

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ  
ANABİLİM DALI

**DENEYSEL SUBARAKNOİD KANAMA MODELİNDE TOPIKAL LEPTİN  
UYGULAMASININ SEREBRAL VAZOSPAZMA ETKİSİNİN  
HİSTOPATOLOJİK VE STEREOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Cem DEMİREL

SAMSUN-2013

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ  
ANABİLİM DALI

**DENEYSEL SUBARAKNOİD KANAMA MODELİNDE TOPİKAL LEPTİN  
UYGULAMASININ SEREBRAL VAZOSPAZMA ETKİSİNİN  
HİSTOPATOLOJİK VE STEREOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ  
Dr. Cem DEMİREL

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Cengiz ÇOKLUK

SAMSUN-2013

## TEŞEKKÜR

Ondokuzmayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı'nda bulunduğum süre içinde uzmanlık eğitimime bilgi ve deneyimleriyle katkısı olan başta tez danışmanım Prof. Dr. Cengiz ÇOKLUK ve tüm değerli hocalarıma,

Tez çalışmalarımın başlatılması ve yürütülmesinin her aşamasında desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Abdurrahman AKSOY ve Prof. Dr. Süleyman KAPLAN ile Arş. Gör. Mehmet Emin ÖNGER, Dr. Enes ATMACA ve Arş. Gör. Ömür DENİZ'e,

İstatistiksel çalışmalarıyla katkıda bulunan değerli hocam Prof. Dr. Yüksel BEK'e,

Zor günlerde birlikte çalıştığım bütün asistan arkadaşlarıma,

Eğitim sürecinin servis ve ameliyathane aşamalarında desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, değerli ameliyathane hemşiremiz Tülay Acar YILMAZ başta olmak üzere birlikte çalıştığım tüm hemşire ve personel arkadaşlara,

Beni yetiştirip bu günlere gelmemde emeği olan annem ve babama,

Ve bu sıkıntılı süreçte değil hayatın her aşamasında tüm zorlukları beraber göğüslediğimiz eşim Dilek ve henüz üç haftalık olan kızım Duru'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez projesi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından (PYO.TIP.1904.12.028) maddi olarak desteklenmiştir.

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR	vi
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1 SUBARAKNOİD KANAMA	3
2.1.1 Tanım	3
2.1.2 Epidemiyoloji	3
2.1.3 Etiyoloji	3
2.1.4 Risk faktörleri	4
2.1.5 Belirti ve Bulgular	4
2.1.6 Komplikasyonlar	4
2.2 SEREBRAL VAZOSPAZM	4
2.2.1 Tanım	4
2.2.2 Tarihçe	5
2.2.3 Epidemiyoloji	5
2.2.4 Fizyopatoloji	5
2.2.5 Klinik Özellikleri	7
2.2.6 Tanı	7
2.2.7 Tedavi	8
2.2.7.1 Cerrahi Tedavi	8
2.2.7.2 Medikal Tedavi	8
2.2.7.3 Endovasküler Tedavi	9
2.2.8 Vasküler Düz Kas	9

2.3	LEPTİN	10
2.3.1	Leptin Özellikleri	11
2.3.2	Leptin Reseptörleri	11
2.3.3	Leptin Sentezi ve Regülasyonu	13
2.3.4	Leptin Etki Mekanizması	14
2.3.4.1	Leptin ve Obesite	14
2.3.4.2	Leptin Hematopoez ve İmmün Sistem	14
2.3.4.3	Leptin ve Anjiogenez	16
2.3.4.4	Leptin Nöronal ve Vasküler Etkileri	16
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1	Anestezi	17
3.2	Deneysel Subaraknoid Kanama Oluşturulması	17
3.3	Leptinin Topikal Olarak Uygulanması	20
3.4	Perfüzyon Fiksasyon İşlemi	21
3.5	Tedavi Grupları	21
3.6	Serum Leptin Düzeyi Ölçümleri	21
3.7	Histolojik Takip	23
3.7.1	Işık Mikroskopik Takip Protokolü	23
3.7.2	Kesit Alma ve Hematoksilen-Eozin Boyama	23
3.7.3	Stereolojik Çalışma	24
3.8	İstatistiksel Çalışma	26
4.	BULGULAR	27
4.1	Makroskobik bulgular	27
4.2	Serum leptin ölçüm bulguları	27
4.3	Stereolojik bulgular	29
5.	TARTIŞMA	39
6.	SONUÇLAR	43
7.	KAYNAKLAR	44

## KISALTMALAR

<b>BOS</b>	Beyin Omurilik Sıvısı
<b>BT</b>	Bilgisayarlı Tomografi
<b>Ca</b>	Kalsiyum
<b>cAMP</b>	Siklik adenozin monofosfat
<b>cGMP</b>	Siklik guanozin monofosfat
<b>EEG</b>	Elektroensefalografi
<b>ET</b>	Endotelin
<b>GSH-P<sub>x</sub></b>	Glutasyon Peroksidaz
<b>H&amp;E</b>	Hemotoksilen- Eozin
<b>ip</b>	İntraperitoneal
<b>K</b>	Potasyum
<b>MCA</b>	Orta Serebral Arter
<b>MRI</b>	Manyetik Rezonans Görüntüleme
<b>ng</b>	Nanogram
<b>NO</b>	Nitrik oksit
<b>NOS</b>	Nitrik oksit sentetaz
<b>PBS</b>	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
<b>PDGF</b>	Platelet kaynaklı büyüme faktörü
<b>PET</b>	Pozitron Emisyon Tomografisi
<b>PGD<sub>2</sub></b>	Prostaglandin D <sub>2</sub>
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
<b>PGF<sub>2</sub><math>\alpha</math></b>	Prostaglandin F <sub>2</sub> $\alpha$
<b>SAK</b>	Subaraknoid Kanama
<b>SPECT</b>	Single Photon Emission Tomografisi
<b>TCD</b>	Transkranyal Doppler Ultrasonografi
<b><math>\mu</math>L</b>	Mikrolitre
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor

## TABLO LİSTESİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1</b> : Leptin sentezini etkileyen faktörler	14
<b>Tablo 2</b> : Grupların ortalama serum leptin düzeyleri	28
<b>Tablo 3</b> : Grupların serum leptin düzeylerinin istatistiksel analizi	28
<b>Tablo 4</b> : Grupların baziller arter lümen alanları	31
<b>Tablo 5</b> : Grupların baziller arter lümen alanlarının istatistiksel analizi	31
<b>Tablo 6</b> : Grupların baziller arter tunica media alanları	34
<b>Tablo 7</b> : Grupların baziller arter tunica media alanlarının istatistiksel analizi	34
<b>Tablo 8</b> : Grupların baziller arter tunica medialarının lümene oranları	36
<b>Tablo 9</b> : Grupların tunica medialarının lümene oranlarının istatistiksel analizi	36

## ŞEKİL LİSTESİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Şekil 1</b> : Serebral vazospazm seyri	7
<b>Şekil 2</b> : Leptinin 167 aminoasitten oluşan polipeptit yapısı	11
<b>Şekil 3</b> : Leptin reseptörlerinin aktivasyonu	13
<b>Şekil 4</b> : Leptinin hematopoez ve immün sisteme etkileri	15
<b>Şekil 5</b> : Oksipito-servikal orta hat düz insiyon	18
<b>Şekil 6</b> : Atlanto-oksipital membran görünümü	18
<b>Şekil 7</b> : Rat femoral arteri	19
<b>Şekil 8</b> : Sisterna magnadan BOS boşaltılarak otolog kan enjeksiyonu	19
<b>Şekil 9</b> : Cerrahi işlem tamamlanarak sütüre edilmiş rat	20
<b>Şekil 10</b> : Topikal leptin uygulanması	20
<b>Şekil 11</b> : ELİSA uygulanmış pleyt görünümü	22
<b>Şekil 12</b> : Cavalier prensibinin uygulanmasını gösteren şekil	25
<b>Şekil 13</b> : SAK sonrası beyin ve beyin sapının makroskobik görünümü	27
<b>Şekil 14</b> : Grupların serum leptin düzeylerini gösteren grafik	29
<b>Şekil 15</b> : Grupların baziller arter lümen alanlarını gösteren grafik	32
<b>Şekil 16</b> : Grupların baziller arter tunica media alanlarını gösteren grafik	35
<b>Şekil 17</b> : Grupların tunica medialarının lümene oranlarını gösteren grafik	37
<b>Şekil 18</b> : Grupların baziller arter histolojik görüntüleri	38

## ÖZET

**Amaç.** Bu çalışmada ratlarda deneysel subaraknoid kanama (SAK) modelinde endojen polipeptit hormon olan leptinin topikal (göz damlası) uygulanmasının serebral vazospazm üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem.** Çalışmamızda toplam 40 adet Spraque-Dawley cinsi dişi rat kullanıldı. Ratlar randomizasyon ile 5 gruba ayrıldı. 1.Grup hariç 2, 3, 4 ve 5. Grup ratlara genel anestezi altında oksipitoservikal bileşkeye düz bir insizyon yapıp oksipital kasları ekarte edilip atlantookspital membranları ortaya kondu. 25 gauge iğne ile atlantookspital membrandan sisterna magna ulaşıldı. Yaklaşık 0.1 ml beyin omurilik sıvısı (BOS) direne edildikten sonra ratların femoral arterinden alınan nonheparinize otolog arterial kan (0.1ml) yavaşça sisterna magna içerisine enjekte edildi. Tedavi gruplarından Grup 3' teki ratlara 3 gün boyunca, Grup 5' teki ratlara ise 7 gün boyunca 24 saatte bir aynı göze 1.2mg/ml leptin solusyonundan 10 µl topikal (göz damlası) olarak verildi. 2 ve 4. Gruplara herhangi bir tedavi uygulanmadı. Grup 2 ve 3' teki ratlar 3. gün, Grup 4 ve 5' teki ratlar 7. gün genel anestezi altında intrakardiyak 3 ml kan alınıp perfüzyon fiksasyon işlemine tabi tutularak sakrifiye edildi.

**Bulgular.** Tüm grupların serum leptin ortalamaları karşılaştırıldığında kontrol grubu serum leptin düzeyi ile topikal leptin tedavi uygulanan Grup 3 ve Grup 5'in serum leptin düzeyleri arasında tedavi uygulanan gruplar lehine istatistiksel anlamlı fark görüldü ( $p<0.05$ ). Baziller arter lümen ve media tabakasının stereolojik analiz sonuçlarında Grup 3' ün Grup 1 ve Grup 2 ile karşılaştırılmasında lümen ve media tabakası arasında istatistiksel bir fark tespit edilmedi ( $p>0.05$ ). Grup 5'in Grup 4 ile karşılaştırılmasında baziller arter lümen alanı ölçümlerinde vazodilatasyon lehine anlamlı istatistiksel fark tespit edilirken ( $p<0.05$ ), media tabakaları arasında istatistiksel bir fark tespit edilmedi ( $p>0.05$ ). Tüm grupların tunica media tabakaları karşılaştırıldığında Grup 5 ile hem Grup 1 hemde Grup 2 arasında istatistiksel anlamlı fark tespit edildi ( $p<0.05$ ). Tunica medianın lümene oranları karşılaştırıldığında Grup 4 ile tüm Gruplar arasında anlamlı fark tespit edildi ( $p<0.05$ ).

**Sonuç.** Leptinin göz damlası şeklinde topikal uygulaması ile sistemik dolaşıma etkin düzeyde geçmekte olduğu ve deneysel olarak oluşturulan subaraknoid kanamaya bağlı baziller arter vazospazmında tekrarlayan dozlarda vazodilatasyona neden olduğu gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Subaraknoid kanama , Serebral vazospazm, Leptin, Baziller arter.

## ABSTRACT

**Purpose:** In this study, it was aimed to investigate the impact of topical (eye drop) administration of leptin, an endogenous polypeptide hormone, on cerebral vasospasm in an experimental model of subarachnoid hemorrhage (SAH) in rats.

**Materials and Methods:** A total of 40 female Sprague-Dawley rats were used in the study. The rats were randomized into 5 groups. Straight incisions were made in rats in the second, third, fourth and fifth groups in the occipitocervical junction under general anesthesia and occipital muscles were excluded and atlantooccipital membranes were exposed. Cisterna magna was reached through the atlantooccipital membrane via a 25-gauge needle. After draining approximately 0.1 ml of cerebrospinal fluid (CSF), nonheparinized autologous arterial blood (0.1ml) drawn from the femoral artery was slowly injected into the cisterna magna. Rats in the third treatment group were given 10  $\mu$ l topical (eye drop) of 1.2mg/ml leptin solution for 3 days in the same eye for every 24 hours whereas rats in the fifth treatment group received the same dosage for 7 days. Second and fourth groups did not receive any treatment. After taking intracardiac blood samples (3 ml) from the rats in the second and third group on the third day and from those in the fourth and fifth groups on the seventh day under general anesthesia, the rats were sacrificed by perfusion fixation.

**Results:** When compared, a statistically significant difference was observed in the mean serum leptin levels in favor of the treated groups between control and third and fifth groups treated with topical leptin serum ( $p < 0.05$ ). Stereological analysis results of the basilar artery lumen and media layers revealed no statistically significant difference between the third, second and first groups with respect to lumen and media layers ( $p > 0.05$ ). When group 4 and group 5 were compared, a statistically significant difference in favour of vasodilation was observed in the basilar arterial lumen measurements ( $p < 0.05$ ) whereas no statistically significant difference was detected between media layers ( $p > 0.05$ ). Tunica media comparisons of all groups revealed statistically significant difference between group 5 and group 1 and group 2 ( $p < 0.05$ ). When tunica media / lumen ratios were compared, a significant difference was detected between group 4 and all other groups ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** The study revealed that topical application of leptin in the form of eye drop can access the systemic circulation and can cause recurrent vasodilation in basilar artery vasospasm due to experimentally induced subarachnoid hemorrhage.

**Keywords:** Subarachnoid hemorrhage, cerebral vasospasm, leptin, basilar artery.

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Serebral vazospazm subaraknoid kanamadan günler sonra ortaya çıkan uzamış, ağır seyredilebilir ama geri döndürülebilir, serebral arterlerin patolojik daralmasıdır ve genellikle etkilenen arterin distalinde perfüzyonda azalma ile birlikte dir.

İlk kez Ecker ve Reimenschneider tarafından 1951 yılında anjiyografik olarak gösterilmiştir. Serebral vazospazm anjiyografik (radyolojik) ve semptomatik (klinik) olarak iki grup altında incelenebilir. Anjiyografik vazospazm ana arter lümeninde bölgesel veya yaygın daralma olmasıdır. Semptomatik vazospazm ise serebral arterlerin daralması sonucu ortaya çıkan iskemiyeye bağlı görülen klinik tablodur. Anjiyografik vazospazm SAK sonrası 3. günde başlayıp 5-14. günlerde pik yapar ve 2-4 hafta içinde giderek azalır. Serebral vazospazm, olguların %50'sinden fazlasında anjiyografik olarak saptanabilirken ancak %30'unda semptomatik olarak gözlenir. Semptomatik vazospazm geri dönebilir hafif-orta şiddette işlev kaybıyla sonuçlanabildiği gibi iskemik enfarkta bağlı ağır nörolojik kayıplara ve mortaliteye sebep olabilmektedir.

Günümüzde vazospazm gelişiminin çok etkenli olduğu düşünülmektedir. SAK sonrasında endotelial nitrik oksit sentaz aktivitesinde ve nitrik oksit (NO) düzeyinde azalma, NO'nin nitrit ve nitrate dönüşümü, serbest oksijen radikal düzeylerinde artma ve bunun sonucunda membran fosfolipidlerinin oksidasyonu ve lipid peroksidasyonu, endotel hasarı ve vasküler düz kas hücre proliferasyonunun indüklenmesi vazospazmın altında yatan nedenler olarak kabul edilmektedir.

Leptin 167 amino asit içeren, 16 kDa molekül ağırlığında yağ hücresi ve birçok dokudan salgılandığı saptanan, plazmada belirli bir kan düzeyi oluşturan, kanda serbest ve proteine bağlı olarak taşınan endojen polipeptid bir hormondur (88, 89). Kana geçtikten sonra özel reseptörleri aracılığı ile kan beyin bariyerini aşarak merkezi sinir sistemine ulaşır ve besin alımını azaltıp, enerji harcamasını arttırarak etkisini gösterir (87).

Leptinin bu en iyi bilinen özelliğine ek olarak yapılan araştırmalarda iskemik nöronal hasar sonrası eksojen leptin uygulanması ile nöronal kök hücre gelişimini etkileyerek nöron ve glia hücrelerinde artışa neden olmuş, perilezyoner korkeksde kan damarlarını arttırmıştır (76,77). Antioksidan enzimler olan katalaz, glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz düzeylerini arttırarak direkt olmasa da dolaylı yoldan antioksidan etkinliği olduğu öne sürülmüştür (78). Eksojen leptinin serbest NO'ı indükleyerek vazodilatasyona neden olabildiği gibi farklı eneyssel çalışmalardada eksojen leptin uygulanması ile aynı anda NO sentetaz inhibitörü olan N-monomethyl-Larginine (L-NMMA) de verilerek leptinin NO' den bağımsız olarak da vazodilatasyona neden olduğu gösterilmiştir (79, 80, 81). Leptinin 1.2 mg/ml solüsyonundan 10 µl

topikal göz damlası şeklinde uygulandıktan 30 dk. sonra BOS'da , 60 dk. sonra serumda teropatik düzeye ulaştığı ratlar üzerinde deneysel olarak bildirilmiştir ( 83).

Bütün bu bilgiler ışığında biz de çalışmamızda beyin cerrahisi yoğun bakım kliniklerinde şuuru kapalı hastalarda yeni tedavi modellerinin oluşturulmasına katkıda bulunacağını düşündüğümüz leptinin topikal (göz damlası) uygulanabilme üstünlüğü ile SAK sonrasında ortaya çıkan ve multifaktöryel patogeneze sahip olduğu kabul edilen serebral vazospazmı önleyici etkisini baziller arter stereolojik çalışmalarıyla incelemeyi amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Subaraknoid Kanama

#### 2.1.1. Tanım

Damar içindeki kanın çeşitli nedenlerle beyin veya spinal kordda, araknoid ile pia arasında bulunan subaraknoid mesafeye geçmesine subaraknoid kanama adı verilir. En sık travmaya sekonder olmakla birlikte altta yatan herhangi bir neden olmaksızın spontan olarak da gelişebilir.

