

NİGELLA SATİVA EKSTRESİNİN CAS: 490-91-5 DENEYSEL SUBARAKNOİD KANAMAYA BAĞLI VASKÜLER DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN İŞİK MİKROSKOBİK VE STEREOLOJİK İNCELENMESİ

THE STEREOLOGICAL AND LIGHT MICROSCOPY INVESTIGATION OF THE EFFECT OF NIGELLA SATİVA EXTRACT CAS: 490-91-5 ON VASCULAR CHANGES IN EXPERIMENTAL SUBARACHNOID HEMORRHAGE MODEL

Mehmet Kürşat KARADAĞ¹✉, Hakan Hadi KADIOĞLU¹

1. Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı Erzurum/TÜRKİYE

ORCID: 0000-0001-9123-0597, 0000-0002-7744-6241

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
06.06.2022	24.06.2022	31.07.2022
Bu makaleye atıfta bulunmak için / to cite this article:		
Karadağ M, Kadioğlu G. Nigella sativa ekstresinin cas: 490-91-5 deneysel subaraknoid kanamaya bağlı vasküler değişiklikler üzerine olan etkisinin ışık mikroskopik ve stereolojik incelenmesi, J Surg. Med. Sci. 2022; 1(2): 50-60		

Özet

Giriş: Bu çalışmada Nigella Sativa Ekstresinin CAS:490-91-5, ratlarda oluşturulan deneysel subaraknoid kanama modelinde vazospazm üzerine etkileri incelendi. **Metot:** 60 adet erkek Wistar cinsi albino rat, altı gruba ayrıldı. Grup 1 (kontrol), grup 2 (sham), grup 3 (subaraknoid kanama sonrası birinci saatte dekapitasyon), grup 4 (subaraknoid kanama sonrası 48. saatte dekapitasyon), grup 5 (subaraknoid kanama öncesi thymoquinone verilip, 6 saat sonrasında subaraknoid kanama oluşturulup bundan 1 saat sonra dekapitasyon) ve grup 6 (subaraknoid kanama sonrası birinci, 24. ve 48. saatlerde thymoquinone verilip sonrasında dekapitasyon) olarak tanzim edildi. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'nda dimetil sülfoksit yardımı ile dilüe edilerek hazırlanan thymoquinone, 5mg/kg dozunda intraperitoneal yolla verildi. İşlem sırasında 8 adet rat kaybı oldu. Kalan 52 adet ratın dekapitasyon işlemi sonrasında baziler arterlerin lümen alanları ve duvar kalınlıkları stereolojik yöntemle histopatolojik olarak incelendi. **Bulgular:** Subaraknoid kanama öncesi tek doz verilen (grup5) ve subaraknoid kanama sonrası 3 gün thymoquinone verilen (grup6) grupların her ikisi de hiç thymoquinone verilmeyen (grup3) gruba göre baziller arter lümen alanlarında genişleme istatistiksel olarak anlamlıdır. Arter duvar kalınlıkları thymoquinone verilen (grup6 ve grup5) gruplar ile thymoquinone verilmeyenler (grup3, grup4) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu sonuç bize ilaç verilme ve verilmeme durumu arasında duvar kalınlığı açısından farklılık olduğunu ortaya koymuş, ilaç verilen gruplarda duvar kalınlığı azalmıştır. **Sonuç:** Bu çalışmada elde edilen bulgular, thymoquinone'nun ratlarda subaraknoid kanama sonrası vazospazmı önleyici olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Nigella Sativa Ekstresi CAS:490-91-5, stereoloji, subaraknoid kanama, vazospazm

