

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**DENEYSEL SUBARAKNOİD KANAMA SONRASI SEREBRAL İSKEMİ
MODELİNDE PULSED ELEKTROMANYETİK ALAN UYGULAMASININ
İSKEMİK DOKU HASARINA ETKİLERİ**

HAZIRLAYAN
Dr. Mustafa SADEF

UZMANLIK TEZİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Nilgün ŞENOL

ISPARTA - 2021

Isparta, 2021 18.10.2019 tarih ve TTU-2019-7355 sayı
Bu tez çalışması Süleyman Demirel Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi
tarafından desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitim sürecimde bizlere modern bir klinik, mükemmel bir çalışma ortamı sağlayan, bu çalışmayı planlayıp gerçekleştiren, uzmanlık eğitimimi tamamlayabilmemde bana her zaman destek olan ,eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimleriyle her türlü desteği sunan , hem etik hem cerrahi hem teorik olarak tüm birikimini sabırla paylaşan, sıkıntıya düştüğüm zamanlarda hayat tecrübesiyle bana yol gösteren ,eğitimimi yanında tamamlamaktan onur duyduğum Anabilim Dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Hakan Murat GÖKSEL Hocam’a,

Tezimin planlama, deney ve yazım aşamasında büyük emeği olan, tüm planlamayı yaparak hayata geçiren, asistanlık sürecim boyunca teorik ve cerrahi bilgisiyle eğitimimde büyük katkısı olan , yoğun çalışma temposuna isyan ettiğimde sakinliğiyle ve her zaman yapıcı tavrıyla daha yoğun çalışmamı sağlayan,yeri geldiğinde hem hoca hem ablalık yapan, kendisiyle çalışmaktan mutluluk duyduğum tez danışmanım sayın Doç. Dr. Nilgün ŞENOL’a,

Tez çalışmamın deney aşamasında tüm desteğiyle yanımda olan ,deney boyunca laboratuvarında benimle birlikte çalışan ,pratik ve analitik çözüm alışkanlığını örnek almaya çalıştığım, tüm cerrahi bilgisini gece gündüz demeden aktarıp meslek hayatıma yön veren , hem hocam hemde abim olarak her zaman yanımda olan ve kendisinden çok şey öğrendiğim Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ali Serdar OĞUZOĞLU ‘na,

Asistanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini esirgemedi her türlü desteği sağlayan ve kendilerinden çok şey öğrendiğim Sayın Dr. Öğr. Üyesi Kemal ERTİLAV ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Tamer KARAASLAN’a

Kliniğimizde birlikte çalıştığım mesai arkadaşlarım Dr. Yusuf ASLAN’A ve Dr. Alpkaan DURAN’a, tez çalışmamdaki katkılarından dolayı Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr.Halil AŞCI’ya gönülden teşekkürü bir borç bilirim.

Cerrahi eğitimimin o zor sürecinde yanımda olan,ancak çoğu zaman yanında olmadığım, desteğini esirgemeyen çok sevgili değerli eşim Elgiz Baş SADEF’e, asistanlık eğitimim boyunca bana dayanma gücü veren canlarım Eren ve Lidya’ya

Herzaman yanımda olan babam Musa ve annem Fatma Sade'e tüm içtenliğimle teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Mustafa Sade

ISPARTA, 2021



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Subaraknoid Kanama	3
2.2. Klinik Evreleme ve Sınıflandırmalar	5
2.3. Subaraknoid Kanamanın Komplikasyonları	6
2.3.1. Kardiyovasküler Problemler	6
2.3.2. İntrakranial Basınç Artışı	7
2.3.3. İntraserebral, İntraventriküler ve Subdural Kanama	7
2.3.4. Yeniden Kanama	7
2.3.5. Serebral Vazospazm	7
2.3.6. Hidrosefali	7
2.3.7. Nöbet	8
2.3.8. Diğer Komplikasyonlar	8
2.4. Klinik Vazospazm	8
2.5. Vazospazmın Epidemiyolojisi.....	10
2.6. Vazospazm Fiziopatogenezi	10
2.6.1. Vazospazmı Serebral Arter Değişiklikleri.....	12
2.6.2. Vasküler Düz Kas.....	13
2.6.3. İnflamasyon	15
2.6.4. Serbest Radikaller.....	15
2.6.5. Endotelin	17
2.6.6. Nitrik Oksid in (NO) vazospazm üzerine etkisi	18
2.6.7. Subaraknoid kanama sonrası Serebral Kan Akımı	19

2.6.8. Apoptoz	19
2.6.9. Oksidatif Stres	20
2.6.10. Pulsed Elektromanyetik alan ve etki mekanizması	21
2.6.11. Elektromanyetik Alan Uygulamaları.....	22
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	26
3.1. PEMF Çalışma Tasarımı Uygulaması	26
3.2. PEMF Prosedürlerinin Özellikleri, Özel Kafesler ve Uygulama Cihazı.....	28
3.3. Anestezi	29
3.4. Gruplar.....	30
3.5. Verilerin Toplanması.....	34
3.5.1. Biyokimyasal ve Genetik Analizler	34
3.5.2. Histopatolojik Analizler	36
3.5.3. İstatiksel Analizlerin Yapılması	38
4. SONUÇLAR	39
4.1. Biyokimyasal Sonuçlar.....	39
4.1.1. Oksidatif Stress Parametreleri	39
4.1.2. RT-qPCR Sonuçları.....	40
4.2. Histopatolojik Sonuçlar	40
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	49
ÖZET.....	50
SUMMARY	51
KAYNAKLAR	52

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Subaraknoid Kanamaların Klinik Derecelendirilmesi	6
Tablo 2. Subaraknoid Kanama Sonrası Gelişen Komplikasyonlar	6
Tablo 3. Çalışma Gruplarının Özeti	30
Tablo 4. Çalışmada Beyin İçin Kullanılan Primer Dizileri.....	36
Tablo 5. Dehidratasyon Aşamasında Kullanılan Alkol Dereceleri ve Uygulama Süreleri	37
Tablo 6. H-E Boyama Protokolü.....	38
Tablo 7. Oksidatif Stres Parametreleri Sonuçları a - Kontrol, b - SAK, c - SAK + PEMF.	39
Tablo 8. AKT1, Hif-1 α ve eNOS İfadelerinin Göreceli İfade Seviyeleri.....	40
Tablo 9. Beyin Dokularının Histopatolojik Bulguları.....	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. NO Oluşum mekanizması	18
Şekil 2. Osilatör ve Yükselteç Devresi Simülasyon Çıktıları	26
Şekil 3. Maruziyet Sisteminin Işıma Örüntüsü	27
Şekil 4. Maruziyet Sisteminin Işıma Örüntüsü	27
Şekil 5. PEMF Uygulama Sistemi ve Kurulumu	29
Şekil 6. Deneysel Protokol Şeması	29
Şekil 7. Kan Alımı İçin Kullanılan Restrainer	31
Şekil 8. Atlantookspital Membran	32
Şekil 9. Subaraknoid Hemoraji	33
Şekil 10. Prepontin Sistemlerdeki ve Baziller Arter Etrafındaki Subaraknoidal Kanama	33
Şekil 11. Prepontin Sistemlerdeki ve Baziller Arter Etrafındaki Subaraknoidal Kanama	34

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No

Resim 1. Kontrol Grubu Beyin Korteks Normal Histolojik Yapı. HE, x40, Ölçüm Çubuğu= 50 µm.	41
Resim 2. SAK Grubu Beyin Kortikal Alan Histopatolojik Değişiklikler; Subaraknoid Hemoraji (Beyaz Ok), Apoptotik Cisimler (Siyah Ok), Vakualizasyon (Ok Başı). HE, x40, Ölçüm Çubuğu= 50 µm.....	42
Resim 3. SAK+PEMF Grubu Beyin Kortikal Alan Histopatolojik Değişiklikler; Subaraknoid Hemoraji (Beyaz Ok), Apoptotik Cisimler (Siyah Ok), Vakualizasyon (Ok Başı). HE, x40, Ölçüm Çubuğu= 50 µm.....	42
Resim 4. PEMF+SAK Grubu Beyin Kortikal Alan Histopatolojik Değişiklikler; Subaraknoid Hemoraji (Beyaz Ok), Apoptotik Cisimler (Siyah Ok), Vakualizasyon (Ok Başı). HE, x40, Ölçüm Çubuğu= 50 µm.....	43
Resim 5. Kontrol Grubu Beyin Hipokampal Alan Normal Histolojik Yapı.HE, x40, Ölçüm Çubuğu= 50 µm.	44
Resim 6. SAK Grubu Beyin Hipokampal Alan Histopatolojik Değişiklikler; Apoptotik Cisimler (Siyah Ok), Vakualizasyon (Ok Başı). HE, x40, Ölçüm Çubuğu= 50 µm.	44
Resim 7. SAK+PEMF Grubu Beyin Hipokampal Alan Histopatolojik Değişiklikler; Apoptotik Cisimler (Siyah Ok), Vakualizasyon (Ok Başı). HE, x40, Ölçüm Çubuğu= 50 µm.	45
Resim 8. PEMF+SAK grubu beyin hipokampal alan histopatolojik değişiklikler; apoptotik cisimler (siyah ok), vakualizasyon (ok başı). HE, x40, ölçüm çubuğu= 50 µm.	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADMA	:	Asimetrik dimetilarjinin
AT	:	Anjiotensin
ATP	:	Adenozin Trifosfat
AVM	:	Arteriovenöz Malformasyonlar
Bax	:	Proapopitotik Gen Bcl
Xl	:	Antiapopitotik Gen Bcl
Xs	:	Proapopitotik Gen
BOS	:	Beyin Omurilik sıvısı
Bcl 2	:	Antiapopitotik Gen
Ca⁺²	:	Kalsiyum
cAMP	:	Cylic Adenosine Monophosphate
cGMP	:	Cyclic Guanosine Monophosphate
CT	:	Bilgisayarlı Tomografi
DAG	:	Diaçil gliserol
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
EDRF	:	Endotelyal Derived Relaksing Factor
ET	:	Endotelin
GC	:	Guanil Siklaz
GKS	:	Glasgow Koma Skalası
GSİ	:	Geç serebral iskemi
GTP	:	Guanosine Triphosphate
H₂O₂	:	Hidrojen Peroksid
HT	:	Hipertansiyon
ICAM	:	Intercellular adhesion molecule
IF	:	Interferon
IL	:	Interlökin
IP3	:	phosphatidyl inositol triphosphate
IKB	:	İntrakranial basınç artışı
K⁺	:	Potasyum
KATP	:	K Bağımlı ATP kanalı
MABP	:	Ortalama Arterial Basınç
MLCF	:	Myosine light chain fosfataz

MLCK	:	Myosine light chain kinase
MSS	:	Merkezi Sinir Sistemi
NFκB	:	Nuclear Factor kappa
B NMDA	:	N-Methyl-D-Aspartate
NO	:	Nitrik oksid
NOO⁻	:	Peroksinitrit
NOS	:	Nitrik oksid sentetaz
NSCC	:	nonselektif katyonik kanal
O₂⁻	:	Superoksid
OH⁻	:	Hidroksiradikal
PDE	:	fosfodiesteraz
PEMF	:	Pulsed Elektromanyetik Alan
PG	:	prostoglandin
PKC	:	Fosfokinaz C
PKG	:	Fosfokinaz G
PLC	:	Fosfolipaz C
PRMT-1	:	tip 1 protein arjinin metil transferaz
ROS	:	Reaktif oksijen species
SAK	:	Subaraknoid kanama
SDMA	:	simetrik dimetilarjinin
SKA	:	serebral kan akımı
SOCC	:	store operated kalsiyum kanalları
SOD	:	superoksid dismutaz
SPB	:	serebral perfüzyon basıncı
SV	:	Serebral vazospazm
TBA	:	tiyobarbiturik asid
TCD	:	transkranyal doppler
TNF	:	tumor nekrozis factor
VCAM	:	Vascular cell adhesion molecule

1. GİRİŞ

Subaraknoid aralık, araknoid zar ile pia zarı arasında tüm Merkezi Sinir Sistemi'ni (MSS) çevreleyen, içi Beyin-Omurilik (BOS) Sıvısı ile dolu, Willis poligonu ve dallarının içine yerleşmiş olduğu alandır. Herhangi bir nedenle, primer olarak bu boşlukta oluşan kanamalar, subaraknoid kanama (SAK) olarak adlandırılır. Primer SAK, subdural yada intraparaknoidal yayılım gösterebilir.

Subaraknoid kanamalar en sık kafa travması sonrası görülürken, spontan SAK %75-80 oranında rüptüre olmuş intrakranial anevrizmalara bağlı meydana gelir (1,2). Diğer nedenler arasında vaskülitler, hipertansiyon, intrakranial tümörler, arteriovenöz malformasyonlar, koagülasyon bozuklukları ve ilaçlar sayılabilir (1).

Intrakraniyal patolojisi olan hastalarda nörolojik bozuklukların en sık nedenlerinden biri subaraknoid kanamadır. SAK'ın en sık görülen komplikasyonu arterlerde meydana gelen şiddetli spazmdır (3). Serebral ödem ve vazospazm hipoperfüzyona neden olmakta, hipoperfüzyona bağlı gelişen iskemik ve hipoksik hasar da kalıcı nörolojik hasarların oluşmasında etkili olmaktadır (4).

Subaraknoid kanama sonrası hemoglobinin açığa çıkması arterlerde vazokonstriksiyona neden olan mekanizmalardan birisidir. Bunun yanı sıra, nitrik oksid (NO) miktarındaki azalma, endotelin-1 düzeylerindeki artış, oksidatif stresin düz kaslar üzerindeki direkt etkisi, serbest radikallerin oluşumu, hücre membranlarındaki lipid peroksidasyonu, potasyum ve kalsiyum kanallarındaki değişiklikler de vazokonstriksiyonda etkili olan diğer sebeplerdir (5-9).

Hem geniş serebral arterlerde, hem de mikrosirkulasyonda bulunan potasyum bağımlı ATP kanalları (K-ATP) vasküler tonusun düzenlenmesinde ve nitrik oksit yoluyla vazodilatasyonda etkilidir (10). SAK'lı hastalarda K-ATP kanallarındaki bozukluklar NO üretiminde ve buna bağlı olarak da endotelden vazodilatatörlerin salınımında azalmaya neden olmaktadır. Bunun sonucunda vazospazm artmakta, iskemi alanı genişlemektedir (11).

Serebral vazospazmın mevcut tedavi modalitelerinde etkilenen damarların direkt veya indirekt dilatasyonu sağlanmaktadır. Reaktif oksijen radikalleri, hipoksik koşullarda endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) gen ekspresyonunun artmasıyla,

hipoksi ile indüklenabilir faktör 1-alfa (HIF-1 α) üzerinden nitrik oksit (NO) sentezinde artışa neden olarak düzenleyici rol oynamaktadır. Tedavi amacıyla kullanılan ajanlar, iskemi reperfüzyonu gibi birçok hasarda dokuları korumak için bu gen ekspresyonlarının seviyelerini değiştirirler. Artmış NO seviyeleri, dokuyu, enfeksiyon ve apoptozdan korumak için vazodilatasyona neden olsa da, ciddi yaralanmalara açık hale getirir (12).

Pulsed elektromanyetik alan (PEMF) tedavisinin, kronik yaralar, kemik kırıkları, yumuşak doku yaralanmaları, cerrahi sonrası ağrı tedavisi, enflamasyonun indüklediği ödem gibi farklı klinik endikasyonlar için kullanımı bildirilmiştir (13). Yapılan çalışmalarda tavşanlarda geçici, farelerde de kalıcı fokal iskemi sonrasında enfarkt boyutlarında küçülmeye neden olduğu ayrıca antiinflamatuvar etkisinin yanı sıra intravital mikroskopide kurbağalarda arteriollerini dilate ettiği gösterilmiştir. Mikrodamarlarda PEMF'nin etki göstermesinde etkili mediatörün iyi bilinen bir vazodilatatör olan NO olduğu düşünülmüş ve PEMF'nin NO-bağımlı bir mekanizma ile arteriolar dilatasyonu artırdığı gösterilmiştir (14-18).

Deneyssel kronik glomerülonefritte silier cisim mikrosirkulasyonundaki bozukluklar incelenmiş; PEMF tedavisinin vasküler tonusta ciddi azalmaya neden olduğunu bildirilmiştir (19). Sağlıklı ratlarda kremaster kasındaki arteriollerin çaplarına etkisi incelenmiş, ancak SAK sonrası gelişen vazospazm tedavisinde hiç denenmemiştir (20). Bu nedenle, planladığımız çalışma özgün değere sahiptir.

Bu çalışmada, yüksek mortalite ve morbidite oranına sahip SAK tedavisine katkı sağlamak için vazodilatör etkinliği bilinen PEMF' in deneyssel SAK sonrası gelişen iskemik doku hasarı üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Medikal ve cerrahi tedavi seçeneklerinin yan etkileri ve komplikasyonları dikkate alındığında, vazospazmın tedavisinde PEMF non-invaziv ve uygulanabilir bir tedavi yöntemi olarak etkili bir tercih olabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Subaraknoid Kanama

Spontan subaraknoid kanama (SAK) yaklaşık % 12 ölüm oranı ile nörolojik sekellerin en sık nedenlerinden birisidir ve insidansı yılda yaklaşık 8 / 100.000'dir (21,22). Subaraknoid kanamaların sebepleri travmatik ve non-travmatik (spontan) olarak 2 temel etyolojik gruba ayrılır. Spontan subaraknoid kanamaların en önemli nedeni, serebral arter anevrizmalarıdır. En sık görülen serebral anevrizma tipi multifaktöriyel nedenlerin neden olduğu sakküler anevrizmalardır (23,24). Arteriyel bifurkasyondaki hemodinamik değişiklikler, konjenital damar defektleri, edinilmiş dejeneratif arteriyel duvar değişiklikleri, hipertansiyon, sigara, ateroskleroz, alkol alımı gibi sebepler anevrizma gelişiminde ve rüptüre olmasında rol alır. Spontan subaraknoid kanamaların diğer sebepleri arasında arteriovenöz malformasyonlar (AVM), kanama diskrazileri, ilaca bağlı SAK gibi daha seyrek görülen sayılabilir. Olguların %10 kadarında ise etyolojik neden tespit edilememektedir. Spontan SAK olgularının en sık görüldüğü yaş grubu 5. ve 6. dekadlar olup, kadınlarda erkeklere oranla daha sıktır (25-28).

SAK sebebiyle tedaviye alınan olgularda; asıl kanamadan 15 gün öncesine dek görülebilen, “sızıntı” şeklinde kanamaya bağlı baş ağrısı hikayesi olabilir. Akut atakta, ani gelişen, çok şiddetli baş ağrısı, bulantı ve kusma (%77 olguda), bilinç kaybı (%53 olguda), klasik klinik tabloyu oluşturmaktadır. Bilinç kaybı geçici olabileceği gibi, ilerleyici koma şeklinde de görülebilmektedir. Ense sertliği (%35 olguda) ve eşlik eden bulguların yanı sıra, her olguda değişen fokal nörolojik bulgular da meydana gelebilir (29)

Subaraknoid Kanamanın Major Semptomları

1.Baş ağrısı: SAK'ın başlangıç semptomu olan baş ağrısı yüksek basınçlı kanın dar hacimli subaraknoid boşlukta yayılmasına bağlı ani gelişir ve çok şiddetlidir. Baş ağrısı kanama miktarı ile doğru orantılı olup, ışık, ses, baş ve boyun hareketleriyle artar. Klinik prognozun en önemli göstergesi kanama miktarıdır. Kanın ventrikül içine veya serebral parankime yayılması kötü prognoz işaretidir (30).

Sadece ani başlangıçlı baş ağrısı SAK kliniğinde görülen tek bulgu olabilir (25,26)

2. Bilinç Bozukluğu: Kısa süreli bilinç bozukluğu,baş ağrısı sonrası sık görülen bulgulardandır. Geçici veya aynı düzeyde kalıcı olabilir. Başlangıç öyküsü yada prodromal belirti olmadan görülebilir. Yeniden kanama, vazospazm veya beyin ödemi de bilinç bozukluğu gelişimine neden olabilir.

3. Meninks İritasyon Bulguları: BOS'daki kan ürünlerinin sebep olduğu iritasyona bağlı meningismus (ense sertliği, fotofobi, Brudzinski ve Kernig bulguları) görülebilir. Meninks iritasyonunu azaltmak için hastalar alt ekstremitelerini dizden fleksiyona getirmeye çalışırlar, ışıktan rahatsız oldukları için göz kapakları kapalıdır, hiperestezi, irritabilite, hiperakuzi ve fotofopi gibi sensoryel değişiklikler de izlenebilir (31).

4. Sistemik Bulgular: Hemorajiye sekonder gelişen inflamasyona bağlı 24-36. saatlerde vücut ısısı yükselmeye başlar. Hipotalamus hasarı nedeniyle kalp hızı değişiklikleri, titreme, bulantı-kusma izlenebilir. İleri düzey etkilenme nedeni ile gastrointestinal sistem kanaması ve idrar retansiyonu görülebilir. Ağrıya sekonder ve hipotalamusun düzenleyici etkisinin ortadan kalkması sebebiyle taşikardi izlenebilirken, kafa içi basıncı yükselmesi sonucu bradikardi gelişebilir. Serebral oksijenizasyonun sağlanması için refleks hipertansiyon oluşabilirken, hiperglisemi EKG değişiklikleri meydana getirebilir.

5. Nörolojik Bulgular: Subaraknoid aralıkta oluşan kanamanın sınırlı olduğu durumlarda nörolojik defisitler sık görülmezken, masif kanama varlığında (intracerebral, intraventriküler kanamalar) motor güç kaybı, konuşma bozukluğu gibi nörolojik bulgular gelişebilir.

