapeutic potential of piceatannol for cancer treatment, with mechanistic insights. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2016;64(4):725-37.
128. Piotrowska H, Kucinska M, Murias M. Biological activity of piceatannol: leaving the shadow of resveratrol. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2012;750(1):60-82.
129. Saiko P, Szakmary A, Jaeger W, Szekeres T. Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2008;658(1-2):68-94.
130. Latruffe N, Vervandier-Fasseur D. Strategic syntheses of vine and wine resveratrol derivatives to explore their effects on cell functions and dysfunctions. *Diseases*. 2018;6(4):110.
131. Chen W, Yeo SCM, Elhennawy MGAA, Xiang X, Lin H-S. Determination of naturally occurring resveratrol analog trans-4, 4'-dihydroxystilbene in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to a pharmacokinetic study. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2015;407(19):5793-801.
132. Chen W, Yeo SCM, Elhennawy MGAA, Lin H-S. Oxyresveratrol: A bioavailable dietary polyphenol. *Journal of functional foods*. 2016;22:122-31.
133. Setoguchi Y, Oritani Y, Ito R, Inagaki H, Maruki-Uchida H, Ichiyanagi T, et al. Absorption and metabolism of piceatannol in rats. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2014;62(12):2541-8.
134. Zhang Y, Zhang L-H, Chen X, Zhang N, Li G. Piceatannol attenuates behavioral disorder and neurological deficits in aging mice via activating the Nrf2 pathway. *Food & function*. 2018;9(1):371-8.
135. Garcia JH, Wagner S, Liu K-F, Hu X-j. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats: statistical validation. *Stroke*. 1995;26(4):627-35.

136. Özdemir M, Bozkurt M, KAHİLOĞLU G, Uğur HÇ, Egemen N. Subaraknoid kanama ve komplikasyonlarının tedavisi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası. 2011;64(1):52-5.
137. Benbir Şenel G, Uygunoğlu U, İnce B. Anevrizmal olmayan perimezensefalik subaraknoid kanamaya bağlı semptomatik baziler arter vazospazmı. Türk Beyin Damar Hastalıkları Dergisi. 2021;27(1):56-9.
138. İlik MK. Deneysel subaraknoid kanama modelinde Moksonidin'in serebral vazospazm üzerine etkisi. 2009.
139. KANBAĞLI S. Anevrizma kesesinde ve parent arterde peroperatif basınç ölçümlerinin kanamış ve kanamamış hastalarda karşılaştırılması: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2013.
140. YAMAN N. ANEVİRİZMAL SUBARAKNOİD KANAMA GEÇİREN HASTALARDA TEDAVİ SÜRESİNCE GELİŞEN HEMODİNAMİK DEĞİŞİKLERİN KLİNİĞE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI: PROSPEKTİF GÖZLEMSEL ÇALIŞMA.
141. Öztürk B. Hiperkolesterolemik sıçanlarda resveratrolün intrakavernozal basınç üzerine etkileri: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2010.
142. Kılıçaslan A. Levobupivakain ve ropivakainin izole insan umbilikal arter ve veni üzerine vazoaaktif etkileri. 2008.
143. Zhou C-h, Wang C-x, Xie G-b, Wu L-y, Wei Y-x, Wang Q, et al. Fisetin alleviates early brain injury following experimental subarachnoid hemorrhage in rats possibly by suppressing TLR 4/NF-κB signaling pathway. Brain Research. 2015;1629:250-9.
144. Zhu Q, Enkhjargal B, Huang L, Zhang T, Sun C, Xie Z, et al. Aggf1 attenuates neuroinflammation and BBB disruption via PI3K/Akt/NF-κB pathway after subarachnoid hemorrhage in rats. Journal of neuroinflammation. 2018;15(1):1-13.
145. Chang C-Z, Wu S-C, Kwan A-L. A purine antimetabolite attenuates toll-like receptor-2,-4, and subarachnoid hemorrhage-induced brain apoptosis. journal of surgical research. 2015;199(2):676-87.
146. Prunell GF, Mathiesen T, Svendgaard N-A. A new experimental model in rats for study of the pathophysiology of subarachnoid hemorrhage. Neuroreport. 2002;13(18):2553-6.
147. Jeong C, Sun H, Wang Q, Ma J. Glycyrrhizin suppresses the expressions of HMGB1 and ameliorates inflammatory effect after acute subarachnoid hemorrhage in rat model. Journal of Clinical Neuroscience. 2018;47:278-84.
