ÖZGÜN ARAŞTIRMA ORIGINAL RESEARCH

Med J SDU / SDÜ Tıp Fak Derg ▶ 2021:28(2):275-282 doi: 10.17343/sdutfd.849527

SUBARAKNOİD KANAMANIN NEDEN OLDUĞU SEREBELLAR HASARDA UYGULANAN FARKLI TEDAVİ MODALİTELERİNİN OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

THE EFFECTS OF DIFFERENT TREATMENT MODALITIES ON OXIDATIVE STRESS MARKERS FOR CEREBELLAR INJURY SECONDARY TO SUBARACHNOID HEMORRHAGE

Ali Serdar OĞUZOĞLU[1], Nilgün ŞENOL[1], İlter İLHAN[2], Halil AŞCI[3], Mine KAYNAK[3], Selçuk ÇÖMLEKCİ[4]

[1] Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, ISPARTA
[2] Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, ISPARTA
[3] Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, ISPARTA
[4] Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Elektrik-Elektronik Mühendisliği Bölümü, ISPARTA

Cite this article as: Oğuzoğlu AS, Şenol N, İlhan İ, Aşcı H, Kaynak M, Çömlekci S. The Effects of Different Treatment Modalities on Oxidative Stress Markers for Cerebellar Injury Secondary to Subarachnoid Hemorrhage Med J SDU 2021; 28(2): 275-282.

Öz

Amaç
Bu çalışmada, Subaraknoid Kanama (SAK) sonrasında serebellar dokuda meydana gelen oksidatif stres üzerinde, uygulanabilecek farklı tedavi modalitelerinin etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç-ve Yöntem
Kuyruk arterlerinden alınan 0,3 cc otolog kanın sisterna magna bölgesine enjekte edilmesi ile SAK oluşturulan ratlara farklı dozlarda (30-60 mg/kg Pregabalin (PREG), Nimodipin (NİMO), Salubrinal (SLB) ve Darbeli Elektromanyetik Alan (DEMA) uygulandı. Sakrifikasyon sonrasında alınan serebellum dokularında total oksidan kapasite (TOS), total antioksidan kapasite (TAS) ve oksidatif stres indeksi (OSİ) gibi oksidatif stres parametreleri incelendi.

Bulgular
TOS ve OSİ değerlerinde $PREG_{30}$ (iki değer için de p=0.003), $PREG_{60}$ (p=0.026 ve p=0.005, sırasıyla), SLB ve DEMA uygulanan gruplarda anlamlı olarak azalma görüldü. TAS seviyelerinde ise PREG ve DEMA uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmazken, SLB ve NİMO uygulanan gruplarda anlamlı değişiklik olduğu görüldü. NİMO uygulanan grupta OSİ değerinde de (p=0,046) SAK grubuna göre anlamlı bir azalma saptandı.

Sonuç
PREG ve SLB SAK'ta farklı iki mekanizma üzerinden koruyucu olabilmektedir. DEMA tedavisinin de etkinliğinden söz edilebilir ancak etkisinin değerlendirilmesi için farklı uygulama zamanları ve süreleri ile yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Subaraknoid kanama, oksidatif stres, pregabalin, DEMA, sıçan, serebellum

Abstract

Objective
In this study, we aimed to evaluate the effects of different treatment modalities on oxidative stress occured in cerebellar tissue after subarachnoid hemorrhage (SAH).

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: drnilgunsenol@yahoo.com
Müracaat tarihi/Application Date: 30.12.2020 • Kabul tarihi/Accepted Date: 14.02.2021
ORCID IDs of the authors: A.S.O. 0000-0002-1735-4062; N.S. 0000-0002-1714-3150; İ.İ. 0000-0003-3739-9580; H.A. 0000-0002-1545-035X; M.K. 0000-0003-3956-7672; S.Ç. 0000-0003-1389-6435

Materials and Methods
Different doses of Pregabaline (30-60 mg/kg Pregabalin (PREG), and Nimodipine (NIMO), Salubrinal (SLB), Pulsed ElectromagneticFfield (PEMF) was used in the rats, that SAH was comprised via 0,3cc otolog blood injection into the cisterna magna. After sacrification oxidative stress parameters like Total Antioxidant Status (TAS), Total Oxidant Status (TOS), and Oxidative Stress Index (OSI) were evaluated in the cerellum tissues.

Results
Significant decrease was seen in the TOS and OSI values of the groups that $PREG_{30}$ (p=0.003 for both), $PREG_{60}$ (p=0.026 and p=0.005, respectively), SLB and PEMF were used. Although there was no statistically difference in the TAS values of the PREG and DEMA groups, significant difference was seen in the SLB and NIMO groups. In the NIMO group there was a significant decrease (p=0,046) in the OSI values according to the SAH group.

Conclusion
PREG and SLB can be protective in SAH via two different mechanisms, PEMF treatment can be effective but new studies with different application periods and doses are needed to evaluate the effects.