Akut SAK sonrası uzamış baş ağrısı, epileptik nöbetler, kafa içi basınç artışı ve/veya hidrocefaliye ait belirti ve bulgular da görülebilir. Komplikasyonlar olarak adlandırılan serebral vazospazm (SV) ve geç serebral iskemi (GSİ), uzamış bilinç bozukluğu ve fokal nörolojik bulgularla kendilerini gösterirler. Özellikle anevrizmaya bağlı gelişen SAK olgularında, yeniden kanama ciddi bir risktir. Akut SAK sonrası ilk 72 saat içinde yeniden kanama riski %5-22 arasında bildirilirken “çok erken” (ilk 24 saat içinde) yeniden kanama insidansı %15 ve bu olgularda

mortalite oranı %70 olarak saptanmıştır. Myokard disfonksiyonuna ait kalp bulguları, nörojenik pulmoner ödemde SAK sonrası ortaya çıkabilir. Yoğun bakımda izlem boyunca Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu (SİYS) ve enfeksiyonlar (katetere bağlı üriner sistem, pulmoner, sistemik) görülebilir. Olguların %30 kadarı, çeşitli nörolojik defisitlerle taburcu edilmektedir (29)

SAK'ın teşhisinde önerilen ilk tetkik kontrastsız Bilgisayarlı Beyin Tomografisi (BBT)' dir. BBT'de hastaların %95'de anevrizma rüptürü sonrası ilk 24 saatte subaraknoid sisternlerdeki yüksek dansiteli kan pıhtısı görülür (32).

Subaraknoid aralıkta kanın varlığı, yerleşim yeri, eşlikçi hematom (intracerebral / subdural) veya hidrosefali gelişip gelişmediği BBT ile ayırt edilir. Kuşkulu durumlarda lomber ponksiyon (LP) tanıyı kesinleştirmek için yapılmaktadır. Non-travmatik SAK olgularında etyolojiyi saptamak için altın standart serebral anjiyografidir. Manyetik rezonans anjiyografi (MRA) ya da 3 boyutlu Bilgisayarlı Tomografi anjiyografi (BTA) tedavi planlaması için gereklidir. Günümüzde pek çok merkezde BTA SAK sonrası anevrizma tanısı ve buna yönelik tedavinin seçiminde ilk ve yeterli yöntem olarak kullanılmaktadır (33,34). Anevrizma cerrahisinin hızlı ve başarılı olması tekrar kanamanın önlenmesinde, vazospazm ve apoptoz gelişme riskini azaltmada ve prognozun daha iyi olmasında anahtar bir rol oynar (35).

2.2. Klinik Evreleme ve Sınıflandırmalar

Subaraknoid kanama hastalarının prognozlarını öngörmek için kullanılabilecek bir çok derecelendirme skalası olmakla beraber klinikte en yaygın kullanılanlar Hunt-Hess Skalası ve "World Federation of Neurosurgical Societies" (WFNS) Skalası'dır. Radyolojik bulgularda ise Fisher Skalası kullanılabilir (Tablo 1).

Tablo 1. Subaraknoid Kanamaların Klinik Derecelendirilmesi

Derece	WFNS	HH	Fisher
1	GKS:15 Motor defisit –	Aseptomatik / minimal baş ağrısı Normal bilinç durumu +/- Hafif ense sertliği	Belirgin kanama yok
2	GKS:14-13 Motor defisit –	Ciddi baş ağrısı Normal bilinç durumu Motor defisit yok Orta-Ağır derecede ense sertliği	<1 mm kanama tabakası
3	GKS:14-13 Motor defisit +	Hafif motor defisit Somnolans, konfüzyon	≥1 mm kanama tabakası
4	GKS:12-7 Motor defisit + / –	Stupor Orta ciddi motor defisit	Diffüz veya intraventriküler kanama
5	GKS: 6-3 Motor defisit + / –	Derin koma Reflex postür / flask paralizi	–

2.3. Subaraknoid Kanamanın Komplikasyonları

SAK sonrası görülebilen komplikasyonlar Tablo-2 de verilmiştir.

Tablo 2. Subaraknoid Kanama Sonrası Gelişen Komplikasyonlar

1. Kardiyak Problemler, EKG değişiklikleri (QT uzaması, ST depresyon)
2. Nöbet (%3-26)
3. Erken ve geç dönemde hidrocefali gelişmesi
4. Hiponatremi
5. Serebral ödem
6. Vazospazm

2.3.1. Kardiyovasküler Problemler

SAK 'lı hastaların %20-30 kadarında akut kardiyak enzimler yükselmektedir. Özellikle Troponin-1 artışı, kötü prognozla ilişkilidir (36). Kardiyak aritmiler ventriküler taşikardi veya atrial taşikardiler %5 olguda görülebilir. Hastaların yaklaşık %16'sında hipertansiyon eşlik etmektedir. Yüksek intrakranial basınç (İKB)

ve düşük serebral perfüzyon basıncına cevap olarak sistemik arter basıncının yükselmesine bradikardinin eşlik etmesi ‘Cushing Yanıtı’ olarak adlandırılmaktadır (37,38).

2.3.2. İntrakranial Basınc Artışı

SAK sonrasında İKB artışı kanamanın artmasına neden olabilmektedir. Bunun yanı sıra serebral perfüzyon basıncının düşmesi ve herniasyona neden olabileceği için dikkatli olunmalıdır (37).

2.3.3. İntraserebral, İntraventriküler ve Subdural Kanama

Anevrizmanın lokalizasyonuna bağlı SAK ile birlikte subdural, intraventriküler ve intraserebral kanama görülebilmektedir. En fazla intraserebral kanamaya yol açan anevrizmalar interhemisferik fissürde bulunan distal anterior serebral arter anevrizmaları ve sylvian fissür yerleşimli orta serebral arter anevrizmalarıdır. Ventrikül içi kanamanın eşlik etmesi kötü prognoz göstergesi olarak kabul edilmektedir. Subdural kanama ise %1-2 oranında görülmektedir (37,38).

2.3.4. Yeniden Kanama

SAK'lı hastalarda yeniden kanama riski ilk 24 saat içerisinde en yüksek olup (%4) ikinci günün sonundan itibaren azalarak günde %1,5 düzeylerine inmektedir. İlk 14 günün sonunda toplam yeniden kanama riski %19 olarak saptanmıştır. Kanamadan 6- 12 ay sonrasında ise risk yıllık %3 düzeyine iner (36,37).

2.3.5. Serebral Vazospazm

Ayrı başlık altında incelenecektir.

2.3.6. Hidrosefali

SAK hastalarının %30-50 kadarında hidrosefali izlenmektedir. Spontan SAK sonrası erken dönemde ortaya çıkabileceği gibi; atağı izleyen 2–12 haftalık dönemde de görülebilir (29,39). Hastaların ortalama %20' sinde geç veya kronik hidrosefali

geliştiği bildirilmiştir. Kanamanın ventrikül içine açılması ve kanın şekilli elemanları ve bunların yıkım ürünlerinin etkisiyle subaraknoid aralığın tıkanması akut hidrosefali gelişmesine neden olurken, hastanın klinik tablosunun ağır olması, hipertansiyon, alkolizm, kadın cinsiyet, anevrizma boyutunun büyük olması ve menenjit gibi araya giren bazı enfeksiyonlar kronik hidrosefali gelişiminde etken faktörler olarak bildirmiştir (37, 38, 40).

2.3.7. Nöbet

SAK hastalarının yaklaşık %4-22'sinde nöbet görülebilmektedir. Özellikle intraserebral hematomu ve yoğun subaraknoid kanaması olan hastalarda nöbet görülme sıklığı artmaktadır. Nöbet gelişmesi kliniğin kötüleşmesine neden olabileceği için hastalara profilaktik antiepileptik tedavi başlanması gerekliliği  ne sürülmektedir, ancak postoperatif antikonvülsif tedavinin ne kadar devam edeceği konusunda fikir birliği yoktur (41).

2.3.8. Diğer Komplikasyonlar

Sıvielektrolit bozuklukları (uygunsuz ADH, diabetes insipitus), solunum bozuklukları (aspirasyon pnömonisi, pulmoner ödem, pulmoner emboli), tromboembolik komplikasyonlar, nöropsikolojik bozukluklar, enfeksiyon, gastrointestinal bozukluklar(motilite değişiklikleri, kanama) diğer olası komplikasyonlar olarak sayılabilir.

2.4. Klinik Vazospazm

Willis poligonu dallarında, sisternalar içinde toplanmış olan kan, kan metabolitleri ve bazı kimyasal maddelerin sebep olduğu patolojik daralma hali “Serebral Vazospazm” olarak adlandırılmaktadır. SAK atağından yaklaşık 4 gün sonra başlamakta, 6.-8. günler arasında pik yapmakta ve 3 hafta kadar sürebilmektedir. SAK sonrası gelişen fokal serebral iskemiye bağlı olarak görülen morbidite ve mortalitenin en önemli sebeplerinden birisidir. Anevrizmal SAK'ın en korkulan komplikasyonu tekrar kanama olmasına rağmen, serebral vazospazm morbidite ve mortalite açısından reversible bir neden olduğu için önemlidir. Vazospazmın yarattığı doku hipoperfüzyonu sonucu olduğu düşünülen nörolojik kayıplar da “Geç

Serebral İskemi” olarak tanımlanmaktadır. Bu nörolojik kayıplar, yeni ortaya çıkan fokal nörolojik bulgu veya başka nedenlerle açıklanamayan, en az 1 hafta süren Glasgow Koma Skalası (GKS) ’nın en az 2 puan düşmesi biçiminde tanımlanır (29).

Vazospazm gelişmesinde risk faktörleri; tomografide izlenen sisternlerdeki kan (kalınlığı 5mm. den fazla ise vazospazm gelişme riski %96), kötü nörolojik klinik, hipertansiyon ve sigara kullanımının olmasıdır. Hiponatremi, sepsis, hipoksi, hidrosefali ve postiktal paralizi ile birlikte olan nöbetler değerlendirilerek klinikteki kötüleşmenin vazospazma bağlı olabileceği söylenebilir. Hipovolemiden kaçınmak, hipotansiyon ve hiponatremiye karşı önlem almak vazospazm gelişme riskini azaltmak için gereklidir.

Bazı klinik çalışmalarda intraoperatif veya postoperatif kataterle verilen fibrinolitik ajanların (rTPA,urokinaz) vazospazmın gelişimini azalttığı gösterilmiştir. İntravenöz sıvı tedavisini arttırmak cerrahi sonrası semptomatik serebral vazospazm gelişen hastalarda uygulanmaktadır. Bu tedavi ile tansiyon yükselmekte, kardiyak output ve serebral perfüzyon basıncı artmaktadır. Ancak, semptomatik vazospazmın tedavisinde oldukça yaygın kullanılan 3H tedavisinin (hipervolemi, hemodilüsyon, hipertansiyon) yararı henüz tam olarak teyit edilememiştir (42,43).

SAK sonucu oluşan hasara neden olan mekanizmaları aydınlatmaya yönelik çalışmalar devam etse de, klinik durum iyi tarif edilmiş ve dökümanite edilmiştir. Serebral anjiyografide vazospazm izlenen vakaların yaklaşık yarısında iskemiye bağlı nörolojik hasar gelişmektedir. Klinik vazospazmın gelişmesi kanama sonrası ilk 3 günde sık görülmemektedir. Vazospazmın tanısında radyolojik ve klinik olarak korelasyon gerekmektedir. Vazospazm tanısında standart yöntem anjiyografi olmasına rağmen, transkranyal doppler ultrasonografi de tanı ve izlemde kullanılabilir. Transkranyal Doppler (TKD) ultrasonografi orta serebral arter kan akımı hızını ölçebilen güvenli ve non-invaziv tanı yöntemidir. Orta serebral arter akım hızının 20 cm/sn.’den büyük olduğu hastalar yüksek klinik spazm riskine sahiptir. Ayrıca kanama sonrası vazospazm gelişimi basal sisternlerdeki kan miktarına bağlıdır. (44-46).

2.5. Vazospazmın Epidemiyolojisi

Spontan SAK'nın yıllık insidansı 6-11/100.000'dir ve bu hastalarda yaklaşık %50 oranında mortalite bildirilmiştir (47,48). SAK sonrası yaşayan hastaların ise %69'unun yaşam kalitesi düşmektedir. Vazospazm ve buna bağlı gecikmiş serebral iskemi, SAK sonrası morbiditenin ana nedenlerinden birisidir (47). Anevrizmaya bağlı serebral vazospazmın varlığı, ilk kez 1951 yılında Ecker ve Riemenshneider tarafından bildirilmiştir (49).

Serebral vazospazm SAK sonrası hastaların %70'inde görülmektedir ve vakaların %30 kadarında semptomatik olurken; kötü prognoz, kognitif ve fonksiyonel sekeller, mortalitenin en önemli nedenleridir. Weir ve ark. 1978'de serebral vazospazmın SAK'tan sonraki 4.-12. günler arasında geliştiğini, 6.-8. günler arasında pik yaptığını ve 2. hafta içerisinde çözüldüğünü yayınlamışlardır (28).

SAK sonrası 3.-12. günler arası yapılan anjiyografide radyolojik olarak vazospazm görülme oranı %16-66'dır. Bununla birlikte SAK'tan sonraki 40. günden itibaren gecikmiş vazospazm görülebileceği bildirilmiştir. Kan miktarının artması vazospazm gelişme riskini de arttırmaktadır. BT'de tespit edilen sisternlerdeki kan kalınlığı 5 mm.den fazla ise vazospazm gelişme ihtimali %96 olarak bildirilmiştir (28).

2.6. Vazospazm Fiziopatogenezi

Serebral vazospazm patagonezinde dört bölge önemli rol oynamaktadır. Bu bölgelerden düz kaslarda nitrik oksid sentetaz, kalsiyum ve potasyum kanalları; subaraknoid boşlukta kalsiyum ve magnezyum, oksihemoglobin, trombositler; damar endotelinde nitrik oksid (NO), Endotelin 1 (ET-1), serbest radikaller, araşidonik asitler; adventisyal sinirlerde adrenerjik innervasyon, karbonmonoksit ve kalsitonin gen ilişkili peptid (CGRP) bulunmaktadır (50).

Endotelden salınan vazodilatatör maddeler; bradikinin, vazopressin, NO, asetilkolin (Ach), adenosindifosfat (ADP), adenosintrifosfat (ATP), histamin, substance P, neurokinin A, neurokinin B olarak sayılabilir. Vazokonstriktör ajanlar ise; endotelin ,serotonin, noradrenalin, tromboxan A2 'dir.

Vazospazm kanamadan 3-4 saat sonra görülen akut ve 3-5. günlerde başlayıp 14. güne kadar süren kronik dönem olmak üzere iki dönemde ortaya çıkmaktadır (51).

Akut dönemde trombositlerden salınan güçlü vazokonstriktör etkili serotonin (5-HT₂) ile birlikte stres ve korkuyla artan sempatik aktivitenin de vazospazma katkısı olduğu bildirilmiştir (52). SAK sonrası gelişen Kan Beyin Bariyeri (KBB) yıkımı ile birlikte serebral dokuya geçen serotonin, 5HT-2A reseptörleri üzerinden damar duvarında vazokonstriksiyon, trombositlerde agregasyon yapar. 5 HT₂ Gq proteini ile kenetli reseptördür. Agonist reseptöre bağlandığı zaman aktif hale gelen alfa GTP kompleksi hücre membranının diğer tarafında bulunan fosfolipaz C enzimini uyarır. Fosfolipaz C enzimi ikincil haberciler olan diaçilgliserol (DAG) ve inozitoltrifosfat (IP₃) sentezini uyarır. IP₃ sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum (Ca⁺⁺) salınımını arttırarak kalmodulini aktif hale getirir ve sonuçta miyozin vazokonstriktör etkiye neden olur (17,39). Ca⁺⁺, kasılmanın başlangıç fazı için çok önemlidir (53).

Sempatik etki ise stres ve korkuyla ortaya çıkar. Hastalığa bağlı anksiyete olayı tetikler ve bir kısır döngü meydana gelir. Sinir liflerinin uyarılması vazokonstruksiyon ile ciddi anlamda ilişkilidir. Adrenalin, noradrenalin gibi katekoleminlerin ortama salınması sonucunda damar düz kasındaki α₁ reseptörler ile kenetli Gq proteini uyarılır ve benzer şekilde hücre içi depolardan Ca⁺⁺ salınımı artarak vazokonstriktör etki oluşur (50).

Adrenerjik innervasyonun fazla olduğu bölgelerde vazospazmın daha sık görüldüğü saptanmıştır. Vazospazm üzerindeki etki mekanizmaları bilinmesine rağmen adrenerjik antagonistler klinik vazospazm tedavisinde etkili ilaçlar değildir. Benzer şekilde eikozonoidlerin de vasküler dengede etkili oldukları bilinmesine rağmen indometazin SAK sonrası vazospazm gelişimini önlemede etkili bulunamamıştır (53).

Geç dönemde, ortamdaki pıhtılaşmış kandan kaynaklanan eritrosit ve hemoglobin yıkım ürünlerinden açığa çıkan oksihemoglobin, methemoglobin, trombin, bilirubin ve endotelin gibi proteinler vazospazma neden olmaktadır (50,54-57). SAK sonrası vazospazm gelişimindeki esas kaynak kanın kendisidir

(53). Özellikle oksihemoglobinin methemoglobine oksidasyonu serebral vazospazm gelişiminde önemli rol oynamaktadır (56). Eritrositler olmadan kanın sistern içine enjekte edilmesinin arterlerde anjiyografik veya yapısal olarak daralma yapmadığı, parçalanmış eritrositlerden salınan oksihemoglobinin sürekli bir vazokonstriksiyona neden olduğu bilinmektedir (50). Açığa çıkan oksihemoglobin vazokonstriktör etkili endotelin üretimini artırırken vazodilatatör etkili nitrik oksidi inhibe eder (57,58). NO' in esas inhibitörü oksihemoglobinin oksidasyonu sonrasında ortaya çıkan serbest oksijen radikali olan superoksittir (50). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda endotelin antagonisti ilaçların radyolojik vazospazmı belirgin olarak azalttığı saptanmıştır (58).

Bilirubin ise hem yıkımının son ürünüdür, trombin ve oksihemoglobine benzer şekilde vazokonstriktör etki gösterir. Bu üç madde vazospazm üzerine etkilerini saptamak amacıyla deneysel SAK modellerinde sıklıkla kullanılmaktadır ve etkileri ile ilgili çok çeşitli hipotezler vardır (53). Hemoglobin ve bilirubinin vazospazm üzerindeki etkileri dakikalar veya saatler içinde ortaya çıkmaktadır (59). Subaraknoid mesafedeki perivasküler pıhtı miktarı ile serebral vazospazm şiddeti arasında ciddi bir ilişki saptanmıştır (60).

Pıhtının doku plazminojen aktivatörü (tPA), ürokinaz gibi fibrinolitik ajanlar kullanılarak eritilmesinin morbidite ve mortaliteyi azalttığı bilinmektedir (61).

Endotel normal şartlar altında damar düz kası gevşeten ve trombosit agregasyonunu inhibe eden PGI₂ (prostosiklin) gibi maddeleri ortama salar. SAK sonrası bu maddelerin salınımı bozulur, trombosit agregasyonu ve damar düz kas kasılmasına neden olan adenzindifosfat (ADP), adenzintrifosfat (ATP), serotonin ve trombin ortama salınır. Ayrıca ortama salınan trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) damar tunika media tabakasındaki hücrelerin proliferasyonuna neden olur (50).

2.6.1. Vazospazmda Serebral Arter Değişiklikleri

Hayvanlarda deneysel ve insanlarda anevrizma rüptürü ardından gelişen SAK sonrası yapılan anjiyografilerde vazospazmın izlendiği durumlarda yapılan biyopsilerde damar duvarlarında patolojik bir takım değişiklikler görülmüştür.

Yapılan çalışmalarda elektron mikroskopik inceleme ile endotel hücre tabakalarında bazı değişiklikler izlenmiş olup bu değişiklikler; vakuolizasyon, interendoteliyal sıkı bağlantılarda bozulma, endoteliyal dökülme ve luminal mikrotrombozis olarak sayılabilir. Damar lümeninde ve çapında meydana gelen değişiklikler tunika intimanın altında kalan internal elastik lamina gibi mediya katmanının kontraksiyonu sonucu ortaya çıkar.

Bu çalışmalarda polimorf hücre infiltrasyonu, granülasyon dokusu oluşumu, ödem, düz kas hücrelerinin migrasyonu veya proliferasyonuna bağlı fibroplazi ve kollejenizasyona bağlı intimal kalınlaşma belirlenmiştir (62-64).

SAK ardından gelişen vazospazm sonrası damarlarda belirgin kalınlaşmış media tabakası ve yangısal veya hipertrofik reaksiyonel sekonder değişiklikler oluşur. Damar duvarının kalınlaşması primer olarak vasküler kontraksiyon, duvar alanında artış, adventisyanın enflamatuvar infiltrasyonuna bağlıdır. Vazospazma tunika media tabakasında oluşan değişik miktarda miyonekroz eşlik edebilir (65).

2.6.2. Vasküler Düz Kas

Damar düz kasları yavaş, tonik ve uzun süreli kasılırlar. Düz kas hücreleri sürekli bir kısmi kasılma durumunda olup damar tonusunu belirlemektedir. Bu şekilde membran potansiyelindeki değişiklikler ile kan basıncını ve organların kan akımını düzenler (66). Damar düz kas hücresinde Ca iyonu depolarizasyonda önemli katyon olup düz kasta kasılmaya sebep olurken, hiperpolarizasyonda önemli katyon olan potasyum (K) iyonu ise repolarizasyona sebep olarak gevşemeyi sağlar (67).

Eksitasyon sırasında hücre dışı Ca; hücre membrandaki Ca iyon kanallarının açılması sonucu hücre içine girerek hücre içinde kalmoduline bağlanır. Kalmodulin özel kalsiyum bağlayan bir protein yapısıdır. Kalsiyum kalmodulin kompleksi MLCK (myosine light chain kinase) adlı enzimi aktive ederek myozin hafif zincirlerini fosforile eder. Fosforilasyon sonrası miyozin başı ve aktin filamentlerinin arasında gerçekleşen çapraz bağ oluşumu vasküler düz kas hücrelerinin kasılmasına neden olur (68,69).