148. Hao H, Bai Y, Liu Y, Liang J, Guo S. Protective mechanism of FoxO1 against early brain injury after subarachnoid hemorrhage by regulating autophagy. Brain and Behavior. 2021;11(11):e2376.
149. Dixon CE, Lyeth BG, Povlishock JT, Findling RL, Hamm RJ, Marmarou A, et al. A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. Journal of neurosurgery. 1987;67(1):110-9.
150. Hayes R, Jenkins L, Lyeth BG, Balster R, Robinson S, Clifton G, et al. Pretreatment with phencyclidine, an N-methyl-D-aspartate antagonist, attenuates long-term behavioral deficits in the rat produced by traumatic brain injury. Journal of neurotrauma. 1988;5(4):259-74.

151. Lyeth BG, Dixon C, Jenkins L, Hamm R, Alberico A, Young H, et al. Effects of scopolamine treatment on long-term behavioral deficits following concussive brain injury to the rat. *Brain research*. 1988;452(1-2):39-48.
152. Dunham N, Miya T, Edwards L. The pharmacological activity of a series of basic esters of mono-and dialkylmalonic acids. *Journal of the American Pharmaceutical Association*. 1957;46(1):64-6.
153. Kuribara H, Higuchi Y, Tadokoro S. Effects of central depressants on rota-rod and traction performances in mice. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 1977;27(1):117-26.
154. Hamm RJ, Pike BR, O'DELL DM, Lyeth BG, Jenkins LW. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*. 1994;11(2):187-96.
155. Savarraj J, Parsha K, Hergenroeder G, Ahn S, Chang TR, Kim DH, et al. Early brain injury associated with systemic inflammation after subarachnoid hemorrhage. *Neurocritical care*. 2018;28(2):203-11.
156. Liu D, Hu W, Chen G. Apelin-12 exerts neuroprotective effect against ischemia-reperfusion injury by inhibiting JNK and P38MAPK signaling pathway in mouse. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(12):3888-95.
157. Liu G, Wang T, Wang T, Song J, Zhou Z. Effects of apoptosis-related proteins caspase-3, Bax and Bcl-2 on cerebral ischemia rats. *Biomedical reports*. 2013;1(6):861-7.
158. Shen X, Yuan G, Li B, Cao C, Cao D, Wu J, et al. Apelin-13 attenuates early brain injury through inhibiting inflammation and apoptosis in rats after experimental subarachnoid hemorrhage. *Molecular Biology Reports*. 2022;49(3):2107-18.
159. Cossu G, Messerer M, Oddo M, Daniel RT. To look beyond vasospasm in aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Biomed Res Int*. 2014;2014:628597.
160. Höllig A, Weinandy A, Nolte K, Clusmann H, Rossaint R, Coburn M. Experimental subarachnoid hemorrhage in rats: comparison of two endovascular perforation techniques with respect to success rate, confounding pathologies and early hippocampal tissue lesion pattern. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123398.
161. Sugawara T, Ayer R, Jadhav V, Chen W, Tsubokawa T, Zhang JH. Simvastatin attenuation of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rats via increased phosphorylation of Akt and endothelial nitric oxide synthase. *J Neurosci Res*. 2008;86(16):3635-43.
162. Pluta RM, Hansen-Schwartz J, Dreier J, Vajkoczy P, Macdonald RL, Nishizawa S, et al. Cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: time for a new world of thought. *Neurol Res*. 2009;31(2):151-8.
163. Edebali N, Tekin İÖ, Açıkgöz B, Açıkgöz Ş, Barut F, Sevinç N, et al. Apoptosis and necrosis in the circumventricular organs after experimental subarachnoid hemorrhage as detected with annexin V and caspase 3 immunostaining. *Neurological Research*. 2014;36(12):1114-20.
164. He X, Sun J, Huang X. Expression of caspase-3, Bax and Bcl-2 in hippocampus of rats with diabetes and subarachnoid hemorrhage. *Experimental and therapeutic medicine*. 2018;15(1):873-7.

165. Jafari Anarkooli I, Sankian M, Ahmadpour S, Varasteh A-R, Haghiri H. Evaluation of Bcl-2 family gene expression and Caspase-3 activity in hippocampus STZ-induced diabetic rats. *Experimental diabetes research*. 2008;2008.
166. Park S, Yamaguchi M, Zhou C, Calvert J, Tang J, Zhang JH. Neurovascular protection reduces early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2004;35(10):2412-7.