Abstract

Objective: In this study, the effect of Nigella Sativa Extract CAS: 490-91-5 The effects on vasospasm in an experimental subarachnoid hemorrhage model in rats was investigated. **Method:** 60 male Wistar albino rats divided into 6 groups as following; Group 1 (control), group 2 (sham), group 3 (decapitation, one hour after subarachnoid hemorrhage), group 4 (decapitation, 48 hours after subarachnoid hemorrhage), group 5 (6 hours prior to subarachnoid hemorrhage thymoquinone injection and one hour later after subarachnoid hemorrhage decapitation), group 6 (thymoquinone injection 1, 24 and 48 hours later subarachnoid hemorrhage and decapitation after last injection). Thymoquinone that prepared in the Atatürk University Biochemistry Laboratory via dilatation of dimethyl sulfoxide injected intraperitoneally with the dose of 5mg/kg to the rats. 8 rats died during the procedure. The basilar artery lumen size and wall thickness of remaining 52 rats investigated with a stereological approach histopathologically after decapitation. **Results:** The widening of basilar artery lumen of group 5 (one dose of thymoquinone) and group 6 (3 doses of thymoquinone after subarachnoid hemorrhage) is statistically significantly increased than group 3 (no thymoquinone injection). The difference of artery wall thicknesses between thymoquinone injected groups (5 and 6) and non-thymoquinone injected groups (3-4) are also statistically significant. This result indicates that the thymoquinone effectively makes a significant difference to the wall thickness, thymoquinone injected groups have decreased wall thickness. **Conclusion:** The result of this study shows that thyquinone scan prevent vasospasm related to subarachnoid hemorrhage. Further studies that use this agent in clinical trials are needed to show the clinical effects of thymoquinone.

Key Words: Nigella Sativa Extract CAS: 490-91-5, stereology, subarachnoid hemorrhage, vasospasms

1. GİRİŞ

Subaraknoid kanama (SAK), değişik patolojilere bağlı olarak pia mater ile araknoid mater arasındaki beyin omurilik sıvısının bulunduğu subaraknoid mesafede kan bulunması olarak tanımlanmaktadır. SAK ciddi mortalite ve morbiditeye sebep olabilen akut serebrovasküler bir patolojidir (1). Serebrovasküler hastalıklar arasında aterotromboz, emboli ve primer intraserebral kanamayı takiben 4.sıklıkta SAK yer almaktadır. SAK'ın en sık sebebi travmadır. Travma dışı SAK'lara ise primer veya spontan SAK denir. Erişkinlerde travmatik olmayan SAK'ın yaklaşık olarak %85 nedeni sakküler anevrizmaların rüptüre olmasıdır. İntrakranial arteriovenöz malformasyonlar, hipertansiyon, ateroskleroz, intrakranial tümörler, vaskülitler, kanama diyatezleri, kanama diskrazileri, enfeksiyonlar, cerrahi girişimler, intoksikasyonlar ve idiopatik sebepler yer almaktadır (2, 3).

SAK'ın görülme sıklığı ırklar arasında değişkenlik göstermektedir. Anevrizmal SAK'ın görülme sıklığı Finlandiya ve Japon ırklarında daha fazla olmakla birlikte ortalama 6-7/100.000'dir. SAK insidansı kadınlarda erkeklere göre 1.6 kat daha fazladır. SAK en sık 60 yaş ve üzeri kişilerde görülmektedir (5, 6). SAK sonrası yeniden kanama, vazospazm (VS), hidrosefali, intraventriküler ve intraserebral kanamalar, nöbet, sıvı elektrolit bozuklukları, beyin ödemi, serebral iskemik morbidite ve mortaliteyi önemli oranda artıran komplikasyonlardır. SAK'nın %30 mortalitesi ve %40-50 oranında morbiditesi bulunmaktadır. Kanama sonrası serebral dolaşım bozukluğu ve nöronal hasar nedeniyle SAK geçiren her 10 hastadan ancak 2'si kanama öncesi durumunu geri dönmektedir (3).

Serebral vazospazm; SAK sonrası serebral arterlerin geri dönüşümlü olarak daralmasıdır. SAK sonrası 3-7 günler arasında gelişir ve 14.günden sonra geriler. Anjiyografik vazospazm yaklaşık %70-80 oranında izlenirken, klinik vazospazm ise hastaların yaklaşık %30'unda gözlenir. SAK sonrası serebral infarkt ise %26 oranında izlenmektedir. SAK'a bağlı gelişen morbidite ve mortalitede birinci derecede etken vazospazmdır. Yıllardan beri yapılan klinik, laboratuvar ve deneysel çalışmalara rağmen hala vazospazma dair açıklanamayan hususlar bulunmaktadır (6).