Keywords: Subarachnoid hemorrhage, oxidative stress, pregabaline, PEMF, rat, cerebellum

Giriş

Subaraknoid kanama, travma, anevrizma, vasküler malformasyonlar, kanama bozuklukları, beyin tümörleri, antikoagülan tedavi komplikasyonu sonucunda görülebilen ve genellikle arteryel nadiren venöz nedenlere bağlı gelişen serebrovasküler bir olaydır. Görülme sıklığı yılda 10-16/100.000'olarak bildirilmiştir (1). Arter rüptürünü takiben gelişen ve çeşitli derecelerde damar lümeninin daralmasına neden olan vazospazm, mortalite ve morbiditeye neden olan önemli fizyopatolojik bir olaydır (2). Bu süreçte, hemoglobinin ekstravazasyonu, endotelyal zedelenmeye bağlı olarak nitrik oksit (NO) azalması, endotelin-1 düzeyinde artış, oksidatif stresin düz kas hücreleri üzerine doğrudan etkisi, serbest radikal üretimi, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu, potasyum ve kalsiyum kanallarının modifikasyonu etkili olabilmekte, ayrıca endoplazmik retikulum (ER) stresinin de olduğu bir çok hücre içi mekanizma da rol oynamaktadır (3-6,8,9). Ancak, bu hasar mekanizmalarında rol oynayan en önemli faktör o bölgede oluşan serbest oksijen radikalleri (SOR) aracılığı ile oluşan oksidatif stres ve bunun indüklediği inflamasyondur (10-12).

SAK'ta meydana gelen hasarları önlemede antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik özellikleri olduğu bilinen bir çok etken maddenin yanısıra dokuda vazodilatasyonu sağlayan tedavi modaliteleri de araştırılmış ve araştırılmaktadır (1,13,14).

GABA reseptör analoğu olarak bilinen ve antiinflamatuvar, antioksidan özellikleri ispatlanmış olan Pregabalin (PREG), epileptik nöbetlerin ve nöropatik ağrının önlenmesinde klinikte rutin olarak kullanılmaktadır (15,16).

Salubrinal (SLB), ökaryotik başlangıç faktörü 2 alfa (Eukaryotic translation initiation factor 2A-eIF2a) defosforilasyonunun selektif bir inhibitörüdür. eIF2a'nın translasyonunu inhibe eden eIF2a fosforilasyonu, protein sentezini azaltarak ER stresi sürecinde sitoprotektif etki sağlamaktadır (17). Yapılan çalışmalarda SLB'nin; ER aracılı apopitozu, nöro-inflamasyonu ve ROS üretimini önleyerek oksidatif stresi azalttığı, mitokondriyal apoptotik yolu inhibe ederek mitokondriyal fonksiyonun düzenlenmesine katkı sağladığı ve böylece nöronal mitokondri hasarını azalttığı, nöronal hücre zarları ve hücre içi organellerde hasara neden olan NF-kß, iNOS, TNF-α, IL-1 gibi inflamatuvar sitokinleri ve mikroglia aktivasyonunu azalttığı, kan-beyin bariyeri disfonksiyonuna olumlu ve protektif bir etki oluşturduğu bildirilmiştir (8-10, 18-26).

Darbeli Elektromanyetik Alan (DEMA), uygulandığı bölgedeki vasküler yapıların endotel tabakasından endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) aracılı NO ve aynı hücre içi yol üzerinden vasküler endotel büyüme faktörü gibi doku büyüme faktörlerinin sentezini arttırarak vazodilatasyona katkıda bulunmaktadır (27).

Bu çalışmada, SAK sonrası serebral kortekste meydana gelen hasarı azaltmak amacıyla her birini ayrı tedavi modalitesi olarak uyguladığımız (pregabalin, salubrinal ve DEMA) üç farklı çalışmadan elde edilen serebellum dokularında oksidatif stres parametreleri üzerinden tedavilerin etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Üç çalışma; Ulusal Sağlık Enstitüleri tarafından hayvan araştırmaları kılavuzuna göre yapılmış ve Sü-

leyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından izin alınarak Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. (Etik kurul no: 08.07.20-04/01)

Deney Hayvanları

Bu çalışmalarda; toplam 94 adet, 6-8 aylık, ağırlıkları 250-300 gram arasında değişen Wistar Albino ratlar kullanıldı; deney süresi boyunca oda kontrollü sıcaklık (21 °C -22 °C) ve nem (% 60 ±% 5) koşullarında 12:12 saatlik bir aydınlık / karanlık döngüsü muhafaza edildi. Günlük içme suyu ve % 21 ham protein içeren pelet yemlerle beslendi (Korkuteli Yem, Antalya, TÜRKİYE).

PREG çalışmasında; 38 adet deney hayvanı; SHAM (n=8), SAK(n=10), SAK+ $PREG_{30}$ (30 mg/kg ip) (n=10) ve SAK+$PREG_{60}$ (60 mg/kg, ip) (n=10) gruplarına ayrıldı. Deney planı Tablo 1'de özetlenmiştir.

SLB çalışmasında; 32 adet deney hayvanı, her grupta 8 adet olmak üzere; kontrol, SAK, SAK+SLB ve SAK+NİMO gruplarına ayrıldı. Deney planı Tablo 2'de özetlenmiştir.