167. Ding Y, Zhang L, Zhou W, Lu H, Gao X, Li J, et al. Role of cyclin-dependent kinase 5 in early brain injury following experimental subarachnoid hemorrhage. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2022;23(2):1-10.
168. Gu Q, Zhai L, Feng X, Chen J, Miao Z, Ren L, et al. Apelin-36, a potent peptide, protects against ischemic brain injury by activating the PI3K/Akt pathway. *Neurochemistry international*. 2013;63(6):535-40.
169. Guo D, Xie J, Zhao J, Huang T, Guo X, Song J. Resveratrol protects early brain injury after subarachnoid hemorrhage by activating autophagy and inhibiting apoptosis mediated by the Akt/mTOR pathway. *Neuroreport*. 2018;29(5):368.
170. Zhou X-M, Zhou M-L, Zhang X-S, Zhuang Z, Li T, Shi J-X, et al. Resveratrol prevents neuronal apoptosis in an early brain injury model. *Journal of Surgical Research*. 2014;189(1):159-65.
171. Li Z, Han X. Resveratrol alleviates early brain injury following subarachnoid hemorrhage: possible involvement of the AMPK/SIRT1/autophagy signaling pathway. *Biological chemistry*. 2018;399(11):1339-50.
172. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*. 2003;22(56):9030-40.
173. Culmsee C, Mattson MP. p53 in neuronal apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;331(3):761-77.
174. Cahill J, Calvert JW, Marcantonio S, Zhang JH. p53 may play an orchestrating role in apoptotic cell death after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 2007;60(3):531-45.
175. Cai L, Ge B, Xu S, Chen X, Yang H. Up-regulation of circARF3 reduces blood-brain barrier damage in rat subarachnoid hemorrhage model via miR-31-5p/MyD88/NF- κ B axis. *Aging (Albany NY)*. 2021;13(17):21345.
176. Gao C, Liu X, Liu W, Shi H, Zhao Z, Chen H, et al. Anti-apoptotic and neuroprotective effects of Tetramethylpyrazine following subarachnoid hemorrhage in rats. *Autonomic Neuroscience*. 2008;141(1-2):22-30.
177. Inagawa T. Risk factors for cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a review of the literature. *World neurosurgery*. 2016;85:56-76.
178. Simon M, Grote A. Interleukin 6 and aneurysmal subarachnoid hemorrhage. A narrative review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(8):4133.
179. Maddahi A, Povlsen G, Edvinsson L. Regulation of enhanced cerebrovascular expression of proinflammatory mediators in experimental subarachnoid hemorrhage via the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway. *Journal of neuroinflammation*. 2012;9(1):1-16.
180. Zaremba J, Losy J. Cytokines in clinical and experimental ischemic stroke. *Neurologia i neurochirurgia polska*. 2004;38(1 Suppl 1):S57-62.

181. Harris JJ, Jolivet R, Attwell D. Synaptic energy use and supply. *Neuron*. 2012;75(5):762-77.
182. Mishra A, Reynolds JP, Chen Y, Gourine AV, Rusakov DA, Attwell D. Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles. *Nature neuroscience*. 2016;19(12):1619-27.
183. Chung C-L, Tsai H-P, Huang Y-H, Wu S-C, Chai C-Y, Kwan A-L. Attenuation in Proinflammatory Factors and Reduction in Neuronal Cell Apoptosis and Cerebral Vasospasm by Minocycline during Early Phase after Subarachnoid Hemorrhage in the Rat. *BioMed Research International*. 2021;2021.
184. Jeon H, Ai J, Sabri M, Tariq A, Macdonald R. Learning deficits after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Neuroscience*. 2010;169(4):1805-14.
185. Wu C-H, Tsai H-P, Su Y-F, Tsai C-Y, Lu Y-Y, Lin C-L. 2-PMAP Ameliorates Cerebral Vasospasm and Brain Injury after Subarachnoid Hemorrhage by Regulating Neuro-Inflammation in Rats. *Cells*. 2022;11(2):242.
186. Vellimana AK, Diwan D, Clarke J, Gidday JM, Zipfel GJ. SIRT1 Activation: A Potential Strategy for Harnessing Endogenous Protection Against Delayed Cerebral Ischemia After Subarachnoid Hemorrhage. *Neurosurgery*. 2018;65(CN_suppl_1):1-5.