Damar düz kas relaksasyonu hücre membran hiperpolarizasyonu sonucu K gradienti ile tayin edilir. Vasküler düz kas hücrelerinde K^+ kanalları mevcuttur. Bunlar K_{ir} , K_{ATP} , K_v ve BK kanallarıdır. BK ve K_v kanalları özellikle vasküler tonusun düzenlenmesinde görev alır. Depolarizasyon sonrası kalsiyum artışı olduğu zaman BK kanalları açılır, hücre içindeki (+) yüklü K^+ dışarı çıkar, hücre hiperpolarize olur. L-tipi kalsiyum kanalları kapanır ve vazodilatasyon gerçekleşir (68,70-72).

Vazokonstriktör ve vazodilatör sistemlerin birlikte çalışması ile serebral arteriyel damar tonusu dengede tutulmaktadır. Endotel NO ve endotelin (ET) gibi damar üzerinde vazodilatatör ve vazokonstriktör etki gösteren maddeler üretmektedir. Normal koşullarda endotel hücrelerinden salınan NO vasküler düz kas hücrelerine difüze olarak solubl guanilat siklazı aktive etmektedir. Guanilat siklaz, siklik guanozin monofosfat (cGMP) üretmek suretiyle hücre içi kalsiyum kanallarını aktive etmekte, bunun sonucunda da düz kas hücreleri gevşemektedir (Şekil 2). SAK sonrasında ise hemoglobin NO'e bağlanarak etkinliğini azaltmaktadır. Ayrıca hemoglobinin direk olarak guanilat siklazı inhibe edici etkisi de bulunmaktadır (88). SAK sonrası inflamatuvar süreçte proinflamatuvar sitokinlerin yanında ET-1 de sentezlenmektedir. Subaraknoid mesafedeki kan pıhtısı hemolize olduktan sonra lökositlerden ET-1 sentezi indüklenmekte, ET-1 ise hem vazokonstriksiyona yol açarak hem de endotelial ve düz kas hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi ile vazospazm gelişmesine katkıda bulunmaktadır (73).

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

Fosfoinozitol yolu: Fosfolipaz C (PLC) aktive olur. Fosfatidil inozitol 4,5'i hidrolize eder ve diasilgliserol (DAG) ve IP3 oluşumuna neden olur. DAG protein kinaz C (PKC)'yi aktive eder ve vasküler kasın devamlı (sustained) kasılmasından sorumludur. IP3 ise hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyum salınmasını sağlar (74,75).

G-protein ile ilişkili yol: G_s adenilat siklazın aktive, G_i enziminin inhibe olmasına neden olur. cAMP'nin aktive olması MLCK'nın inhibe olmasına neden olarak kasılmayı inhibe eder (76,77).

NO-cGMP yolu: Bu yolda ise L-Arjininden Nitrik oksid sentetaz (NOS) tarafından sentezlenen NO, guanil siklazı (GC) aktive ederek GTP'den cGMP oluşumuna neden olur. Düz kaslarda NO $\alpha_1\beta_1$ GC'a bağlanmasıyla GTP'de cGMP sentezi gerçekleşir. cGMP inozitol reseptörlere etki eder, myoglobulin hafif zincir fosfatazı defosforile eder ve düz kaslarda relaksasyona neden olur. cGMP protein kinaz yoluyla K_V kanallarını aktive eder, voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının kapanmasıyla damar dilatasyonu olur (78).

2.6.3. İnflamasyon

SAK sonrası görülen vazospazm patogeneğinde hem nörojenik, hem de klasik inflamatuvar yanıtın rol aldığı gösterilmiştir (79).Yapılan çalışmalarda, SAK sonrası BOS'nda substance P ve kalsitonin gen ile ilişkili peptit konsantrasyonlarında artış gösterilmiştir (80). Nörojenik inflamatuvar yanıtın sorumlu bu maddeler histamin, bradikinin, 5-18 hidroksitriptamin ve ET-1 ile beraber kan-beyin bariyerinin bozulmasına yol açarak etkilerini gösterirler. SAK sonrası ekstrasöz olan kan bir takım mekanizmalarla klasik inflamatuvar yanıtın oluşmasına neden olur. Bu mekanizmalar ;

- Eritrositlerin lizisi sonucu hemoglobinin ortaya çıkması
- Lipooksijenaz, siklooksijenaz, NO sentaz enzim aktivitelerinde artış
- ET-1'in etkileri
- Komplaman ve trombinin protrombotik ve proinflamatuvar etkileri
- Trombositlerin aktivasyonu ve trombosit kökenli growth faktör üretimi
- Perivasküler ve intramural makrofaj ve granülositlerin adhezyon molekülleriyle etkileşimleridir.

2.6.4. Serbest Radikaller

Serbest radikaller dış yörüngesinde serbest bir elektron bulunduran atom veya moleküllerdir. Serbest radikal reaksiyonları normal biyolojik olaylar sürecinde geniş bir spektrum içinde yer alır. Birçok hücrel enzim ve elektron transport sisteminde katalizör fonksiyonu görebilirler. Biyolojik korunma reaksiyonlarıyla ortamdan

temizlenen bu radikaller biyolojik olaylarda ara ürün olarak ortaya çıkarlar. Aşırı miktarda serbest radikal üretilmesi normal dengeyi bozarak istenmeyen etkilere yol açar. Son derece reaktif olan serbest radikallerin, serebral iskemi, kafa travması gibi serebral hasara neden olan durumlardan sonra gelişen nöronal zedelenmede önemli role sahip oldukları belirlenmiştir.

Subaraknoid aralıktaki eritrositlerin parçalanmasıyla açığa çıkan oksihemoglobin methmoglobine çevrilirken güçlü bir serbest radikal olan superoksit (O_2^-) oluşur. Superoksitler superoksit dismutaz (SOD) ile H_2O_2 'e çevrilir (81,82). H_2O_2 oksijen toksisitesinden esas sorumlu radikal olup en hızlı, kolay oluşan ve diğer radikallerin öncüsü olan radikaldir. Mitokondrial süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile süperoksit radikal konsantrasyonu minimal düzeyde tutulup oluşan radikalın sitoplazmaya geçişi engellenmeye çalışılır. Bu radikal yüksek konsantrasyonlara ulaştığında hücreyi penetre ederek içeri girer. ATP seviyesini azaltır, hücre membranını, DNA, Ca^{++} depolarını ve mitokondri gibi hedef organelleri tahrip ederek hücrenin saniyeler içinde parçalanmasına neden olur.

Oluşan H_2O_2 kanama sonucu ortamda bulunan eritrositlerin parçalanmasıyla açığa çıkan demir ile reaksiyona girer ve hidroksi radikallerinin (OH) oluşumuna neden olur. Böylece Haber Weiss ve Fanton reaksiyonu adı verilen serbest radikal reaksiyonu başlamış olur (82).

Hidroksil radikali en aktif olan serbest oksijen radikali ve oluşması için ortamda katalizör olarak demir (Fe) ve bakır (Cu) gibi transizyonel metallerin bulunması gerekir. Hidroksil radikali hücre içindeki tüm moleküllerle reaksiyona gerçekleştirebilir.

Reaktif oksijen türevleri (ROT) aerobik canlıların hayatlarını sürdürebilmesi için gerekli biyolojik reaksiyonlarda yer alırlar ve bunlar endojen antioksidan maddelerle vücuttan uzaklaştırılırlar. Oksidatif stres; ROT ile endojen antioksidan mekanizmalar arasında olan dengenin ortadan kalkmasıdır. Sonuçta serebral vazospazmın gelişiminde en önemli faktörlerden biri olan serbest radikaller etkisiz hale getirilememiş olur. ROT proteinleri hasara uğratırlar, DNA'yı kırar ve lipid peroksidasyonunu başlatırlar. Bunun sonucunda dokular oksidatif strese maruz kalır. Oksidatif stres hücre metabolizmasında bir takım bozukluklara neden olur (83-86).

Bunlar;

DNA yapısının bozulması, intrasellüler serbest Ca^{+2} miktarında yükselme , hücre membranı iyon transportunun zarar görmesi, lipid peroksidasyonudur (86).

Serbest radikallerin biyolojik hücrel kaynakları olarak; indirgenmiş flavinler, tiyoller, epinefrin, antibiyotik gibi küçük moleküllerin oto oksidasyon, ksantin oksidaz, siklooksigenaz, lipooksigenaz, aldehid oksidaz, amin oksidaz, flavin dehidrogenaz enzimlerin katalitik siklusu, mitakondriyal elektron transport zinciri, peroksizomal oksidan enzimler, katekolaminler, granülosit aktivasyonu, vasküler endotel, demir, bakır gibi transizyonel metaller sayılabilir. Hedefleri ve toksik etkileri proteinler, nükleik asitler, DNA, karbonhidratlar, membran lipidleri ve lipid peroksidasyonu üzerine olmaktadır (87-90).

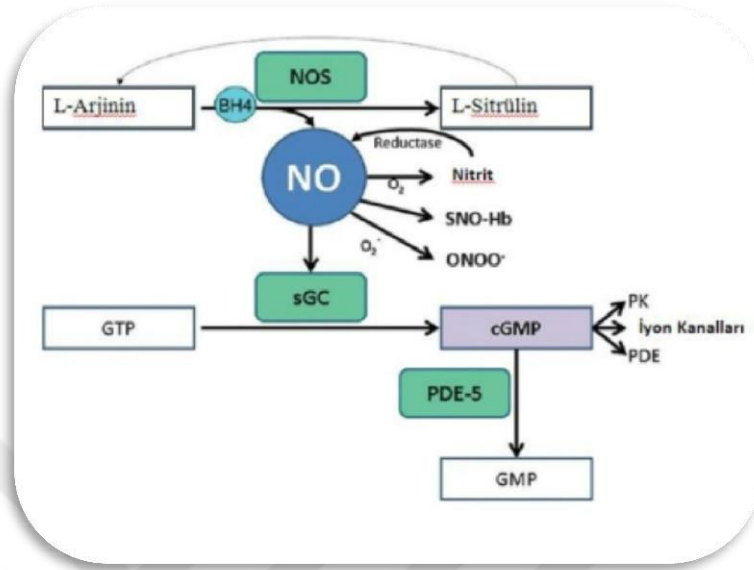
2.6.5. Endotelin

Damar düz kas tonusunu belirleyen önemli maddelerden birisi endotelindir. Vasküler endotel tarafından üretilen; belirli bir denge içinde bulunan vazokonstriktör ve vazodilatör maddeler bulunmaktadır. Bu maddelerin etkisi sonucunda damar, dış etkenlere karşı konstrüksiyon ve dilatasyona uğrayarak cevap verir. Damar endotelinden birçok maddenin salınmasına neden olan bradikinin ve asetilkolinin kaynağı damar endotelidir. Asetilkolin ve bradikinin salgılanmasına sebep olan en önemli mediyatörlerden birisi EDRF (Endotel kökenli relaksasyon faktörü)'dir. Vasküler endotelden salınan en önemli vazokonstriktör madde Endotelin 1(ET1) ve ET2 dir. Endotelin vasküler endotelden salınan bir peptittir ve son derece kuvvetli bir vazokonstriktördür (90).

Diğer endotelyal kaynaklı vazorelaksan faktörler (EDRF); NO, Ach, bradikinin, histamin, subans P, nörokinin A, nörokinin B, PGF α ; vazokonstriktör maddeler ise serotonin, PGE $_2$, Trombaksan A $_2$, norepinefrindir. NO miktarındaki azalmaya paralel olarak gelişen serebral vazospazmda esas sorumlu madde olarak bilinen en güçlü vazokonstriktör endotelindir (91-93).

Endotelinin dört izopeptid formu vardır. Bunlar ET-1, ET-2, ET-3 ve ET-4' dir. Bunlardan ET-1 SAK sonrası vazospazmda esas rol alan endotelin tipidir. ET-1,

hücre dışı mesafedeki kalsiyumun hücre içine girmesi ve intrasellüler kalsiyum artışı ile vazokontraksiyona sebep olur.



Şekil 1. NO Oluşum Mekanizması

2.6.6. Nitrik Oksid' in (NO) vazospazm üzerine etkisi

Nitrik Oksid, L-Arjiinden NOS enziminin katalize ettiği reaksiyonla sentezlenir. Daha sonra NO sGC adlı enzimi aktive ederek, GTP'den cGMP oluşumuna neden olur. İki farklı GC vardır. NO-sensitif GC ve natriüretik peptid (NP)-activated GC. Tüm dokularda bu enzimin $\alpha_1\beta_1$ formu bulunur. Beyinde ise $\alpha_2\beta_1$ izoformu bulunur (94).

NO serebral dolaşımında dengenin sağlanması için önemli bir modülatör olup güçlü vazodilatör etkili, endotel bağımlı gevşetici faktör olarak kabul edilir (52,95). NO vücuttaki en potent vazodilatatördür (96). NO çok kısa yarı ömre, hızlı ve güçlü vazodilatör etkiye sahiptir.

NO lipofilik olmasından dolayı hücre duvarından kolaylıkla geçer. Hücre içinde solubl guanilat siklazı ve hücre içinde artan cGMP protein kinaz G yi aktive ederek miyozin hafif zincirinde defosforilasyon oluşturur. NO trombosit agregasyonunu ve adezyonunu engeller, damarlarda ve düz kaslarda belirgin dilatasyon yapar (97). Vazospazm gelişmesindeki en önemli sebeplerden birisi subaraknoid aralıkta bulunan kan yıkım ürünlerine karşı gelişen, inflamatuvar yanıt sonucu nötrofillerin ortamda bulunan NO' i tüketmesidir (98). Vazospazmda NO' in

vazodilatatör etkisinin kaybolmasının yanısıra, NO yıkımına bağlı olarak ortaya çıkan nitrojen ürünlerinin toksisitesi ve damar duvarına verdikleri zarar da etkilidir (99).

Vazospazmda endotel yapısının bozulması sonucu vasküler tonusu düzenleyen endotelin ile NO arasındaki denge bozulmuştur. NO azalması trombosit agregasyonunu ve düz kas proliferasyonunu uyarak damar gevşemesini engeller (50).

2.6.7. Subaraknoid kanama sonrası Serebral Kan Akımı

SAK sonrası erken dönemde serebral kan akımı kontrolü bozulur. Bunun sebebi çoğunlukla İKB artışına sekonder gelişen beyin kan akımı azalmasıdır. Serebral metabolizma SAK'tan sonra 'uyku' moduna geçer. Ancak bu durum geçicidir. Vazospazm geliştiğinde ise kemoregülasyon bozulur, serebral kan hacmi artar, serebral kan akımı azalır. Bunun nedeni proksimal arterlerin konstrükte olması, distal damarların ise dilatasyonudur. SAK'ın erken döneminde bozulmuş olan SKA otoregülasyonu bu dönemde iyice bozulur. Bunun nedeni ise normal şartlar altında kemoregülasyonun eNOS'lar tarafından düzenlenmesi ve vazospazmda bu fonksiyonun bozulması damarların nöronal kontrolünün kaybolmasıdır. NO-bağımlı regülatör sistemlerin hasar görmesi otoregülasyonun kaybolmasına neden olur (100-102).

2.6.8. Apopitoz

SAK sonrası nöronlarda ve serebral vasküler dokularda iskemi; subaraknoid alandaki kanın yaptığı basınç, inflamasyon, serebral kan akımının otoregülasyonunun bozulması, endotelial vasküler hücre hasarı, endotelin artması / NO azalması, vazokonstriksiyon gibi daha birçok mekanizma sonucunda gelişir. İskemi sebebiyle hücre içi ATP azalması sonucunda hücre duvarındaki Na/K, ATPaz, 3Na/Ca ve Na/H transport pompaları işlevlerini yerine getiremez. Hücre içi Na miktarındaki artış L tipi voltaj duyarlı kalsiyum pompalarının açılmasına neden olarak hücre içi kalsiyum miktarını yükseltir. Sonuçta glutamat gibi eksitatör aminoasitler sinaptik aralığa salınır. Böylece NMDA reseptörleri aktive olarak kalsiyumun hücre içine girişini

hızlandırır. Hücre içi kalsiyum seviyesinin artmasında lipaz, fosfolipaz, proteaz, endonükleaz gibi hücredeki yıkıcı enzimlerin artışına neden olur. Bu durum apoptoza yol açan etmenlerin aktivasyonuna yol açar. Sonuç olarak; oksihemoglobin, trombin, sitokinler, proteazlar, endonükleazlar, metHb, bilirubin, serbest radikaller apoptoz mekanizmasını harekete geçirirler (103-106).

Apoptozun hücredeki bulgularına baktığımızda nükleusta bulunan kromatin yapısının yoğunlaştığı ve ayrılmalar gösterdiği, sitoplazmanın yoğunlaştığı, nükleer yapının bütünlüğünün bozulduğu görülmektedir (107, 108).

2.6.9. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, oksidatif düzenin bozulmasına neden olan serbest oksijen radikallerinin (hidroksil radikali, süperoksit radikali ve hidrojen peroksit) artışı (ROS) ile onları vücutta zararsız hale getirmek için bazı tepkimelere giren maddeler olan antioksidanların yetersizliği sonucu oluşur. Oksidatif stresin artması ile serbest oksijen radikallerinin ortamdaki miktarının artması sonucu hücre içi lipit ve proteinlerin atomik yapıları bozularak zincirleme oksidasyon reaksiyonları başlar. Sonuç olarak hücre duvarı, hücre içi protein, lipit ve DNA gibi makromoleküller hasarlanarak hücre ölümü gerçekleşir. Serbest radikallerin hasarı sonucu ortama salınan protein karbonil (PCO), malondialdehit (MDA) , 8-hidroksiguanin (8-OHG) vb. toksik ürünlerin vücut sıvıları ve dokularda biyokimyasal yöntemlerle değerlerinin ölçülmesi sonucunda oksidatif hasar olduğu tespit edilir.

2.6.9.1. Total Antioksidan Seviye (TAS)

Serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bu yöntem Erel tarafından tanımlanmıştır (109). Fenton tipi reaksiyon kullanılarak Fe^{2+} - o-dianisidine bileşiği hidrojen peroksit ile OH radikalini ortaya çıkartır. Güçlü bir reaktif oksijen türevi olan OH radikali o-dianisidine ile reaksiyona girerek dianisidyl radikallerini oluşturur. Ortamda bulunan dianisidyl radikalleri ile serbest oksijen radikalleri arasında gerçekleşen reaksiyonlar sonucu renk oluşumu artmaktadır. Örneklerdeki antioksidanlar gerçekleşen oksidasyon reaksiyonlarını bozarak renk

oluşumunu önler. Bu reaksiyon spektrofotometrik yöntemlerle otomatik analizatörlerde ölçülerek hesaplanır.

2.6.9.2. Total Oksidan Seviye (TOS)

Kolorimetrik olarak Erel tarafından geliştirilen bu yöntemde ölçüm yapılacak materyalde bulunan oksidanlar ferröz iyon-odanisidine bileşimini ferrik iyon oksitler (110). Ortamdaki gliserol katalizör görevi göstererek reaksiyonu yaklaşık 3 katı kadar hızlandırır. Sonuçta ferrik iyonlar asidik ortamda xilenol orange ile renkli bir bileşik oluştururlar. Rengin şiddetiyle ortamda bulunan oksidanların miktarı orantılı olarak spektrofotometrik yöntemle ölçülmektedir.

2.6.9.3. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) ; Total Oksidan Seviye (TOS) 'nin, Total Antioksidan Seviye (TAS)'ye bölünmesiyle hesaplanır.

2.6.10. Pulsed Elektromanyetik alan ve etki mekanizması

İyonize radyasyon etkisiyle hücrede serbest radikaller oluşur. Bunlar apoptoz sonucu hücre ölümünü başlatırken elektromanyetik alanların (EMA) etkisiyle oluşan elektrik potansiyeli, hücrelerdeki iyonik yükleri manyetik alan çizgisi tarafına doğru yer değiştirmeye zorlar (111,112). EMA'nın hücreler üzerine etkisini belirleyen faktörler dalga boyu, şiddeti ve frekansıdır. PEMF, çok kısa süreli, yüksek yoğunluklu elektromanyetik darbe ve çoklu frekanslar sağlar. Düşük frekanslı uygulamalarda manyetik alan etki ederken, yüksek frekanslı uygulamalarda elektrik alan ve ısı etkisi ile sonuç verir. Tedavide kullanılan EMA ise şiddeti mikrottesla (μT) ya da en fazla birkaç militeslayı (mT) geçmeyen, frekansları çok düşük tutulan alanlardır. Pulsed elektromanyetik alanlar (PEMF) dokular üzerindeki etkilerini faraday akımı üreterek gösterir (113).

Elektromanyetik alanların biyolojik davranışı hücre içi ve çevresinde elektriksel değişikliklere yol açmasıdır. PEMF uygulaması sonucu dokular üzerindeki kan akımı artar, oksijen basıncı yükselir, yeni damar oluşumu ile metabolitlerin birikmesi önlenir (114,115). Patoloji gelişen hücrelerde, hücrenin her iki kutbunda

düzgün dağılım gösteren pozitif ve negatif yükler hücrede gelişigüzel bir dağılım göstererek yayılır. PEMF etkisi sonucunda bozulan yük dağılımı düzelerek hücrenin iyonları normal pozisyonuna döner. Normal hücre zarında istirahat potansiyeli -90 mV iken inflamasyon durumunda -120 mV, dejeneratif durumda ise +30 mV olur. PEMF etkisiyle elektromanyetik alan hücre fonksiyonlarının düzelmesini sağlar. Hasarlı hücrede PEMF etkisi ile kan akımının artması sonucu iyon yerleşimleri düzelir, dolaşım sağlanarak, hücrenin tekrar oksijen ihtiyacı yeniden karşılanacak duruma gelerek biyolojik reaksiyonlar tekrar başlar. İyileşme dönemi başlayarak hücre zarı istirahat potansiyeline geri döner (116). PEMF etkisinin hedefi hücre zarıdır. Manyetik alanlar hücre zarında bulunan kanallardan Na-K pompasını uyarır, Ca metabolizmasını değiştirir, hücre zarında iletimin sağlanmasını yönlendiren reseptörlerin bağlı kalma süresini ve dağılımını etkiler (117,118). Yapılan çalışmalarda PEMF tedavisi sonucu anti-inflamatuar, neovaskülarizasyon, rejeneratif etkilerin ortaya çıktığı bildirilmiştir. Manyetik alan hücrelerin genişlemesine ve daralmasına neden olur. Bunun sonucunda lenf sıvısını, kan-oksijeni hücrelerde hareket ettirir ve hücrelerin dolaşımına izin vererek hücrelerin detoksifiye olmasına yardımcı olur. Manyetik alan, hücrelerin kendilerini yeniden şarj etmelerine yardımcı olur.