#### 2.1.2. Epidemiyoloji

Subaraknoid kanama geçiren hastaların yaklaşık %10-15'i herhangi bir tıbbi müdahale göremeden kaybedildiği için gerçek insidansı tam olarak bilinmemektedir (1). SAK'ın görülme sıklığı coğrafyadan coğrafyaya değişiklik göstermekte olup 11-16/100.000'dur (2). SAK en sık 60 yaş ve üzeri kişilerde görülür. Bazı çalışmalarda erkeklerde sonbahar, kadınlarda ise ilkbaharda daha sık görüldüğü bildirilmiştir (3, 4). SAK'ın görülme sıklığı kadınlarda daha fazla olmasına rağmen, hayatın ilk dekadında erkek/kadın oranı 4/1, beşinci dekatta erkek/kadın oranı eşit, 6.dekatta ise kadınlarda 10 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir (72).

#### 2.1.3. Etiyoloji

Subaraknoid kanama nedenleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir(5).

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

SAK'ın en sık sebebi kafa travmalarıdır. Nontravmatik SAK'ın en sık sebebi ise vasküler lezyonlardır. Vasküler lezyonlar içinde anevrizma rüptürü ilk sıradadır.

#### **2.1.4 Risk Faktörleri**

Subaraknoid kanama, tanı ve tedavi yöntemlerindeki gelişmelere rağmen günümüzde halen önemli bir morbidite ve mortalite sebebidir. SAK geçiren hastalarda ailevi predispozisyon önemli bir risk faktörü olup yapılan çalışmalarda SAK geçiren hastaların birinci ve ikinci derece yakınlarında SAK geçirme insidansının normal popülasyona göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (6, 7, 8). Polikistik böbrek hastalığı, Ehler Danlos ve Nörofibromatozis gibi hastalıklarda SAK'ın önemli sebeplerinden olan anevrizma görülme sıklığının normal popülasyona göre daha fazla olduğu literatürde bildirilmiştir (9, 10). Alkol ve sigara kullanımı, hipertansiyon, antikoagulan ilaç kullanımı, uyuşturucu madde kullanımı SAK için risk faktörleri olarak kabul edilmekle birlikte tam olarak kanıtlanamamıştır (11, 12, 13).

#### **2.1.5 Belirti ve Bulgular**

SAK'ın en sık ve en belirgin belirtisi ani başlangıçlı, şiddetli ve yaygın baş ağrısıdır. Bunun dışında bilinç bozukluğu, bulantı ve kusma, baş dönmesi, çift görme ve halsizlik diğer sık görülen belirtilerdir(14). Nörolojik muayenede ise menenjizm bulguları, ense sertliği, görme kayıpları, görme alanı defekti, ekstraoküler kas güçsüzlüğü, disfaji, hemiparezi ve hipertansiyon en sık görülen bulgulardır (15).

#### **2.1.6. Komplikasyonlar**

SAK sonrasında en sık görülen komplikasyonlar , artmış kafa içi basıncı, yeniden kanama, intraserebral ve intraventriküler kanama, vazospazm, hipertansiyon hidrosefali ve nöbettir. Ek olarak kardiyovasküler, gastrointestinal komplikasyonlar ve sıvı elektrolit bozuklukları görülebilir (16). SAK sonrası yeniden kanama riski ilk 24 saat içerisinde %4 olup ilerleyen günlerde azalarak devam eder.Yeniden kanayan hastaların büyük çoğunluğu kaybedilir. Yeniden kanama, geçmiste SAK sonrası mortalite ve morbiditeyi belirleyen en önemli etkenlerden biriyken anevrizma tedavisinde erken cerrahinin yaygınlaşmasıyla beraber günümüzde yerini vazospazma bırakmaya başlamıştır.

### **2.2. Serebral Vazospazm**

#### **2.2.1. Tanım**

Serebral vazospazm, SAK'tan sonra büyük serebral arterlerde yavaş gelişen belirgin daralma ve beyinde iskemi ya da enfarkt gelişmesi sonucu geç başlayan nörolojik kayıp veya her ikisinin beraber olduğu patolojik olaylar zinciridir (17).

### **2.2.2. Tarihçe**

19. yüzyılın ikinci yarısından itibaren çeşitli semptomların gelişmesinde serebral vazospazmın etkili olduğu düşünülmüştür. Kan yıkım ürünlerinin vazospazma yol açtığı ilk kez 1944'te Zucker tarafından gösterilmiş ve takiben 1951 yılında Ecker ve Reimenschneider serebral vazospazmı ilk kez anjiyografik olarak göstermiştir (18). 1965 yılında Allcock ve Drake, vazospazmın SAK sonrasında görülen morbidite ve mortalitenin asıl sebebi olduğunu göstermişlerdir (19). 1970'li yıllarda yapılan çalışmalarla sistemik kan basıncı ve santral venöz basıncın yükseltilmesi suretiyle hastalarda gelişmiş olan nörolojik kayıpların bazılarının geri döndürülebileceği gösterilmiştir (20). 1977'de Grup ve arkadaşları pozitron emisyon tomografisi (PET) ile yaptıkları çalışmalarında vazospazm gelişen bölgede serebral kan akımının ve oksijen metabolizma hızının azaldığını göstermişlerdir (21). 1980 yılında Fischer ve arkadaşları bilgisayarlı beyin tomografisindeki kan miktarıyla serebral vazospazmın yakından ilişkili olduğunu göstermişlerdir (22). 1981 yılında Sasaki ve arkadaşları, SAK sonrasında oksihemoglobinin methemoglobine dönüşümü sırasında açığa çıkan serbest oksijen radikallerinin membran fosfolipidlerinde peroksidasyona yol açmak suretiyle serebral vazospazmın etyopatogenezinde önemli bir role sahip olduğunu öne sürmüşlerdir (23).

### **2.2.3. Epidemiyoloji**

Subaraknoid kanama insidansında coğrafi bölge, iklim, ırk gibi faktörlerin etkili olduğu bilinmekle beraber bu vakaların bir kısmının daha hastanelere ulaşmadan ölmeleri nedeniyle SAK'ın gerçek sıklığının belirlenmesi zordur. Anevrizmal SAK insidansı ABD'de yıllık 6-16/100.000 ve Finlandiya'da 15/100.000 iken bu oran Japonya'da 25/100.000'dir (24). SAK sonrasında yapılan anjiyografilerde hastaların % 30-70'inde serebral vazospazm görülmektedir ve bu hastaların da % 20-30'unda vazospazm beyin iskemisi ve enfarkta yol açacak derecede şiddetlidir (25, 26). Vazospazmın en sık görüldüğü zaman dilimi SAK'tan sonraki 5 ile 14. gündür ve sonrasında zamanla azalır (27). Serebral vazospazm gelişimiyle subaraknoid mesafedeki kan miktarı başta olmak üzere yaş, sigara kullanımı ve hipergliseminin ilişkili olduğu literatürde belirtilmiştir (22, 28, 29, 30).

### **2.2.4. Fizyopatoloji**

Multifaktöryel olduğu düşünülen serebral vazospazmın fizyopatolojisi günümüzde halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Patogenezinin altında yatan mekanizmalar arasında endotel hasarı, subaraknoid mesafedeki kanın çözülmesi esnasında ortaya çıkan spazmotik ajanların yol açtığı düz kas kontraksiyonu, damar duvarının inflamatuvar ve immünolojik reaksiyonları sayılabilir. Yapılan deneysel

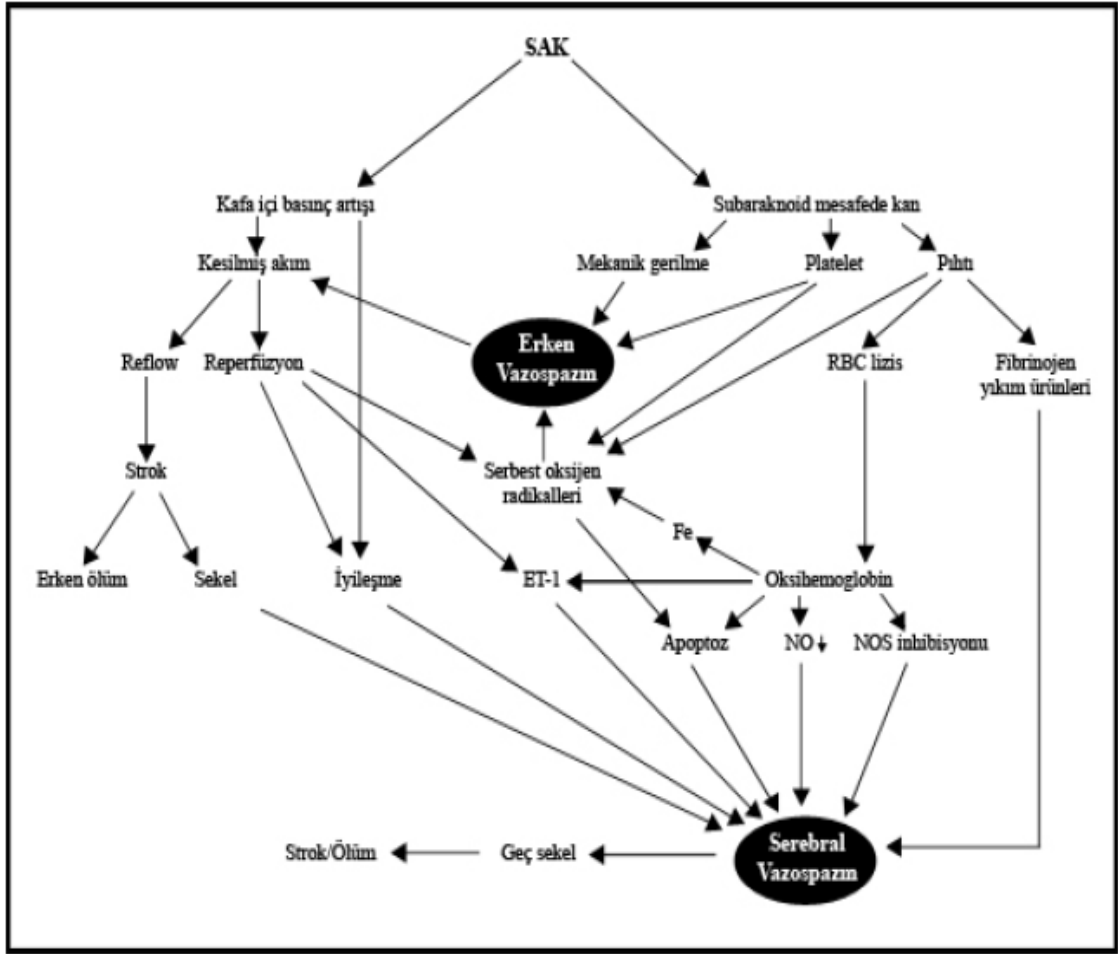
çalışmalarda subaraknoid mesafedeki kanın vazospazma neden olduğu ve BT'deki kan miktarının vazospazmla ilişkili olduğu bulunmuştur (22, 49, 50).

SAK'ın hızlı volüm yükselmesine neden olması ve beyin omurilik sıvısının (BOS) yavaş yer değiştirmesi nedeni ile intrakranyal basınç artar. Basınçtaki bu erken yükselme sonucunda perfüzyon basıncı azalır ve anevrizma etrafındaki arterlerde kan akımı yavaşlar. Bu da pıhtı oluşumuna yol aarak anevrizmadaki deliğin kapanmasıyla sonuçlanır. Fakat "stop flow" uzar veya yaygınlaşırsa nörolojik defisit, bilinç kaybı ve bazen de ölümlle sonuçlanan iskemik stroka yol aabilir. Geçici serebral iskemi, enflamatuar reaksiyon başlatabilir. Ayrıca perfüzyon basıncı normale döndüğünde reperfüzyon hasarı gelişebilir (52).

SAK sonrası oluşan pıhtının iğerdiği aktive plateletlerden salınan serotonin ve tromboksan A2 gibi vazokonstriktör maddeler anevrizma etrafındaki damarlarda kısa süreli vazospazma yol aar. Subaraknoid mesafede bulunan kan ilk 48 saatte inflamatuvar reaksiyona yol aarak ortama artmış oranda nötrofil ve makrofaj göçüne sebep olur. Böylece, erken dönemde vazospazma neden olan bu olay geç vazospazmın gelişmesini de tetikler (52).

SAK'tan 48 saat sonra kan pıhtısının fagositozu başlar ve hemoglobin metabolize edilir. Hemoglobinin parçalanmasıyla aığa çıkan demir iyonu serbest radikal oluşumuna neden olur. Hücre membranı bu serbest radikaller tarafından etkilenerek lipid peroksidasyon aktive edilir. Subaraknoid kanama geçirmiş hastalar üzerinde yapılan çalışmalarda artmış lipid peroksit düzeyinin vazospazm derecesi ile uyumlu olduğu gösterilmiştir (53, 54). Yine araşidonik asit metabolizması ürünlerinden prostaglandin F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ), prostaglandin D2 (PGD2), prostaglandin E2 (PGE2) ve tromboksan A2'nin de gelişen vazospazmda arttığı çeşitli deneysel modellerde gösterilmiştir (55, 56).

Vasküler endotel, serebral damarlardaki tonusu endotel kaynaklı gevşeme faktörü nitrik oksit (NO) ve endotel kaynaklı kasılma faktörü endotelin (ET) vasıtasıyla kontrol eder. Oksihemoglobin hem nitrik oksite bağlanarak, hem de endotelin salınımını arttırarak damar düz kaslarının kasılmasına ve vazospazma yol aar (51).



**Şekil 1:** Serebral vazospazm seyri

### 2.2.5. Klinik Özellikleri

Semptomatik vazospazm, geç iskemik nörolojik kayıp olarak da adlandırılır ve kaybın lokalizasyonuna uygun olarak semptom ve bulgular verir. Arter daralmasının şiddeti ve lokalizasyonu, hastanın yaşı ve klinik durumu, intrakraniyal basınç yüksekliği, intraserebral hematoma, hidrosefali, hiponatremi, hipovolemi ve hipotansiyon gibi komplike faktörlerin eşlik edip etmemesine ve geniş kollateral dolaşımın varlığına bağlı olarak vazospazm kliniği değişkenlik gösterir. Nitekim anjiyografik serebral vazospazm tespit edilen hastaların yarısı asemptomatik olabilmektedir (25).

### 2.2.6. Tanı

Ateş yükselmesi ve lökositoz genellikle ilk gelişen bulgulardır ve bu tabloya nörolojik durumda bozulmanın eklenmesi vazospazmın işareti olup kesin tanı invaziv bir yöntem olan serebral anjiyografi ile konur (31). Anjiyografik olarak vazospazm etkilenen arterde kontrast madde akımının azalmasıyla saptanır. Anjiyografide vazospazm 3. günden önce hemen hemen görülmezken, 5 ile 14. günde maksimum

arteriyel daralma gözlenir ve 2 ile 4. haftalara doğru aşamalı olarak düzelir (27, 32). Vazospazmın tanısında kullanılan diğer tanı yöntemleri ise transkranyal doppler ultrasonografi (TCD), single photon emission computerize tomografi (SPECT), pozitron emisyon tomografi (PET), bilgisayarlı tomografi (BT), BT anjiyografi, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), MR anjiyografi, elektroensefalografi (EEG) sayılabilir (33).

### **2.2.7. Tedavi**

Serebral vazospazmın tedavisinde bir çok yöntem olmasına rağmen halen üzerinde mutakabat sağlanmış kesin bir tedavi yöntemi yoktur.

#### **2.2.7.1. Cerrahi Tedavi**

Anevrizmal SAK olgularında son yıllarda giderek yaygınlaşan görüş erken cerrahi tedavi ve anevrizmanın kliplenmesi yönündedir (27). Erken cerrahi tedavi ile kanayan damarın kliplenmesi, yeniden kanama riskini azaltmasının yanı sıra vazospazmın en büyük etkeni olan kanın temizlenmesine ve 3H tedavisi, trombolitik ve anjiyoplastik tedavi gibi agresif medikal tedavi yöntemlerinin uygulanmasına olanak sağlamaktadır(34, 35).

#### **2.2.7.2. Medikal Tedavi**

Hipervolemi, hemodilüsyon ve hipertansiyon 3H tedavisi olarak en yaygın tedavi yöntemidir. Sıvı yüklenmesi ve hemodilüsyon ile kan viskozitesinin azaltılması ve tansiyonun yükseltilmesinin serebral kan akımı, serebral perfüzyon ve mikrosirkülasyonu artırarak hastalarda nörolojik düzelmeye yol açtığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (36, 37, 38).

Vasküler düz kaslar, çizgili kas ve kalp kasının aksine yavaş, tonik ve uzun süreli kasılırlar. Kasıldıklarında damar boşluğunu daraltacak şekilde organize olmuşlardır. Vasküler düz kasların kasılmasını engellemek amacıyla kullanılan pekçok deneysel ajan klinik çalışmalarda benzer etkinliği gösterememiştir. Ancak nicardipin ve intraarteriyel yüksek doz papaverin uygulamasının erken semptomatik vazospazm tedavisinde etkili olduğu bildirilmiştir (39, 40).

Subaraknoid kanama sonrasında oluşan kan yıkım ürünleri membran depolarizasyonuna yol açar ve bunun sonucunda voltaj kontrollü kalsiyum kanallarının açılmasıyla hücre içi kalsiyum (Ca) düzeyi artar. Serebral damar kasılmasında intrasellüler kalsiyum düzeyi esas olarak ekstrasellüler mesafedeki kalsiyum miktarına bağlıdır (41). Yapılan çalışmalar Ca kanal blokörü olan nimodipinin vazospazm sıklığını

%10'un altına indirdiği yönünde olup bu etkisini damarları genişletmekten ziyade iskemik nöronal hücrelere kalsiyum girişini engellemek süretiyle gösterdiği bildirilmiştir (42).

Subaraknoid kanama sonrasında ortamdaki kan pıhtısına karşı sellüler ve moleküler inflamatuvar yanıt gelişir. Antiinflamatuvar birer ajan olan ibuprofen ve metilprednizolon ile antioksidan birer ajan olan 21-aminosteroid ve desferroksaminin vazospazmda etkili oldukları deneysel çalışmalarda gösterilmişse de klinik düzeyde benzer etkileri görülememiştir (39, 40).