DEMA çalışmasında ise; 24 adet deney hayvanı, her grupta 6 adet olmak üzere kontrol, SAK, SAK+DEMA, DEMA+SAK gruplarına ayrıldı. DEMA uygulamasında deney hayvanları 27.12 mHz elektromanyetik alan içeren ortama maruz bırakıldı. Bu frekans, daha önce beyinde basiller arter üzerinde DEMA'nın NO salgılatıcı etkisine bakıldığı çalışma örnek alınarak planlandı (30). Bragin ve ark.larının yaptığı çalışmada, NO seviyelerinin 30 dk'da maksimum seviyelere ulaştığı sonrasında DEMA uygulamasının sonlandırılmasını takiben 1,5-3 saatte bazal düzeye indiği saptanmıştır. DEMA'dan etkilenmemesi için Eurotype-2 kafeslerin kullanıldığı tüm uygulamalarda metal aksan kullanılmamasına gayret gösterildi. Grup 3'te 30 dk profilaktik DEMA uygulaması sonrasında SAK geliştirildi ve sonrasında DEMA'ya devam edildi ve deney sonuna kadar bu bölgede tutuldu. DEMA'nın terapötik amaçlı kullanıldığı grup 4'te ise SAK uygulamasından 30 dk sonra hayvanlar DEMA bölgesine konuldu ve deney sonuna kadar bu bölgede tutuldu (Tablo 3).

Üç çalışmada da deney hayvanlarında, hem SAK modelini oluşturmak hem de sakrifikasyon işlemi (PREG için 7 gün, SLB ve DEMA için 4. gün) için 80-100 mg/kg Ketamin ve 8-10 mg/kg Xylazin anestezisi uygulandı. SAK modelini oluşturmak için kuyruk arterlerinden alınan 0,3 cc otolog kan sisterna magna bölgesine

Tablo 1 PREG çalışmasının deney planı

GRUPLAR	0.GÜN	1-6 GÜN	7.GÜN
KONROL	SAK+ $İP_{SF}$	$İP_{SF}$	$İP_{SF}$ + Sakrifikasyon
SAK	SAK+ $İP_{SF}$	$İP_{SF}$	$İP_{SF}$ + Sakrifikasyon
SAK+$PREG_{30}$	SAK+$İP_{PREG30}$	$İP_{PREG30}$	$İP_{PREG30}$ + Sakrifikasyon
SAK+$PREG_{60}$	SAK+$İP_{PREG60}$	$İP_{PREG60}$	$İP_{PREG60}$ + Sakrifikasyon

-SAK: Subaraknoid kanama, - PREG: Pregabalin, İP SF: intraperitoneal SF

Tablo 2 Salubrinal çalışmasının deney planı

Gruplar	1.Gün	2-3.Gün	4.gün
SHAM	$İP_{Sağ}$ SF + $İP_{Sol}$ SF	$İP_{S}$	KESİM
SAK	SAK + $İP_{Sağ}$ SF + $İP_{Sol}$ SF	$İP_{S}$	
SAK+SLB	SAK+30 dk sonra $İP_{SLB}$ + $İP_{Sol}$	$İP_{S}$	
SAK+ NİMO	SAK+30 dk sonra $İP_{NİMO}$ + $İP_{Sol}$	$İP_{Nimo}$	

-SLB: Salubrinal 1mg/kg intraperitoneal (İP), - NİMO: Nimodipin 0.gün 0.1 mg/kg x 3 /d İP. - İPSağ SF: sağ inguinalden intraperitoneal SF, IPs: İntraperitoneal serum fizyolojik

Tablo 3 Darbeli Elektromanyetik Alan çalışmasının deney planı

GRUPLAR	1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN	4.GÜN
SHAM	SF + 30 dk sonra ve 3 saat sonra $DEMA_0$	Günde 3 Saat Arayla 2 Kez $DEMA_0$	Günde 3 Saat Arayla 2 Kez $DEMA_0$	Günde 3 Saat Arayla 2 Kez $DEMA_0$ + 30 dk sonra Sakrifikasyon
SAK	SAK + 30 dk sonra ve 3 saat sonra $DEMA_0$	Günde 3 Saat Arayla 2 Kez $DEMA_0$	Günde 3 Saat Arayla 2 Kez $DEMA_0$	Günde 3 Saat Arayla 2 Kez $DEMA_0$ + 30 dk sonra Sakrifikasyon
SAK + DEMA	SAK + 30 dk sonra DEMA + 3 saat sonra DEMA	Günde 3 Saat Arayla 2 Kez DEMA	Günde 3 Saat Arayla 2 Kez DEMA	Günde 3 Saat Arayla 2 Kez DEMA + 30 dk sonra Sakrifikasyon
DEMA + SAK	DEMA + 30 dk sonra SAK + 3 saat sonra DEMA	Günde 3 Saat Arayla 2 Kez DEMA	Günde 3 Saat Arayla 2 Kez DEMA	Günde 3 Saat Arayla 2 Kez DEMA + 30 dk sonra Sakrifikasyon

- SAK: Subaraknoid Kanama; DEMA: Darbeli Elektromanyetik Alan
-SAK0 : Aynı cerrahi prosedür uygulandı ama SAK geliştirilmedi.
-SHAM ve SAK grupları da aynı strese maruz kalsın diye DEMA yaymayan (DEMA0) kafeslere konuldu.
-DEMA uygulamaları: Kafes etrafı bobinler ile sarıldı, hayvanlar içerisinde 24 saat maruz kalacak şekilde serbest bırakıldı.
-SAK uygulaması: Cisterna Magnaya 0.30 ml hayvandan alınan kan uygulandı.

enjekte edildi. Ardından bekletilen sürede ratlar hipoterminin önlenmesi için termal ışık altında bekletildi. Sakrifikasyon sonrasında alınan serebellum dokuları total oksidan kapasite (TOS), total antioksidan kapasite (TAS) ve oksidatif stres indeksi (OSİ) gibi oksidatif stres parametrelerine bakılmak üzere aliminyum folyo içerisine konulup -20° buzdolabına kaldırıldı.