Vazospazm ile ilgili bugüne kadar yapılan deneysel çalışmalarda birçok teori öne sürülmüştür. Bu çalışmaların bir kısmında damar duvarı değişiklikleri sonucunda hücrel immünite kaynaklı vaskülopati ve inflamasyonun vazospazma neden olduğu gösterilmiştir. Bu inflamasyon sonrası vazospazma "MyD88-nuclear factor kB(NF-kB)" bağımlı patolojik sinyal yolağı üzerinden tümör nekrotizan faktör alfa (TNF-alfa), İnterlökin 1b (IL-

1B) ve interlökin 6 (IL-6) başta olmak üzere inflamatuvar sitokinler sebep olmaktadır (7). Yine yapılan çalışmalarda SAK'da subaraknoid mesafedeki oksihemoglobinin oksidasyonu ile methemoglobin ve superoksit anyon radikallerinin olduğu gösterilmektedir. Bunların da lipit peroksidasyonuna yol açtığı ve sonucunda hidroksil radikalleri ile lipit peroksitlerin meydana gelerek, serbest radikaller ile birlikte güçlü vazospazm etkinliğe sahip oldukları gösterilmektedir (8).

Thymoquinone (TQ), Ranunculaceae botanik ailesine üye olan Nigella sativa veya halk arasında çörek otu olarak adlandırılan bitkiden üretilmektedir. Çörek otu insanoğlu tarafından 2000 yıldan fazla süredir birçok hastalıkta geleneksel olarak kullanılmıştır. (9) Çörek otunun biyolojik olarak aktif kısmının yağ derivesi içerisinde fikse edilen "2-isopropyl-5-methylbenzo-1, 4-quinone (Thymoquinone)" isimli madde olduğu yapılan kimyasal çalışmalar ile ortaya konulmuştur (10).

TQ 'nun antioksidan ve antiinflamatuvar etkinliği olduğu bilinmektedir. TQ, demir bağımlı lipit peroksidasyonunu güçlü bir şekilde engellemektedir. Vazospazmotik etkinliği olan serbest oksijen radikalleri ve peroksit radikallerinin oluşumunu baskılayarak antioksidan özellik göstermektedir (11). TQ'nun vazospazmotik etkisi olduğu bilinen IL-1, TNF-alfa, IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin "NF-KB patolojik sinyal yolağı" üzerinden yapımını azaltmaktadır (12). TQ'nun hem antioksidan hemde anti-inflamatuvar etkinliği sayesinde vazospazma neden olan sitokin ve serbest radikallerin üretimini engelleyerek, serebral vazospazm üzerinde etkili olabileceğini düşünmekteyiz.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Deneysel Hayvanları

Bu çalışma, Erzurum Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneysel Yeterlik Kurulu'nun 30.06.2017 tarih ve 79 numaralı onayı ile yapıldı. Çalışmada, 60 adet her biri 200-250 gram ağırlığında Wistar cinsi erkek albino rat kullanıldı. Ratlar, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Çalışmamızda, deneysel subaraknoid kanama modelleri arasında tercih edilen tekli kanama modeli kullanılmış olup, toplam deney süresi 48 saat olarak belirlendi (13,14).

2.2. Deneysel Prosedürü ve Doku Örneklerinin Alınması

Denekler işlem öncesi sekiz saat süre ile aç bırakıldı. İntramüsküler ketamin hidroklorür 50 mg/kg ve xylazin 5 mg/kg ile anestetize edildi. Yapılacak işleme göre supin veya prone pozisyonda masaya tespit edilen deneklerin işlem yapılacak anatomik

sahaları traşlanarak dezenfekte edildi. Deneyde kullanılacak olan Nigella Sativa Ekstresi CAS:490-91-5 (TQ), Sigma-Aldrich firması tarafından üretilmiş %98 saflıkta, kirli sarı renkte, kristal tozu halinde olup, katalog numarası 274666-1G'tir. Üretici firma tarafından teslim edilen TQ, oda sıcaklığında Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'nda dimetil sülfoksit (DMSO) yardımı ile dilüe edildi. Deney sonrası ratlar Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde oda sıcaklığında yemek içmek serbest olarak takip edildi. Deneyler sırasında toplam sekiz adet rat öldü. Çalışmamızdaki mortalite oranı %13.33 olarak tespit edildi. Geriye kalan ratların sayısı, deney sonuçlarını istatistiksel olarak değerlendirebilmek açısından yeterli olduğundan ölenlerin yerine yeni ratlar çalışmaya eklenmedi.