2.6.11. Elektromanyetik Alan Uygulamaları

2.6.11.1. Merkezi Sinir Sistemine Etkileri

Sinir yaralanması sonrasında sinir hücrelerinde hiperpolarizasyon gelişerek hücrenin uyarılması zorlaşmaktadır (119). Ratlar üzerinde yapılan çalışmalarda anestezi altında siyatik sinir hasarı oluşturulmasının ardından puls uygulanması ile miyelin kılıf rejenerasyonu sağlanarak siyatik sinirde iyileşme izlenmiştir (120). Bir başka çalışmada,PEMF uygulamasının sinir zedelenmesi sonrası iyileşmeyi hızlandırdığı belirtilmiştir (121). Yapılan çalışmalarda farklı şiddetlerle uygulanan PEMF sonrasında; purkinje hücre sayısında azalma, hipotalamusta nöron büyümesi ve norepinefrin / dopamin miktarında azalma, beyin hücreleri ısısında yükselme, EEG frekanslarında değişim gözlenmiştir (122-124). Ayrıca KBB geçirgenliğinde

de artma izlenmiştir. Beyinde peroksidaz düzeyinde artma, myelin dejenarasyonu ve glial hücre proliferasyonunda yükselme gözlenmiştir (125,126).

2.6.11.2. Kardiyak Fonksiyonlar

Kalp hızı değişkenliği (HRV) üzerinde yapılan çalışmalarda EMA'nın kardiyovasküler cevaptaki sempatik sinir sistemi aktivitesini etkileyebileceği belirtilmiştir. Diğer bir çalışmada 17 günlük EMA maruziyeti sonucunda bradikardi ve EKG'de değişiklikler izlenmiştir. Hem kan basıncında hemde kalp ritminde düzensizlikler görülebilmektedir (127,128).

2.6.11.3. Hematolojik Sistem

Hematokrit ve lenfosit düzeyinde artma, lökosit hücrelerinde azalma saptanmıştır (129,130).

2.6.11.4. Osteonekroz

Yapılan bir çalışmada spoontan diz osteonekrozu olan 30 hastaya 1.5 mT, 75 Hz ile PEMF tedavisi uygulanmış dizdeki nekroz alanının ve diz ağrısının azaldığı bildirilmiştir. PEMF tedavisinin ROS üretimini azaltarak osteoblast aktiviteyi arttırdığı, antinflamatuar etkisinin olduğu ve iyileşme hızını arttırdığı gösterilmiştir (131,132).

2.6.11.5. Osteoporoz

PEMF tedavisinin osteoporoz üzerindeki etkisini araştıran 111 çalışma incelenerek hazırlanan bir derlemeye göre primer osteoporozda osteoblastik aktiviteyi arttırdığı ve ağrıyı azalttığı sekonder osteoporozda ise kemik mineral yoğunluğunu arttırdığı bildirilmiştir (133). Kullanmamaya sekonder gelişen osteoporozda PEMF tedavisinin kemik kitle kaybını düşürdüğü ve ileri yaş kadın hastalarda kemik mineral yoğunluğunu arttırdığı izlenmiştir (134,135).

2.6.11.6. Osteoartrit

Yapılan çalışmalarda servikal osteoartritli hastalarda PEMF uygulananlarda eklem fonksiyonlarında iyileşme, ağrıda azalma, eklem hareket açıklığında düzelme izlenmiştir. Diz osteoartritinde yapılan bir çalışmada ise PEMF tedavisinin ağrıyı azaltmada, eklem fonksiyonlarında izlenen düzelme ile günlük aktiviteler üzerine olumlu etkiler gösterdiği bildirilmiştir (136,137).

2.6.11.7. Fibromiyalji ve Romatoid Artrit

Fibromiyalji kronik bir romatolojik problemdir. Yapılan bir çalışmada fibromiyalji tanılı hastalara kulaklık benzeri bir cihaz ile PEMF tedavisi uygulandıktan sonra hastaların VAS skorlarında azalma izlendiği bildirilmiştir. Ayrıca romatoid artrit sekonder diz ağrısında manyetik alan uygulamasının ağrıyı azalttığı yönünde çalışmalar vardır (138).

2.6.11.8. Antioksidan Sistem Üzerine Etkileri

Antioksidan ve oksidatif stres parametrelerinde değişiklikleri inceleyen bir çalışmada inflamatuvar koşullarda farmakolojik tedavilere karşın noninvaziv bir yöntem olan PEMF tedavisinin etkileri incelenmiştir. Ratlar üzerinde yapılan, oksidatif stress ve antioksidan düzeylerinin incelendiği bir çalışmada dokular üzerine incelendiğinde inflamasyon sonrası hücrelerde glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) düzeylerinin yükseldiği, malondialdehit (MDA) seviyelerinin arttığı, PEMF uygulama sonrasında ise CAT, SOD ve GPx aktivitelerinin arttığı ve MDA düzeyinin azaldığı görülmüştür (139).

2.6.11.9. Diyabet

Diyabet üzerine PEMF' in etkilerini inceleyen bir çalışmada streptozotosin düzeyine etki görülmezken kan şekerini düşürdüğü bildirilmiştir. Azalan vücut ağırlıklarına etki etmemesine rağmen kan şekerinde düşüş görülmüştür PEMF tedavisinin diyabet hastalarında gelişen polinöropatinin üzerinde azaltıcı etkiye sahip olduğu, sinir iletiminde hızlanmaya neden olduğu gözlenmiştir (140).

2.6.11.10. Kırık

Yapılan alışmalarda PEMF tedavisinin kaynama zamanını kısalttığı, bağ dokusunda ekstraselüler matriks proteinlerini kodlayan gen ekspresyonunu düzenleyerek kırık ve kemik doku oluşumunu ve osteoblastları uyarak osteoblastlar üzerinden kemik oluşumunu arttırdığı izlenmiştir (141).

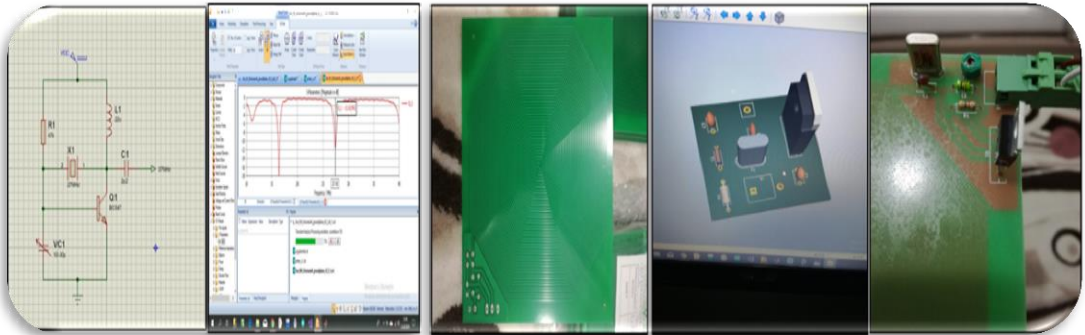


3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Etik Kurulu tarafından deneysel araştırmalar için belirlenen kurallar ve prosedürler doğrultusunda, gerekli onay (08/07/2020 tarih DA04/01 sayı) alındıktan sonra yürütülmüştür. Çalışmada ağırlıkları 250 ile 350 gram arasında Wistar –Albino türü dişi toplam 24 adet rat kullanılmıştır. Ratların genel sağlığı çalışma öncesi kontrol edilmiş ve her rat yer aldığı gruba göre uygun yöntemle işaretlenmiştir. Deney süresince ratlar oda sıcaklığında (21°C - 22°C) ve nem ($60\% \pm 5\%$) olacak koşullarda, 12 saat karanlık - 12 saat aydınlık döngüde olacak şekilde kafesler içerisinde tutulmuştur. Bütün denekler ticari yem (Korkuteli Yem, Antalya, TURKEY) ile beslenmiştir.

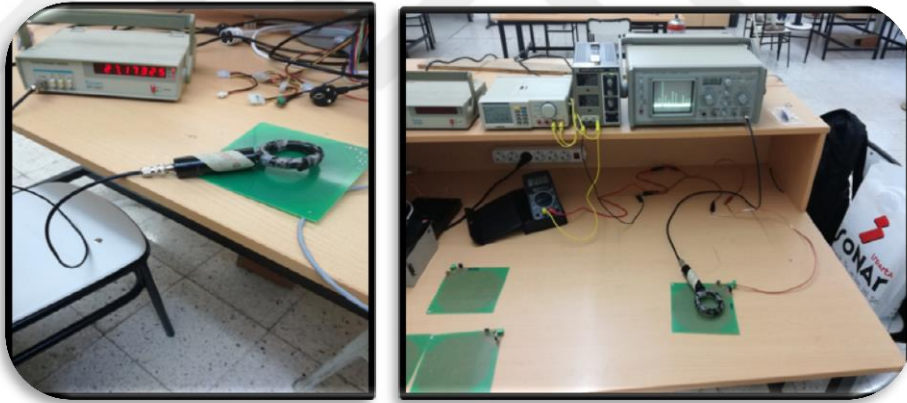
3.1. PEMF Çalışma Tasarımı Uygulaması

Bilindiği üzere 27.12 MHz ISM Bandının Tıbbi Uygulama için ayrılmış kısmında yer alır (IEEE C95, 2019). Bu çalışmada 27.12 MHz merkez frekansında çalışan kuartz kristal osilatör devresi ve osilatör çıkışını yükselten bir güç transistörlü (2SC 2020) yükselteç tasarlanmıştır. Tasarım için CST Studio Suite 3D simulation (Oxfordshire, UK) bilgisayar programı kullanılmıştır. Devre kartı üzerinde ayrıca spiral formda pcb anten tasarımı da yapılmıştır. Böylece anten kablo bağlantısı olmadığından bağlantı kayıplarından da kurtulunmuştur. PCB antenden RF yayılım ve ışıma örüntüsünün beklenildiği gibi olduğunun doğrulaması için simülasyon sonuçları kullanılmıştır. Devre şeması ve simülasyon görüntüleri Şekil 2.' de görülmektedir.

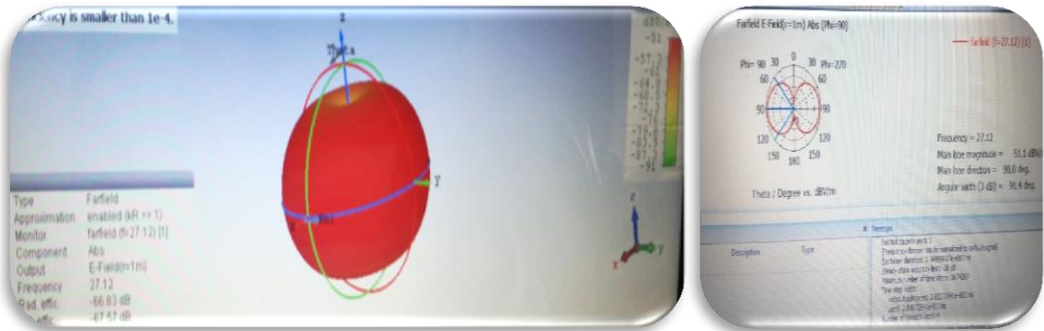


Şekil 2. Osilatör ve Yükselteç Devresi Simülasyon Çıktıları

Anten ve osilatör devresinin tasarlandığı şekliyle montajından sonra her bir kart 12 V_{dc} gerilim ile beslendi ve alan ölçer ile ışıma değeri ve PEMF alan homojenliği ölçüldü ((MUSTOOL MT-525 (CHINA), ELF meter PF-4 (CHINA), (EXTECH 480836 (USA). Bu cihazlar yayılan enerjiyi x, y, z boyutlarından gelen değerleri ile göstermenin yanında tüm yönlerden alınan değerlerin ortalamasını da vermektedir. Böylece PEMF alanın maruziyetinin her noktada aynı olduğundan emin olunmaktadır. Her Eurotype-2 pleksiglas kafeste 2 hayvanın maruziyeti planlandığı için hayvanların kafeste hareket etmelerinde de vücutlarının yaklaşık mükemmel homojen maruziyet alması için pcb anten devrelerinden ikisinin çapraz montajının yeterli olacağı simülasyon sonuçlarından anlaşılmıştır. Ayrıca yayılım frekansında dalga boyu düşünüldüğünde (11 m) kafes maruziyet düzeneğinin her noktası kaynağın yakın alan bölgesi içinde olmaktadır. Dolayısı ile deneylerin her aşamasında ve ölçümlerde frekansa uygun bir yakın alan probu anten olarak kullanılmıştır. Ölçüm düzeneği Şekil 3 de görülmektedir. Ayrıca Şekil 4 te PEMF maruziyet sisteminin anteninden yayılan enerjinin simülasyonu verilmektedir.



Şekil 3. Maruziyet Sisteminin Işıma Örüntüsü



Şekil 4. Maruziyet Sisteminin Işıma Örüntüsü

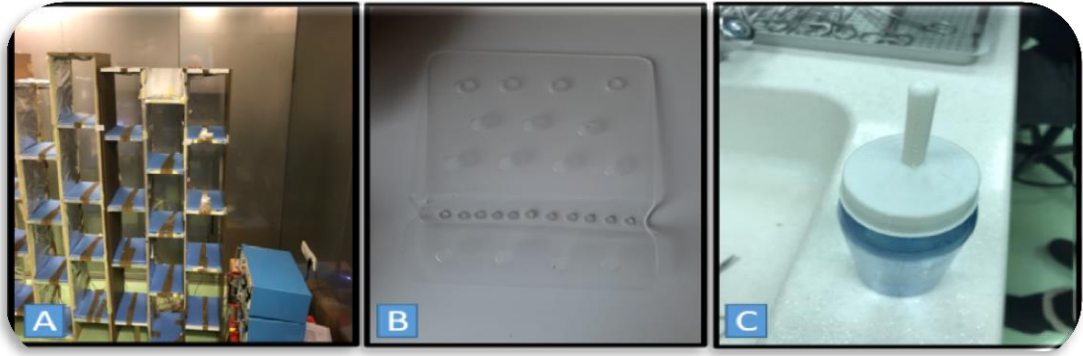
Böylece her kafesin üzerinde hedef olan 10 V/m elektrik alan yoğunluğu verecek şekilde devrelerin beslemeleri ve ayarları yapılarak deneylere başlanmıştır. Deney adımlarının her aşamasında Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Elektrik-Elektronik Mühendisliği bölüm laboratuvarlarında bulunan spektrum analizörler (ROHDE- SCHWARZ FSH6 spektrum analizör USA, PROMAX AE-566 spektrum analizör, USA) kullanılmıştır. Bilimsel literatürde bu tür maruziyet düzeneklerinin dış ortamdan izole edilmesi gerektiği vurgulanmaktadır. Bu nedenle deneylerin gerçekleştirildiği Süleyman Demirel Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Laboratuvarının elektromanyetik izole odasının ekranlama verimliliği bu çalışma frekansı (27.12 MHz) için (80 dB) olarak ölçülmüştür. Ayrıca ortamdaki olası tekrarlayan yansımaların bozucu etkilerinin minimize olduğu da yukarıda özellikleri verilen spektrum analizör cihazları ile doğrulanmıştır.

3.2. PEMF Prosedürlerinin Özellikleri, Özel Kafesler ve Uygulama

Cihazı

PEMF uygulaması: Tüm ratlar özel donanımlı kafeslere konularak Şekil 5'te gösterildiği gibi PEMF uygulama cihazına yerleştirildi. 27.12 MHz frekanslı PEMF'yi hazırlamak için 10 V / m elektrik alan şiddeti değeri kullanıldı. Bu devrenin çıkış transistörünün güvenlik sınır değeri olması nedeniyle amaçlanmıştır. Her hayvan, ayrı ayrı euro tip 2 kafeslere yerleştirildi. PEMF ünitesindeki kafesler arası paraziti önlemek için her bölmenin duvarları alüminyum ile kaplanmıştır (Şekil 5). Litaratürden bilindiği üzere PEMF'e 30 dakika maruz kalmak NO sentezini arttırmaktadır (1).

PEMF cihazı 30 dakika çalıştırılıp 1,5 saat durdurularak uygulandı ve böylece 24 saatte 12 kez vardiyalı olarak çalıştırılmış oldu.



Şekil 5. PEMF Uygulama Sistemi ve Kurulumu

A) PEMF cihazı 27.12 MHz frekans içerir

B) Fareyi PEMF'den korumak için mika'dan yapılmış Euro tip 2 kafes kapağı

C) PEMF den etkilenmeyecek metal yerine yapılan suluk başlığı

3.3. Anestezi

Ratlarda genel anestezi 12 Saat açlık sonrası Ketamin 80-100 mg/kg (Alfamin, Alfasan IBV) /Xylazin 8-10 mg/kg (Alfamin, Alfasan IBV) anestezi karışımının intraperitoneal enjeksiyonu ile sağlanmıştır (96). Spontan solunumu inhibe etmeyecek şekilde ratların ağrı hissi duymayacağı şekilde ek doz uygulanarak anestezi verilmiştir. Deney esnasında ratların vücut ısısı rektal ısı probu ile kontrol edilerek 37 C° sabit tutulmuştur. İşlem sırasında nasal maske ile 1.5 lt/dk. dan O₂ verilmiştir. Cerrahi sonrası ratlar normal oda ısısında (20-22 C°) tutulmuşlardır.

GRUPLAR	1. Gün	2. Gün	3. Gün	4. Gün
Grup 1	SF	PEMF (-)	PEMF (-)	Dekapitasyon
Grup 2	SAK	PEMF (-)	PEMF (-)	
Grup 3	SAK + PEMF	PEMF (+)	PEMF (+)	
Grup 4	PEMF + SAK	PEMF (+)	PEMF (+)	

Şekil 6. Deneysel Protokol Şeması

3.4. Gruplar

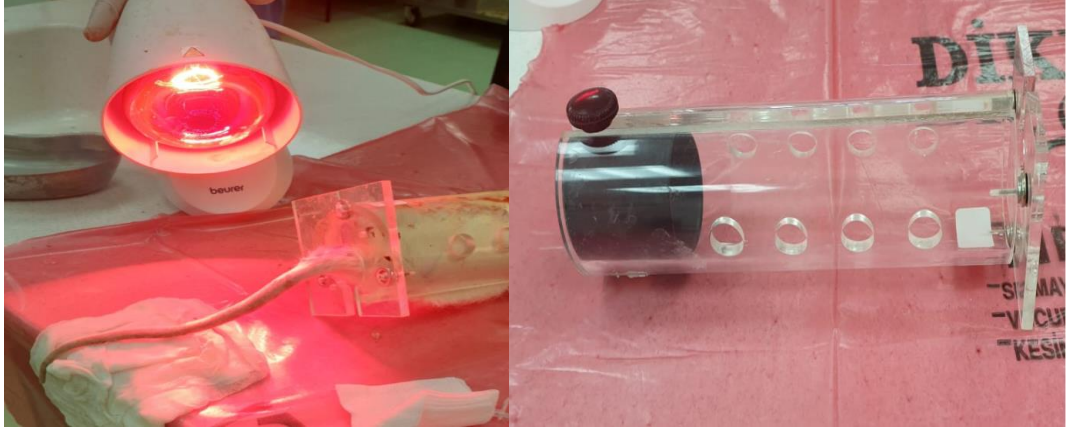
Ratlar, her biri altı rat içeren aşağıdaki dört gruba ayrıldı: kontrol, SAK, SAK+PEMF ve PEMF+SAK grupları.

Tablo 3. Çalışma Gruplarının Özeti

GRUPLAR	RAT SAYISI	TEDAVİ PROTOKOLÜ
Grup 1 (Kontrol)	6	SAK ve tedavi yok
Grup 2 (SAK)	6	SAK sonrası tedavi yok
Grup 3 (SAK +PEMF)	6	SAK+ PEMF tedavisi
Grup 4 (PEMF + SAK)	6	Proflaktik PEMF +SAK+PEMF tedavisi

3.4.1.1. Grup 1 (Kontrol) (n:6)

Genel anestezi sağlandıktan sonra, ratların inion ile atlas arası traş edildi. Batticon® ile steril saha temizliği yapıldıktan sonra anterior servikale spanç konularak ratın başı 45 derece fleksiyona getirildi. Occipitoservikal aralık açıldı. 2 cm uzunluğunda inion- atlas arası mesafeye cilt insizyonu yapıldı. Cilt altı doku geçildi, oksipital adale her iki tarafta bilateral olarak künt diseksiyonla oksipital kemikten disseke edildi. Sonrasında posterior servikal adaleler disseke edilerek atlantooksipital membrana ulaşıldı (Şekil 8).Bu gruptaki hayvanların sisterna magna bölgesine 0.3 ml salin (SF) uygulandı. SAK oluşturulmadan PEMF uygulamak için hazırlanmış özel donanımlı kafeslere PEMF e maruz bırakılmadan koyuldu. SAK oluşturulmayan bu gruptaki ratlara deneyin 4. Gününde pentobarbital sodyum (120 mg/kg) verilerek dekapitasyon yapılmıştır. Abdominal insizyon yapılarak V.Cava İnferiordan kan alınarak cerrahi eksanguinasyon yöntemi uygulanıp kan örnekleri alındı. Dekapitasyonu takiben kafa kaidesi açılıp beyin dokuları korteks, hipokampus ve serebellum olmak üzere ayrılarak biyokimyasal, genetik ve histopatolojik değerlendirmeler için diseke edildi. Örnekler alındı ve -80 derecede saklandı.