Biyokimyasal Analizler
Serebellar dokuları % 10 homojenat üretmek için soğuk fosfat tamponunda homojenize edildi (pH 7.4). Dokular motorlu bir doku homojenizatör (IKA Ultra-Turrax T25 Basic; Labortechnic, Staufen, Almanya) ve sonikatör (UWe2070 Bandelin Electronic, Germany) aracılığıyla fosfatlı tampon (pH 7.4) kullanılarak homojen hale getirildi. Çekirdekler ve hücre artıkları 4 C°'de 10 dakika boyunca 10000g'de santrifüj ile çökeltildi. Homojenattaki protein düzeyleri Bradford ve ark. metodu kullanılarak belirlendi (31). Bu doku homojenize edilmiş kalp dokularından TAS ve TOS düzeyleri bakıldı (32,33).

Numunelerin TAS düzeyleri 660 nm'de absorbansta spektrofotometrik olarak ölçüldü. Sonuçlar mmol Trolox Eq / mg protein olarak ifade edildi. Örneklerdeki renk yoğunluğu TOS molekülü miktarı ile ilgilidir.

Sonuçlar g litre (mmol H2O2 Equiv / L, mmol H2O2 Equiv / mg protein) başına eşdeğer mM hidrojen peroksit cinsinden ifade edilir. Oksidatif stres düzeyi parametresi göstergesi olan OSI'nin belirlenmesi ve TOS'un TAS'a oranı aşağıdaki kullanılarak hesaplandı (34):

OSI (arbitrary unit) ¼ [(TOS, mmol / L) / (TAS, mmol Trolox)

TAS ve TOS otomatik kimya analizörü ile Beckman Coulter AU5800 (Japonya) ile ölçüldü.

İstatistiksel Analiz
Verilerin analizinde SPSS 15.0 yazılımı (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) kullanılmıştır. Değişkenler yüzdeler, ortalama ± standart sapmalar, medyanlar veya minimum-maksimumlar olarak sunuldu. Grupların biyokimyasal parametrelerini karşılaştırmak için ANOVA testleri ve posthoc LSD testi kullanıldı. P <0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Biyokimyasal Bulgular
PREG'in iki farklı dozunun kullanıldığı bu çalışmanın serebellum dokularının oksidan ve antioksidan parametrelerinin incelemesinde öncelikle yapılan One way ANOVA analizinde gruplar arası TOS ve OSI seviyeleri için p değerleri sırasıyla p=0.016 ve p=0.013 saptanması gruplararası anlamlılık olduğunu gösterirken TAS seviyesi için p değerinin p=0.19 saptanması gruplararası anlamlılığın olmadığını gösterdi. Bunun

üzerine yapılan post –hoc LSD testine göre TOS ve OSI değerleri SAK grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken (p=0,02 ve p=0.03, sırasıyla), aynı değerler $PREG_{30}$ (iki değer için de p=0.003) ve $PREG_{60}$ (p=0.026 ve p=0.005, sırasıyla) uygulanan gruplarda SAK grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Bu azalma $PREG_{30}$ grubunda daha belirgin olmakla birlikte $PREG_{60}$ grubu ile arasında anlamlı bir farklılık göstermedi. TAS seviyeleri SAK grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek saptanırken PREG uygulanan gruplarda SAK grubuna göre bu değerlerde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı (Tablo 4).

SLB'nin rutinde kullanılan kalsiyum kanal blokeri nimodipin (NİMO) ile karşılaştırıldığı ikinci çalışmada serebellum dokularının oksidan ve antioksidan parametrelerinin incelemesinde yapılan One way ANOVA analizinde gruplar arası TOS ve OSI seviyeleri için p değerleri sırasıyla p=0.051 ve p=0.013 saptanması TAS seviyesi için ise p değerinin p<0.001 saptanması her üç değerin gruplararası anlamlılığının olduğunu gösterdi. Bunun üzerine yapılan post –hoc LSD testine göre TOS ve OSI değerleri SAK grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken (p=0,0,15 ve p=0.011, sırasıyla), SLB tedavisi ile iki değer de SAK grubuna göre anlamlı olarak azalırken (p=0,017 ve p=0.002, sırasıyla), NİMO uygulanan grupta sadece OSİ değerinde (p=0,046) SAK grubuna göre anlamlı bir azalma saptandı (Tablo 5).