Ratlar altı gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol grubu (n=8) belirlendi ve her hangi bir müdahale yapılmayan denekler perfüzyon fiksasyon yöntemi ile dekapite edildikten sonra alınan beyin örneklerinde baziler arter alanları ve baziler arter duvar kalınlıkları incelendi. İkinci grup sham grubu (n=7) olarak belirlendi. Subaraknoid kanama oluşturulmaksızın sisterna magnaya 0.15 cc steril serum fizyolojik verildikten bir saat sonra perfüzyon fiksasyon yöntemi ile dekapite edilerek alınan beyin örneklerinden baziler arter alanları ve baziler arter duvar kalınlıkları incelendi. Üçüncü grup SAK grubu (n=8) olup sisterna magnaya tek sefere mahsus 0.15 cc otolog nonheparinize kan enjekte edildikten bir saat sonra perfüzyon fiksasyon yöntemi ile dekapite edilerek alınan beyin örneklerinden baziler arter alanları ve baziler arter duvar kalınlıkları incelendi. Dördüncü grup SAK grubu olup (n=9) olup sisterna magnaya 0.15 cc otolog nonheparinize kan verildikten sonra 48 saat süre ile takip edilen ve ardından perfüzyon fiksasyon yöntemi ile dekapite edilerek alınan beyin örneklerinden baziler arter alanları ve baziler arter duvar kalınlıkları incelendi. Beşinci grup profilaktik olarak 12,5 mg/kg TQ intraperitoneal yolla verildikten 6 saat sonra sisterna magnaya 0.15 cc otolog nonheparinize kan enjekte edilip takip eden birinci saatte perfüzyon fiksasyon yöntemi ile dekapite edilen grup (n=10) olup alınan beyin örneklerinden baziler arter alanları ve baziler arter duvar kalınlıkları incelendi. Altıncı grup (n=10) ise sisterna magnaya 0.15 cc otolog nonheparinize kan enjekte edilip birinci saat, 24. saat ve 48. saatte olmak üzere toplam üç doz intraperitoneal yolla 12,5 mg/kg TQ verilerek son dozdan beş dakika sonra perfüzyon fiksasyon yöntemi ile dekapite edilip alınan beyin örneklerinden baziler arter alanları ve baziler arter duvar kalınlıkları incelendi.

2.3. Histopatolojik Analizler

Alınan dokuların hazırlanması Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Laboratuvarı'nda yapılmış olup, histolojik incelemeler Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Beyin dokuları baziler arterin anatomik seyri göz önünde bulundurularak üst sınır mamiller cisimler, alt sınır pons ile bulbusun birleşim noktası olacak şekilde proksimal, orta ve distal kısımlardan kesitler alınarak rutin takip işlemi için SAKURA® firmasının ürettiği Tissue-Tek VIP adlı doku takip cihazı içerisine yerleştirilerek izleme alındı. Takip işlemi tamamlanan dokular, parafin bloklara gömüldü. Hematoksilen & Eosin ve TUNEL boyaları uygulamak için 0.5 mikrometre (µm) kalınlıkta kesitler alındı. Kesitler, grupların dağılımını bilmeyen iki tarafsız patolog tarafından Leica marka ışık mikroskopu altında MBF® Bioscience firmasına ait Stereo Investigator adlı yazılım eşliğinde bilgisayar ortamında incelendi ve baziler arter lümen alanlarının ölçülmesi ile beraber kesitlerin fotoğraflanması da yine bu program yardımı ile yapıldı. Her bir rata ait baziler arterden proksimal, orta ve distal kısımlar olmak üzere çıkarılan üçer kesit, 10'luk, 100'lük ve 200'lük magnifikasyonla incelendi. Arter lümen alanı, her bir rata ait baziler arterin üç farklı kesiti, endotel tabakaları boyunca bilgisayar ortamında Stereo Investigator programı yardımı ile çizilerek objektif olarak belirlenmiş oldu ve bu üç kesitin ortalaması nihai değer olarak kaydedildi. Yine damar duvar kalınlıklarında, her bir rata ait baziler arterin üç farklı kesiti, Stereo Investigator programı ile objektif olarak ölçülüp ortalaması alınarak nihai değer olarak kaydedildi.