Şekil 7. Kan Alımı İçin Kullanılan Restrainer

3.4.1.2. Grup 2 (SAK) (n:6)

Özel olarak hazırlanan restrainerlara ratlar konularak kuyruk bölgesi steril edildi. Traş edilerek kuyruk arteri kızılötesi ısıtıcı lamba ile ısıtılarak vazodilatasyon sağlandı. Kuyruk arteri kateterize edildikten sonra 0.4 ml/kg'a nonheparinize arteriyel kan alındı ve sonrasında genel anestezi sağlandı, ratların inion ile atlas arası traş edildi. Batticon® ile steril saha temizliği yapıldıktan sonra anterior servikale spanç konularak ratın başı 45 derece fleksiyona getirildi, Oksipitoservikal aralık açıldı. 2 cm uzunluğunda inion- atlas arası mesafeye cilt insizyonu yapıldı. Cilt altı doku geçildi, oksipital adale bilateral olarak künt diseksiyonla oksipital kemikten disseke edildi. Posterior servikal adaleler disseke edilerek atlantookspital membrana ortaya konuldu (Şekil 8). Ucu 90 derece açı verilmiş 32G iğne ucu kullanılarak sisterna magnaya girildikten sonra 0.5 cc BOS boşaltılmasını takiben kuyruk arterinden alınan kan sisterna magnaya 30 saniye sürede enjekte edildi. Enjektör giriş noktasında sızıntıyı önlemek için iğne ucu 3 dakika boyunca çıkartılmadan bekletildikten sonra ratlara 10 dakika boyunca trendelenburg pozisyonu verildi (Şekil 7). Ratlar ısıtıcı altında uyandırıldıktan sonra PEMF işlemi yapılacak kafeslerine alındı ancak PEMF işlemi uygulanmadı. Deneyin 4. gününde ratlara pentobarbital sodyum (120 mg/kg) verilerek dekapitasyon yapıldı. Abdominal insizyon yapılarak V.Cava İnferiordan kan alınarak cerrahi eksanguinasyon yöntemi uygulanıp kan örnekleri alındı. Dekapitasyonu takiben kafa kaidesi açılıp beyin dokuları korteks, hipokampus ve serebellum olmak üzere ayrılarak biyokimyasal,

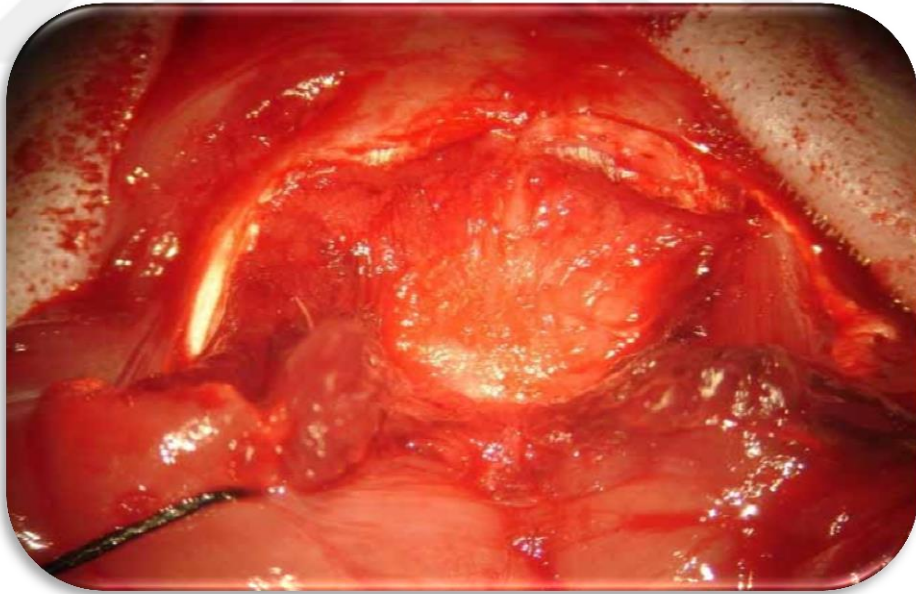
genetik ve histopatolojik değerlendirmeler için diseke edildi. Alınan rnekler -80 derecede saklandı.

3.4.1.3. Grup 3 (SAK+Terapötik PEMF 27.12 MHz) (n:6)

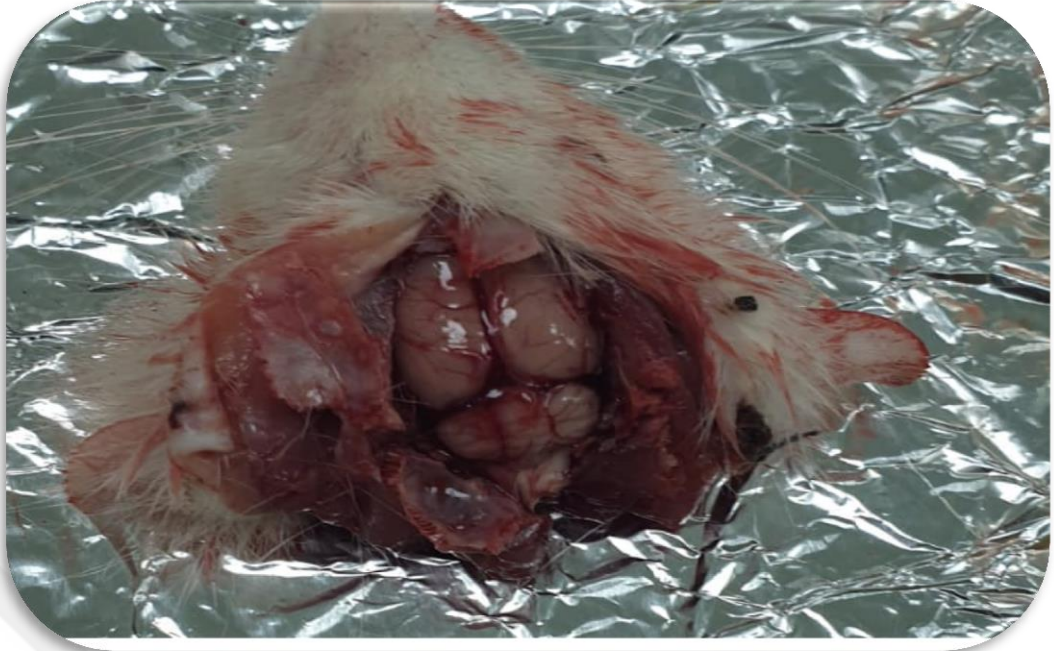
Aynı yöntemle ratlara SAK oluşturulduktan 30 dakika sonra hazırlanmış özel donanımlı kafeslerde PEMF uygulandı. PEMF cihazı 30 dakika çalıştırılıp 1,5 saat durdurularak uygulandı ve böylece 24 saatte 12 kez vardiyalı olarak çalıştırılmış oldu. Deneyin 4. gününde ratlara kontrol grubundaki işlemler uygulandı.

3.4.1.4. Grup 4 PEMF+SAK (Profilaktik PEMF 27,12 MHz+SAK) (n = 6)

Bu gruptaki hayvanlara SAK oluşturmadan önce 30 dakika özel donanımlı kafeslerde profilaktik PEMF ve SAK oluşturulmasından 30 dakika sonra PEMF uygulandı. PEMF cihazı 30 dakika çalıştırılıp 1,5 saat durdurularak uygulandı ve böylece 24 saatte 12 kez vardiyalı olarak çalıştırılmış oldu. Deneyin 4. gününde ratlara kontrol grubundaki işlemler uygulandı.



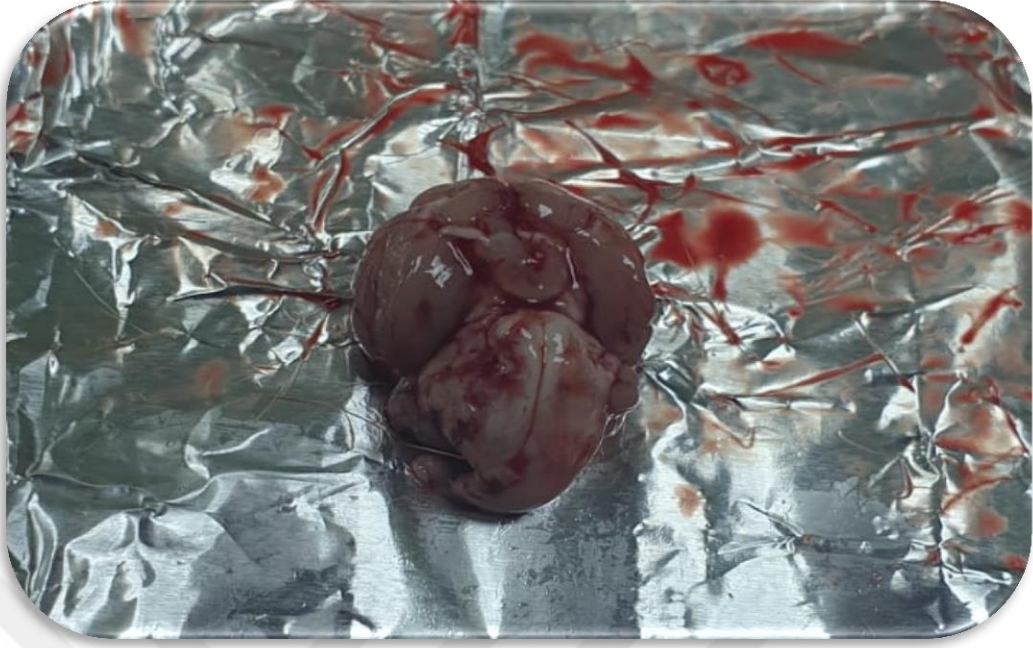
şekil 8. Atlantooksipital Membran



Şekil 9. Subaraknoid Hemoraji



Şekil 10. Prepontan Sisternlerdeki ve Baziller Arter Etrafındaki Subaraknoidal Kanama



Şekil 11. Preontin Sisternlerdeki ve Baziller Arter Etrafındaki Subaraknoidal Kanama

3.5. Verilerin Toplanması

3.5.1. Biyokimyasal ve Genetik Analizler

3.5.1.1. Beyin Dokusunda Oksidatif Stres Parametrelerinin Ölçümü

Beyin dokusu örnekleri oksidan-antioksidan analiz için bir vorteks karıştırıcı (Thermo, ABD) kullanılarak ayrıştırıldı. Serum TAS, TOS ve OSI değerleri, modifiye Erel yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. Serumdaki TAS ve TOS sonuçları sırasıyla $\mu\text{mol Trolox Eq / L}$ ve $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq / L}$ olarak ifade edildi. Dokular için TAS ve TOS sonuçları protein değerine göre bölünerek ifade edildi. OSI, $\text{OSI} = \text{TOS} / \text{TAS}$ formülü kullanılarak hesaplandı (160). Serum TAS, Erel tarafından geliştirilen yeni bir otomatik kolorimetrik ölçüm yöntemi kullanılarak ölçüldü. Bu yöntemde, numunedeki antioksidanlar, koyu mavi-yeşil renkli 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikalini renksiz indirgenmiş ABTS formuna indirgemektedir. 660 nm'de absorbans değişikliği, numunenin toplam antioksidan seviyesi ile ilgilidir. Bu yöntem, numunenin üretilen hidroksil radikalleri tarafından başlatılan güçlü serbest radikal reaksiyonlarına karşı

antioksidatif etkisini belirler. Sonuçlar, litre başına milimolar Trolox eşdeğeri olarak ifade edilir (142). Plazma TOS'u, açıklanan yeni bir otomatik kolorimetrik yöntem kullanılarak ölçüldü. (143). Bu yöntemde, numunede bulunan oksidanlar, demirli iyon-dianisidin kompleksini demir iyonuna oksitler. Oksidasyon reaksiyonları ortamda bol miktarda bulunan gliserol molekülleri tarafından geliştirilir. Ferrik iyon, asidik bir ortamda ksilenol turuncuyla renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, numunede hali hazırda mevcut olan oksidan moleküllerin toplam miktarı ile ilişkili bulunmuştur. Tahlil, hidrojen peroksit ile kalibre edildi ve sonuçlar, litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eqv./L}$) cinsinden ifade edildi (142).

3.5.1.2. Kantitatif RT-PCR Analizi ile Total RNA İzolasyonu ve Ekspresyonu

Toplam RNA ekstraksiyonu ve saflaştırma

Toplam RNA, üreticinin talimatlarına göre Monarch Total RNA izolasyon kiti (New England BioLabs) kullanılarak ratların beyin dokusundan izole edildi. RNA konsantrasyonu ve saflığı, MySPEC mikrohacim spektrofotometresi (VWR) ile belirlendi.

cDNA sentezi

cDNA'lar, iScript™ cDNA Sentez kiti kullanılarak sentezlendi (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California). Ters transkripsiyon, üreticinin protokolüne göre numune başına 1 μg mRNA ve oligo dT primerleri kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı 5 dakika 25 ° C'de, 20 dakika 46 ° C'de ve 1 dakika 95 ° C'de inkübe edildi.

3.5.1.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)

Gerçek zamanlı PCR amplifikasyonu, iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) ve CFX96 Real-time PCR System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) kullanılarak gerçekleştirildi ve izlendi. AKT1, Hif-1 α , eNOS ve GAPDH'ye karşı özel primerler tasarlanmıştır. Tüm primer

dizileri Tablo 1'de listelenmiştir. CDNA örnekleri, her PCR için üç kopya halinde analiz edilmiştir. Transkriptler için kat değişikliği, temizlik geni GAPDH'ye (Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz) normalize edildi. Aşağıdaki PCR koşulları kullanıldı: 95 ° C'de 10 dakika denatürasyon, ardından 45 döngü: 95 ° C'de 10 saniye, 60 ° C'de 30 saniye. Gen ifadesinin görelî nicelendirmesi, karşılaştırmalı $\Delta\Delta C_t$ yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. RT-qPCR sonuçları, bir kat değişimi olarak grafiklerde sunuldu.

Tablo 4. Çalışmada Beyin İçin Kullanılan Primer Dizileri

Gen Adı		Astar Dizisi
eNOS (RAT)	Forward	GTGAAGGCGACTATCCTGTATG
	Reverse	CATGCTCTAGGGATAACCACATC
Hif1 α (RAT)	Forward	GGAAATGCTGGCTCCCTATATC
	Reverse	GTAAGTGGGTCTGCTGGAATC
AKT1 (RAT)	Forward	GCTCAAGAAGGACCCTACA
	Reverse	GGGCTCAGCTTCTTCTCATAC
GAPDH (RAT)	Forward	CAAGGTCATC CCA GAG CTG AA
	Reverse	CATG TAG GCC ATG AGG TCC AC

3.5.2. Histopatolojik Analizler

-Fiksasyon ve Yıkama

Hayvanlardan elde edilen dokular fiksasyon için %10 luk nötral formaldehit solüsyonu içerisinde en az 48 saat bekletildi. Fiksasyonun tamamlanmasının ardından dokular bir gece akarsu altında yıkanarak doku takip işlemlerine başlandı.

-Doku Takibi

Yıkama işleminin ardından dokulardaki suyun uzaklaştırılması amacıyla dokular dereceli olarak artan alkollerde belirlenen sürelerde bekletildi (Tablo 5).

Tablo 5. Dehidratasyon Aşamasında Kullanılan Alkol Dereceleri ve Uygulama Süreleri

ALKOL DERECEŚİ	SÜRE
%50	45 dakika
%60	45 dakika
%70	45 dakika
%80	45 dakika
%90	45 dakika
%96	45 dakika
%100	1 saat
%100	1 saat

Dehidratasyon aşamasının ardından dokuların durumları kontrol edilerek 5-15 dk ksilolde şeffaflandırıldı. Ardından dokular parafin emdirme işlemi için 60 °C deki sıvı parafin içerisinde 1 saat etüvde, katı parafin, içerisinde 1 gece oda sıcaklığında bekletildi. Tekrar etüvde 60 °C de sıvılaştırılan parafin içerisindeki dokular bloklar halinde gömüldü.

-Kesit Alma

Elde edilen parafin bloklardan mikrotom yardımı ile 4-5 µm kalınlığında kesitler elde edildi ve sıcak su banyosu yardımıyla lamlara aktarıldı.

-H-E Boyama

Histokimyasal değerlendirmelerin yapılabilmesi amacıyla elde edilen kesitler belirtilen protokol uyarınca Hematoksilen-Eozin (H-E) ile boyandı (Tablo 6).

Tablo 6. H-E Boyama Protokolü

	İşlem	Süre-Tekrar
1	Deparafinizasyon (60 °C)	1 gece
2	Deparafinizasyon (ksilol)	30 dk
3	Deparafinizasyon (ksilol)	30 dk
4	Alkol serisi (%100, %90, %80, %70, %60, %50)	10 dk
5	Distile su	10 dk – 2 kez
6	Hematoksilen	4,5 dk
7	Yıkama	5 dk – 2 kez
8	Asit Alkol (%1 lik)	Batır-çıkar
9	Yıkama	5 dk
10	Eozin	3,5 dk
11	Yıkama	5 dk – 2 kez
12	Alkol serisi (%50, %60, %70, %80, %90, %100)	Batır- çıkar
13	Ksilol	30 dk – 2 kez
14	Entellan ile Kapatma	-

-Değerlendirme

H-E ile boyanan dokular histopatolojik değerlendirme amacıyla görüntüleme destekli binoküler ışık mikroskopunda değerlendirildi ve fotoğraflar elde edildi. Tespit edilen bulgunun derecesine göre (-): herhangi bir bulgu yok, (+): düşük düzeyde bulgu, (++): orta düzeyde bulgu, (+++): ciddi düzeyde bulgu şeklinde histopatolojik skora yapıldı.

3.5.3. İstatiksel Analizlerin Yapılması

Değişkenler ortalama $\pm$ standart sapmalar olarak sunuldu. Gruplar arasındaki biyokimyasal ve genetik skorları karşılaştırmak için ANOVA (post hoc LSD) testleri kullanıldı. İstatistiksel hesaplamalar SPSS 18.0 program paketi kullanılarak yapıldı (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ alınmıştır.

4. SONUÇLAR

Deney süresince yapılan işlemler ratlar tarafından genel olarak iyi tolere edildi. Grup 2'den 2, grup 3'ten ve Grup 4'ten 1'er rat kanamadan sonraki 1. günde kaybedildi. Çalışmaya toplam 28 adet rat dahil edildi.

4.1. Biyokimyasal Sonuçlar

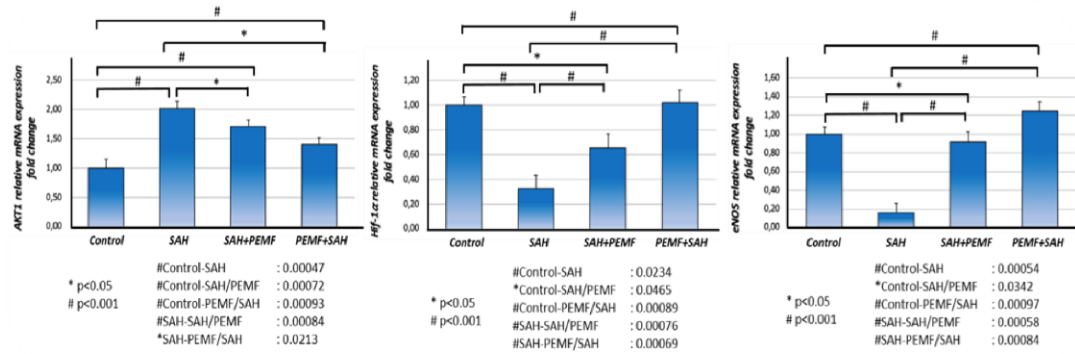
4.1.1. Oksidatif Stress Parametreleri

Tablo 7. Oksidatif stres parametreleri sonuçları a - Kontrol, b - SAK, c - SAK + PEMF.

Gruplar	TAS (mmol Trolox Equivalents/L)		TOS (μ mol H ₂ O ₂ Equivalents/L)		OSI index	
	Mean $\pm$ SD	P value	Mean $\pm$ SD	P value	Mean $\pm$ SD	P value
Kontrol	0,81 $\pm$ 0,69		12,93 $\pm$ 2,09		1,60 $\pm$ 0,27	
SAK	0,77 $\pm$ 0,12		16,27 $\pm$ 2,07	a:0,045	2,20 $\pm$ 0,45	a:0,013
SAK+PEMF	0,63 $\pm$ 0,06	a: 0,012 b: 0,040	10,71 $\pm$ 3,17	b:0,002	1,59 $\pm$ 0,43	b:0,016
PEMF+SAK	0,79 $\pm$ 0,16	c: 0,022	12,19 $\pm$ 2,42	b:0,010	1,57 $\pm$ 0,32	b:0,014

Gruplar arasında oksidatif stres belirteç puanlarını karşılaştırmak için ANOVA (post hoc LSD) testleri kullanıldı. SAK grubunda TAS düzeyleri kontrol grubuna göre azaldı ($p > 0.05$). SAK + PEMF grubunda da azalma gözlemlendi (sırasıyla $p = 0.012$ ve $p = 0.040$). Öte yandan profilaktik PEMF uygulanan PEMF + SAK grubunda bu düzeyler SAK + PEMF grubuna göre artmıştır. SAK grubunda TOS ve OSI indeks düzeyleri kontrol grubuna göre arttı (sırasıyla $p = 0,045$ ve $0,013$), SAK + PEMF'de azaldı (sırasıyla $p = 0,002$ ve $p = 0,016$). ve PEMF + SAK grupları (sırasıyla $p = 0,010$ ve $p = 0,014$) (Tablo 7).

4.1.2. RT-qPCR Sonuçları



Grafik 1. PEMF Tedavisinin Beyin Dokularında AKT1, Hif-1α ve eNOS Ekspresyonu Üzerindeki Etkisi

Değerler ortalama $\pm$ SD olarak sunulmuştur. (SAH: Spontan subaraknoid kanama; PEMF: Pulsed elektromanyetik alan)

Tablo 8. AKT1, Hif-1α ve eNOS İfadelerinin Göreceli İfade Seviyeleri

	AKT1	eNOS	Hif-1α
SAK	2,012	0,158	0,328
SAK+PEMF	1,708	0,912	0,650
PEMF+SAK	1,400	1,242	1,023

AKT1 düzeyleri kontrol grubuna göre artarken ($p < 0.001$), SAK grubuna göre SAK + PEMF grubunda ($p < 0.001$) ve PEMF + SAK grubunda ($p < 0.02$) azaldı. *Hif-1α* ve eNOS ekspresyon seviyeleri SAK grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı (sırasıyla $p = 0.02$ ve $p < 0.001$). Tersine, *Hif-1α* ve eNOS seviyeleri SAK+PEMF grubunda (sırasıyla $p < 0.001$ ve $p < 0.001$) ve PEMF + SAK grubunda (sırasıyla $p < 0.001$ ve $p < 0.001$) artmıştır (Tablo 8).