### **2.2.7.3. Endovasküler Tedavi**

Son yıllarda gelişen teknik ve teknoloji endovasküler girişimleri serebral vazospazm tedavisinde bir alternatif olarak ortaya çıkarmıştır. Bu yöntemlerden bilinen en önemli ikisi balon anjiyoplasti ve intrarteriyel papaverin uygulamasıdır. Balon anjiyoplastiyle olumlu sonuçlar alınmasına karşın işleme bağlı komplikasyonların %2-5 gibi yüksek düzeyde olması bu yöntemin yaygın olarak kullanılmasını engellemiştir (43, 44, 45). Yıllardır nöroşirurjiyenler tarafından spazmı çözmek üzere topikal olarak kullanılan papaverinin intraarteriyel selektif enjeksiyonu vazospazm tedavisinde kullanılmaktadır. İntrarteriyel papaverinin spastik damarı açmakta başarılı olduğu, ancak bu etkisinin kısa sürede kaybolduğu ve tekrarlayan enjeksiyonlar yapılması gerektiği bildirilmiştir. İntraarteriyel tedavi ile anjiyografik spazmın açılmasıyla klinikteki düzelmeye arasında zayıf bir korelasyon bulunduğu gösterilmiştir. Papaverin enjeksiyonları sırasında kafa içi basıncın yükseldiği, bununla serebral perfüzyon basıncını düşürüp iskeminin artmasına yol açabileceği, bu nedenle papaverin enjeksiyonlarının intrakraniyal basınç monitörizasyonu altında yapılması gerektiği bildirilmiştir (46, 47, 48).

### **2.2.8 Vasküler Düz Kas**

Vasküler tonusunu belirleyen düz kas hücrelerinin membran potansiyeli sabit olmayıp ritmik olarak sürekli değişir, yani damar düz kası sürekli bir kısmi kasılma durumundadır. Bu durum periferik kan basıncını ve organların kan akımını düzenler (57). Damar düz kas hücresi membran potansiyelinin depolarizasyonu düz kasta kontraksiyona neden olurken, repolarizasyonu ya da hiperpolarizasyonu relaksasyona neden olur. Depolarizasyonda en önemli katyon kalsiyum (Ca) iyonu iken, hiperpolarizasyonda en önemli katyon potasyum (K) iyonudur (58).

Hücre membrandaki Ca iyon kanallarının eksitasyon sırasında açılması sonucu hücre dışı Ca, iyon kanallarından hücre içine girerek sarkoplazmik retikulum ve sitoplazma membranının iç yüzüne bağlı Ca havuzundan Ca saliverilmesine neden olur

ve böylece artmış hücre içi Ca, düz kas kasılma sürecini başlatır (59). Yapılan deneysel çalışmalarda serebral vazospazmın erken döneminde kalsiyumun etkili olduğu gösterilmesine rağmen kronik dönemde hücre içi kalsiyum artışının vazospazm ile ilişkisi gösterilememiştir (60, 61).

Hücre membran hiperpolarizasyonu damar düz kasında relaksasyona neden olup başlıca potasyum gradienti ile tayin edilir. Serebral vazospazmın, hücre membranı K iyon kanallarının inaktivasyonu sonucu serebral damar düz kas hücresi membran potansiyelinde oluşan kronik depolarizasyondan kaynaklandığı da öne sürülen bir diğer görüştür ve K kanallarını aktive eden veya açan farmakolojik ajanların vazospazmın tedavisinde etkin rol oynadığı literatürde bildirilmiştir (62, 63).

Serebral arteriyel damar tonusu vazokonstriktör ve vazodilatör sistemlerin uyum içinde çalışması ile dengede tutulmaktadır. Endotel, düz kas hücreleri üzerinde hem NO gibi vazodilatör, hem de endotelin (ET) gibi vazokonstriktör maddeler üretmektedir. Günümüzde serebral vazospazma yol açan en önemli faktörlerin endotel kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Hem klinik çalışmalarda hem de hayvan deneylerinde SAK sonrası NO düzeylerinin 10. dakikada düştüğü gösterilmiştir. Endotel disfonksiyonuna yol açan asıl faktörün ise oksihemoglobin veya bilirubin olduğu sanılmaktadır (64).

Normal koşullarda endotel hücrelerinden salınan NO vasküler düz kas hücresine difüze olarak solubl guanilat siklazı aktive etmektedir. Guanilat siklaz siklik guanozin monofosfat (cGMP) üretmek suretiyle hücre içi Ca kanallarını aktive etmekte, bunun sonucunda da düz kas hücreleri gevşemektedir. SAK sonrasında ise hemoglobin NO'ye bağlanarak etkinliğini azaltmaktadır. Ayrıca hemoglobinin direk olarak guanilat siklazı inhibe edici etkisi de bulunmaktadır (64).

SAK sonrası inflamatuvar süreçte proinflamatuvar sitokinlerin yanında ET-1 de sentezlenmektedir. Subaraknoid mesafedeki kan pıhtısı hemolize olduktan sonra lökositlerden ET-1 sentezini indüklemekte, ET-1 ise hem vazokonstriksiyona yol açarak hem de endotelial ve düz kas hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi ile vazospazm gelişmesine katkıda bulunmaktadır (64).

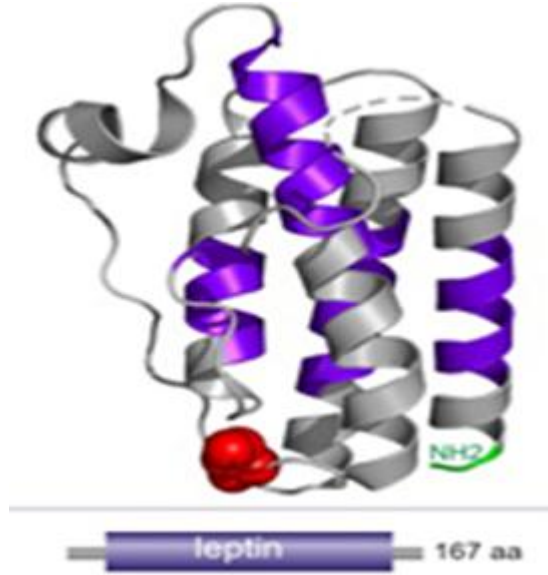
### **2.3. LEPTİN**

Leptin, latince *leptos* kelimesinden türetilmiş zayıflatıcı anlamında, yağ hücresinde ve diğer birçok dokuda ob-gen tarafından üretilen ve plazmaya salınan bir hormondur (85,86). Kana geçtikten sonra özel reseptörleri aracılığı ile kan beyin bariyerini aşarak merkezi sinir sistemine ulaşır ve besin alımını azaltıp, enerji harcamasını arttırarak etkisini gösterir (87).

### 2.3.1. Leptinin Özellikleri

1994 yılında J Fridman ve Y Zhang uzun süren yağ hücresi kültürü çalışmaları sonucu ob-geni izole ettiler. Leptinin ob-gen tarafından yağ hücresinde üretildiği ve plazmada belirli bir kan seviyesi oluşturduğu ilk defa aynı ekip tarafından bildirildi (88).

Leptin 167 amino asit içeren, 16 kDa molekül ağırlığında yağ hücresi ve birçok dokudan salgılandığı saptanan, plazmada belirli bir kan düzeyi oluşturan kanda serbest ve proteine bağlı olarak taşınan bir polipeptidir (88,89). Leptin, ob-gen tarafından kodlanır ve bu gen, sıçanlarda 6 no'lu kromozomda, insanlarda ise 7. kromozomun uzun kolundadır (7q31 bölgesinde). Yapısı IL-6 ve IL-11, IL 12 ile benzerlik gösterir. Biyolojik aktiviteden N-terminal bölgesi sorumludur (90). Leptin organizmada böbrekler tarafından idrar yolu ile atılır. Sağlıklı erişkinlerde plazma leptinin fizyolojik sınırları 5–20 ng/ml arasındadır (91).



**Şekil 2 :** Leptinin 167 aminoasitten oluşan polipeptit yapısı (cellbiol.net).

### 2.3.2. Leptin Reseptörleri

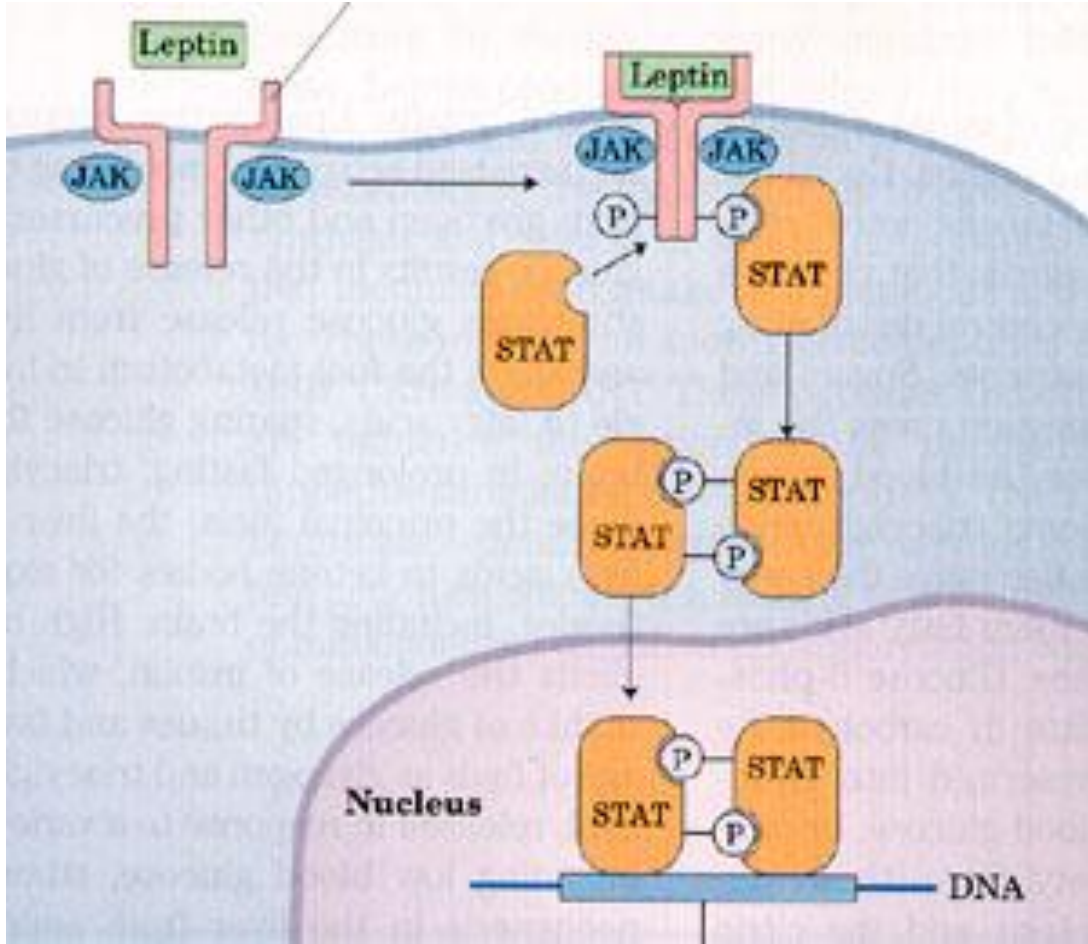
Leptin etkisini leptin reseptörleri yoluyla gerçekleştirir. Leptin reseptörü, 1996 yılında, leptine rezistans olduğu gösterilen db/db farelerde db-gen ürünü olarak keşfedilmiştir. Leptin reseptörleri, farelerde 4. kromozomda bulunan db geni tarafından kodlanır (92). Leptin, sitokin ailesine olan aşırı benzerliği nedeniyle Klas-1 sitokin reseptör ailesinden sayılmaktadır. Leptin IL-6 ve IL-11 ile yüksek oranda benzerlik gösterirken, leptin reseptörleri de IL-6 ile homoloji göstermektedir. Toplam 6 reseptör saptanmıştır. Bunlar; OB Ra-b-c-d-e-f 'dir. OB Re reseptörü hariç diğer 5 tanesi

transmembranöz alana sahip olup sadece OB Rb (uzun leptin reseptörü) intraselüler motifler içerir. OB Re ise çözünür reseptör şeklinde dolaşımda bulunur. Bir leptin taşıyıcı protein olup kanda biyolojik olarak aktif leptinin potansiyel rezervuarı olarak görev görmektedir (93).

**OB-Rb (uzun form) reseptörler** sinyal iletme kapasitesine sahiptirler ve en çok hipotalamusta; az miktarda akciğer, böbrekler, karaciğer, iskelet kası, kalp, pankreas, ince barsaklar, overler, testisler, hematopoetik hücreler, yağ doku ve daha birçok hücre ve dokuda bulunur (94).

**OB-Ra (kısa form) reseptörlerin** ise intrasellüler sinyal için gerekli olan segmentlerin tümünü taşımazlar ve bu nedenle sinyal iletiminde rolleri çok az veya yoktur. Bunlar, başlıca böbrek, akciğer, beyin kapillerleri ve plexus koroideusta bulunurlar. Beyin kapillerleri ve plexus koroideus'da OB-Ra reseptörlerinin bol olarak bulunması, kısa form reseptörlerin leptinin merkezi sinir sistemine transportunda önemli görevleri olduğunu düşündürmektedir (95).

Leptin reseptörüne bağlandıktan sonra diğer sitokinler gibi JAK-STAT (JanusKinase/Signal Transducer and Activator of Transcription) sinyal transdüserini aktive eder ve daha sonra STAT ve MAP kinaz aktivasyonu yaparak etkisini gösterir (Şekil 3). Leptin ayrıca insülin ile beraber arkuat nükleusta fosfatidilinozitol 3 kinazı(PI3K) stimüle ederek etkisini gösterir (96).



**Şekil 3:** Leptin reseptörlerinin aktivasyonu (altair.chonnam.ac.kr).

### 2.3.3. Leptin Sentezi ve Sekresyonunun Regülasyonu

Leptin başlıca adipositlerden salınmakla beraber, son yıllarda iskelet kasından, mide fundus mukozasından, gebelikte plasentedan ve koroid pleksus gibi değişik dokulardan salındığı ortaya konmuştur. Yağ hücresinde ob-gen tarafından mRNA'ya kodlanarak üretilir (86,96). Leptin mRNA'sına beyinde serebral korteks, serebellum, hipotalamus ve pineal bezde raslanmıştır (97). Leptin düzeyinin ana belirleyicisi vücut yağ kitlesi ve vücut kitle indeksi olsa da bir çok faktör leptinin regülasyonunda rol almaktadır (98). Kadınlarda erkeklerden daha yüksek bulunur. Kadınlarda yağ dokusunun fazla olması ve erkeklerde testosteronun leptin sekresyonunu inhibe etmesi bu seks farklılığının nedenleri olarak düşünülmektedir. Yarı ömrü 25 dakikadır ve obezlerde yarı ömrü değişmez (101, 102). Leptin sekresyonu sirkadiyen değişiklik gösterir. Sabah en düşüktür, öğleden sonra artmaya başlar ve gece saat 01:00–04:00 arası pik yapar. Gece ise LH pulsasyonlarıyla senkronize bir salınımı vardır. Leptin sekresyonu ayrıca pulsatil bir karakter gösterir (104).

**Tablo 1:** Leptin sentezini etkileyen faktörler(adutdergi.org)

<b>STİMÜLE EDENLER</b>	<b>İNHiBE EDENLER</b>
Besin alınımı	Tiroid hormonları
İnsülin	Büyüme hormonu
Glukokortikoid	Somatostatin
Prolaktin	Yağ asitleri
Östrojenik hormonlar	Katekolaminler
Ateş	Androjenik hormonlar
TNF $\alpha$ (akut)	TNF $\alpha$ (kronik)
Endotoksemi	Açlık
Metil p tirozin	Egzersiz
	Uzun süreli soğuğa maruz kalma

### **2.3.4. Leptinin Etki Mekanizması**

#### **2.3.4.1. Leptin ve Obesite**

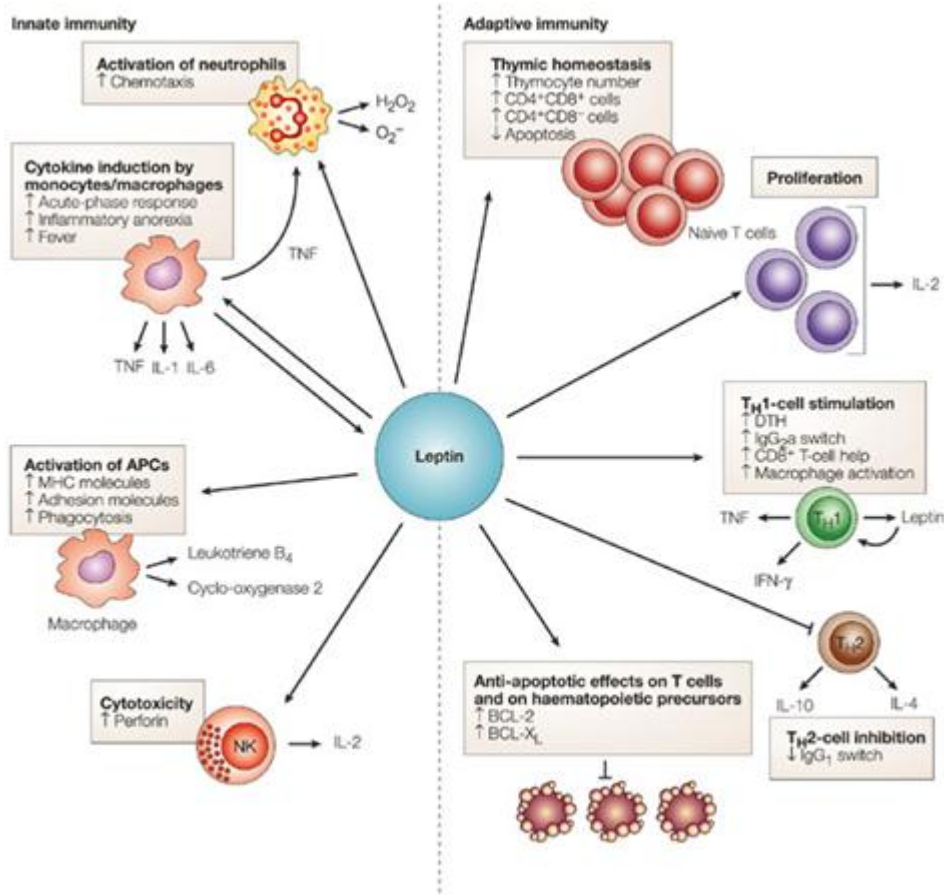
Leptin eksikliğinin obezite ile sonuçlandığı günümüzde artık oldukça iyi bilinen ve kabul edilmiş bir gerçektir. Leptin antiobezite etkisini başlıca enerji alımını azaltıp, harcanmasını artırarak göstermektedir (93). Leptin vücut yağ kitlesi ile orantılı olarak dolaşımda bulunur ve santral sinir sistemine de plazma seviyeleri ile orantılı olarak geçer. Leptinin ana etki mekanizması birçok hipofizer hormonun regülasyonunda görev alan ve asıl etkisi iştahı artırmak olan nöropeptid-Y'nin arkuat nükleus'dan salınımı ve ekspresyonunu inhibe etmektir (105). Bununla birlikte yapılan çalışmalar leptinin diğer birtakım mediyatörler ile de etkileşim içinde olduğunu ve kompleks bir iletişim ağı olduğunu göstermiştir (106).