Tablo 4 Pregabalin çalışmasındaki serebellar dokuların oksidatif stres marker sonuçları

	TOS (mmol H_2O_2 Eq./L)		TAS (mmol TroloxEq./L)		OSI (TOS/TAS)	
Groups	**Ort ± SD**	**p değeri**	**Ort ± SD**	**p değeri**	**Ort ± SD**	**p değeri**
KONTROL	7,11 ± 4,95		0.43 ± 0,11		2,53 ± 0,86	
SAK	11,86 ± 2,62[a]	a: 0.020	0,29 ± 0,03[a]	a: 0,045	3,83 ± 0,77[a]	a: 0.030
SAK+$PREG_{30}$	5,76 ± 1,76[b]	b: 0.003	0.40 ± 0,09		2,07 ± 0,97[b]	b: 0.003
SAK+$PREG_{60}$	7.35±2.25[b]	b: 0.026	0.39± 0,17		2,06 ± 1,18[b]	b: 0.005

SAK – Subaraknoid Kanama; PREG-Pregabalin; TOS – Total Oksidan Kapasite; TAS – Total Antioksidan Kapasite; OSI – Oksidatif Stres Indeksi. Gruplararası anlamlılığın değerlendirilmesinde one-way ANOVA ve post hoc LSD testleri kullanıldı.
a: p<0.05 vs KONTROL, b: p<0.05 vs SAK

Tablo 5 Salubrinal çalışmasının serebellar dokudaki oksidatif stres marker sonuçları

	TOS (mmol H_2O_2 Eq./L)		TAS (mmol TroloxEq./L)		OSI (TOS/TAS)	
Groups	**Mean ± SD**	**p value**	**Mean ± SD**	**p value**	**Mean ± SD**	**p value**
KONTROL	7,12 ± 3,17		1,08 ± 0,14		0,70 ± 0,20	
SAK	10,97 ± 3,02[a]	a: 0.015	0,84 ± 0,10[a]	a: 0,001	1,00 ± 0,21 [a]	a: 0.011
SAK+SLB	7,35 ± 1,23[b]	b: 0.017	1,18 ± 0,04[b]	b:0,000	0,63 ± 0,14[b]	b: 0.002
SAK+NİMO	8.74±0.62		1.12± 0,09[b]	b:0,000	0,77 ± 0,09[b]	b: 0.046

SAK – Subaraknoid Kanama; SLB-Salubrinal; NİMO:Nimodipin; TOS – Total Oksidan Kapasite; TAS – Total Antioksidan Kapasite; OSI – Oksidatif Stres Indeksi. Gruplararası anlamlılığın değerlendirilmesinde one-way ANOVA ve post hoc LSD testleri kullanıldı.
a: p<0.05 vs KONTROL, b: p<0.05 vs SAK

Tablo 6 DEMA çalışmasının serebellar dokudaki oksidatif stres markır sonuçları

	TOS (mmol H_2O_2 Eq./L)		TAS (mmol TroloxEq./L)		OSI (TOS/TAS)	
Groups	**Mean ± SD**	**p value**	**Mean ± SD**	**p value**	**Mean ± SD**	**p value**
KONTROL	9,50 ± 4,69		0,50 ± 0,32		2,31 ± 0,68	
SAK	20,74 ± 4,32 [a]	a: 0.000	0,58 ± 0,08		3,43 ± 0,49[a]	a: 0.011
SAK+DEMA	21,43 ± 4,91 [a]	a: 0.000	0,75 ± 0,10		2,98 ± 0,25[a]	a: 0.036
DEMA+SAK	18,49 ± 3,04 [a]	a: 0.002	0.68 ± 0,17		2,81 ± 0,33[b]	b: 0.035

SAK – Subaraknoid Kanama; DEMA-Darbeli Elektromanyetik Alan; TOS – Total Oksidan Kapasite; TAS – Total Antioksidan Kapasite; OSI – Oksidatif Stres Indeksi. Gruplararası anlamlılığın değerlendirilmesinde one-way ANOVA ve post hoc LSD testleri kullanıldı. a: p<0.05 vs KONTROL, b: p<0.05 vs SAK

İnvitro bir yöntem olarak uygulanan ve dokudan NO salınımı esasına dayanan üçüncü DEMA çalışmasında serebellum dokularının oksidan ve antioksidan parametrelerinin incelemesinde yapılan One way ANOVA analizinde gruplar arası TOS ve OSI seviyeleri için p değerleri sırasıyla p<0.001 ve p=0.009 saptanması bu iki parametre için gruplararası anlamlılığı gösterirken TAS seviyeleri için saptanan değer (p=0.204) ise bu parametrenin gruplararası anlamlı değişiklik yapmadığını göstermiştir.

TOS seviyeleri SAK, tedavi ve profilaktik amaçlı DEMA uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu (p<0.001, p<0.001 ve p=0.002; sırasıyla). OSİ değerleri açısından SAK ve tedavi amaçlı DEMA verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak artış gösterirken (p=0,011 ve p=0.036, sırasıyla), profilaktik DEMA uygulanan grupta OSİ değerleri SAK grubuna göre anlamlı düşüş gösterdi (p=0.036) (Tablo 6).

Tartışma

Subaraknoid kanama oldukça morbid ve mortal seyredebilen serevbrovasküler bir durumdur (35,36). Kanamanın meydana geldiği ilk saaatlerde kanama bölgesinin distalinin kan dolaşımının bozulması nedeniyle hipoksik şartların gelişmesi dokularda hasarın gelişmesine neden olmaktadır (3,4,37,38). Bunun yanısıra 3-4. gün tabloya eklenen vazospazm, distaldeki nöronal yapıların etkilenmesine ve hasarın artmasına neden olmaktadır. (37-41). Vazospazmın oluş mekanizmasında hücresel seviyede o bölgede artan hemoglobin, gelen sitokinlerden salınan endotelin-1 gibi vazokonstriktör ajanlar, endotel hasarına sekonder sentezlenemeyen NO gibi bir çok neden suçlanmış ve bunlara yönelik tedavi modaliteleri denenmiştir (42-44). Rutinde kullanılan medikal tedaviler kısıtlı olup öncelikli kullanımı olan bir kalsiyum kanal blokeri olan NİMO'dur (45-47).