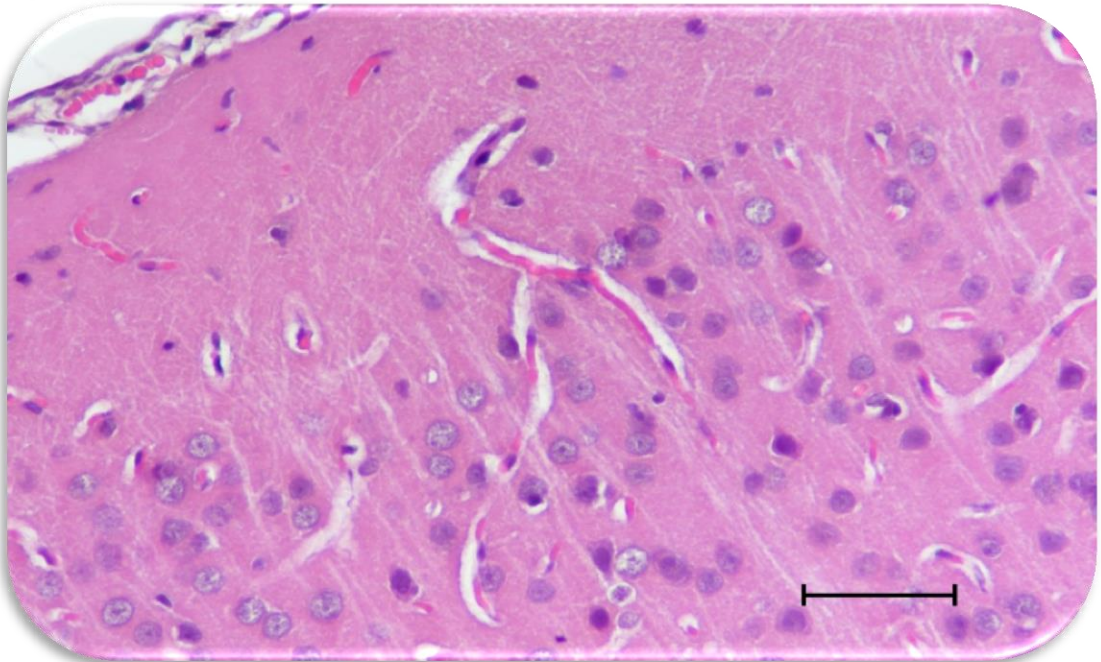
4.2. Histopatolojik Sonuçlar

Histokimyasal değerlendirmede kontrol grubuna ait hayvanların beyin dokularında kortikal ve hipokampal alanda herhangi bir patolojik bulgu gözlenmedi (Tablo 9).

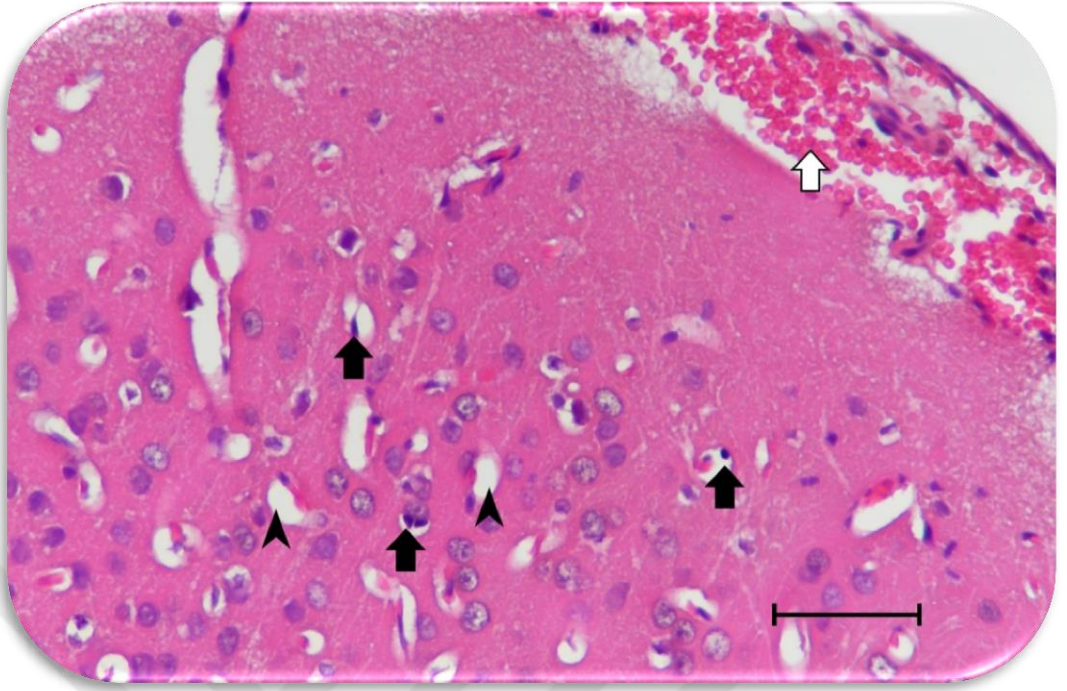
Tablo 9. Beyin Dokularının Histopatolojik Bulguları

PARAMETRE/GRUP		K	SAK	SAK+PEMF	PEMF+SAK
Subaraknoid hemoraji		-	+++	++	+
Kortikal alan bulguları	Ödem	-	+++	++	+
	Vakualizasyon	-	+++	++	++
	Apoptotik cisimler	-	+++	+++	+
Hipokampal alan	Vakualizasyon	-	++	++	++
	Apoptotik cisimler	-	++	++	+

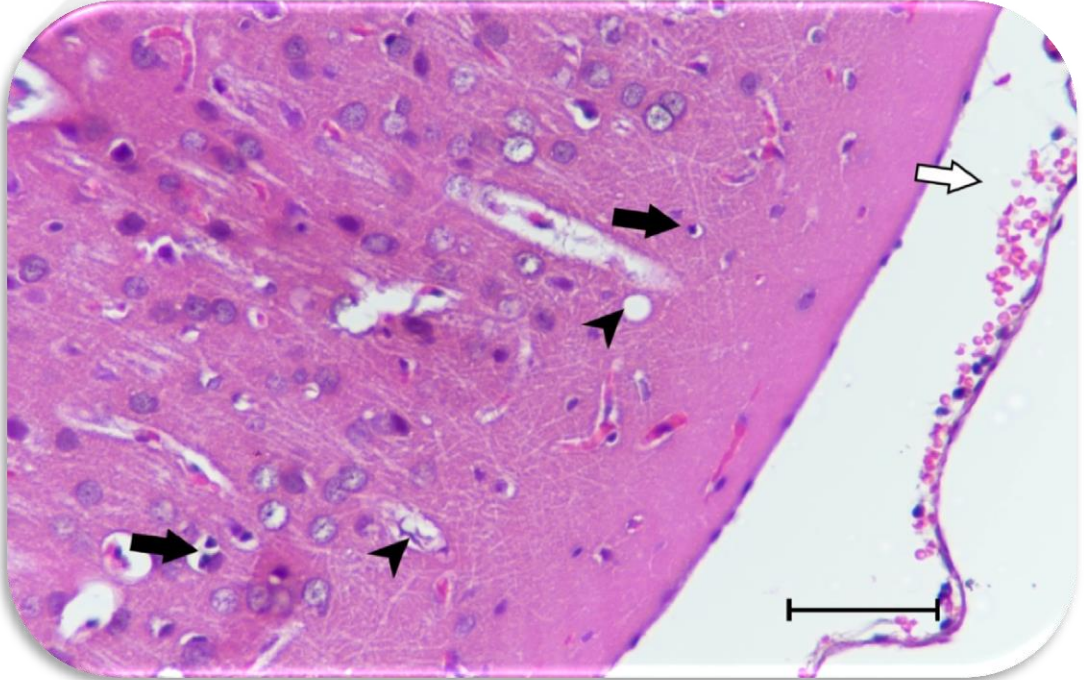
SAK grubu hayvanların beyin kortikal alanda önemli histopatolojik değişimler gözlemlendi; subaraknoid alanda yoğun hemoraji, kortikal alanda ödem, nöron çevresi vakualizasyon ve apoptotik cisimler izlendi. Hipokampal alanda da benzer şekilde apoptotik cisimler ve nöron çevresi vakualizasyonlar gözlemlendi. (Tablo 9).



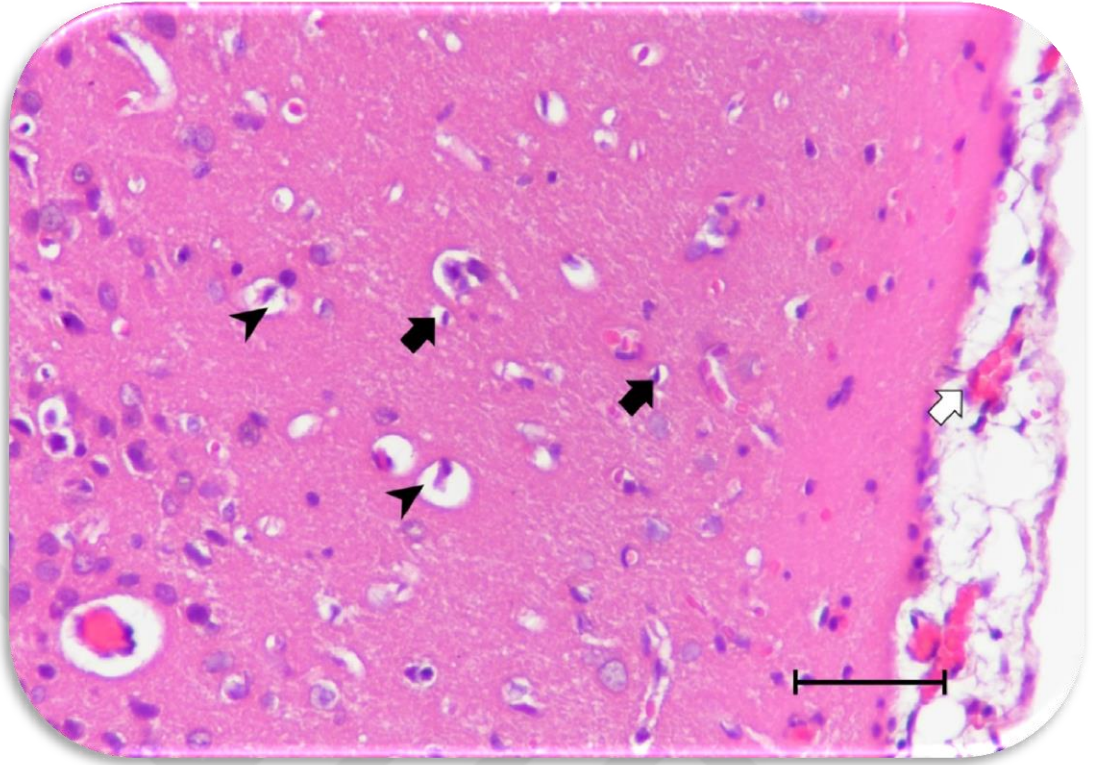
Resim 1. Kontrol Grubu Beyin Korteks Normal Histolojik Yapı. HE, x40, Ölçüm Çubuğu= 50 µm.



Resim 2. SAK Grubu Beyin Kortikal Alan Histopatolojik Değişiklikler; Subaraknoid Hemoraji (Beyaz Ok), Apoptotik Cisimler (Siyah Ok), Vakualizasyon (Ok Başı). HE, x40, Ölçüm Çubuğu= 50 μ m.



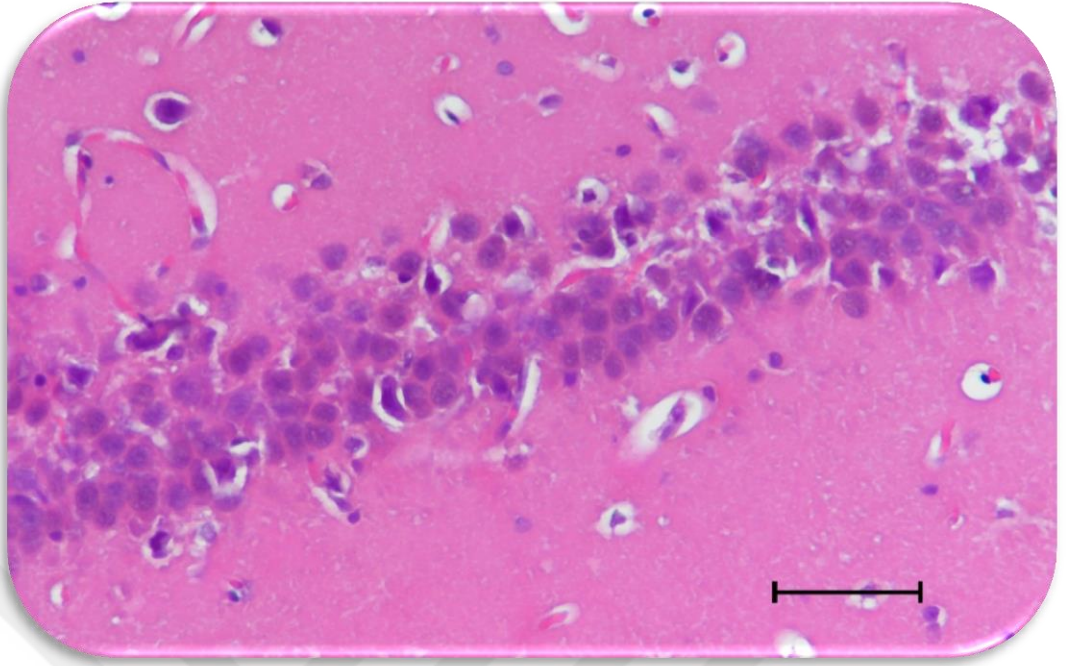
Resim 3. SAK+PEMF Grubu Beyin Kortikal Alan Histopatolojik Değişiklikler; Subaraknoid Hemoraji (Beyaz Ok), Apoptotik Cisimler (Siyah Ok), Vakualizasyon (Ok Başı). HE, x40, Ölçüm Çubuğu= 50 μ m.



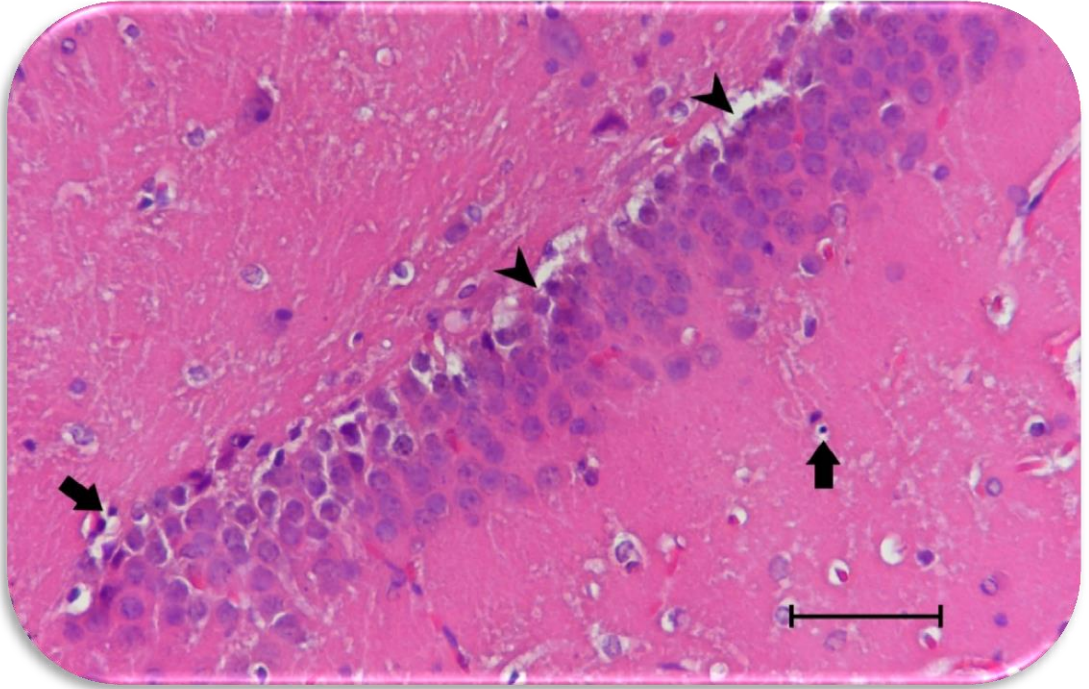
Resim 4. PEMF+SAK Grubu Beyin Kortikal Alan Histopatolojik Değişiklikler; Subaraknoid Hemoraji (Beyaz Ok), Apoptotik Cisimler (Siyah Ok), Vakualizasyon (Ok Başı). HE, x40, Ölçüm Çubuğu= 50 µm.

SAK+PEMF grubu hayvanların beyin kortikal alanda SAK grubuna kıyasla bulgulara anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Subaraknoid alanda hemoraji, kortikal alanda ödem, apoptotik cisimler ve nöron çevresi vakualizasyonlar izlendi. Hipokampal alanda da apoptotik cisimler ve vakualizasyonlar gözlemlendi (Resim 4).

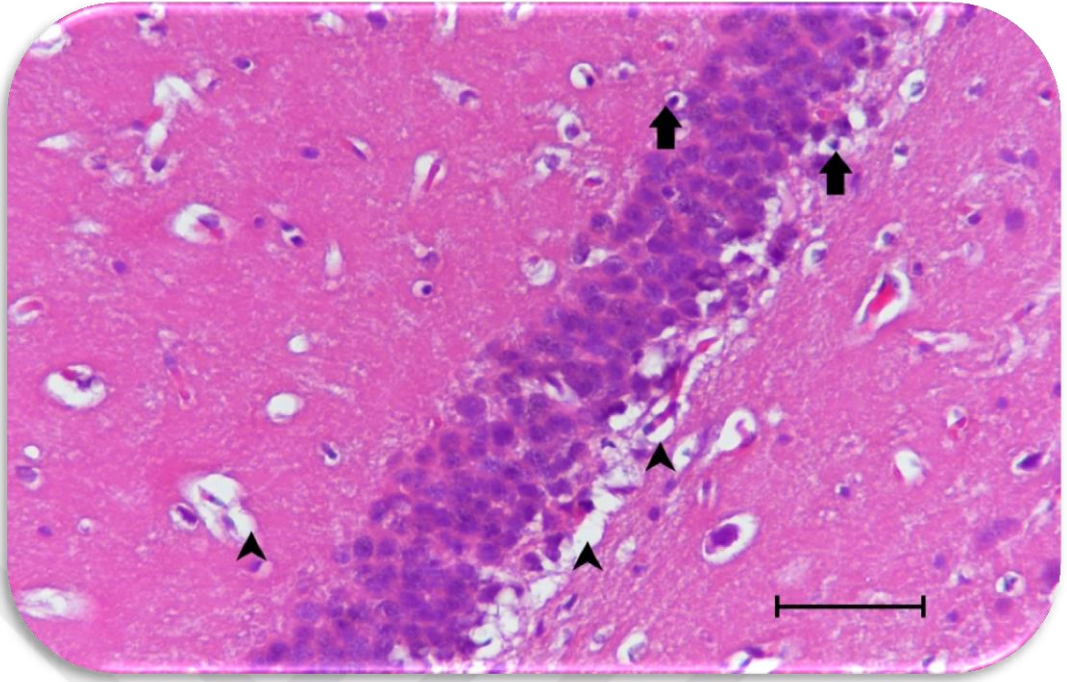
PEMF+SAK grubu hayvanların beyin beyin kortikal alanda SAK grubuna kıyasla subaraknoid hemorajik alanlarda, kortikal ödem, vakualizasyon ve apoptotik cisimlerde azalma izlendi. Benzer şekilde hipokampal alandaki vakualizasyon ve apoptotik cisim bulgularında da azalma gözlemlendi (Resim 4).



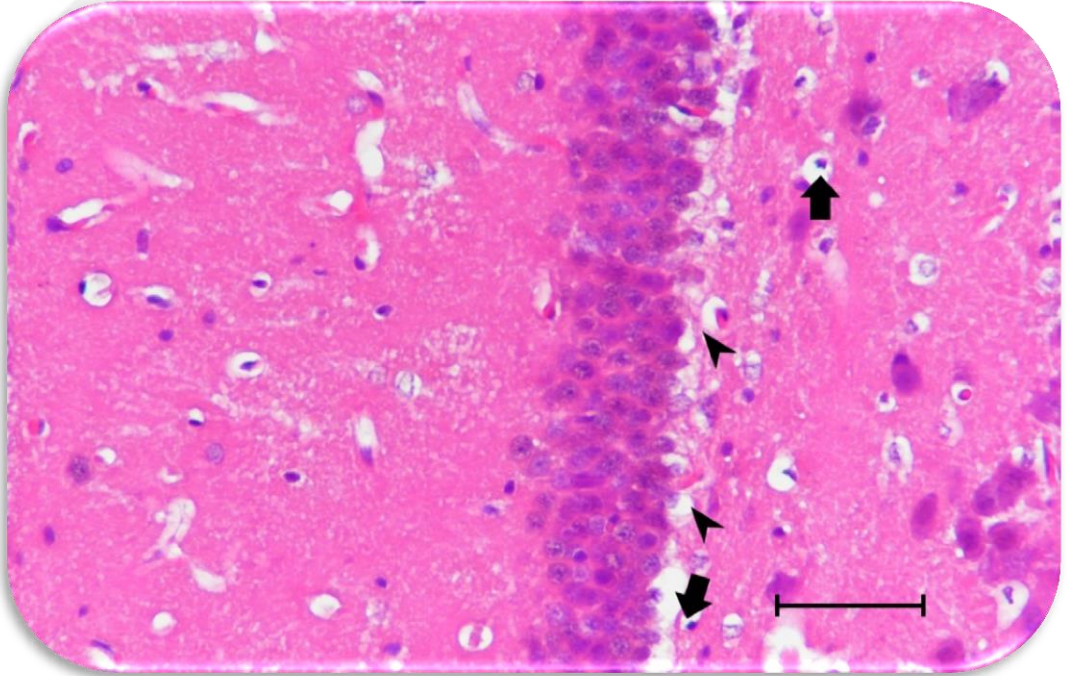
Resim 5. Kontrol Grubu Beyin Hipokampal Alan Normal Histolojik Yapı. HE, x40, Ölçüm Çubuğu= 50 μ m.