#### **2.3.4.2. Leptin Hematopoez ve İmmün Sistem**

Hematopoetik dokularda ve embriyonik gelişim dönemlerindeki "stem" hücrelerinde leptin reseptörlerinin gösterilmesi leptinin hematopoezde rolü olabileceğini düşündürmüştür (111). Kemik iliğindeki adipositlerde leptin sekresyonu

gösterilmiş ve leptinin hematopoezide önemli rol oynadığı saptanmıştır. Kültüre edilmiş periferik kan monosit hücrelerinde apoptozise karşı monositlerin yaşam sürelerini arttırdığı ortaya konmuştur. Kök hücrelerin diferansiyasyonunda ve osteoblast oluşumunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Leptin, lökosit sentezini uyarır ve eritropoetin hormonunun eritrositlere olan etkisini artırır (112). Tıpkı bakteriler gibi leptin de makrofajların salınımını uyarır (113). Leptin, çeşitli hücre tiplerinde proliferatif ve anti-apoptotik etkiler gösterir (114, 115). Leptinin CD4+ helper T hücrelerinde stimülasyon etkisi ile proliferasyonu artırdığı gösterilmiştir. Leptin, Th2 yanıtını inhibe ederken Th1 yanıtını destekler (116, Şekil 4).

Leptin, enfeksiyon ve otoimmüniteye duyarlılığın dengelenmesinde önemli role sahiptir (116). Leptin yetmezlikli hastalarda immün sistemde değişiklikler olduğu saptanmış olup, ayrıca bu hastalarda antioksidan koruma sisteminin bozuk olduğu da gösterilmiştir. Ekzojen leptin verilmesinin, leptin yetmezliği veya düşük leptin düzeyi ile ilişkili immunolojik bozuklukları düzelttiği bildirilmiştir (114) .



Şekil 4: Leptinin hematopoez ve immün sistem etileri(Nature Reviews Immunology).

### 2.3.4.3. Leptin ve Anjiogenez

Obezitenin gelişme ve düzelme (zayıflama) fazlarında, leptindeki artma ve azalmalara paralel olarak yağ dokusunun vaskülaritesinde de fizyolojik olarak artmalar ve azalmalar olduğu saptanmıştır. Bu da leptinin anjiyogenezde bir lokal regülatör olarak davrandığını düşündürmüştür (117). Leptin reseptörleri damar endotel hücrelerinde mevcuttur ve anjiogenezisi artırır. Leptin, normal rat korneasında yeni damar oluşumuna neden olurken leptin reseptörü yetersiz olan *Zucker* fa/fa rat korneası için etkisiz olmuştur (118). Hem in vitro hem in vivo çalışmalar, leptinin anjiyogenezini ilerletici aktivitesi olduğunu göstermiştir (119).

### 2.3.4.4. Leptin Nöronal ve Vaskuler Etkileri

Güncel çalışmalarda leptinin nöroprotektif, nöroenezis etkileri bildirilmiştir. İskemik nöronal hasar sonrası eksojen leptin uygulaması nöronal kök hücre gelişimini etkileyerek nöron ve glia hücrelerinde artışa neden olmuş, perilezyoner korteksde kan damarlarını artırmıştır (77, 76). Vasküler endotelin leptin için hedef bir organ olduğu söylenerek bu fonksiyonlarını belirlemek için çeşitli bilimsel çalışmalar yapılmıştır (118). Leptinin intravenöz uygulanmasının serum nitrit/nitrat konsantrasyonunu artırdığı ve eksojen leptinin serbest NO'ı indükleyerek vazodilatasyona neden olabileceği gösterilmiştir (79). Deneysel çalışmalarda eksojen leptinin uygulanması ile aynı anda NO sentetaz inhibitörü olan N-monomethyl-Larginine (L-NMMA) de verilerek leptinin NO'den bağımsız olarakda vazodilatasyona neden olduğu gösterilmiştir ( 80, 81).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Ondokuzmayıs Üniversitesi etik kurulundan 06.02.2012 tarih ve 02-2012/01 karar nolu etik kurul izni alınarak Ondokuzmayıs Üniversitesi deney hayvanları araştırma laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmada 280-300 gr ağırlığında 40 adet Spraque-Dawley cinsi dişi sıçan kullanılmıştır. Tüm denekler 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık siklusunda, standart laboratuvar koşullarında tutulup ve standart yem ile beslenmiştir.

Deney planında 5 grup belirlendi:

- Grup 1 : Kontrol grubu 8 adet
- Grup 2 : SAK (+) Leptin (-) 3.gün sakrifiye 8 adet
- Grup 3 : SAK (+) Leptin (+) 3.gün sakrifiye 8 adet
- Grup 4 : SAK (+) Leptin (-) 7.gün sakrifiye 8 adet
- Grup 5 : SAK (+) Leptin (+) 7.gün sakrifiye 8 adet

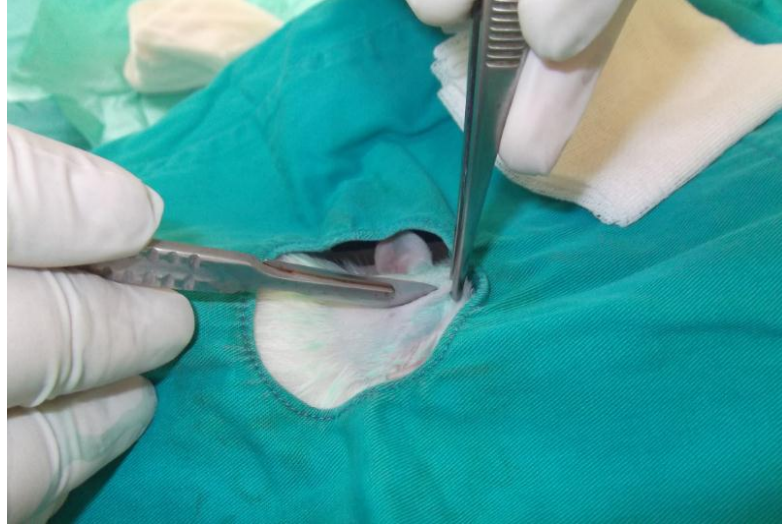
#### 3.1. Anestezi

Bir gece önceden aç bırakılan ratlarda genel anestezi Ketamin (50 mg/kg ) (Ketalar, Eczacıbaşı) , Ksilazin (10 mg/kg) (Rompun-%2, Bayer) karışımının intraperitoneal enjeksiyonu ile sağlanmıştır. Anestezi ratlar ağrıya yanıtız olacak ve deney sırasında spontan solunumlarına devam edecek şekilde ayarlanmış, gerektiğinde ek doz verilmiştir. Deney sırasında ratların vücut ısısı rektal ısı probu ile kontrol edilerek, 37°C 'de sabit tutulmuştur. İşlem sırasında 1.5 lt/dk. dan nazal maske ile O<sub>2</sub> verilmiştir.

#### 3.2. Subaraknoid Kanama Oluşturulması

Genel anestezi sağlandıktan sonra, ratların inion ile atlas arası traş edilip, baş 45 derece fleksiyonda olacak şekilde stereotaktik frame yerleştirildi. Polivinilpirolidon iyod ile cerrahi alan temizliği yapıldı. Orta hat oksipitoservikal 2 cm lik düz insizyonla cilt cilt altı geçildi, oksipital adale ve posterior servikal adaleler disseke edilerek atlantookspital membran ortaya kondu (Şekil 5, 6 ). Ratlara supine pozisyon verilerek sol inguinal bölgeleri polivinilpirolidon iyod ile temizlendi. Cilt insizyonunun ardından sol femoral arter ortaya kondu (Şekil 7 ). Femoral arter kateterize edilip 0.1 ml

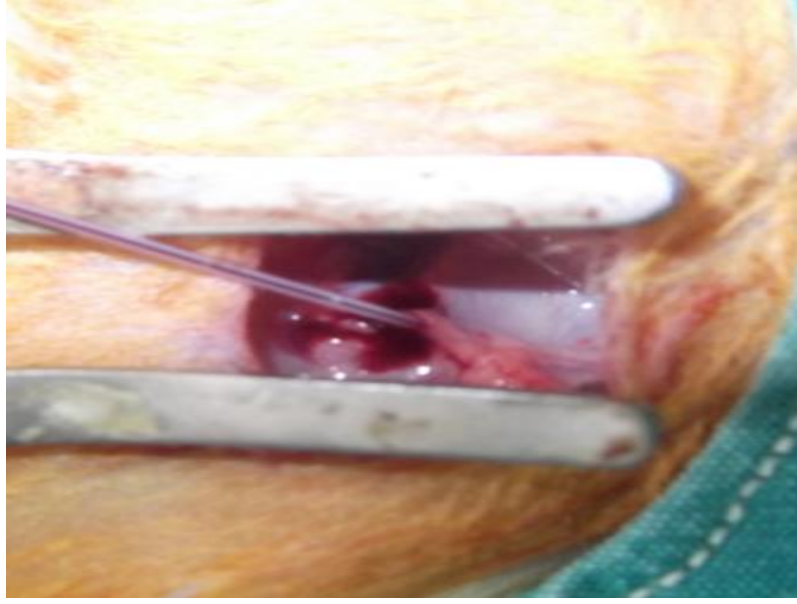
nonheparinize otolog arteryal kan alınıp tekrar prone pozisyona geçildi. Atlantooksipital membrandan 25 gauge iğne ile sisterna magnaya girildi. 0.1 ml beyin omurilik sıvısı ( BOS ) boşaltılmasını takiben aynı miktardaki arteryal kan 30 saniye sürede yavaşça enjekte edildi. Adele dokusu ve cilt suture edilerek cerrahi saha kapatıldı. Ratlar intrasisternal kan pıhtı formasyonu oluşması için 15 dakika 45 derece trendelenburg pozisyonunda yatırıldı. Ratlar tamamen uyandıktan sonra kafeslerine alındı. İşlem öncesi bütün deneklere 50 mg/kg sefalosporin i.p. profilaktik olarak uygulandı. Cerrahi yara yerlerine denekler sakrifiye edilene kadar günlük olarak polivinilpirolidon iyod ile pansuman yapıldı.



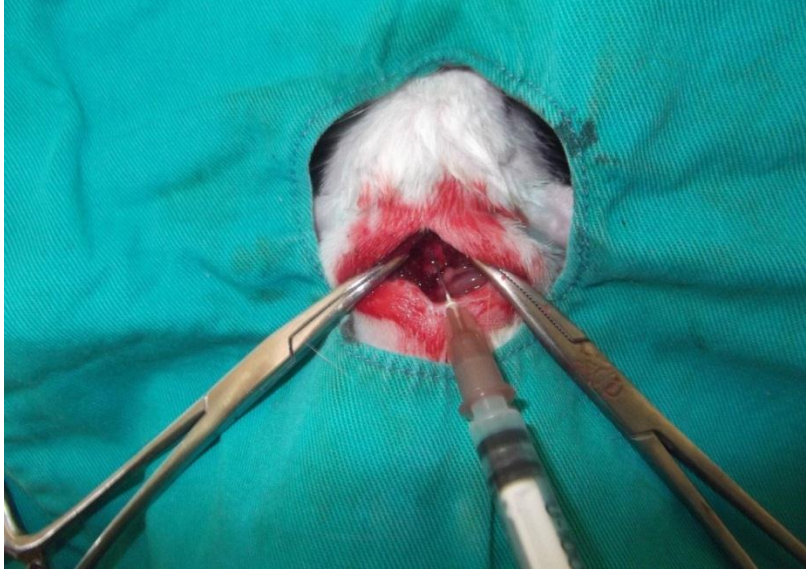
**Şekil 5:** Oksipito-servikal orta hat düz insizyon (Orijinal).



**Şekil 6:** Atlanto-oksipital membran görünümü (Orijinal).



**Şekil 7:** Rat femoral arteri (Orijinal).



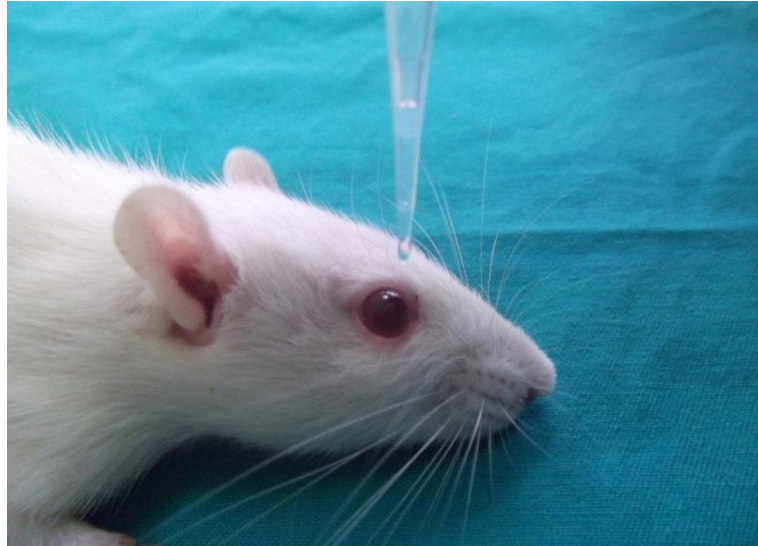
**Şekil 8:** Sisterna magnadan BOS boşaltılarak otolog kan enjeksiyonu (Orijinal).



**Şekil 9:** Cerrahi işlem tamamlanarak suture edilmiş rat (Orijinal).

### 3.3. Leptinin Topikal Uygulanması

Subaraknoid kanamanın oluşturulduğu gün 0. gün olarak kabul edildi. İlk doz SAK oluşturulmasından hemen sonra uygulanmak üzere, 24 saatte bir sol göze fosfat tamponlu tuz çözeltisinde (phosphate buffered saline, PBS), (Sigma-P4417) solüsyonunda hazırlanmış 1.2mg/ml lik solüsyondan 10  $\mu$ L topikal (göz damlası) leptin Grup 3' teki deneklere 3 kez, Grup 5' teki deneklere 7 kez olarak uygulandı.



**Şekil 10:** Topikal leptin uygulanması (Orijinal).

### 3.4. Perfüzyon Fiksasyon İşlemi

Ketamin ve Xylazine genel anestezisi altında göğüs boşluğu açıldı. Kan leptin düzeyi ölçümleri için halen atmakta olan kalpten 3 cc intrakardiyak kan alınıp santrifüj edilip serumları ayrılarak -20 derecede saklandı. Kan alınmasını takiben ratların inen aortaları klemple kapatıldı. Sol ventriküle intraket yerleştirildi. Önce 200 ml heparinli serum fizyolojik solüsyonu verildi. Beyin perfüzyonunu takiben kalbe geri dönen sıvı sağ atrium açılarak boşaltıldı. 200 ml %10 'luk formaldehit solüsyonu verilerek vasküler yapıların fiksasyonu sağlandı. Geniş kraniektomi yapılarak beyin ve beyin sapı bütün olarak çıkarıldı. Stereolojik inceleme için, önceden etiketlenerek hazırlanmış içerisinde % 10'luk formaldehit bulunan kaplara konuldu.

### 3.5. Tedavi Grupları

**Grup 1:** Herhangi bir işlem ve ilaç uygulaması yapılmayan grup.

**Grup 2 :** SAK işlemi uygulanıp ilaç verilmeden 3. günde sakrifiye edilen grup.

**Grup 3:** SAK işlemi uygulanıp 3 gün boyunca 24 saat aralıklarla toplam 3 kez leptin tedavisi verilip 3. gün sonunda sakrifiye edilen grup.

**Grup 4 :** SAK işlemi uygulanıp ilaç verilmeden 7. gün sakrifiye edilen grup.

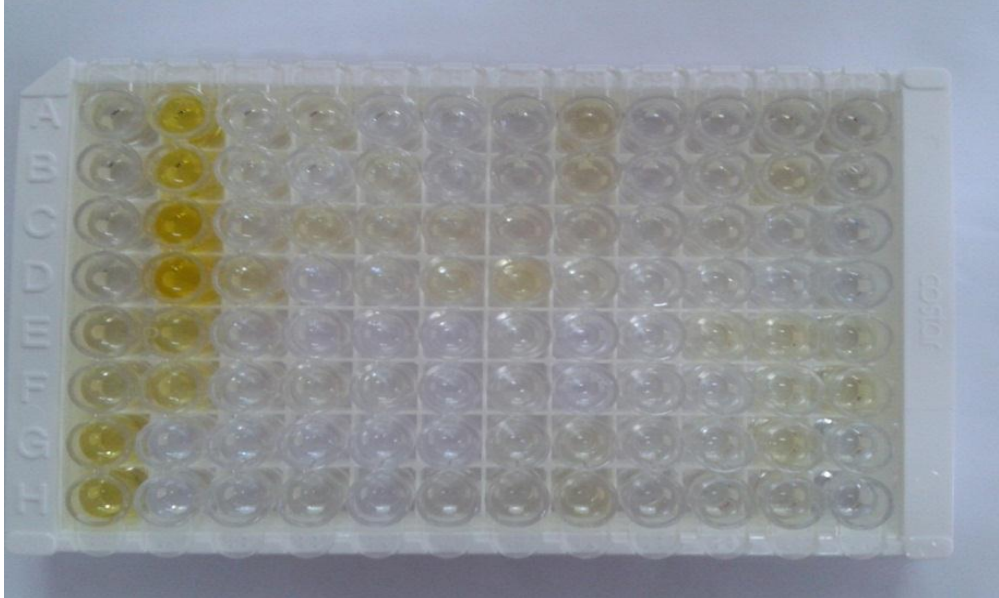
**Grup 5:** SAK işlemi uygulanıp 7 gün boyunca 24 saat aralıklarla toplam 7 kez leptin tedavisi verilip 7. Gün sonunda sakrifiye edilen grup.