2.4. Histolojik İnceleme

Grup 1 ve 2' nin H&E boyası yapılan preparatları histolojik olarak incelendiğinde benzer özellik gösterdiği görüldü. Işık mikroskopik incelemede arter duvarının intima, media ve adventisya tabakaları ile perivasküler alan ve çevre dokuların normal histolojik yapıya sahip olduğu izlendi (Resim 1, A-C). TUNEL boyama yapılan preparatlarda arter duvarında ve çevre dokularında apoptozu düşündürcek morfolojik değişiklik gözlenmedi (Resim 1, B-D) . Grup 3'ün yapılan histolojik incelemesinde H&E boyama yapılan preparatlarda damar duvar kalınlığının arttığı, damar lümen alanının azaldığı, endotel tabakada kıvrımlaşmanın olduğu gözlemlendi (Resim 2-A). TUNEL boyama yapılan preparatlarda apoptozu düşündürcek bulgu saptanmadı. İntrasellüler ödem, endotel hücrelerde lümeneye doğru çıkıntı ve alttaki elastik laminadan ayrılma görüldü (Resim 2-B). Grup 4'de H&E boyama sonrası yapılan histolojik incelemede baziller arter damar lümeninde daralma, duvar kalınlığında artış, perivasküler alanda kan elemanları ve yer yer endotelde kıvrımlaşma izlendi (Resim 2-C). TUNEL boyama yapılan preparatlarda

apopitozu düşündürecek değişikler yani nükleer pozitivite izlenmiştir (Resim 2-D). Grup 5’de H&E ve TUNEL ile yapılan boyamalarda baziller arter damar lumen alanının daraldığı ilaç verilmeyen SAK gruplarına göre daha az daraldığı , damar duvar kalınlığının artmadığı, sitoplazmik vakuolizasyonun görülmediği gözlemlendi (Resim 3-A). TUNEL boyamada baziller arterde apopitoz düşündürecek morfolojik değişiklik izlenmediği gösterilmiştir (Resim 3-B). Yalnız çevre dokularda apopitotik hücrelerde TUNEL metodu ile nükleer pozitivite izlenmiştir (Resim 4-A). Grup 6’da H&E ve TUNEL boyama yapılan preparatlarda baziller arter lumeninde daralma, duvar kalınlığında belirgin artış izlenmemiş olup, TUNEL boyamada apopitoz düşündürecek morfolojik değişiklik izlenmedi (Resim 3 C-D). Yalnız çevre dokularda apopitotik hücrelerde TUNEL metodu ile nükleer pozitivite izlendi (Resim 4-B).

2.5. Stereolojik İnceleme

Analizler IBM SPSS 20 istatistik analiz programı ile yapıldı. Veriler ortalama, standart sapma, medyan, minimum, maksimum, yüzde ve sayı olarak sunuldu. Sürekli değişkenlerin normal dağılımına Shapiro Wilk testi ile bakıldı. İki den fazla bağımsız grup ile sürekli değişkenlerin kıyaslanmasında normal dağılım şartı sağlandığı durumda ANOVA testi, sağlanmadığı durumda Kruskal Wallis testi kullanıldı. ANOVA testi sonrası post-hoc testler varyanslar homojen olduğunda Tukey testi ile varyanslar homojen olmadığı durumda Tamhane’s T2 testi kullanılarak yapıldı. Kruskal Wallis testi sonrası post-hoc testler için Kruskal Wallis testi sonrası post-hoc testleri kullanılarak yapıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak alındı.