Resim 6. SAK Grubu Beyin Hipokampal Alan Histopatolojik Değişiklikler; Apoptotik Cisimler (Siyah Ok), Vakualizasyon (Ok Başı). HE, x40, Ölçüm Çubuğu= 50 μ m.



Resim 7. SAK+PEMF Grubu Beyin Hipokampal Alan Histopatolojik Değişiklikler; Apoptotik Cisimler (Siyah Ok), Vakualizasyon (Ok Başı). HE, x40, Ölçüm Çubuğu= 50 μ m.



Resim 8. PEMF+SAK grubu beyin hipokampal alan histopatolojik değişiklikler; apoptotik cisimler (siyah ok), vakualizasyon (ok başı). HE, x40, ölçüm çubuğu= 50 μ m.

5. TARTIŞMA

Non-travmatik subaraknoid kanamanın en sık nedeni arteriyel duvarın media tabakasının konjenital anomalisine ve kan basıncındaki artışa bağlı intrakranyal sakküler anevrizma rüptürüdür (99,100). Nörolojik bulgular kanamanın yeri, miktarı ve uzanımı ile ilişkilidir. Subaraknoid alana kanın yüksek basınçla yayılımı ani baş ağrısı oluşmasına ve kısa süreli bilinç kaybına neden olabilir (146).

SAK sonrası mortalite ve morbiditenin temel nedeni erken dönemde görülen tekrar kanama ve kanama sonrası 3-14 gün süresince gelişen serebral vazospazmdır. Vazospazmın patogeneğinde, subaraknoid mesafedeki kan, kan yıkım ürünleri, uzamış arteriyel kasılma, inflamatuvar ve endokrin yanıtlar ve arteriyel duvardaki yapısal değişiklikler önemli rol oynamaktadır (147).

Subaraknoid mesafeye salınan eritositlerin parçalanmasının ardından hemoglobin oksidasyonu meydana gelir. Serebral vazospazmın ana nedeni olan oksihemoglobin (oxyHb) metHb'e okside olurken serbest oksijen radikallerinin (SOR) açığa çıkmasına neden olur. SOR'ler; superoksid anyon, hidroksil radikal, hidrojen peroksit, nitrik oksit (NO) ve peroksinitrat'ı içerir. Tüm bu yol ve hasarlı mitokondriden superoksid anyonlarının çıkışı, oksidatif stres, apoptozis ve inflamasyonu tetikler. Hücre düzeyinde oluşan bu hasar mekanizmalarını engellemek için birçok tedavi edici ajan denenmiştir. Sun ve ark. yaptıkları bir çalışmada, Salvinorin A'nın eNOS ve NO salınımındaki artış ile SAK sonrası oluşan beyin hasarının azaldığını göstermişlerdir (148).

Oksidatif stres doku oksijenasyonu bozulduğu zaman, iskemi ve reperfüzyon durumlarında ortaya çıkan ve diğer hasar mekanizmalarını tetikleyen patolojik bir süreçtir. Bu çalışmada, biz oksidatif stres göstergesi olan TOS ve OSI düzeylerindeki değişikliklerin dokuda bu mekanizmayı tetiklediğini ve PEMF tedavisinin bunu engellediğini gördük. Diğer taraftan, PEMF dokuda antioksidan enzim düzeylerini arttırmadan oksidan parametreleri azaltmaktadır. PEMF'in neden olduğu vazodilatasyon sonucunda kan miktarının artmasına bağlı hipoksi ve inflamasyonun gerilemesinin bu durumda bir rolü olabilir. PEMF'in önce uygulandığı grupta, TAS düzeylerinin sonra uygulananlardan yüksek olduğu görülmüştür ki bu durum dokuları besleyen damarlarda SAK öncesi var olan nitrik oksit düzeylerinin

dokudaki stres etkenlerine olan direnci arttırıp, inflamasyonun ilerlemesini önlediğini göstermiştir.

Bilindiği gibi, oksidatif stres bazı hücre içi yolları etkileyerek hücrede diğer hasar mekanizmalarını tetikleyebilmektedir. İnfamasyon ve apoptozu içeren bu mekanizmaların aktive olması hücrede ilerleyici hasarlara neden olabilmektedir.

Literatürde, Hif1 α / eNOS yolu birçok hasar mekanizmasında araştırılmıştır ve hipoksiyi engelleyerek iskemiye olan toleransı arttırdığı gözlenmiştir (149). Oksijen hemostazının korunmasında etkili olan bu yolun aktive olması, eNOS-ilişkili NO üretiminin artmasını sağlayarak katkıda bulunacak ve NO-ilişkili vazodilatasyona bağlı kan akımı artacaktır (150). Bu çalışmada, SAK gruplarında hasar ve kanamaya bağlı dokuda meydana gelen hipoksik çevrede, HIF1 α düzeylerinde azalma olduğu görülmüştür. Bilindiği gibi, damar endotelinin sağlam olması eNOS-ilişkili NO üretimine ve salınımına neden olmaktadır. Damar endotelindeki hasar ise NO üretiminin azalmasına neden olur. PEMF tedavisi ile dokularda NO düzeylerinin artması ve inflamasyonun, apoptozisin azaltılması önemli bir tedavi alternatifi olabilir. Cichon ve ark. post-akut inme hastalarında PEMF uygulamasının koruyucu etkisinde bu mekanizmanın rol aldığını göstermişlerdir (151). Bu çalışmada, görülmektedir ki in vitro uygulanabilen bu metod var olan ve kullanılmakta olan ilaç tedavilerine ek katkı sağlayacaktır. Özellikle dokulardaki yara tedavilerini içeren çalışmalarda gösterildiği gibi, SAK tedavisinde hasarlı alanlardaki kan akımındaki artışa ek olarak proliferatif etkisinin de olumlu sonuçları olacaktır.

Sinir dokuları hipoksiye bağlı gelişen hasar mekanizmalarına daha duyarlıdır. Hasara müdahalede geç kalınması, ani hücre ölümlerine neden olmaktadır. Bu durum, beyin dokusunun ilişkili bölümlerinde meydana gelen dejeneratif değişikliklere bağlı çeşitli semptomlara neden olmaktadır (152). Bu nedenle, tedavi mümkün olduğunca hızlı olmalı ve hasarlı alanın distal bölümünün beslenmesi en kısa sürede sağlanmalıdır.

Çalışmanın histopatolojik değerlendirmesinde, SAK gruplarında ödemin gözlenmesi, serebral kortekste ve hipokampüste apoptotik cisimlerin ve vakuolizasyonun bulunması hasarın ne kadar ciddi olabileceğini göstermektedir.

Diğer yerlere göre daha izole olan ve entellektüel kapasitede önemli bir rolü olan hipokampus alanı da etkilenebilmektedir.

Vazospazmın rutin tedavisinde ve serebral vazospazmın negatif etkilerini azaltabilmek için kullanılan sınırlı sayıda ilaç (nimodipin, nikardipin gibi..) mevcuttur. Tedavide birçok ajan denenmesine rağmen etkinliği ortaya konmuş ve rutin tedaviye girmiş yeni bir ilaç veya modalite bulunmamaktadır.

PEMF uygulamasının SAK sonrası kullanımı özellikle gelişen vazospazmın önlenmesinde ve hastalardaki tekrar kanama olması durumunda gelişecek komplikasyonların önlenmesinde etkili olacaktır.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

SAK sonrası vazospazm oluşmasında oksidasyon, inflamasyon, lipid peroksidasyonu, vasküler dokuda ve nöronal hücrelerdeki apoptoz, vasküler düz kas hücre proliferasyonu ve nekroz gibi birbiriyle bağlantılı bir çok patolojik olay yer almaktadır. Apoptozun vazospazm sürecinin bir parçası olması, ayrıca inflamatuvar reaksiyonlar, kalsiyum metabolizması, serbest radikal oluşumu ve lipid peroksidasyon mekanizmalarının da bu süreçte etkili olmaları nedeni ile bu reaksiyonların oluşumunun engellenmesi vazospazm tedavisindeki başarıyı arttıracaktır.

Çalışmamızda, kompleks ve multifaktöriyel bir patolojik süreç sonucunda gelişen vazospazmın tedavisinde in vitro ve medikal tedavilere ek olarak kullanılabilecek PEMF tedavisi araştırılmış ve SAK'a bağlı gelişen beyin doku hasarını azaltabileceği gösterilmiştir. Beyin dokusuna PEMF uygulanması ile ilgili daha detaylı moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca rutin ilaç tedavisine alternatif veya ek olabilecek bu yöntemin klinik çalışmalarda kullanılabilirliği de planlanabilir.

ÖZET

Deneyisel Subaraknoid Kanama Sonrası Serebral İskemi Modelinde Pulsed Elektromanyetik Alan Uygulamasının İskemik Doku Hasarına Etkileri

Serebral iskemiye sebep olan serebral vazospazm, subaraknoid kanamaya bağlı gelişen morbidite ve mortalitenin en önemli sebeplerinden biridir. Serebral vazospazmın patofizyolojisi ve tedavisine yönelik araştırmalar yapılmakta, cerrahi tedavilerin yanı sıra birçok tıbbi ajan üzerinde çalışılmaktadır. Medikal ve cerrahi tedavi seçeneklerinin yan etkileri ve komplikasyonları dikkate alındığında, vazospazmın tedavisinde PEMF non-invaziv ve uygulanabilir bir tedavi yöntemi olarak etkili bir tercih olabilir.

Bu çalışmada toplam 24 Wistar Albino rat kullanıldı. Ratlar her biri 6'şar rat olmak üzere 4 gruba ayrıldı; kontrol (grup 1), SAK (grup 2), Terapötik SAK + PEMF (grup 3), Profilaktik PEMF + SAK (grup 4). Grup 2, 3 ve 4'te sisterna magna'ya otolog kan (0.3ml) enjekte edilerek SAK oluşturuldu. Grup 3'te SAK'tan 30 dakika sonra PEMF uygulandı. Grup 4'te SAK'dan hemen önce 27.12 MHz PEMF uygulaması yapıldı. Oksidatif stres parametreleri, PCR ve histopatolojik analizler yapıldı.

Kontrol grubuna göre SAK grubunda TOS ve OSI indeks düzeyleri artmış, TAS düzeyleri azalmıştır. SAH grubunda AKT1 ekspresyonları artmış, eNOS ve Hif1 α ekspresyonları anlamlı olarak azalmıştır. PEMF tedavisi ile tüm bu parametrelerin tersine döndüğü görülmüştür. SAK grubundaki hayvanların beyin dokularında önemli histopatolojik değişiklikler, subaraknoid bölgede yoğun kanama, serebral korteksde ödem, nöronal doku çevresinde vakuolizasyon ve apoptotik cisimler, hipokampal alanda nöron etrafında apoptotik cisimler ve boşluklar gözlenirken, PEMF tedavisinin bu alanlarda olumlu etkilerinin olduğu görülmüştür.

SAK'ta PEMF tedavisi, özellikle damarların distal kısımlarında vaskülarizasyonu arttırdığı gibi oksidatif stresi, inflamasyonu ve apoptozu azaltmaktadır. PEMF'in rutin tedavi modalitesi olarak kullanılabilmesi için, beyin dokusu üzerindeki etkilerine ilişkin daha detaylı çalışmalar planlanmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Subaraknoid kanama, oksidatif stress, pulsed elektromanyetik alan tedavisi , nikrik oksid sentaz , vazospazm

SUMMARY

Effects of Pulsed Electromagnetic Field Application on Ischemic Tissue Injury in Cerebral Ischemia Following Experimental Subarachnoid Hemorrhage Model

Cerebral vasospasm leading to cerebral ischemia is still a major complication and source of morbidity and mortality in subarachnoid hemorrhage. A great deal of interest and research has been focused on its pathophysiology and treatment. Besides surgical treatments many medical agents are being working on. As side effects and complications of the other treatment options are considered, Pulsed electromagnetic field (PEMF) is a non-invasive and feasible treatment modality that can be an effective option.

A total of 24 Wistar Albino rats were used in this study. The rats were divided into 4 groups of 6 rats each; control (group 1), sham (group 2), *Therapeutic* SAH + PEMF (group 3), *Prophylactic* PEMF + SAH (group 4). Autologous blood (0.3ml) was injected into the cisterna magna in group 2,3, and 4. 27.12 MHz PEMF was applied 30 minutes after SAH in group 3, and just before SAH in group 4. Oxidative stress parameters, PCR and histopathological analyses were done.

TOS and OSI index levels increased, TAS levels decreased in SAH group compared with the control group. AKT1 expressions increased, and eNOS and Hif1 α expressions decreased in SAH group significantly. PEMF treatment reversed all these parameters.

Significant histopathological changes, dense hemorrhage in the subarachnoid area, edema in the cortical area, vacuolization around the neuron and apoptotic bodies, and vacuolations around the neuron in the hippocampal area were observed in the brain tissues of animals in the SAH group. PEMF treatment restored all these changes.

PEMF decrease the oxidative stress, inflammation, and apoptosis on SAH as increasing the vascularization of especially the distal part of the vessels. More detailed studies should be planned for the effect of PEMF on brain tissue to use as a routine treatment modality.

Key Words: subarachnoid hemorrhage, Pulsed electromagnetic field, nitric oxide synthase, oxidative stress, vasospasm

KAYNAKLAR

1. Fassbender, K., Hodapp, B., Rossol, S., Bertsch, T., Schmeck, J., Schutt, S., Fritzing, M., Horn, P., Vajkoczy, P., Kreisel, S., Brunner, Z., Schmiedek, P. and Hennerici, M., 2001, Inflammatory cytokines in subarachnoid hemorrhage, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 70, 4, 534- 537 p.
2. İsmailoğlu, Ö., Albayrak, B. ve Çetinalp, E., Travmatik Subaraknoid Kanamalarda Nimodipinin Etkisi, *Sinir Sistemi Cerrahisi Derg*, 2, 4, 200-204 s.
3. Zimmermann M, Seifert V. Endothelin and subarachnoid hemorrhage: an overview. *Neurosurgery* 1998; 43: 863.
4. Brain aneurysm foundation. Brain aneurysm statistics and facts. Available from: <https://www.bafound.org/about-brain-aneurysms/>. Accessed November 1, 2017.
5. Pluta RM. Delayed cerebral vasospasm and nitric oxide: review, new hypothesis and proposed treatment. *Pharmacol Ther*. 2005;105(1):23-56.
6. Seifert V, Löffler B, Zimmermann M, Roux S, Stolke D. Endothelin concentrations in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Correlation with cerebral vasospasm, delayed ischemic neurological deficits and volume of hematoma. *J Neurosurg* 1995;82(1):55-62.
7. Ostrowski RP, Colohan AR, Zhang JH. Molecular mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Neurol Res* 2006;28(4):399-414.
8. Sehba FA, Bederson JB. Mechanisms of acute brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Neurol Res* 2006;28(4):381-398.
9. Zuccarello M, Bonasso CL, Lewis AI, Sperelakis N, Rapoport RM. Relaxation of subarachnoid hemorrhage-induced spasm of rabbit basilar artery by the Kchannel activator cromakalim. *Stroke* 1996;27(2):311-316.
10. Sobey CG, Faraci FM. Subarachnoid hemorrhage: what happens to the cerebral arteries? *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1998;25(11):867-876.
11. Rondeau N, Cinotti R, Rozec B, et al. Dobutamine-induced high cardiac index did not prevent vasospasm in subarachnoid hemorrhage patients: a randomized controlled pilot study. *Neurocrit Care* 2012;17(2):183-190.
12. Movafagh S, Crook S, Vo K. Regulation of hypoxia-inducible factor-1a by reactive oxygen species: new developments in an old debate. *J Cell Biochem*. 2015;116(5):696-703. doi:10. 1002/jcb.25074
13. Bragin DE, Statom GL, Hagberg S, Nemoto EM. Increase in microvascular perfusion and tissue oxygenation via pulsed electromagnetic fields in the healthy rat brain. *J Neurosurg* 122:1239-1247,2015.
14. Pena-Philippides JC, Yang Y, Bragina O, Hagberg S, Nemoto E, Roitbak T. Effect of pulsed electromagnetic field (PEMF) on infarct size and inflammation after cerebral ischemia in mice *Transl Stroke Res* 5: 491-500,2014.

15. Miura M, Okada J. Non-thermal vasodilatation by radio frequency burst-type electromagnetic field radiation in the frog. *J Physiol* 435: 257-273,1991.
16. Pilla A, Fitzsimmons R, Muehsam D, Wu J, Rohde C, Casper D. Electromagnetic fields as first Messenger in biological signalling; application to calmodulin-dependent signaling in tissue repair. *Biochim Biophys Acta* 1810: 1236-1245, 2011.
17. Bragin DE, Statom GL, Hagberg S, Nemoto EM. Increased in microvascular perfusion and tissue oxygenation via pulsed electromagnetic fields in the healthy rat brain. *J Neurosurg* 122:1239-1247, 2015.
18. Grant G, Cadossi R, Steinberg G. Protection against focal cerebral ischemia following exposure to a pulsed electromagnetic field. *Bioelectromagnetics*. 15(3):205-16,1994.
19. Obrubov SA, Ivanova O, Klyuchnikov SO, Dreval AA, Boginskaya OA. Study of microcirculation of the ocular ciliary body in experimental kidney disease. *General Pathology and Pathophysiology* 157(4): 440-442,2014.
20. Smith TL, Gibbons DW, Maultsby J. Microcirculatory effects of pulsed electromagnetic fields. *Journal of Orthopaedic Research* 22: 80-84,2004.
21. (1)Huang J, van Gelder JM. The probability of sudden death from rupture of intracranial aneurysms: a meta-analysis. *Neurosurgery* 2002; 51: 1101-5; discussion 1105-7.
22. Linn FH, Rinkel GJ, Algra A, van Gijn J. Incidence of subarachnoid hemorrhage: role of region, year, and rate of computed tomography: a metaanalysis. *Stroke* 1996;27: 625-9.
23. Adams HP Jr, Love BB. Medical management of aneurysmal SAH. In Barnett HJM, Mohr JP, Stein BM, Yatsu FM (Eds)., *Stroke*, New York: Churchill Livingstone, 1992; 769-778.
24. Weir B. Intracranial aneurysm and SAH. In Wilkins RH and Rengachary SS (Eds). *Neurosurgery*, New York: McGraw Hill Book Comp, 1985;1308-1329
25. Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: the emerging revolution. *Nat Clin Pract Neurol* 3 (5):256-63, 2007.
26. Stapf C, Mohr J. Aneurysm and subarachnoid hemorrhage epidemiology. In H. W. P.D. Le Roux, & D. W. Newell (Eds.), *management of Cerebral Aneurysms*:183-187. Philadelphia, PA: Elsevier, 2004.
27. Phillips L II, Whisnant J. The unchanging pattern of subarachnoid hemorrhage in a community. *Neurology* 30: 1034-1040, 1980.
28. Weir B, Grace M. Time course of vasospasm in man. *J Neurosurg* 48: 173-181, 1978.
29. De Oliveira Manoel AL, Parrella DT, Duggal A, Murphy A, McCredie V, Marotta TR, Managing aneurysmal subarachnoid hemorrhage: It takes a team, *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 2015; 82(3):177-192.
30. Hizdra A, Vermeulen M, Van Gijn M, Van Crevel H. Respiratory arrest in Subarachnoid hemorrhage. *Neurology*, 1984; 34: 1501-1503.
31. Millikon CH, McDowell F, Easton JD. *Stroke*, Philadelphia: Lea and Febiger, 1987:171-187.