### 3.6. Serum Leptin Düzeyi Ölçümleri

Test protokolüne uygun olarak rat leptin standart solüsyonları hazırlandı. Rat serumları ependorf tüplerde 20 kat sulandırılarak analize hazır hale getirildi. Tüm deneklerden alınan serum örneklerine RAT Leptin ELISA (BioVender,Cat.No:RD2910001200R) kit prosüdüğü aşağıdaki sırayla uygulandı.

- 1) Standartlar, kalite kontrol örneği, dilüsyon tamponu (blank) ve dilüe edilmiş örneklerden 100'er µl pleyt kuyucuklarına konuldu.
- 2) Pleyt oda ısısında (25°C) orbital çalkalayıcıda (300 rpm) çalkalanarak 1 saat inkübe edildi.
- 3) Kuyucuklar üç kez yıkama solüsyonu (0.35 ml/kuyucuk) ile yıkanarak son yıkama sonrası kurutuldu.

- 4) 100 µl işaretli biotin antikor solüsyonundan her kuyucuğa eklendi.
- 5) Pleyt oda ısısında (25 °C) orbital çalkalayıcıda (300 rpm) çalkalanarak 1 saat inkübe edildi.
- 6) Kuyucuklar üç kez yıkama solüsyonu (0.35 ml/kuyucuk) ile yıkanarak son yıkama sonrası kurutuldu.
- 7) Her kuyucuğa 100 µl Streptavidin-HRP konjugatı eklendi.
- 8) Pleyt oda ısısında (25 °C) orbital çalkalayıcıda (300 rpm) çalkalanarak 30 dk inkübe edildi.
- 9) Kuyucuklar üç kez yıkama solüsyonu (0.35 ml/kuyucuk) ile yıkanarak son yıkama sonrası kurutuldu.
- 10) Her kuyucuğa 100 µl substrat solüsyonu eklenip alüminyum folyo ile sarıldı.
- 11) Pleyt 10 dk oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon esnasında çalkalanmadı.
- 12) Kuyucuklara 100 µl stop solüsyonu eklendi.
- 13) Kuyucuklardaki örneklerin absorbansı pleyt okuyucu ile 450 nm dalga boyunda (referans dalga boyu 630 nm) belirlendi.



**Şekil 11:** ELISA testi uygulanmış pleyt görünümü (Orijinal).

### **3.7. Histolojik Takip**

Tüm gruplardan elde edilen beyin sapı dokuları baziller artere zarar vermeden %10 'luk formol solüsyonu içerisinde saklandı. Histoloji-Embriyoloji bölümüne ulaştırılan dokuların burada ışık mikroskopik takibi yapıldı. Takibi yapılan dokulardan baziller arter yatağında kalacak şekilde örnekler hazırlanarak parafine gömüldü. Parafin bloklar hazır hale geldikten sonra her bloktan mikrotom yardımıyla stereolojinin temel prensiplerinden sistematik rastgele örnekleme prensibine uygun olarak, pilot çalışma sonucu doğrultusunda 15 mikron kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler rutin histolojik takip işlemlerinden sonra Hematoksilen-Eozin ile boyandı. Boyanan kesitler üzerinde Calvalier yöntemi kullanılarak damar lümeni ve tunika medya tabakasının alanları hesaplandı.

#### **3.7.1 Işık Mikroskopik Takip Protokolü**

- %10'luk formaldehit ( 10 gün)
- Akarsu (20 saat)
- %70'lik alkol (1 saat)
- %80'lik alkol (1 gece)
- %96'luk alkol (1 saat)
- %96'luk alkol (1 saat)
- %100'lük alkol (1 saat)
- %100'lük alkol (1 saat)
- Ksilen (10 dk)
- Ksilen (10 dk)
- Ksilen (10 dk)
- Paraplast (1 saat)
- Paraplast (1 saat)
- Paraplast (1 saat)
- Gömme

#### **3.7.2 Kesit Alma ve Hematoksilen-Eozin Boyama**

Bloklanan dokulardan mikrotom kullanılarak 15 mikron kalınlığında kesitler alındı. Kesitler jelâtinli sıcak su dolu benmari içerisinde konularak açılmaları sağlandı ve

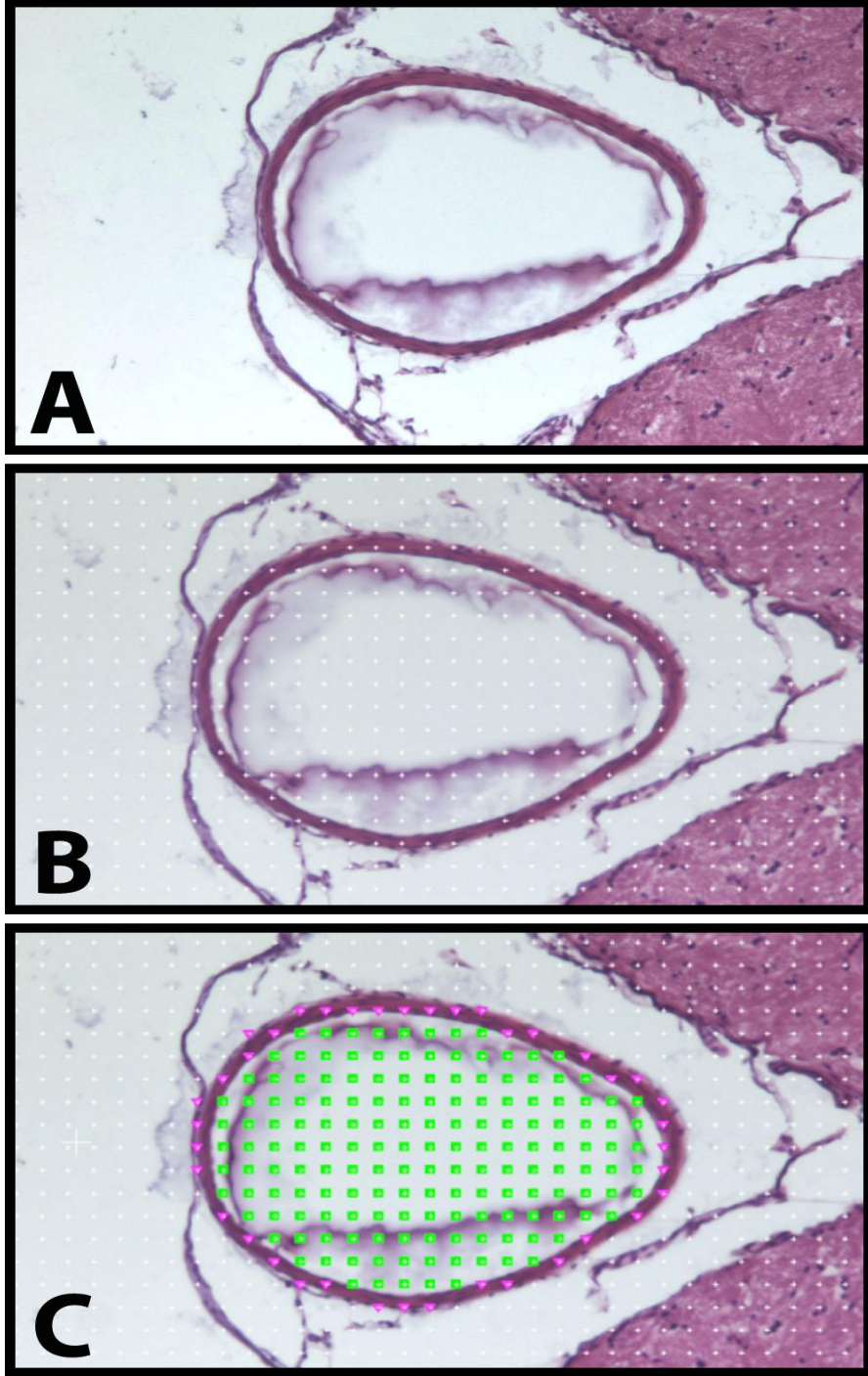
lamlara alınan kesitler iyice kuruduktan sonra Hematoksilen-Eozin boyama işlemine geçildi.

- Ksilen (10dk)
- Ksilen (10dk)
- Ksilen (10dk)
- %100'lük alkol (6dk)
- %96'luk alkol (6dk)
- %80'lik alkol (6dk)
- %70'lik alkol (6dk)
- Akar su
- Hematoksilen boyası (1dk)
- Asit-alkol karışımı (daldır-çıkart)
- Eozin solüsyonu (10 sn)
- Akar su (5 dk)
- %80'lik alkol (daldır-çıkart)
- %96'lik alkol (daldır-çıkart)
- %96'lik alkol (daldır-çıkart)
- %100'lük alkol (10 dk)
- %100'lük alkol (10 dk)
- Ksilen (50 dk)
- Ksilen (50 dk)
- Entellan ile kapama

### **3.7.3 Stereolojik Çalışma**

Yapılan ön çalışmayla alınacak kesit kalınlığı 15 µm olarak belirlendi. Bu amaçla kontrol grubuna ait rastgele seçilen iki hayvan kullanıldı. Kesitlerin stereoloji çalışma istasyonunda (Stereoinvestigator 9.0.MicroBrieldField; Colchester; USA) Cavalier metodu kullanılarak alan ölçümleri yapıldı. Bu ölçümler için kesit profilinin hesaplandığı alana göre hazırlanmış noktalı alan ölçüm cetveli kullanıldı. Ölçüm cetvelindeki noktalar arası uzaklık yapılan ön çalışmaya göre 20 µm x 20 µm olarak belirlendi. Kesitler

üzerinde hesaplar yapılırken seri kesit görüntülerindeki ilgili alanlar üzerine noktali ölçüm cetveli rastgele olarak yerleştirildi ve ilgilenilen yapıyla kesişen tüm noktalar sayıldı. Baziller arter lümeni ve tunika medya tabakasına ait alanlar ölçüm yapılması için sınırlandırıldı. İki farklı alan için iki farklı markır kullanıldı ve alan hesaplaması yapıldı (Şekil 12).



**Şekil 12:** Cavalier prensibinin uygulanmasını gösteren şekil (Orijinal).

Noktalı alan ölçüm cetvelinin nokta yoğunluğu uygun HK (Hata katsayısı=coefficient of error)'a göre belirlenmiş seri ışık mikroskopik görüntü sayısı göz önüne alınarak belirlendi (120,121 ). Pilot çalışmada hesaplanan HK 'ya uygun şekilde tespit edilen nokta yoğunluğuna göre tüm gruplarda sayım yapıldı. Elde edilen sayım sonuçları aşağıdaki formülde ilgili alanlara yerleştirilerek adı geçen parametrelerin alanları hesaplandı ( 122).

$$\text{Alan} = a/p (\mu\text{m} \times \mu\text{m}) \times (\Sigma P) \mu\text{m}^2$$

a/p: iki nokta arasındaki alan

$\Sigma P$ : İlgilenilen yapıyla kesişen toplam nokta sayısı

### 3.8 İstatistiksel Çalışma

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS 20.0 (windows) programı kullanıldı. Analiz öncesi normallik testi yapıldı. Normallik testi sonucu verilerin normal dağılım gösterdiği tespit edildi. Veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile analiz edildi. Çok yönlü karşılaştırmada ise Tukey testi kullanıldı. Tüm grupların karşılaştırılmasında 0.05 anlamlılık derecesi (p) baz alındı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Makroskopik bulgular

Çalışmaya toplam 40 adet Spraque-Dawley cinsi dişi rat dahil edildi. Deneklere ait beyin dokusunun makroskopik incelenmesinde uygun subaraknoid kanama modelinin oluştuğu gözlemlendi.



**Şekil 13:** SAK sonrası beyin ve beyin sapının makroskopik görünümü (Orijinal).

### 4.2. Serum leptin ölçüm bulguları

Deneklerden alınan serum örneklerine Rat Leptin ELISA (BioVender, Cat.No: RD2910001200R) kit prosedürü uygulanarak leptin düzeyleri ölçüldü.

Elde edilen sonuçlara göre kontrol grubunun ortalama leptin düzeyi 2192,8 pg/ml olarak tespit edilirken 3 gün süre ile günde 1 kez 10 µl topikal leptin tedavisi uygulanan Grup 3'ün ortalama leptin düzeyi 3682,1 pg/ml olarak tespit edildi (Tablo 2). Bu iki grubun arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı olarak bulundu ( $p < 0.05$ , Tablo 3, Şekil 14).

Kontrol grubu ortalama leptin düzeyi 2192,8 pg/ml olarak tespit edilirken 7 gün süre ile günde 1 kez 10 µl topikal leptin tedavisi uygulanan Grup 5'in ortalama leptin düzeyi 4753,6 pg/ml olarak tespit edildi (Tablo 2). Bu iki grup arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı olarak bulundu ( $p < 0.05$ , Tablo 3, Şekil 14).

Grup 3 ve Grup 5'in ortalama leptin değerleri sırasıyla 3682,1 pg/ml ve 4753,6 pg/ml olarak tespit edildi (Tablo 2). Bu iki grup arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı olarak bulundu ( $p < 0.05$ , Tablo 3, Şekil 14).

**Tablo 2:** Grupların serum leptin düzeyleri (pg/ml).

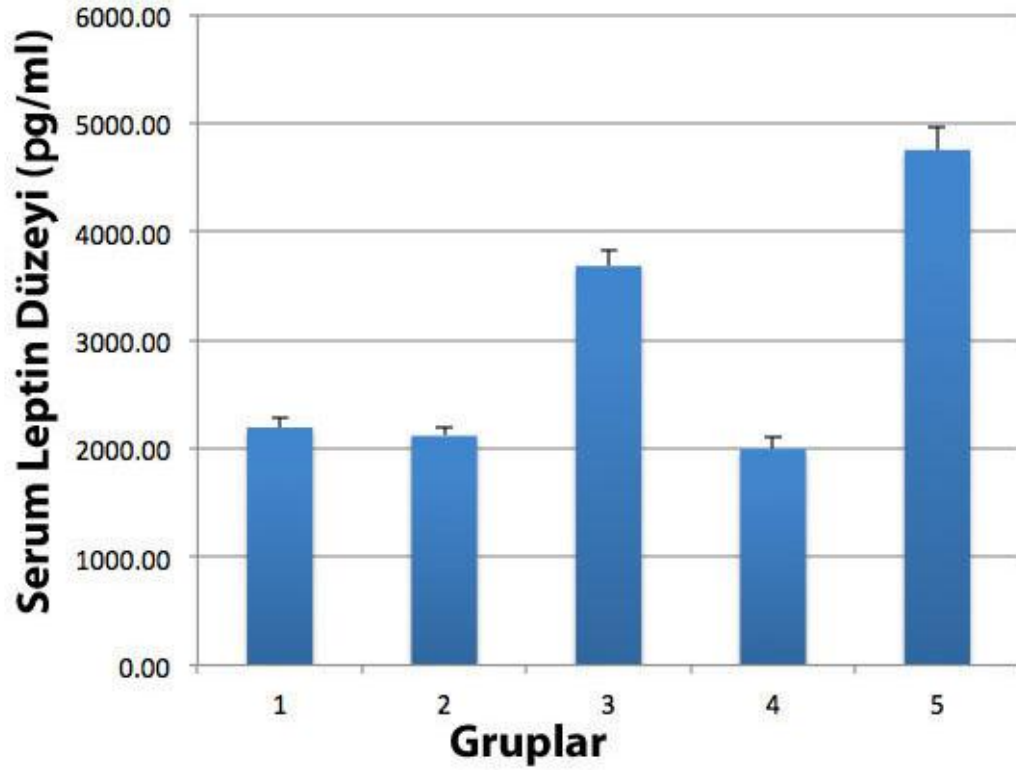
GRUPLAR	N	ORTALAMA	STANDART SAPMA	STANDART HATA	MINİMUM	MAKSİMUM
1	8	2192.90	260.28	92.02	1840.33	2456.99
2	8	2115.53	223.70	79.09	1785.51	2444.74
3	8	3682.12	387.49	137.00	3100.60	4200.99
4	8	1994.71	324.00	114.55	1468.70	2569.15
5	8	4753.67	592.54	209.50	3840.90	5422.90
Toplam	40	2947.79	1163.98	184.04	1468.70	5422.90

**Tablo 3:** Grupların serum leptin düzeylerinin istatistiksel analizleri.

Tukey HSD

GRUPLAR	P	
1	2	.994
	3	.000
	4	.834
	5	.000
2	1	.994
	3	.000
	4	.968
	5	.000
3	1	.000
	2	.000
	4	.000
	5	.000
4	1	.834
	2	.968
	3	.000
	5	.000
5	1	.000
	2	.000
	3	.000
	4	.000

## SERUM LEPTİN DÜZEYLERİ



Şekil 14: Grupların serum leptin düzeylerini gösteren grafik.

### 4.3. Stereolojik bulgular

Deneklerden elde edilen 15 µm kalınlığındaki baziller arter kesitleri H&E ile boyanıp stereoloji çalışma istasyonunda (Stereoinvestigator 9.0 MicroBrieldField; Colchester; USA) Cavalier metodu kullanılarak lümen ve tunica madia alan ölçümleri yapıldı.

Kontrol grubu ile SAK oluşturulup 3 gün takip edilen Grup 2'nin ortalama damar lümen alanları sırasıyla 1.192.640 µm<sup>2</sup> ile 935.600 µm<sup>2</sup> olarak hesaplandı (Tablo 4). Bu iki grubun arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı olarak bulundu (p<0.05, Tablo 5, Şekil 15).

Kontrol grubu ile SAK oluşturulup 3 gün süre ile günde bir kez 10µl topikal leptin tedavisi uygulanan Grup 3'ün ortalama damar lümen alanları sırasıyla 1.192.640 µm<sup>2</sup> ile 1.060.866 µm<sup>2</sup> olarak hesaplandı (Tablo 4). Bu iki grubun arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı değildi (p>0.05, Tablo 5, Şekil 15).