Meydana gelen hasar mekanizmasında oksidatif stres büyük rol oynamaktadır. Bilindiği üzere hipoksi aracılığı ile de gelişen oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz gibi diğer hasar mekanizmalarını da tetikleyebilmektedir (9,18,19,48). Yapılan çalışmalarda damar genişletici ajanların yanısıra, hasar mekanizmalarına yönelik etken maddeler veya yöntemler de denenmektedir.

İlk çalışmamızda kullandığımız antiinflamatuvar ve antioksidan özelliği bilinen bir ajan olan PREG'in SAK sonrası serebellumda gelişen hasarda da koruyucu olduğu bu çalışma ile görüldü. PREG'in antioksidan enzimleri artırmadan oksidatif stres parametrelerini azaltması, ilacın inflamatuvar yolakları baskılaması nedeniyle gelişen antiinflamatuvar aktiviteye sekonder oksidatif stresin azalabileceği yönünde yorumlanabilir (49-52).

SLB'in endoplazmik retikulum stres inhibitörü olarak kullanıldığı çalışmalarda, eIF2alfa defosforilasyon inhibisyonu yaparak endoplazmik stresin mitokondriyal iç yolağa iletilmesini engelleyip hasarın boyutlarını daralttığına dair çalışmalar bulunmaktadır (4,8,10). SLB ve NİMO'nun kullanıldığı diğer bir çalışmamızda, SAK'ta artan oksidan ve azalan antioksidan seviyelerine bakıldığında hem NİMO'da hemde SLB'de tedavilerinin serebellum dokularında da kortekste olduğu gibi bu tabloyu tersine çevidiği gözlenmiştir. Ancak SLB kullanımının NİMO kullanımına göre dokuları

daha iyi koruduğu ve oksidatif stresi daha fazla baskıladığı görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda, rutin kullanılan NİMO'nun yanına doku koruyucu özelliği daha belirgin olan SLB'nin eklenmesinin yararlı olabileceği çıkarımına varıldı (9,10,19,21,53).

Bir diğer araştırmamız olan DEMA çalışmasında, SAK sonrası gelişen doku hasarlarını azaltabilmek için, in-vitro olarak beyin dokusuna uygulanan DEMA ile beyin damarlarının endotelinden NO salınımını artırmak amaçlanmıştır. Buna dair literatürde çeşitli yayınlar bulunmaktadır (54,55).

Bu çalışma kapsamında araştırmayı amaçladığımız serebellum dokularındaki oksidatif stres parametrelerine bakıldığında tedavi amaçlı SAK sonrası DEMA uygulanmasının oksidatif stresi azaltmadığı ve bunun nedeninin DEMA'nın olması gereken primer hemostaz mekanizmalarına salgılattığı NO ile engel olabilmesi olarak düşünüldü. Özellikle profilaktik uygulama sonuçları da gösterdi ki SAK gelişmeden önce kan dolaşımında NO'in hazır bulunması dokudaki protektif etkinin artışına neden oldu. Bu sonuçlar ışığında DEMA'nın SAK geçirmiş hastaların primer hemostaz sonrası tedavi protokolünde yer alabileceği veya tekrar kanama öncesi koruyucu amaçla yoğun bakım şartlarında kullanılabileceği izlenimini doğurdu.
Üç farklı çalışmadaki serebellar dokuların incelendiği bu çalışma sonucunda farklı iki mekanizma üzerinden etki eden PREG ve SLB'nin SAK'ta koruyucu olabileceği, DEMA tedavisinin de etkili olabileceği, ancak farklı uygulama zamanları ve süreleri ile yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu sonucuna varıldı.