32. Fischer C, Kistler J. Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualised by computerized tomographic scanning. *Neurosurgery* 6: 1-6, 1980.
33. Kumar J, Friedman JA, Subarachnoid hemorrhage: The First 24 hours. A surgeon's perspective, *Neurocritical Care* 2011; 14: 287-290.
34. Stevens RD, Naval NS, Mirski MA, Citerio G, Andrews PJ, Intensive care of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: an international survey, *Intensive Care Medicine* 2009; 35: 1556-1566.
35. Pakarinen S. Incidence, aetiology, and prognosis of primary subarachnoid hemorrhage: a study based on 589 cases diagnosed in a defined urban population during a defined period. *Acta Neurochir Scand* 29 (suppl.):1-128, 1967.
36. Weir B, Macdonald RL. Intracranial aneurysms and subarachnoid hemorrhage. An overview. In: Wilkins RH, Rengachary SS, editors. *Neurosurgery*. New York: McGraw Hill, 1996: 2191-2214.
37. Kırış T, Sencer A. Subaraknoid Kanamanın Komplikasyonları. In: Aksoy K, editor. *Temel Nöroşirürji*. Ankara: Türk Nöroşirürji Derneği Yayınları, 2005: 448-56.
38. Weir B, Macdonald RL. Intracranial aneurysms and subarachnoid hemorrhage. An overview. In: Wilkins RH, Rengachary SS, editors. *Neurosurgery*. New York: McGraw Hill, 1996: 2191-2214.
39. Fox JL. Intracranial aneurysms. New York: Springer Verlag, 1983:199-203.
40. Weir B, Findlay JM: Subarachnoid Hemorrhage. In: Carter LP, Spetzler R, editors. *Neurovascular Surgery*, New York: McGraw-Hill, 1997:557-581.
41. Murphy-Human T, Welch E, Zipfel G, Diringer MN, Dhar R, Comparison of short-duration levetiracetam with extended-course phenytoin for seizure prophylaxis after subarachnoid hemorrhage, *World Neurosurgery* 2011; 75:269-274.
42. Findlay JM, Weir BKA, Kassel NF. Intracisternal recombinant tissue plasminogen activator after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 75: 181-188, 1991.
43. Sasahi T, Kawakami M. Urokinase cisternal irrigation therapy for prevention of symptomatic vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. A study of urokinase concentration and the fibrinolytic system. *Stroke* 31: 1256-1262, 2000.
44. Kassell NF, Shaffrey ME, Shaffrey CI. Cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. In: Appuzzo MLJ, ed. *Brain surgery: complication avoidance and management*. New York: Churchill Livingstone 847-856, 1992.
45. Sehhar LN, Weschler LR, Yanas H. Value of TCD examination in the diagnosis of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 22:813-821, 1988.
46. Pasqualin A, Bozaan A, Cavazzani P. Intracranial hematomas following aneurysmal rupture: experience with 309 cases. *Surg Neurol* 25:6-17, 1986

47. Budohoski KP, Guilfoyle M, Helmy A, Huuskonen T, Czosnyka M, Kirollos R, Menon DK, Pickard JD, Kirkpatrick PJ: The pathophysiology and treatment of delayed cerebral ischaemia following subarachnoid haemorrhage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85(12):1343-1353, 2014.
48. Burnett MG, Danish SF, McKann II GM, Le Roux PD: Pathology and pathophysiology of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. In: Le Roux PD, Winn HR, Newell DW (eds). *Management of Cerebral Aneurysms*. Philadelphia, PA: Elsevier, 2004:127-137.
49. Ecker A, Rienmenschneider PA: Arteriographic demonstration of spasm of the intracranial arteries, with special reference to saccular arterial aneurysms. *J Neurosurg* 8: 660-667, 1951.
50. Khurana , V.G. and Besser, M., 1997, Pathophysiological basis of cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid haemorrhage, *J Clin Neuroscience*, 4, 2, 122-131 p.
51. Ladner, R.T, Zuckerman, L.S. and Mocco, J., 2013, Genetics of cerebral vasospasm, *Neurology Research International*, doi: 10.1155/2013/291895.
52. Zileli, M. and Korfali, E., 2010, Temel Nöroşirürji, *Türk Nöroşirürji Derneği Yayınları*, Ankara, 803 s
53. Cook, A.D., 1995, Mechanisms of cerebral vasospasm in subarachnoid haemorrhage, *PharmacTher*, 66, 259-284 p.
54. Çokluk, C., Şenel, A., Tümkaya, L., İyigün, Ö., Önder, A., Çelik, F. Ve Rakunt, C., 2000, Deneysel Subaraknoid Kanamada Oktreotid Asetat'ın Serebral Vazospazma Etkisi, *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 10, 16-25 s.
55. Erdemoğlu, A.K. ve Çomoğlu, S., 1998, Subaraknoid Kanama ve vazospazm, *Van Tıp Dergisi*, 5, 2, 111-113 s.
56. Erdi, F.M., Guney, O., Kiyici, A. and Esen, H. 2011, The effects of Alpha Lipoik Acid on Cerebral vasospasm following experimental subarachnoid hemorrhage in the rabbit, *Turkish Neurosurgery*, 21, 4, 527-533 p.
57. Pluta, M.R., Schwartz, H.J., Dreier, J., Vajkoczy, P., Macdonald, L.R., Nishizawa, S., Kiris, T., Leroux, P. And Zhang, J.H., 2009, Cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: time for a new World of thought, *Neurol Res*, 31, 2, 151-158 p.
58. Laskowitz, D.T. and Kolls, B.J., 2010, Neuroprotection in subarachnoid hemorrhage, *Stroke*, 41, 10, 79-84 p.
59. Clark, J.F. and Geithman, P.G., 2005, Vascular smooth muscle function: The physiology and pathology of vasoconstriction, 12, 35-45 p.
60. Armin, S.S., Colohan, A.R.T. and Zhang J.H., 2008, Vasospasm in traumatic brain injury, *Acta Neurochir Suppl*, 104, 13, 421-425 p.
61. Mehta, V., Russin, J., Spirtos, A., Shuhan, H., Adamczyk, P., Amar, P.A. and Mack, J.W., 2013, Matrix metalloproteinases in cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage, *Neurology Research International*, doi: 10.1155/2013/943761.
62. ZUBHOW AY, Ogihan K, Bernanke DH, Parent AD, Zhang J. Apoptosis of endothelial cells in vessels affected by cerebral vasospasm. *Surg Neurology* 2000; 53: 206-6.
63. ZHANG Z, Nagata I, Kikuchi H, Xue JH, Sakai N, Sakai H, Yanamoto H. BroadSpectrum and Selective Serine Protease Inhibitors Prevent Expression

- of PlateletDerived Growth Factor-BB and Cerebral Vasospasm After Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke* 2001; 32: 1665-1672.
64. SHISHIDO T, Suzuki R, Qian L, Hirakawa K. The role of superoxide anions in the pathogenesis of cerebral vasospasm. *Stroke* 1994; 25: 864-8.
 65. SUZUKI R, Masaoka H, Hirata Y, Marumo F, Isotani E, Hirakawa K. The role of endothelin-1 in the origin of cerebral vasospasm in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 1992; 77: 96-100.
 66. Heistad DD, Kontos HA: Cerebral circulation, in Shepherd JT, Abboud FM (eds): *Handbook of Physiology. Section: Circulation*. Bethesda, Am Physiol Soc, 1993, vol 3, pp 137-182.
 67. Kitazono T, Faraci FM, Taguchi H, Heistad DD: Role of potassium channels in cerebral blood vessels. *Stroke* 26 (9): 1713-1723, 1995.
 68. Aihara Y, Jahromi BS, Yassari R, Nikitina E, Agbaje-Williams M, Macdonald RL. Molecular profile of vascular ion channels after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 24 (1):75-83, 2004.
 69. Dr. Salih Gülşen. Ratlarda deneysel subaraknoid kanama ile oluşturulan serebral vazospazma ralsksifenin etkisi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilimdalı uzmanlık tezi 2004.
 70. Liu P, Xi Q, Ahmed A, Jaggar JH, Dopico AM. Essential role for smooth muscle BK channels in alcohol-induced cerebrovascular constriction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28;101 (52):18217-22, 2004.
 71. Erdos B, Miller AW, Busija DW. Alterations in KATP and KCa channel function in cerebral arteries of insulin-resistant rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283 (6):H2472-7, 2002.
 72. Lohn M, Lauterbach B, Haller H, Pongs O, Luft FC, Gollasch M. beta (1)-Subunit of BK channels regulates arterial wall[Ca (2+)] and diameter in mouse cerebral arteries. *J Appl Physiol.* 91 (3):1350-4, 2001.
 73. Zhang H, Cook D: Cerebral vascular smooth muscle potassium channels and their possible role in the management of vasospasm. *Pharmacol Toxicol* 75 (6):327- 336, 1994.
 74. Moneer Z, Pino I, Taylor EJ, Broad LM, Liu Y, Tovey SC, Staali L, Taylor CW. Different phospholipase-C-coupled receptors differentially regulate capacitative and non capacitative Ca²⁺ entry in A7r5 cells. *Biochem J.* 389 (Pt 3):821-9, 2005.
 75. Hisatsune C, Nakamura K, Kuroda Y, Nakamura T, Mikoshiba K. Amplification of Ca²⁺ signaling by diacylglycerol-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *J Biol Chem.* 25;280 (12):11723-30.
 76. Cawley SM, Sawyer CL, Brunelle KF, Vliet A, Dostmann WR. Nitric oxide – evoked transient kinetics of cyclic GMP in vascular smooth muscle cells. *Cellular Signalling.* 2006, 1-11.
 77. Netherton SJ, Maurice DH. Vascular endothelial cell cyclic nucleotidephosphodiesterases and regulated cell migration: Implications in angiogenesis. *Mol Pharmacol* 67: 263-272, 2005.

78. J. Krumenacker and K. Hanafy et al., Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase, *Brain Res Bull* 62: 505–515, 2004.
79. Sercombe R, Tran Dinh YR, Gomis P: Cerebrovascular inflammation following subarachnoid hemorrhage. *Jpn J Pharmacol* 88:227 – 249, 2002.
80. Tran Dinh YR, Debdi M, Couraud JY, Creminon C, Seylaz J, Sercombe R: Time course of variations in rabbit cerebrospinal fluid levels of calcitonin gene-related peptide- and substance P-like immunoreactivity in experimental subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 25: 160 – 164, 1994.
81. Peiro C, Angulo J, Rodriguez-Manas L, Llergo JL, Vallejo S, Cercas E, Sanchez- Ferrer CF. Vascular smooth muscle cell hypertrophy induced by glycosylated human oxyhaemoglobin. *Br J Pharmacol*. 125 (4):637-44, 1998.
82. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*. 57 (suppl):715S-25S, 1993.
83. Ohkuma H, Suzuki S, Ogane K, Fujita S, Shibata S, Ito K, Kimura M. Preventive effect of intracisternal methylprednisolone on symptomatic vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *No Shinkei Geka*. 24 (2):135-42, 1996.
84. Yamaguchi M, Zhou C, Heistad DD, Watanabe Y, Zhang JH. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase failed to prevent cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 35 (11):2512-7, 2004.
85. Saito A, Kamii H, Kato I, Takasawa S, Kondo T, Chan PH, Okamoto H, Yoshimoto T. Transgenic CuZn-superoxide dismutase inhibits NO synthase induction in experimental subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 32 (7):1652-7, 2001.
86. Hanggi D, Steiger HJ. Nitric oxide in subarachnoid haemorrhage and its therapeutic implications. *Acta Neurochir (Wien)*. 148 (6):605-13, 2006.
87. ASHTON D, Williams R, Wynants J, Van J, Marrannes R, Clincke G. Altered Na(+) channel function as an in vitro model of the ischemic penumbra: action of lubeluzole and other neuroprotective drugs. *Brain Res* 1997;745: 210-221.
88. MURAKAMI K, Kondo T, Epstein CJ, Chan PH. Over expression of CuZn-superoxide dismutase reduces hippocampal injury after global ischemia in transgenic mice. *Stroke* 1997; 28: 1797-1804.
89. JANJUA N, Mayer SA. Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Curr Opin Crit Care* 2003; 9: 113-119.
90. KAZUYA A, Alexander Y, Zubkov , Lan B, John H. Therapeutic effect of caspase inhibitors in the prevention of apoptosis and reversal of chronic cerebral vasospasm. *Journal of Clinical Neuroscience* 2002; 9(6): 672-677.
91. Zimmermann M, Seifert V. Endothelin and subarachnoid hemorrhage: an overview. *Neurosurgery*. 43 (4):863-75, 1998.
92. Cirak B, Kiymaz N, Ari HH, Ugras S. The effects of endothelin antagonist BQ-610 on cerebral vascular wall following experimental subarachnoid hemorrhage and cerebral vasospasm. *Clin Auton Res*. 14 (3):197-201, 2004.

93. Kastner S, Oertel MF, Scharbrodt W, Krause M, Boker DK, Deinsberger W. Endothelin-1 in plasma, cisternal CSF and microdialysate following aneurysmal SAH. *Acta Neurochir (Wien)*. 147 (12):1271-9, 2005.
94. M. Gold and K. Wood et al., L-Arginine causes whereas L-argininosuccinic acid inhibits endothelium-dependent vascular smooth muscle relaxation, *Biochem Biophys Res Commun* 161:536–543, 1988.
95. Altınors, N., Celasun, B., Ozen, O., Cekinmez, M., Caner, H. and Atalay, B., 2006, SystemicAdministration of phosphodiesterase V inhibitör, Sildenafil Citrate, for attenuation of cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage, *Neurosurgery*, 59,5, 1102-1108 p.
96. Çoban, Ö.E, Patır, B., 2010, Antioksidan etkili bazı bitki ve baharatların gıdalarda kullanımı, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5, 2, 7-19 s.
97. Bilginer, B., Onal, B.M., Narin, F., Soylemezoglu, F., Ziyal, I.M. and Ozgen, T., 2009, Theeffects of intravenous cilostazol and nimodipine on cerebrovascular vasospasm aftersubarachnoid hemorrhage in an experimental rabbit model, *Turkish Neurosurgery*, 19, 4, 374-379 p.
98. Rubinstein, A.A. and Wijdicks, E., 2005, Cerebral vasospasm in subarachnoid hemorrhage:current treatment options, *Neurolog*, 7, 99-103 p.
99. Siasios, I., Kapsalaki, E.Z. and Fountas, K.N., 2013, Cerebral vasosapasm Phrmacologicaltreatment: An update, *Neurology Research Internationa l*, doi:10.1155/2013/571328
100. L. Krasznai and E. Grote, Acute vasoparalysis after subarachnoid haemorrhage and cerebral trauma: general reflex phenomenon?, *Neurol Res* 16:40–44, 1994.
101. D. Carpenter and R. Grubb Jr. et al., Cerebral oxygen metabolism after subarachnoid hemorrhage, *J Cereb Blood Flow Metab* 11:837–844, 1991.
102. J. Shinoda and T. Kimura et al., Acetalozamide reactivity of cerebral blood flow inpatients with subarachnoid hemorrhage, *Act Neurochir (Wien)* 109:102–108, 1991.
103. Donovan FM, Pike CJ, Cotman CW, Cunningham DD. Thrombin induces apoptosis in cultured neurons and astrocytes via a pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities. *J Neurosci* 15;17 (14):5316-26, 1997.
104. Lindner H, Holler E, Ertl B, Multhoff G, Schreglmann M, Klauke I, Schultz-Hector S, Eissner G. Peripheral blood mononuclear cells induce programmed cell death in human endothelial cells and may prevent repair: role of cytokines. *Blood* 89 (6):1931-8, 1997.
105. Schwartz-Bloom RD, Sah R. gamma-Aminobutyric acid (A) neurotransmission and cerebral ischemia. *J Neurochem* 77 (2):353-71, 2001.
106. Siesjo BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurg* 77 (3):337-54, 1992.
107. Zubkov AY, Ogihara K, Bernanke DH, Parent AD, Zhang J. Apoptosis of endothelial cells in vessels affected by cerebral vasospasm. *Surg Neurol* 53:260-266, 2000.

108. Cho A, Courtman DW, Langille BL. Apoptosis (programmed cell death) in arteries of the neonatal lamb. *Circ Res* 76 (2):168-75, 1995.
109. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem* 2004;37:112-9.
110. Erel O. A new automated coloremtric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005;38:1103-11.
111. Demirel C, Kilçiksiz S, Ay OI, et al. Effect of N-acetylcysteine on radiationinduced genotoxicity and cytotoxicity in rat bone marrow. *J Radiat Res* 2009;50(1):43-50.
112. Kilciksiz S, Demirel C, Erdal N, et al. The effect of N-acetylcysteine on biomarkers for radiation-induced oxidative damage in a rat model. *Acta Med Okayama* 2008;62(6):403-9.
113. Panagopoulos N, Messini N, Karabarbounis A, et al. Mechanism for action of oscillating electric fields on cells. *Biochem Bioph Res Co* 2000;272:634- 40.
114. Del Seppia C, Ghione S, Luschi P, et al. Pain perception and electromagnetic fields. *Neurosci Biobehav R* 2007;31(4):619-42.
115. Li RL, Huang JJ, Shi YQ, et al. Pulsed electromagnetic field improves postnatal neovascularization in response to hindlimb ischemia. *Am J Transl Res* 2015;7(3):430-44.
116. Oğuz H, Dursun N, Dursun E. *Tıbbi rehabilitasyon lazer, manyetik alan tedavisi ve akupunktur*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi, 2004.
117. Bassett CA. Beneficial effects of electromagnetic fields. *J Cell Biochem* 1993;51:387-93.
118. Marron MT, Goodman EM, Greenebaum B, et al. Effects of sinusoidal 60-Hz electric and magnetic fields on ATP and oxygen levels in the slime mold, *Physarum polycephalum*. *Bioelectromagnetics* 1986;7(3):307-14,
119. Mert T, Gunay I, Dağlioğlu YK. The roles of potassium channels in the frequency-dependent activities of the regenerating nerves. *Pharmacology* 2004;72(3):157-66.
120. Mert T. Kv1 channels in signal conduction of myelinated nerve fibers. *Rev Neurosci* 2006;17(3):369-73.
121. Naomi MS. Therapeutic uses of pulsed magnetic-field exposure: A review. *Radio Sci Bull* 2003;307:9-32.
122. F. Akleman – L. Sevgi. FDTD Analysis of Human Head – Mobile Phone Interaction in Terms of Specific Absorption Rate (SAR) Calculations and Antenna Design, *Proc. of IEEE–APS, Conference on Antennas & Propagation for Wireless Comm.* pp.85–88, Waltham, MA, USA 1998.
123. S. Paker – L. Seygi. FDTD Evaluation of the SAR Distribution in a Human Head Near a Mobile.
124. Krause CM, et al. Effects of electromagnetic field emitted by cellular telephones on the EEG during a memory task. *NeuroReport* 11: 761–764, 2000.
125. Kang GH, Lee CH, Seo JW, Sung RH, Chung YH, Lee SK, Suh YH, Chi JG. In-vivo study on the harmful effect of the extremely low frequency unipolar pulsating magnetic field in mice. *Korean Med Sci* 12(2): 128–134, 1997.

126. Hardell L, Hallquist A, Mild KH. Mobile phones and the risk of brain tumours. *Lancet* 356(9244): 1837–1840, 2000.
127. Sastre, A., Cook, M.R. & Graham, C. (1998). Nocturnal Exposure To Intermittent 60 Hz Magnetic Fields Alters Human Cardiac Rhythm. *Bioelectromagnetics*, 19, 98–106.
128. Nakamura, Y., Yamamoto, Y. & Muraoka, I. (1993). Autonomic Control Of Heart Rate During Physical Exercise And Fractal Dimension Of Heart Rate Variability. *J. Appl. Physiol.* 74, 875–881.
129. Vijayalaxmi, BZ Leal et al; Primary DNA damage in Human Blood Lymphocytes Exposed in Vitro to 2450 MHz Radiofrequency Radiation; *Rad Res* 153: 479–486, 2000.
130. (145)AM Maes; In Vitro Cytogenetic Effects of 2450 MHz Wave on Human Peripheral Blood Lymphocytes; *Bioelectromagnetics* 14: 495–501, 1993.
131. De Mattei M, Caruso A, Traina CG, et al. Correlation between pulsed electromagnetic fields exposure time and cell proliferation increase in human osteosarcoma cell lines and human normal osteoblast cells in vitro. *Bioelectromagnetics* 1999;20:177-82.
132. Marcheggiani GM, Muccioli GA, Setti S, et al. Conservative treatment of spontaneous osteonecrosis of the knee in the early stage: Pulsed electromagnetic fields therapy. *Eur J Radiol* 2013;82(3):530-7.
133. Huang LQ, He HC, He CQ, et al. Clinical update of pulsed electromagnetic fields on osteoporosis. *Chin Med J* 2008;121(20):2095-9.
134. Shen W, Zhao JH. Pulsed electromagnetic fields stimulation affects bmd and local factor production of rats with disuse osteoporosis. *Bioelectromagnetics* 2010;31:113-9.
135. Elsisi HF, Mousa GS, ELdesoky MT. Electromagnetic field versus circuit weight training on bone mineral density in elderly women. *Clin Interv Aging* 2015;10:539-47.
136. Jacobson JJ, Gorman R, Yamanashi WS, et al. Low-amplitude, extremely low frequency magnetic fields for the treatment of osteoarthritic knees: A double-blind clinical study. *Altern Ther Health Med* 2001;7(5):54-64,66-9.
137. Vavken P, Arrich F, Schuhfried O, et al. Effectiveness of pulsed electromagnetic field therapy in the management of osteoarthritis of the knee: A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Rehabil Med* 2009;41:406-11.
138. Segal NA, Toda Y, Huston J, et al. Configurations of static magnetic fields for treating rheumatoid arthritis of the knee. *Arch Phys Med Rehabil* 2001;82(10):1453-60.
139. Mert T, Ocal I, Cinar E, et al. Pain-relieving effects of pulsed magnetic fields in a rat model of carrageenan-induced hindpaw inflammation. *Int J Radiat Biol* 2014;90(1):95-103.

140. Mert T, Gunay I, Ocal I. Neurobiological effects of pulsed magnetic field on diabetes-induced neuropathy. *Bioelectromagnetics* 2010;31:39-47.
141. Massari L, Caruso G, Sollazzo V, et al. Pulsed electromagnetic fields and low intensity pulsed ultrasound in bone tissue. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2009;6(2):149-54.
142. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*. 2005;38(12):1103-11.
143. 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.
144. Schwedt TJ, Matharu MS, Dodick DW. Thunderclap headache. *Lancet Neurol*. 2006;5(7):621–31.
145. Glynn, L. (1940). Medial defects in the circle of Willis and their relation to aneurysm formation. *J Pathol Bacteriol* 51, 213–222.
146. van Gijn J, Rinkel GJ. Subarachnoid hemorrhage: Diagnosis, causes and management. *Brain* 2001;124:249-78.
147. Kolias AG, Sen J, Belli A. Pathogenesis of cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: putative mechanisms and novel approaches. *J Neurosci Res* 2009;87:1-11.
148. Sun J, Zhang Y, Lu J, et al. Salvinorin A ameliorates cerebral vasospasm through activation of endothelial nitric oxide synthase in a rat model of subarachnoid hemorrhage. *Microcirculation*. 2018;25(3):e12442. doi:10.1111/micc.12442.
149. Movafagh S, Crook S, Vo K. Regulation of hypoxia-inducible factor-1a by reactive oxygen species: new developments in an old debate. *J Cell Biochem*. 2015;116(5):696-703. doi:10.1002/jcb.25074
150. Siuta M, Zuckerman SL, Mocco J. Nitric oxide in cerebral vasospasm: theories, measurement, and treatment. *Neurol Res Int* 2013;25:1-11.
151. Cichon N, Rzeznicka P, Bijak M, Miller E, Miller S, Saluk J. Extremely low frequency electromagnetic field reduces oxidative stress during the rehabilitation of post-acute stroke patients. *Adv clin Exp Med* 2018;27(9):1285-1293.
152. Nieber K. Hypoxia and neuronal function under in vitro conditions. *Pharmacol. Ther.* 1999;82(1):71-86.