Kontrol grubu ile SAK oluşturulup 7 gün takip edilen Grup 4'ün ortalama damar lümen alanları sırasıyla 1.190.640  $\mu\text{m}^2$  ile 622.666  $\mu\text{m}^2$  olarak hesaplandı (Tablo 4). Bu iki grubun arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı olarak bulundu ( $p < 0.05$ , Tablo 5, Şekil 15).

Kontrol grubu ile SAK oluşturulup 7 gün süre ile günde bir kez 10  $\mu\text{l}$  topikal leptin tedavisi uygulanan Grup 5'in ortalama damar lümen alanları sırasıyla 1.190.640  $\mu\text{m}^2$  ile 974.333  $\mu\text{m}^2$  olarak hesaplandı (Tablo 4). Bu iki grubun arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı olarak bulundu ( $p < 0.05$ , Tablo 5, Şekil 15).

SAK oluşturulup 3 gün takip edilen Grup 2 ile SAK oluşturulup 3 gün süre ile günde bir kez 10  $\mu\text{l}$  topikal leptin tedavisi uygulanan Grup 3'ün ortalama damar lümen alanları sırasıyla 935.600  $\mu\text{m}^2$  ile 1.060.866  $\mu\text{m}^2$  olarak hesaplandı (Tablo 4). Bu iki grup arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı değildi ( $p > 0.05$ , Tablo 5, Şekil 15).

SAK oluşturulup 3 gün takip edilen Grup 2 ile SAK oluşturulup 7 gün takip edilen Grup 4'ün ortalama damar lümen alanları sırasıyla 935.600  $\mu\text{m}^2$  ile 622.666  $\mu\text{m}^2$  olarak hesaplandı (Tablo 4). Bu iki grup arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı olarak bulundu ( $p < 0.05$ , Tablo 5, Şekil 15).

SAK oluşturulup 7 gün takip edilen Grup 4 ile SAK oluşturulup 7 gün süre ile günde bir kez 10  $\mu\text{l}$  topikal leptin tedavisi uygulanan Grup 5'in ortalama damar lümen alanları sırasıyla 622.666  $\mu\text{m}^2$  ile 974.333  $\mu\text{m}^2$  olarak hesaplandı (Tablo 4). Bu iki grup arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı olarak bulundu ( $p < 0.05$ , Tablo 5, Şekil 15).

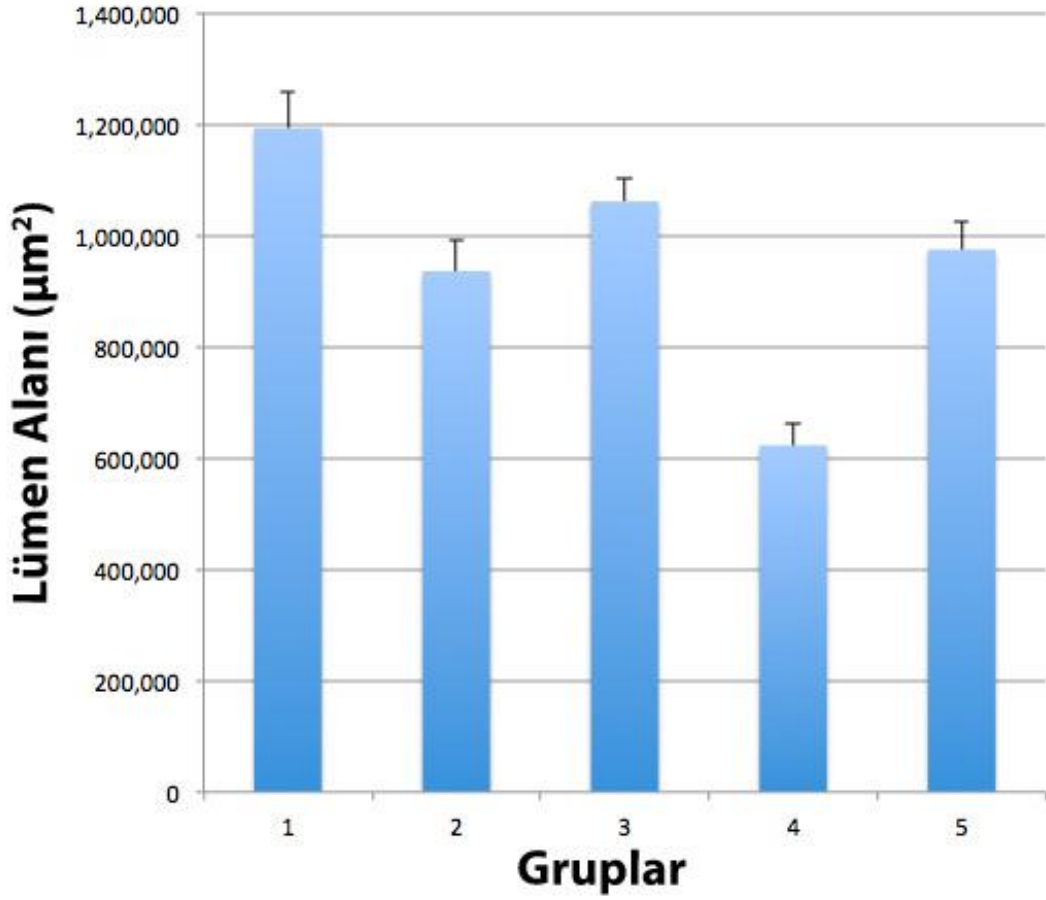
**Tablo 4:** Grupların baziller arter lümen alanları.

GRUPLAR	N	ORTALAMA	STANDART SAPMA	STANDART HATA	MİNİMUM	MAKSİMUM
1	6	1192640.00	162068.35	66164.13	970000	1408000
2	8	935600.00	159247.95	56302.65	724000	1189600
3	8	1060866.75	115310.55	40768.43	921200	1286800
4	8	622666.75	106287.52	37578.31	403200	769600
5	8	974333.50	145644.49	51493.10	810400	1267600
Toplam	38	944830.95	229195.11	37180.36	403200	1408000

**Tablo 5 :** Grupların baziller arter lümen alanlarının istatistiksel analizi.

Tukey HSD		
GRUPLAR		P
1	2	0.013
	3	0.409
	4	0.000
	5	0.045
2	1	0.013
	3	0.383
	4	0.001
	5	0.980
3	1	0.409
	2	0.383
	4	0.000
	5	0.721
4	1	0.000
	2	0.001
	3	0.000
	5	0.000
5	1	0.045
	2	0.980
	3	0.721
	4	0.000

## BAZİLLER ARTER LÜMEN ALANI



**Şekil 15:** Grupların baziller arter lümen alanlarını gösteren grafik.

Kontrol grubu ile SAK oluşturulup 3 gün takip edilen Grup 2'nin ortalama tunica media alanları sırasıyla 278.070 µm<sup>2</sup> ile 277.150 µm<sup>2</sup> olarak hesaplandı (Tablo 6). Bu iki grup arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı değildi (p>0.05, Tablo 7, Şekil 16).

Kontrol grubu ile SAK oluşturulup 3 gün süre ile günde bir kez 10 µl topikal leptin tedavisi uygulanan Grup 3'ün ortalama tunica media alanları sırasıyla 278.070 µm<sup>2</sup> ile 226.950 µm<sup>2</sup> olarak hesaplandı (Tablo 6). Bu iki grup arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı değildi (p>0.05, Tablo 7, Şekil 16).

Kontrol grubu ile SAK oluşturulup 7 gün takip edilen Grup 4'ün ortalama tunica media alanları sırasıyla 278.070 µm<sup>2</sup> ile 217.600 µm<sup>2</sup> olarak hesaplandı (Tablo 6). Bu iki grup arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı değildi (p>0.05, Tablo 7, Şekil 16).

Kontrol grubu ile SAK oluşturulup 7 gün süre ile günde bir kez 10 µl topikal leptin tedavisi uygulanan Grup 5'in ortalama tunica media alanları sırasıyla 278.070 µm<sup>2</sup> ile 196.800 µm<sup>2</sup> olarak hesaplandı (Tablo 6). Bu iki grup arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ( $p < 0.05$ , Tablo 7, Şekil 16).

SAK oluşturulup 3 gün takip edilen Grup 2 ile SAK oluşturulup 3 gün süre ile günde 1 kez 10 µl topikal leptin tedavisi uygulanan Grup 3'ün ortalama tunica media alanları sırasıyla 277.150 µm<sup>2</sup> ile 226.950 µm<sup>2</sup> olarak hesaplandı (Tablo 6). Bu iki grup arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı değildi ( $p > 0.05$ , Tablo 7, Şekil 16).

SAK oluşturulup 3 gün takip edilen Grup 2 ile SAK oluşturulup 7 gün takip edilen Grup 4'ün ortalama tunica media alanları sırasıyla 277.150 µm<sup>2</sup> ile 217.600 µm<sup>2</sup> olarak hesaplandı (Tablo 6). Bu iki grup arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı değildi ( $p > 0.05$ , Tablo 7, Şekil 16).

SAK oluşturulup 3 gün takip edilen Grup 2 ile SAK oluşturulup 7 gün süre ile günde 1 kez 10 µl topikal leptin tedavisi uygulanan Grup 5'in ortalama tunica media alanları sırasıyla 277.150 µm<sup>2</sup> ile 196.800 µm<sup>2</sup> olarak hesaplandı (Tablo 6). Bu iki grup arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ( $p < 0.05$ , Tablo 7, Şekil 16).

SAK oluşturulup 3 gün süre ile günde 1 kez 10 µl topikal leptin tedavisi uygulanan Grup 3 ile SAK oluşturulup 7 gün süre ile günde 1 kez 10 µl topikal leptin tedavisi uygulanan Grup 5'in ortalama tunica media alanları sırasıyla 226.950 µm<sup>2</sup> ile 196.800 µm<sup>2</sup> olarak hesaplandı (Tablo 6). Bu iki grup arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı değildi ( $p > 0.05$ , Tablo 7, Şekil 16).

SAK oluşturulup 7 gün takip edilen Grup 4 ile SAK oluşturulup 7 gün süre ile günde 1 kez 10 µl topikal leptin tedavisi uygulanan Grup 5'in ortalama tunica media alanları sırasıyla 217.600 µm<sup>2</sup> ile 196.800 µm<sup>2</sup> olarak hesaplandı (Tablo 6). Bu iki grup arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı değildi ( $p > 0.05$ , Tablo 7, Şekil 16).

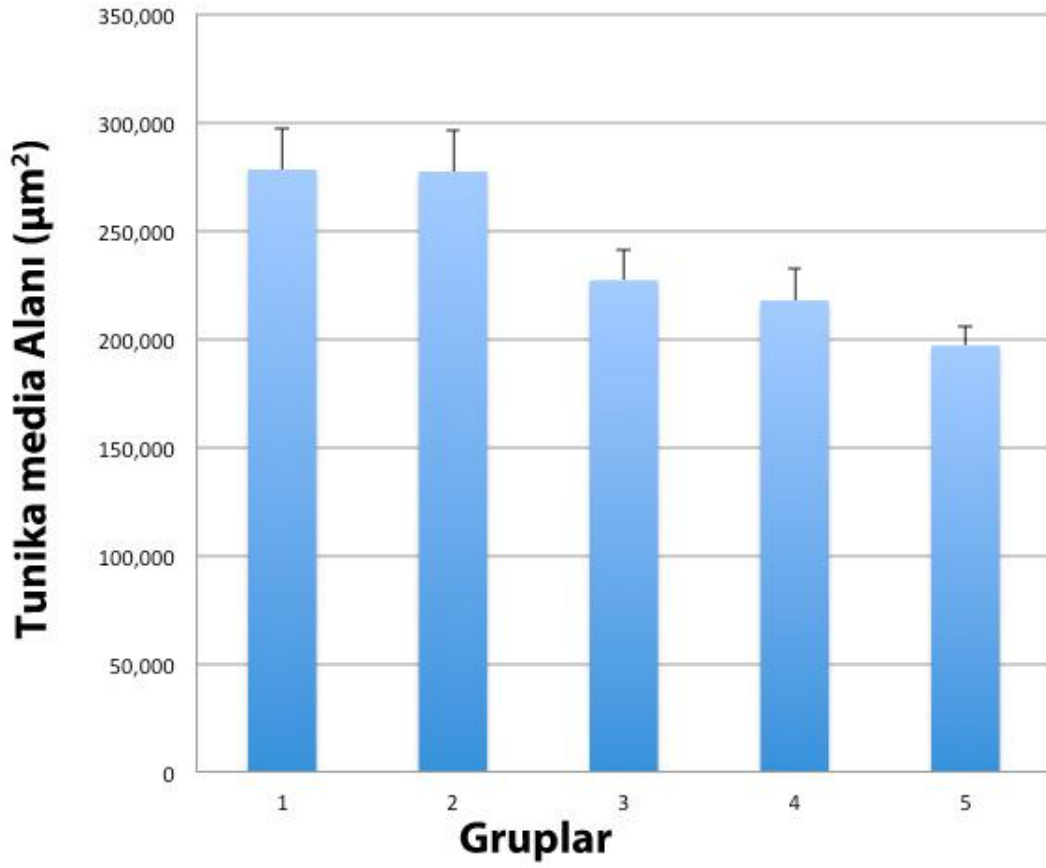
**Tablo 6:** Grupların baziller arter tunica media alanları.

GRUPLAR	N	ORTALAMA	STANDART SAPMA	STANDART HATA	MİNİMUM	MAKSİMUM
1	6	278070.00	46222.28	18870.17	228750	358000
2	8	277150.00	52939.40	18716.90	220400	360400
3	8	226950.00	39604.87	14002.44	180800	298800
4	8	217600.00	40638.90	14368.02	176000	293600
5	8	196800.00	25243.05	8924.76	156400	240000
Toplam	38	237274.21	51218.27	8308.70	156400	360400

**Tablo 7:** Grupların baziller arter tunica media alanlarının istatistiksel analizi.

Tukey HSD		
GRUPLAR		P
1	2	1.000
	3	0.180
	4	0.078
	5	0.008
2	1	1.000
	3	0.138
	4	0.053
	5	0.004
3	1	0.180
	2	0.138
	4	0.991
	5	0.603
4	1	0.078
	2	0.053
	3	0.991
	5	0.854
5	1	0.008
	2	0.004
	3	0.603
	4	0.854

## BAZİLLER ARTER TUNİKA MEDİA ALANI



Şekil 16: Grupların baziller arter tunica media alanlarını gösteren grafik.

Tunica media alanının lümen alanına oranları değerlendirildiğinde, en yüksek oran 0,46 ile Grup 4 te, en düşük oran 0,18 ile Grup 5' te olduğu görülmüştür.

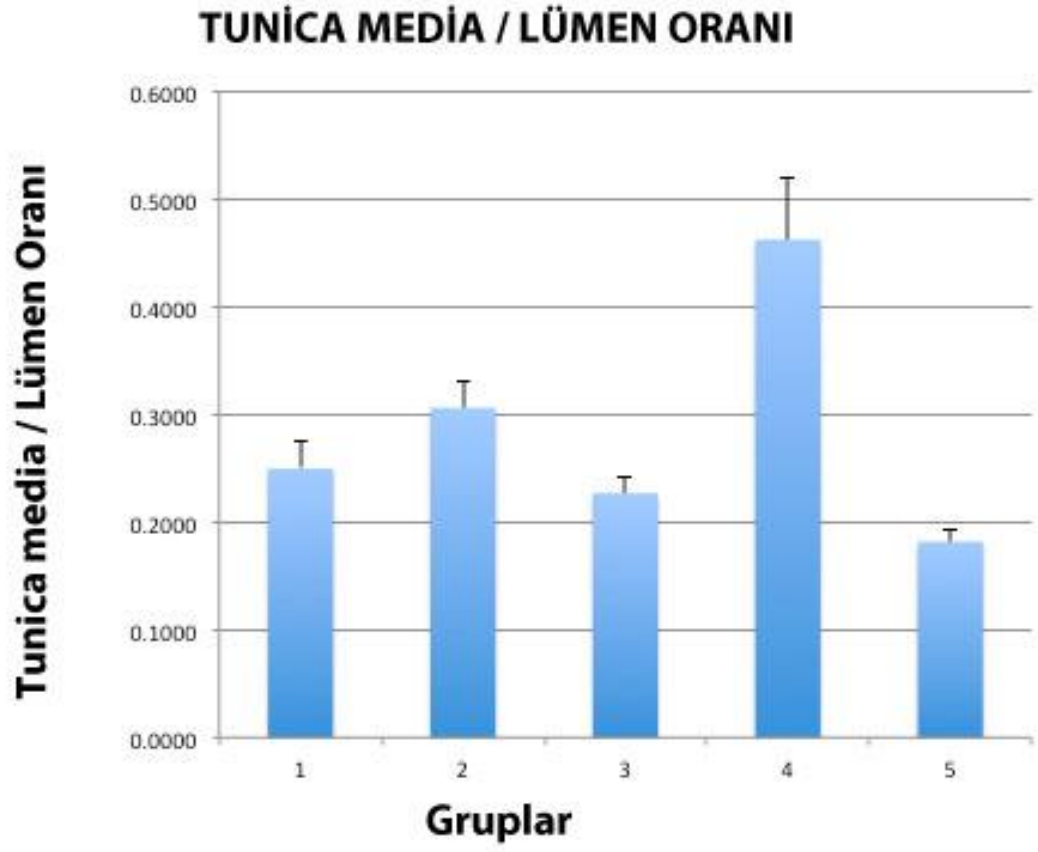
**Tablo 8:** Grupların tunica medialarının lümenlere oranı.