Kaynaklar

1. Özdemir M, Bozkurt M, Kahiloğulları G, Uğur HÇ, Egemen N. Subaraknoid Kanama ve Komplikasyonlarının Tedavisi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2011; 64: 52-55.
2. Çomoğlu S, Erdemoğlu AK. Subaraknoid Kanama ve Vazospazm. Van Tıp Dergisi: 1998;5(2):111-113.
3. Sen O, Caner H, Aydin MV, Ozen O, Atalay B, Altinors N, Baybek M: The effect of mexiletine on the level of lipid peroxidation and apoptosis of endothelium following experimental subarachnoid hemorrhage. Neurol Res 2006;28(8):859-863.
4. Tan HP, Guo Q, Hua G, Chen JX, Liang JC. Inhibition of endoplasmic reticulum stress alleviates secondary injury after traumatic brain injury. Neural Regen Res. 2018; 13(5):827-836.
5. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacological Reviews. 1991;43(2):109–142.
6. Starke RM, Kim GH, Komotar RJ, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene single-nucleotide polymorphism predicts cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2008;28(6):1204–1211.
7. Vellimana AK, Milner E, Azad TD, et al. Endothelial nitric oxide synthase mediates endogenous protection against subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm. Stroke. 2011;42(3):776–782.
8. Deslauriers AM, Afkhami-Goli A, Paul AM, Bhat RK, Acharjee S, Ellestad KK, Noorbakhsh F, Michalak M, Power C. Neuroinflammation and endoplasmic reticulum stress are coregulated by crocin to prevent demyelination and neurodegeneration. J Immunol. 2011;187:4788–4799.
9. Deselms H, Maggio N, Rubovitch V, Chapman J, Schreiber S, Tweedie D, Kim DS, Greig NH, Pick CG. Novel pharmaceutical treatments for minimal traumatic brain injury and evaluation of animal models and methodologies supporting their development. J Neurosci Methods. 2016;272:69-76.
10. Sokka AL, Putkonen N, Mudo G, Pryazhnikov E, Reijonen S, Khiroug L, Belluardo N, Lindholm D, Korhonen L. Endoplasmic reticulum stress inhibition protects against excitotoxic neuronal injury in the rat brain. J Neurosci. 2007;27:901–908.
11. Ersahin M, Toklu HZ, Cetinel S, Yuksel M, Erzik C, Berkman MZ, Yegen BC, Sener G: Alpha lipoic acid alleviates oxidative stress and preserves blood brain permeability in rats with subarachnoid hemorrhage. Neurochem Res 2010;35:418-428.
12. GilgunSherki Y, Rosenbaum Z, Melamed E and Offen D: Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: Current state. Pharmacol Rev 2002;54:271284.
13. Pegoli M, Mandrekar J, Rabinstein AA, Lanzino G. Predictors of excellent functional outcome in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. J Neurosurg. 2015;122(2):414–8.
14. Al-Tamimi YZ, Orsi NM, Quinn AC, Homer-Vanniasinkam S, Ross SA. A review of delayed ischemic neurologic deficit following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: historical overview, current treatment, and pathophysiology. World Neurosurg. 2010;73:654-667.
15. Hummig W, Kopruszinski CM, Chichorro JG. Pregabalin reduces acute inflammatory and persistent pain associated with nerve injury and cancer in rat models of orofacial pain. J Oral Facial Pain Headache. 2014 Fall;28(4):350-9.
16. Aswar M, Patil V. Ferulic acid ameliorates chronic constriction injury induce painful neuropathy in rats. Inflammopharmacology. 2016 Aug;24(4):181-8.
17. Matsuoka M, Komoike Y. Experimental evidence shows salubrinal, an eIF2alpha dephosphorylation inhibitor, reduces xenotoxicant-induced cellular damage. Int J Mol Sci. 2015;16:16275–16287.
18. Raghubir R, Nakka VP, Mehta SL. Endoplasmic reticulum stress in brain damage. Methods Enzymol 2011;489:259-275.
19. Roth TL, Nayak D, Atanasijevic T, Koretsky AP, Latour LL, McGavern DB. Transcranial amelioration of inflammation and cell death after brain injury. Nature. 2014;505:223–228.
20. Vergouwen MD, Vermeulen M, van Gijn J, Rinkel GJ, Wijdicks 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.
21. Rubovitch V, Barak S, Rachmany L, Goldstein RB, Zilberstein Y, Pick CG. The neuroprotective effect of salubrinal in a mouse model of traumatic brain injury. Neuromolecular Med. 2015;17(1):58-70.
22. Hayashi T. Conversion of psychological stress into cellular stress response: roles of the sigma-1 receptor in the process. Psychiatry Clin Neurosci. 2015;69:179–191.
23. Hu YC, Sun Q, Li W, Zhang DD, Ma B, Li S, Li WD, Zhou ML, Hang CH. Biphasic activation of nuclear factor kappa B and expression of p65 and c-Rel after traumatic brain injury in rats. Inflamm Res. 2014;63:109–115.
24. Huang X, Chen Y, Zhang H, Ma Q, Zhang YW, Xu H. Salubrinal attenuates beta-amyloid-induced neuronal death and microglial activation by inhibition of the NF-kappaB pathway. Neurobiol Aging. 2012;33(1007):e1009–e1017.
25. Bracchi-Ricard V, Lambertsen KL, Ricard J, Nathanson L, Karmally S, Johnstone J, Ellman DG, Frydel B, McTigue DM, Bethea JR. Inhibition of astroglial NF-kappaB enhances oligodendrogenesis following spinal cord injury. J Neuroinflamm. 2013; 10:92.