GRUPLAR	N	ORTALAMA	STANDART SAPMA	STANDART HATA	MINİMUM	MAKSİMUM
1	6	0.25	0.06	0.03	0.20	0.36
2	8	0.31	0.07	0.03	0.21	0.42
3	8	0.23	0.04	0.02	0.17	0.32
4	8	0.46	0.16	0.06	0.32	0.73
5	8	0.18	0.03	0.01	0.13	0.22
Toplam	38	0.29	0.13	0.02	0.13	0.73

**Tablo 9:** Grupların tunica medialarının lümenlere oranlarının istatistiksel analizi.

Tukey HSD

GRUPLAR		P
1	2	.766
	3	.989
	4	.001
	5	.623
2	1	.766
	3	.400
	4	.011
	5	.061
3	1	.989
	2	.400
	4	.000
	5	.848
4	1	.001
	2	.011
	3	.000
	5	.000
5	1	.623
	2	.061
	3	.848
	4	.000



Şekil 17: Grupların tunica medialarının lümen oranlarını gösteren grafik.



**Şekil 18:** Grupların baziller arterlerin histolojik görüntüleri. \*: Baziller arter lümenini göstermektedir (Orijinal).

## 5. TARTIŞMA

Serebral vazospazm, SAK sonrası gelişen patogenezi net olarak açıklanamamakla birlikte multifaktöryel olduğu kabul edilen, günümüz beyin cerrahisi pratiğinde en önemli morbidite ve mortalite nedenlerinden biridir. Bu durum uygulanan tedavilerin birden çok faktörün hepsine karşı etkili olamamasına ya da istenmeyen zararlı etkilere bağlanmaktadır (43).

Subaraknoid kanama geçiren hastalarda asıl sorun, intrakranial arterlerdeki kalıcı vazospazm sonucu 3. ve 14. günler arasındaki subakut dönemde gelişen semptomatik beyin iskemisidir. Bir çok deneysel ve klinik çalışmaya rağmen etkin bir tedavisi ve önleme yöntemi bulunamamıştır (73). SAK sonrası ilk iki hafta içinde serebral vazospazm varlığı mortaliteyi 1,5 kattan 3 kata kadar arttırmaktadır (74).

Subaraknoid kanama sonrası gelişen vazospazm deneysel nöroşirurjinin en önemli konularından birisidir. Fakat tam anlamıyla insan benzeri bir model yoktur ve araştırmalarda primat, köpek, tavşan, fare ve sıçan gibi hayvan modelleri kullanılmaktadır (104). Bu çalışmada topikal leptinin serebral vazospazm üzerine etkisini araştırmak amacıyla rat deneysel SAK modeli kullanılmıştır.

Vazospazmın patogenezi ve tedavisi konusundaki en ideal çalışma yöntemi insan serebral arterlerinin kullanılarak yapılmasıdır. İnsan damarlarının in vivo deneylerde kullanılamaması ve postmortem vazospastik insan arterlerinin incelenmesinden sınırlı bilgi alınması nedeni ile hayvanlar üzerinde bazı deney modelleri geliştirilmiştir. Hayvanlarda yapılan in vitro çalışmalarda incelenecek arter dekapitasyon işleminden sonra derhal çıkarılmalı ve formolde tespit edilmelidir. Arter tespitinin ardından otolog kanda ortadan kaldırılacak şekilde çeşitli testlere tabi tutulmalıdır. Ancak bu çalışmaların en önemli kısıtlaması arterleri doğal çevrelerinden ayırmayı gerektirdiğinden elde edilecek bilgi de sınırlı olacaktır (75).

Deney hayvanlarında subaraknoid kanama oluşturabilmek için pek çok yöntem kullanılmıştır. Bunlardan başlıcaları baziller arterin delinerek SAK oluşturulması, arterin cerrahi olarak ortaya çıkarılarak başka bir bölgeden alınmış kanın arter etrafına yerleştirilmesi ve günümüzde bilinen, en çok uygulanan sisterna magnaya başka bir bölgeden alınan kanın enjekte edilmesiyle kanın arter etrafında toplanmasını sağlayan yöntemlerdir (75).

Subaraknoid boşlukta bulunan intrakranial arterlerde periferik sistem arterlerinden farklı olarak adventisya tabakaları iyi gelişmemiştir ve vazovazorumları da bulunmamaktadır. Adventisyadan BOS yoluyla beslenen bu arterlerin kanamayla birlikte porlarına eritrosit infiltrasyonu görülmektedir. Bu nedenle insanlardaki SAK ve vazospazma yakın bir durum sağlanabilmektedir. Ayrıca hayvanlarda kollateral akım iyi

geliştiği için vazospazma bağlı nörololik defisit nadir olarak ortaya çıkar. Baziller arteri kullanmanın bir diğer avantajı da hayvanlarda posterior sirkülasyonun iyi gelişmiş olmasıdır. Biz de çalışmamızda en çok tercih edilen ve günümüzde en çok kullanılan yöntem olan sisterna magnaya otolog kan enjeksiyonu ile subaraknoid kanama modelini uyguladık (75).

Deneysel vazospazmın değerlendirmesinde anjiyografi, TCD ve histolojik ölçümler yaygın kullanılan yöntemler olup bölgesel serebral kan akımının ölçülmesi ve transkraniyal magnetik stimülasyon gibi yöntemler de bildirilmiştir (105, 109, 110,111, 112). Biz alışmamızda güvenilir ve tarafsız yöntemlerden biri olan ve kantitatif sonuçlar elde etmemize imkan sağlayan bir yöntem olması nedeniyle stereolojik ölçümlerle değerlendirme yapmayı tercih ettik.

Multifaktöryel olduğu düşünülen serebral vazospazmın fizyopatolojisi günümüzde halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Patogenezinin altında yatan mekanizmalar arasında endotel hasarı, subaraknoid mesafedeki kanın çözülmesi esnasında ortaya çıkan spazmotik ajanların yol açtığı düz kas kontraksiyonu, damar duvarının inflamatuvar ve immünolojik reaksiyonları sayılabilir. Yapılan deneysel çalışmalarda subaraknoid mesafedeki kanın vazospazma neden olduğu ve BT'deki kan miktarının vazospazmla ilişkili olduğu bulunmuştur (22, 49, 50).

Serebral vazospazm tedavisinde amaç etkilenen damarları doğrudan veya dolaylı olarak dilate etmek ve bunun sonucunda serebral kan akımını artırmaktır. Standart tedavi yöntemi olan hipervolemi, hemodilüsyon ve hipertansiyon serebral vazospazm için profilaktik olsa da vazospazmı nlememekte ve birçok hastada bu girişimlere karşı direnç gözlenmektedir. Bu yüzden, 3H tedavisi halen sorgulanmakta olup yeni çalışmalarda da yüksek komplikasyon oranları nedeni ile artık önerilmemektedir. 3H tedavisinden sonra gündeme kalsiyum kanal blokerleri gelmiş fakat bu ilaçların yaygın kullanımı etkilenen arterlerde vazodilatasyona yol amamaları ve hipotansif etkileri nedeniyle sınırlanmıştır. Vazodilatörler gecikmiş serebral vazospazmın tedavisinde önemli bir yere sahip olmakla birlikte, serebral vazospazmda yararlı olduğu düşünülen hipertansiyon etkisini ortadan kaldırması, serebral arteriyollerde dilatasyon sonucu serebral kan akımını artırarak alma fenomenine yol aması gibi etkiler de gösterebilir (113).

Transluminal serebral anjiyoplasti ve vazodilatörlerin intraarteriyel enjeksiyonu rezistan vasospazm olgularında denenmiş, fakat hem işleme bağlı komplikasyonların yüksek olması, hem de uzun dönemli izlemlerinde nörolojik sekel üzerine klasik l tedaviden farklı etki göstermedikleri saptanmıştır (43).

Çalışmamızda kullanılan leptin, 167 amino asit içeren, 16 kDa molekül ağırlığında yağ hücresi ve birçok dokudan salgılandığı saptanan, plazmada belirli bir kan düzeyi oluşturan kanda serbest ve proteine bağlı olarak taşınan bir polipeptittir (88, 89). Kana geçtikten sonra özel reseptörleri aracılığı ile kan beyin bariyerini aşarak merkezi sinir sistemine ulaşır ve besin alımını azaltıp, enerji harcamasını arttırarak etkisini gösterir (87). Literatürde leptinin en çok bilinen bu özelliği dışında serebral vazospazm patogenezinde rolü olduğu bildirilen mekanizmalara karşı önleyici etki oluşturabileceğini düşündüğümüz özelliklerinden bahsedilmiş fakat SAK sonrası gelişen vazospazmın etkilerini azaltmaya yönelik bir çalışma ise tespit edilememiştir.

Avraham ve ark. yaptıkları çalışmada iskemik nöronal hasar sonrası ratlarda eksojen leptin uygulamasının nörojen ve anjiogenezde artışa neden olduğu bildirmişlerdir (77). Yine Avraham ve ekibinin 2012 yılına ait çalışmasında ise, leptinin iskemik nöronal hasar sonrası geç dönemde uygulanmasının bile nörojen ve anjiogenezde etkili olduğu gösterilmiştir . Bu durum leptinin potent AMP kinaz inhibitörü olması nedeniyle iskemik nöronal dokuda eksojen uygulandığında nöroprotektif, nörojenetik ve anjiogenez etkisi olduğunu göstermektedir (76).

Nakagawa ve ark. ile Matsuda ve ark. eksojen leptin uygulanması ile aynı anda NO sentetaz inhibitörü olan N-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) de verilerek leptinin NO' dan bağımsız olarak vazodilatasyona neden olduğunu göstermişlerdir (80, 81).

Watson ve ark. leptinin anti-oksidan enzimler olan katalaz, glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz düzeylerini arttırarak direkt olmasa da dolaylı yoldan anti-oksidan etkinliği olduğu söylemişlerdir (78).

Liapakis ve ark. ratlarda yanık dokusunda eksojen leptin uygulamasının erken doku angiogenezini arttırarak iyileşmeye olumlu katkıda bulunduğunu belirtmişlerdir (82).

Paul Raymond bir çalışmasında 1.2 mg/ml rat leptin solüsyonundan 10 µl topikal (göz damlası) uygulanması sonrası 30. dkda BOS'ta, 60. dkda serumda pik yaptığını göstermiştir (83).

Biz de çalışmamızda beyin cerrahisi yoğun bakım kliniklerinde şuuru kapalı hastalarda yeni tedavi modellerinin oluşturulmasına katkıda bulunacağını düşündüğümüz leptinin topikal (göz damlası) uygulanabilme üstünlüğü ile SAK sonrasında ortaya çıkan ve multifaktöryel patogeneze sahip olduğu kabul edilen serebral vazospazmı önleyici etkisini inceledik.

Çalışmamızdan elde edilen veriler değerlendirildiğinde tüm grupların serum leptin düzeyleri karşılaştırıldığında Grup 1 ile topikal leptin tedavi uygulanan Grup 3 ve Grup 5'in serum leptin düzeyleri arasında tedavi uygulanan gruplar lehine istatistiksel anlamlı fark görüldü ( $p < 0.05$ ). Bu sonuç topikal uygulanan leptinin sistemik dolaşı geçtiğini göstermiştir.

SAK yapılarak 7 gün topikal leptin tedavisi uygulanan Grup 5'in Grup 1 ve Grup 4 ile karşılaştırılmasında baziller arter lümen alanı ölçümlerinde vazodilatasyon lehine anlamlı istatistiksel fark tespit edilirken ( $p < 0.05$ ), media tabakaları arasında istatistiksel bir fark tespit edilmedi ( $p > 0.05$ ). Tunica medianın lümen oranlamasında en büyük oran 0.46 ile Grup 4'te, en düşük oran 0.18 ile Grup 5'te tespit edildi.

Tunica media alanının lümen alanlarına oranları değerlendirildiğinde, en yüksek oran 0,46 ile Grup 4' te, en düşük oran 0,18 ile Grup 5' te elde edilmiş olması yapılan çalışmada morfolojik değişikliklerin ortaya yaklaşık 7 günde çıktığını düşündürmektedir. Oranın Grup 4'te en yüksek, Grup 5'te en düşük çıkması olası lümen daralma ve genişlemesinin sadece aynı oranda tunica mediadaki kalınlaşma ve incelmeyin yanında başka hücre içi yollarla da kontrol edildiğini göstermektedir.

Watson ve ark. (1999) leptinin anti-oksidan enzimler olan katalaz, glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz düzeylerini artırarak direkt olmasa da dolaylı yoldan anti-oksidan etkinliği olduğu söylemişlerdir. Elde ettiğimiz sonuçların da leptinin bu hücre içi yollarda meydana getirdiği değişikliklerden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Bu yaklaşım Giuseppe ve ark. (2000) da belirtilen sonuçlarla örtüşmektedir.

Avraham ve ark. (2012) leptinin iskemi sonrası önemli derecede nöroprotektif ,nörogenetik ve anjiyogenetik etkileri olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar leptinin muhtemel anjiyogenetik etkisinden kaynaklanmış olabilir. Çünkü leptinin mevcut anjiyogenetik etkisini, öncelikle lümen çapında artış ve devamında Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) aracılığıyla gerçekleştirdiğini düşünmekteyiz.

Leptin etki mekanizması düşünüldüğünde vazodilatasyon yapıcı etkisi yanında, anti-oksidan, angiogenetik ve nöroprotektif etkilerinin de olması tedavide başarıyı arttırmaktadır. Leptinin özellikle şuuru kapalı subaraknoid kanamalı hastalarda topikal uygulanabilme avantajıyla serebral vazospazmın önlenmesinde kullanımı düşünülmeli ve bu konuda daha fazla çalışma yapılması planlanmalıdır.

## 6. SONUÇ

Bu çalışmada mevcut literatürde önerilen teropatik dozlar uygulanmıştır. Göz damlası şeklinde topikal leptin uygulaması sonrası serum leptin düzeyi ölçümleri ile sistemik dolaşıma etkin düzeyde geçmekte olduğu gösterilmiştir. Topikal uygulama üstünlüğü ile sistemik dolaşımda etkin düzeye ulaşan leptinin deneysel subaraknoid kanamaya bağlı gelişen baziller arter vazospazmında tekrarlayan dozlarda vazodilatasyona neden olduğu gösterilmiştir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Ingall TJ, Whisnant JP: Epidemiology of subarachnoid hemorrhage, in Yanagihara T, Piepgras DG, Atkinson JLG (eds): Subarachnoid hemorrhage. New York, Marcel Dekker Inc, 1998, pp63-78
2. Pakarinen S: Incidence, aetiology, and prognosis of primary subarachnoid haemorrhage. A study based on 589 cases diagnosed in a defined urban population during a defined period. *Acta Neurol Scand* 43 (Suppl 29): 1-28, 1967.
3. Lanzino G, Kassell NF, Germanson TP, Kongable GL, Truskowski LL, Torner JC, Jane JA: Age and outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: why the older patients fare worse. *J Neurosurg* 85 (3):410-418, 1996.
4. Vinall PE, Maislin G, Michele JJ, Deitch C, Simeone FA: Seasonal and latitudinal occurrence of cerebral vasospasm and subarachnoid hemorrhage in the northern hemisphere. *Epidemiology* 5 (3):302-308, 1994.
5. MacDonald RL, Weir B: Perioperative Management of subarachnoid hemorrhage, in Winn HR (ed): *Youmans Neurological Surgery, Fifth Edition*. USA, Volume 2, pp 1813-1838
6. Bromberg JE, Rinkel GJ, Algra A, Greebe P, vanDuyn CM, Hasan D, Limburg M, ter Berg HW, Wijdicks EF, vanGijn J: Subarachnoid haemorrhage in first and second degree relatives of patients with subarachnoid haemorrhage. *BMJ* 311(7000): 288-289, 1995.
7. De Braekeleer M, Perusse L, Cantin L, Bouchard JM, Mathieu J: A study of inbreeding and kinship in intracranial aneurysms in the Saguenay Lac-Saint-Jean region (Quebec, Canada). *Ann Hum Genet* 60 (Pt 2):99-104, 1996.
8. Gaist D, Vaeth M, Tsiropoulos I, Christensen K, Corder E, Olsen J, Sorensen HT: Risk of subarachnoid haemorrhage in first degree relatives of patients with subarachnoid haemorrhage: follow up study based on national registries in Denmark. *BMJ* 320 (7228):141-145, 2000.
9. Schievink WI, Torres VE, Piepgras DG, Wiebers DO: Saccular intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 3 (1): 88-95, 1992.
10. Schievink WI, Michels VV, Piepgras DG: Neurovascular manifestations of heritable connective tissue disorders. A review. *Stroke* 25 (4): 889-903, 1994.
11. Qureshi AI, Suri MF, Yahia AM, Suarez JJ, Guterman LR, Hopkins LN, Tamargo RJ: Risk factors for subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 49(3): 607-612, 2001.

12. Thorogood M, Mann J, Murphy M, Vessey M: Fatal stroke and use of oral contraceptives: findings from a case-control study. *Am J Epidemiol* 136 (1):35- 45, 1992.
13. Brown E, Prager J, Lee HY, Ramsey RG: CNS complication of cocaine abuse: prevalence, pathophysiology, and neuroradiology. *AJR Am J Roentgenol* 159 (1): 137-147, 1992.
14. Linn FH, Rinkel GJ, Algra A, van Gijn J: Headache characteristics in subarachnoid hemorrhage and benign thunderclap headache. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65(5): 791-793, 1998.
15. Waga S, Otsubo K, Handa H: Warning signs in intracranial aneurysms. *Surg Neurol* 3(1): 15-20, 1975.
16. Kırıs T, Sencer A: Subaraknoid kanamanın komplikasyonları, in Aksoy K (ed): *Temel Nöroşirürji*. Ankara, TND Yayınları, 2005, cilt 1, pp 448-453.
17. Mayberg M: Cerebral Vasospasm. *Neurosurg Clin N Am* 9 (3):615-627,1998.
18. Ecker A, Riemenschneider PA: Arteriographic demonstration of spasm of the intracranial arteries, with special reference to saccular arterial aneurysms. *J Neurosurg* 8 (6): 660-667, 1951.
19. Allcock JM, Drake CG: Ruptured intracranial aneurysms -the role of arterial spasm. *J Neurosurg* 22: 21-29, 1965.
20. Giannotta SL, McGillicuddy JE, Kint GW: Diagnosis and treatment of postoperative cerebral vasospasm. *Surg Neurol* 8 (4):286-290, 1977.
21. Grubb RL Jr, Raichle ME, Eichling JO, Gado MH: Effects of subarachnoid hemorrhage on cerebral blood volume, blood flow and oxygen utilization in humans. *J Neurosurg* 46 (4): 446-453, 1977.
22. Fisher CM, Kistler JP, Davis JM: Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualized by computerized tomographic scanning. *Neurosurgery* 6 (1): 1-9, 1980.
23. Sasaki T, Wakai S, Asano T, Watanabe T, Kirino T, Sano K: The effect of a lipid hydroperoxide of arachidonic acid on the canine basilar artery. An experimental study on cerebral vasospasm. *J Neurosurg* 54 (3): 357-365, 1981.
24. Pakarinen S: Incidence, aetiology, and prognosis of primary subarachnoid haemorrhage. A study based on 589 cases diagnosed in a defined urban population during a defined period. *Acta Neurol Scand* 43 (Suppl 29): 1-28, 1967.

25. Kassell NF, Sasaki T, Colohan AR, Nazar G: Cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 16 (4):562-572, 1985.
26. Biller J, Godersky JC, Adams HPJr: Management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 19 (10): 1300-1305, 1988.
27. Haley EC, Kassell NF, Tomer JC: The international cooperative study on the timing of aneurysm surgery: the North American experience. *Stroke* 23 (2):205-214, 1992.
28. Rabb CH, Tang G, Chin LS, Giannotta SL: A statistical analysis of factors related to symptomatic cerebral vasospasm. *Acta Neurochir (Wien)* 127(1-2): 27-31, 1994.
29. Lasner TM, Weil RJ, Riina HA, King JT Jr, Zager EL, Raps EC, Flamm ES: Cigarette smoking-induced increase in the risk of symptomatic vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 87(3):381-384, 1997.
30. Charpentier C, Audibert G, Guillemin F, Civit T, Ducrocq X, Bracard S, Hepner H, Picard L, Laxenaire MC: Multivariate analysis of predictors of cerebral vasospasm occurrence after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 30(7): 1402-1408, 1999.
31. Song JK, Elliott JP, Eskridge JM: Neuroradiologic diagnosis and treatment of vasospasm. *Neuroimaging Clin N Am* 7(4): 819-835, 1997.
32. Mayberg MR, Batjer HH, Dacey R, Diringer M, Haley EC, Heros RC, Sternau LL, Torner J, Adams HP Jr, Feinberg W: Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. A statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association. *Stroke* 25 (11): 2315-28, 1994.
33. Rodriguez Garcia PL, Rodriguez Pupo LR, Rodriguez Garcia D: Diagnosis of delayed cerebral ischaemia and cerebral vasospasm in subarachnoid haemorrhage. *Neurologia* 25(5):322-330, 2010.
34. Kassell NF, Helm G, Simmons N, Phillips CD, Cail WS: Treatment of cerebral vasospasm with intra-arterial papaverine. *J Neurosurg* 77 (6): 848-852, 1992.
35. Ohman J, Heiskanen O: Timing of operation for ruptured supratentorial aneurysm: A prospective randomized study. *J Neurosurg* 70 (1): 55-60, 1989.
36. Kosnik EJ, Hunt WE: Postoperative hypertension in the management of patients with intracranial arterial aneurysms. *J Neurosurg* 45(2): 148-154, 1976.

37. Kassell NF, Peerless SJ, Durward QJ, Beck DW, Drake CG, Adams HP: Treatment of ischemic deficits from vasospasm with intravascular volume expansion and induced arterial hypertension. *Neurosurgery* 11(3): 337-343, 1982.
38. Muizelaar JP, Becker DP: Induced hypertension for the treatment of cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage. Direct effect on cerebral blood flow. *Surg Neurol* 25 (4): 317-325, 1986.
39. Flamm ES, Adams HP, Beck DW: Dose-escalation study of intravenous nicardipine in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 68 (3): 393-400, 1988.
40. Bevan JA, Bevan RD, Frazee JG: Functional arterial changes in chronic cerebrovasospasm in monkeys: an in vitro assessment of the contribution to arterial narrowing. *Stroke* 18 (2):472-481, 1987.
41. Koliass AG, Sen J, Belli A: Pathogenesis of cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: putative mechanisms and novel approaches. *J Neurosci Res* 87(1): 1-11, 2009.
42. Auer LM: Acute operation and preventive nimodipine improve outcome in patients with ruptured cerebral aneurysms. *Neurosurgery* 15(1): 57-66, 1984.
43. Jestaedt L, Pham M, Bartsch AJ, Kunze E, Roosen K, Solymosi L, Bendtszus M: The impact of balloon angioplasty on the evolution of vasospasm-related infarction after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 62(3): 610-617, 2008.
44. Bejjani GK, Bank WO, Olan WJ, Sekhar L: The efficacy and safety of angioplasty for cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 42 (5):979-982, 1998.
45. Eskridge JM, McAuliffe W, Song JK, Deliganis AV, Newell DW, Lewis DH, Mayberg MR, Winn HR: Balloon angioplasty for the treatment of vasospasm: results of first 50 cases. *Neurosurgery* 42 (3):510-516, 1998.
46. Milburn JM, Moran CJ, Cross DT, Diringner MN, Pilgram TK, Dacey RG: Increase in diameters of vasospastic intracranial arteries by intraarterial papaverine administration. *J Neurosurg* 88 (1):38-42, 1998.
47. Numaguchi Y, Zoarski GH, Clouston JE, Zagardo MT, Simard JM, Aldrich EF, Sloan MA, Maurer PK, Okawara SH: Repeat intra-arterial papaverine for recurrent cerebral vasospasm after subarachnoid haemorrhage. *Neuroradiology* 39 (10):751 -759, 1997.

48. McAuliffe W, Townsend M, Eskridge JM, Newell DW, Grady MS, Winn HR: Intraarterial pressure changes induced during papaverine infusion for treatment of vasospasm. *J Neurosurg* 83 (3):430-434,1995.
49. Pluta RM, Afshar JK, Boock RJ, Oldfield EH: Temporal changes in perivascular concentrations of oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, and methemoglobin after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 88 (3): 557-561, 1998.
50. Kistler JP, Crowell RM, Davis KR, Heros R, Ojemann RG, Zerwas T, Fisher CM: The relation of cerebral vasospasm to the extent and location of subarachnoid blood visualized by CT scan: a prospective study. *Neurology* 33 (4): 424-436, 1983.
51. Burnett M, Danish S: Pathology and pathophysiology of aneurysmal subarachnoid hemorrhage, in P. Leroux, W. Winn & D. Newell (Eds.): *Management of cerebral aneurysms*. Philadelphia, PA, Elsevier, 2004, pp 127- 137.
52. Pluta RM: Delayed cerebral vasospasm and nitric oxide: review, new hypothesis, and proposed treatment. *Pharmacol Ther* 105 (1): 23-56, 2005.
53. Sakaki S, Kuwabara H, Ohta S: Biological defence mechanism in the pathogenesis of prolonged cerebral vasospasm in the patients with ruptured intracranial aneurysms. *Stroke* 17 (2):196-202,1986.
54. Sasaki T, Tanishima T, Asano T, Mayanagi Y, Sano K: Significance of lipid peroxidation in the genesis of chronic vasospasm following rupture of an intracranial aneurysm. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 28 (2): 536-540, 1979.
55. Chehraz BB, Giri S, Joy RM: Prostaglandins and vasoactive amines in cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 20 (2):217-24, 1989.
56. Maeda Y, Tani E, Miyamoto T: Prostaglandin metabolism in experimental cerebral vasospasm. *J Neurosurg* 55 (5):779-85, 1981.
57. 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.
58. Kitazono T, Faraci FM, Taguchi H, Heistad DD: Role of potassium channels in cerebral blood vessels. *Stroke* 26 (9): 1713-1723, 1995.
59. Alborch E, Salom JB, Torregrosa G: Calcium channels in cerebral arteries. *Pharmacol Ther* 68 (1): 1-34, 1995.

60. Benham CD, Hess P, Tsien RW: Two types of calcium channels in single smooth muscle cells from rabbit ear artery studied with whole-cell and singlechannel recordings. *Circ Res* 61 (4): 10-16, 1987.
61. Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB: Calcium channels, potassium channels, voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol* 259 (1): C3-18, 1990.
62. ZuccarelloM, BonassoCL, SperelakisN: Role of membrane potential in vasospasm after SAH, in Findlay JM(ed): *Cerebral Vasospasm*. Amsterdam, Els Sci Pub Co, 1993, pp 229-233
63. 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.
64. Grasso G: An overview of new pharmacological treatments for cerebrovascular dysfunction after experimental subarachnoid hemorrhage. *Brain Res Brain Res Rev* 44 (1): 49-63, 2004.
65. Marbacher S, Fandino J, Kitchen ND: Standardintracranial in vivo animal models of delayed cerebral vasospasm. *Br J Neurosurg* 24 (4): 415-434, 2010.
66. Logothetis J, Karacostas D, Karoutas G, Artemis N, Mansouri A, Milonas I: Anew model of subarachnoid hemorrhage in experimental animals with the purpose to examine cerebral vasospasm. *Exp Neurol* 81 (2): 257-78, 1983.
67. Kwan AL, Bavbek M, Jeng AY, Toyoda T, Kassell NF, Lee KS: Attenuation ofexperimental subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm by CGS26303, an endothelin-converting enzyme inhibitor. *J Cardiovasc Pharmacol* 31 (Suppl 1): 320-322, 1998.
68. Nelson RJ, Perry S, Hames TK, Pickard JD: Transcranial Doppler ultrasound studies of cerebral autoregulation and subarachnoid hemorrhage in the rabbit. *J Neurosurg* 73 (4): 601-610, 1990.
69. Roux S, Clozel M, Wolfgang R, Sprecher U, Clozel JP: Comparative evaluation of acute cerebral vasospasm by the microsphere and the angiography techniques. *J Neurosci Methods* 59 (2): 245-252, 1995.

70. Goksel HM, Akgun M, Topalkara K, Solak O, Topaktas S: Evaluation of cerebral vasospasm with transcranial magnetic stimulation: an experimental study. *Clin Exp Med* 1 (1): 43-49, 2001.
71. Dorsh NW: Therapeutic approaches to vasospasm in subarachnoid hemorrhage. *Curr Opin Crit Care* 8 (2): 128-133, 2002.
72. Weir B. Aneurysms affecting the nervous system. Baltimore: Williams&Wilkins. 43: 28-56, 1994.
73. Grasso G. An overview of new pharmacological treatments for cerebrovascular dysfunction after experimental subarachnoid hemorrhage. *Brain Res Rev.* 44:49-63, 2004.
74. Treggiari-Venzi MM, Suter PM, Romand JA: Review of medical prevention of vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a problem of neurointensive care. *Neurosurgery* 48:249-262,2001.
75. Megyesi JF, Vollrath B, Cook DA, Findlay JM. In vivo animal models of cerebral vasospasm: a review. *Neurosurgery.* 46(2):448-61,2000.
76. Avraham Y, Dayan M, Lassri V, Vorobiev L, Davidi N, Chernozuk D, Berry E, Leker RR: Delayed leptin administration after stroke induces neurogenesis and angiogenesis. A review. *Neurosci Res.* 14 Nov 2012.
77. Avraham Y, Davidi N, Lassri V, Vorobiev L, Kabesa M, Dayan M, Chernozuk D, Berry E, Leker RR. Leptin induces neuroprotection neurogenesis and angiogenesis after stroke. *Curr Neurovasc Res.* 2011 Nov;8(4):313-22.
78. Watson AM, Poloyac SM, Howard G, Blouin RA. Effect of leptin on cytochrome P-450, conjugation, and antioxidant enzymes in the ob/ob mouse. *Drug Metab Dispos.* 27(6):695-700. 1999.
79. Gema Frühbeck: Pivotal Role of Nitric Oxide in the Control of Blood Pressure After Leptin Administration. *Diabetes* 48:903-908, 1999.
80. Keiji M, Hiroki T, Yukihiro F, Keigo N, Yukihiro H and Kazuaki C : Leptin causes nitric-oxide independent coronary artery vasodilation in humans. *Hypertens Res* 26: 147-152, 2003.
81. Keigo N, Yukihiro H, Shota S, Tetsuya O, Hideo M and Kazuaki C : Leptin causes vasodilation in humans. *Hypertens Res* 25: 161-165, 2002.

82. Liapakis I, Anagnostoulis S, Karayiannakis A, Korkolis D, Lambropoulou M, Matarasso A, Simopoulos C: Burn woun angiogenesis is increased by exogeneously administered recombinant leptin in rats. *Acta Cir Bras.* 23:118-124, 2008
83. Paul Raymond Mayo II. Topically Applied Leptin Accumulates in the Eye and Hypothalamus but does not Influence Food Intake in Rats. Faculty of New England College of Optometry. England. Mayis 2008: 3-5, 43. Master Thesis.
84. Guisepp L, Carmine V, Luigi F, Gennaro M, Valentina T, Guiliad A and Brunuo T: Leptin induces direct vasodilation through distinct endothelial mechanisms. *Diabetes* 49:293-297, 2000
85. Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW, Zhang PL, Considine RV. Leptin: The tale of an obesity gene. *Diabetes.* 45: 1455–62, 1996.
86. Auwerx J, Staels B. Leptin. *Lancet* 351: 737–42, 1998.
87. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, et al. Serum immunoreactive-Leptin concentrations in normal weight and obese human. *New England Journal Of Medicine.* 334: 292–295, 1996.
88. Zhang Y, Proenca R, Maffel M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 372: 425–31, 1994.
89. Samson WK, Murphy TC, Robison D, Vargas T, Tau E, Chang JK. A 35 amino acid fragment of leptin inhibits feeding in the rat. *Endocrinology.* 137(11): 5182–5, 1996.
90. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *J Biol Chem.* 271 (8): 3971–3974, 1996.
91. Landt M, Martin DR, Zeng J, Miller SB, Kohrt WM, Patterson BW. Plasma leptin concentrations are only transiently increased in nephrectomized rats. *Am J Physiol.* 275(3 Pt 1): 495–9, 1998.
92. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol.* 62: 413–37, 2000.
93. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 395(6704): 763–70, 1998.
94. Wallace AM. Measurement of leptin and leptin binding in the human circulation. *Ann Clin Biochem.* 37(3): 244–52, 2000.

95. Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem.* 272: 6093–6, 1997.
96. Li H, Matheny M, Nicolson M, Tümer N, Scarpace PJ. Leptin gene expression increases with age independent of increasing adiposity in rats. *Diabetes.* 46: 2035–39, 1997.
97. Morash B, Leogoid C, Wilkinson M. Leptin and obesity : Is it all in the mind. *Neuroendocrinology* 77(1): 6-11, 1999
98. Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Löllmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med.* 1: 1311–4, 1995.
99. Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B, Auwerx J. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature.* 377(6549): 527–9, 1995.
100. MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92(20): 9034–7, 1995.
101. Licinio J, Negrão AB, Mantzoros C, Kaklamani V, Wong ML, Bongiorno PB, Negro PP, Mulla A, Veldhuis JD, Cernal L, Flier JS, Gold PW. Sex differences in circulating human leptin pulse amplitude: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab.* 83(11):4140–7, 1998.
102. Klein S, Coppack SW, Mohamed-Ali V, Landt M. Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes.* 45: 984–987, 1996.
103. Hardie L, Trayhurn P, Abramovich D, Fowler P. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin Endocrinol.* 47: 101–106, 1997.
104. Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med.* 130(8): 671–80, 1999.
105. Spitzweg C, Heufelder AE. More clues from fat mice: leptin acts as an opponent of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Eur J Endocrinol.* 136: 590–1, 1997.
106. Daniel P, Denis G, Baskin D, Michael WS. Leptin and Insulin Action in the Central Nervous System. *Nutr Rev.* 60: 20–9, 2002.

107. Qian H, Azain MJ, Compton MM, Hartzell DL, Hausman GJ, Baile CA. Brain administration of leptin causes deletion of adipocytes by apoptosis. *Endocrinology*. 139(2): 791–4, 1998.
108. Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV, Boden G, Nolan JJ, Henry R, Mudaliar SR, Olefsky J, Caro JF. Acute and Chronic effect of insulin on leptin production in humans. *Diabetes*. 45: 699–701, 1996.
109. Segal RK, Landt M, Klein S. Relationship between insulin sensitivity and plasma leptin concentration in lean and obese men. *Diabetes*. 45: 988–91, 1996.
110. Cusin I, Sainsbury A, Doyle P, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. The ob gene and insulin, a relationship leading to clues to the understanding of obesity. *Diabetes*. 44: 1467–70, 1995.
111. Bennet BD, Solar GP, Yuan JO, Thomas GR. A role for leptin and its cognate receptor in haematopoiesis. *Curr Biol*. 6: 1170–80, 1996.
112. Graham M. Lord, Giuseppe Matarese, Jane K. Howard, Richard J. Baker, Stephen R. Bloom and Robert I. Lechler. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*. 394: 897–901, 1998.
113. Lee FYJ, Li Y, Yang EK. Phenotypic abnormalities in macrophages from leptin-deficient obese mice. *Am J Physiol*. 276: 386–94, 1999.
114. Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol*. 68(4): 437-46, 2000.
115. Fujita Y, Murakami M, Ogawa Y, Masuzaki H, Tanaka M, Ozaki S, Nakao K, Mimori T. Leptin inhibits stress-induced apoptosis of T lymphocytes. *Clin Exp Immunol*. 128: 21–6, 2002.
116. Matarese G, La Cava A, Sanna V, Lord GM, Lechler RI, Fontana S, Zappacosta S. Balancing susceptibility to infection and autoimmunity: a role for leptin? *Trends Immunol*. 23(4): 182–187, 2002.
117. Crandall DL, Hausman GJ, Kral JG. A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic and angiogenic perspectives. *Microcirculation*. 4: 211–32, 1997.
118. M. Rocío Sierra-Honigmann, Anjali K. Nath, Chiaki Murakami, Guillermo García-Cardena, Andreas Papapetropoulos, William C. Sessa, Lisa A. Madge, Jeffrey S. Schechner, Michael B. Schwabb, Peter J. Polverini, and Jaime R. Flores-Riveros. Biological Action of Leptin as an Angiogenic Factor. *Science*. 281: 1683–1686, 1998

119. Bouloumié A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res.* 83(10): 1059–66, 1998.

120. Gunderson HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, et al Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 96: 379-94, 1988.

121. Makgay CE, Pakkenberg B, Roberts N, Comparison of compartment volumes estimated from MR images and Physical sections of formalin fixed cerebral hemispheres. *Acta Stereol*, 18, 149-59, 1999.

122. Gunderson HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc.* 147: 229-63, 1987.