26. Tan HP, Guo Q, Hua G, Chen JX, Liang JC. Inhibition of endoplasmic reticulum stress alleviates secondary injury after traumatic brain injury. Neural Regen Res. 2018; 13(5):827-836.
27. Gaynor JS, Hagberg S, Gurfein BT. Veterinary applications of pulsed electromagnetic field therapy. Res Vet Sci. 2018;119:1-8.
28. Meymandi MS, Sepehri G, Abdolsamadi M, Shaabani M, Heravi G, Yazdanpanah O, Aghtaei MM. The effects of co-administration of pregabalin and vitamin E on neuropathic pain induced by partial sciatic nerve ligation in male rats. Inflammopharmacology, 2017;25(2):237-246.
29. Ben-Menachem, E. Pregabalin pharmacology and its relevance to clinical practice. Epilepsia, 2004;45:13-18.
30. Bragin DE, Bragina OA, Hagberg S, Nemoto EM. Pulsed Electromagnetic Field (PEMF) Mitigates High Intracranial Pressure (ICP) Induced Microvascular Shunting (MVS) in Rats. Acta Neurochir Suppl. 2018;126:93-95. doi: 10.1007/978-3-319-65798-1_20. PMID: 29492540; PMCID: PMC6340641.
31. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248–254.
32. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clin Biochem 2004;37:277–285.
33. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. Clin Biochem 2005;38:1103–1111.
34. Demirbag R, Gur M, Yilmaz R, Kunt AS, Erel O, Andac MH. Influence of oxidative stress on the development of collateral circulation in total coronary occlusions. Int J Cardiol 2007;116:14–19.
35. Brain aneurysm foundation. Brain aneurysm statistics and facts. Available from: https://www.bafound.org/about-brain-aneurysms/. Accessed November 1, 2017.
36. Ekelund A, Reinstrup P, Ryding E, Andersson AM, Molund T, Kristiansson KA, Romner B, Brandt L, Säveland H. Effects of iso- and hypervolemic hemodilution on regional cerebral blood flow and oxygen delivery for patients with vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Acta Neurochir (Wien) 2002;144:703–712. discussion 712-713.
37. Treggiari-Venzi MM, Suter PM, Romand JA. Review of medical prevention of vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a problem of neurointensive care. Neurosurgery 2001; 48: 249-62.
38. Vergouwen MD, Ilodigwe D, Macdonald RL. Cerebral infarction after subarachnoid hemorrhage contributes to poor outcome by vasospasm-dependent and -independent effects. Stroke. 2011;42(4):924–9.
39. Macdonald RL, Rosengart A, Huo D, Karrison T. Factors associated with the development of vasospasm after planned surgical treatment of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. J Neurosurg. 2003;99:644–652.
40. Pluta RM, Hansen-Schwartz J, Dreier J, et al. Cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: time for a new world of thought. Neurol Res 2009;31:151-8.
41. Crowley RW, Medel R, Dumont AS, Ilodigwe D, Kassell NF, Mayer SA, et al. Angiographic vasospasm is strongly correlated with cerebral infarction after subarachnoid hemorrhage. Stroke. 2011;42(4):919–23.
42. Marin J, Rodriguez-Martinez MA. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. Pharmacol Ther 1997; 75: 111-34.
43. Kiriş T, Karasu A, Yavuz C, et al. Reversal of cerebral vasospasm by the nitric oxide donor SNAP in an experimental model of subarachnoid haemorrhage. Acta Neurochir (Wien) 1999; 141: 1323-28.
44. Jung CS, Iuliano BA, Harvey-White J, Espey MG, Oldfield EH, Pluta RM: Association between cerebrospinal fluid levels of asymmetric dimethyl-L-arginine, an endogenous inhibitor of endothelial nitric oxide synthase, and cerebral vasospasm in a primate model of subarachnoid hemorrhage. J Neurosurg 2004; 101: 836-42.
45. Pickard JD, Murray GD, Illingworth R, Shaw MD, Teasdale GM, Foy PM, et al. Effect of oral nimodipine on cerebral infarction and outcome after subarachnoid haemorrhage: British aneurysm nimodipine trial. British Medical Journal, 1989;298(6674):636-642.
46. Biondi A, Ricciardi GK, Puybasset L, Abdennour L, Longo M, Chiras J, van Effenterre R. Intra-arterial nimodipine for the treatment of symptomatic cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: preliminary results. AJNR Am J Neuroradiol. 2004;25:1067–1076.
47. Hui C, Lau KP. Efficacy of intra-arterial nimodipine in the treatment of cerebral vasospasm complicating subarachnoid haemorrhage. Clin Radiol. 2005;60:1030–1036.
48. Friedrich V, Flores R, Sehba FA. Cell death starts early after subarachnoid hemorrhage. Neurosci Lett. 2012b; 512:6–11.
49. Bannister JP, Adebiyi A, Zhao G, Narayanan D, Thomas CM, Feng JY, Jaggar JH. Smooth muscle cell alpha2delta-1 subunits are essential for vasoregulation by CaV1.2 channels. Circ Res. 2009 Nov 6;105(10):948-55.
50. Hummig W, Kopruszinski CM, Chichorro JG. Pregabalin reduces acute inflammatory and persistent pain associated with nerve injury and cancer in rat models of orofacial pain. J Oral Facial Pain Headache. 2014 Fall;28(4):350-9.
51. Aswar M, Patil V. Ferulic acid ameliorates chronic constriction injury induce painful neuropathy in rats. Inflammopharmacology. 2016 Aug;24(4):181-8.
52. Aşcı S, Demirci S, Aşcı H, Doğuç DK, Onaran İ. Neuroprotective Effects of Pregabalin on Cerebral Ischemia and Reperfusion. Balkan Med J. 2016 Mar;33(2):221-7.
53. Allen GS, Ahn HS, Presozi TJ ve ark: Cerebral arterial spasm-a controlled trial of nimodipine in patients with subarachnoid hemorrhage. N Engl J Med, 1983;308:619-24.
54. Kim CH, Wheatley-Guy CM, Stewart GM, Yeo D, Shen WK, Johnson BD. The impact of pulsed electromagnetic field therapy on blood pressure and circulating nitric oxide levels: a double blind, randomizedstudy in subjects with metabolic syndrome. BVlood Pressure 2020;29:1, 47–54.
55. Bragin DE, Statom GL, Hagberg S, Nemoto EM. Increased in microvascular perfusion and tissue oxygenation via pulsed electromagnetic fields in the healty rat brain. J Neurosurg. 2015;122(5):1239-47.