3. BULGULAR

Tablo 1 ve 2’de baziller arter lümen alanlarının ortalama değerlerinin hangi gruplar arasında

istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre damar lümen alanlarına bakıldığında kontrol grubu ile SAK’tan bir saat sonra dekapite edilen, SAK’tan 48 saat sonra dekapite edilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. ($p < 0,001$). Sham grubuna göre ise istatistiksel olarak yine üçüncü grup anlam ifade etmektedir ($p < 0,001$). SAK oluşturulduktan bir saat sonra dekapite edilen gruba göre ise grup 1 ve 2 istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,001$). SAK sonrası 48. saatte dekapite edilen gruba göre ise birinci grup anlamlıdır ($p < 0,001$). Proflaktik olarak TQ verilip sonrasında SAK oluşturulan ve bir saat sonra dekapite edilen gruba göre ise istatistiksel olarak hiçbir grup anlamlı değildir ($p < 0,001$). SAK oluşturulup günlük TQ verilen ve 48. saatte dekapite edilen gruba göre istatistiksel olarak hiçbir grup ile anlamlı değildir ($p < 0,01$).

Tablo 3 ve 4’de baziller arter duvar kalınlığı ortalama değerlerinin hangi gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre ise damar duvar kalınlıklarına bakıldığında kontrol grubu ile bütün gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir ($p < 0,001$). Sham grubuna göre ise istatistiksel olarak yine grup 6 hariç bütün gruplar ile anlamlı sonuçlar elde edilmiştir ($p < 0,001$). SAK oluşturulduktan bir saat sonra dekapite edilen grup ile bütün gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. SAK sonrası 48. saatte dekapite edilen grup ile bütün gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir ($p < 0,01$). Proflaktik olarak TQ verilip sonrasında SAK oluşturulan ve bir saat sonra dekapite edilen grup ile grup 6 hariç bütün gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. ($p < 0,05$) SAK oluşturulup günlük TQ verilen ve 48. saatte dekapite edilen gruba

Tablo 1: Baziller Arter Lümen Alanlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Gruplar		Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	p	post-hoc
Ortalama	Mean	280,16	259,25	183,34	202,22	208,47	229,78	<0.05	3-2, 3-1, 4-1,
	Standard Deviation	78,02	54,68	30,86	27,22	25,54	17,77		
	Median	256,61	254,18	173,59	199,97	211,79	226,04		
	Minimum	211,53	175,13	146,43	173,24	163,64	211,46		
	Maximum	458,98	338,23	230,43	267,08	247,01	269,46		

Tablo 2: Baziller Arter Lümen Alanlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Baziller lümen alanı	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6
Grup 1	280,16	(-)	**	*	(-)	(-)
Grup 2	(-)	259,25	*	(-)	(-)	(-)
Grup 3	**	*	183,34	(-)	(-)	(-)
Grup 4	*	(-)	(-)	202,22	(-)	(-)
Grup 5	(-)	(-)	(-)	(-)	208,47	(-)
Grup 6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	229,78

* = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001, (-) = anlamsız

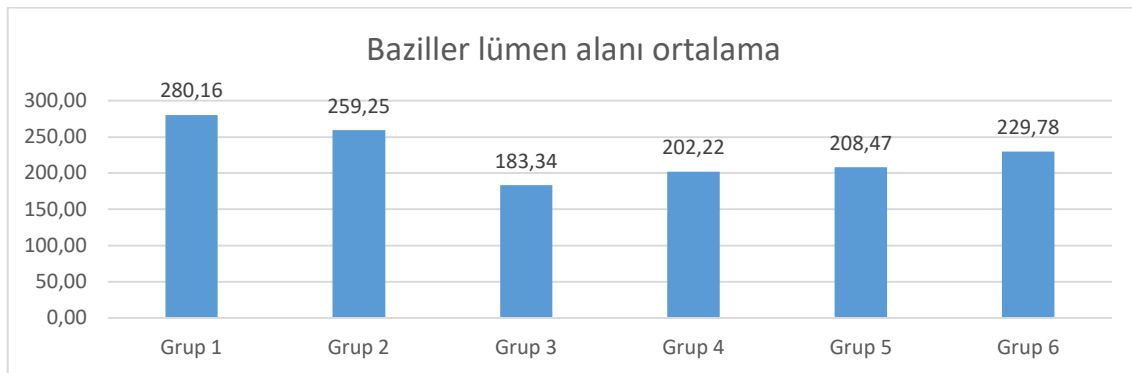
Tablo 3: Baziler Arter Duvar Kalınlıklarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

		Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	p	post-hoc
Ortalama	Mean	24,18	26,77	35,36	33,03	29,47	27,76	<0.05	1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 2-3, 2-4, 2-5, 3-4, 3-5, 3-6, 4-5, 4-6,
	Standard Deviation	2,22	1,71	1,84	1,12	1,18	1,27		
	Median	24,52	26,6	35,58	32,77	29,55	27,58		
	Minimum	20,53	23,6	32,57	31,7	27,67	26,3		
	Maximum	27,27	29,23	38,67	34,63	31,47	29,63		

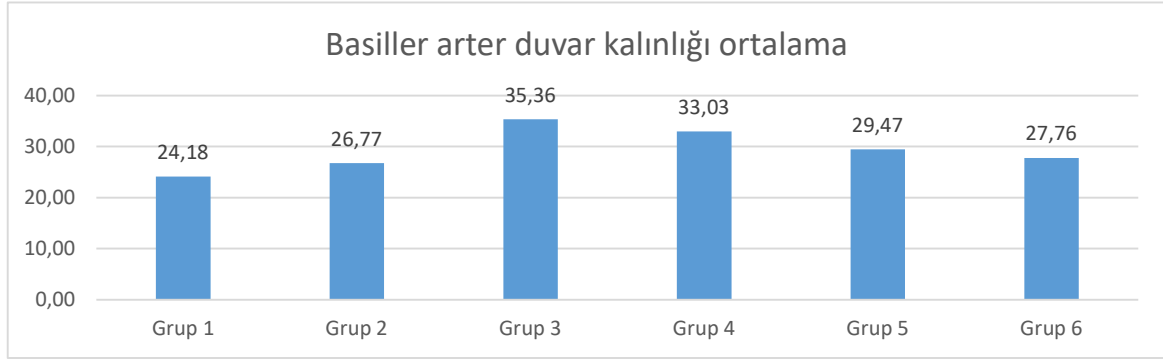
Tablo 4: Baziler Arter Duvar Kalınlıklarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Basiller arter duvar kalınlığı ortalama	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6
Grup 1	24,18	*	***	***	***	***
Grup 2	*	26,77	***	***	*	(-)
Grup 3	***	***	35,36	*	***	***
Grup 4	***	***	*	33,03	***	***
Grup 5	***	*	***	***	29,47	(-)
Grup 6	***	(-)	***	***	(-)	27,76

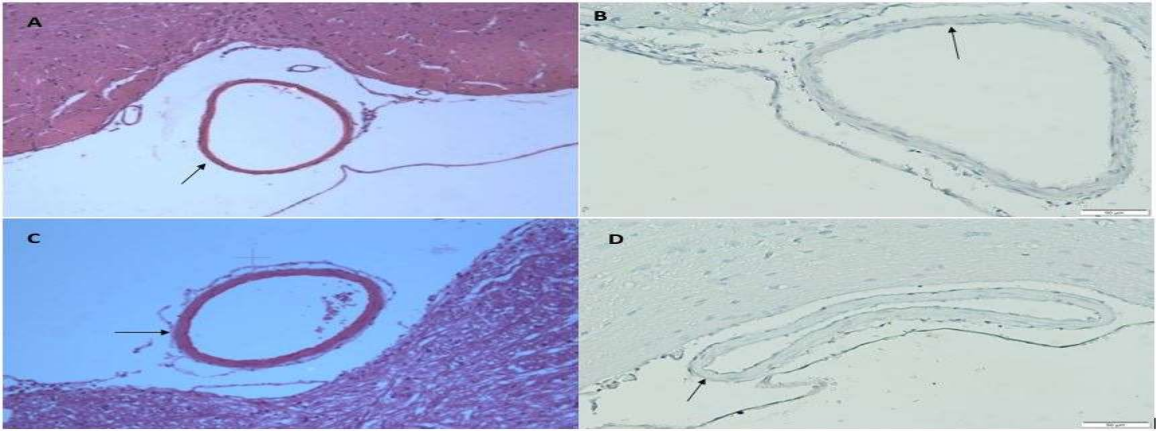
* = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001, (-) = anlamsız

Grafik 1: Baziller arter lümen alanlarının gruptaki ortalama değerini gösteren grafik

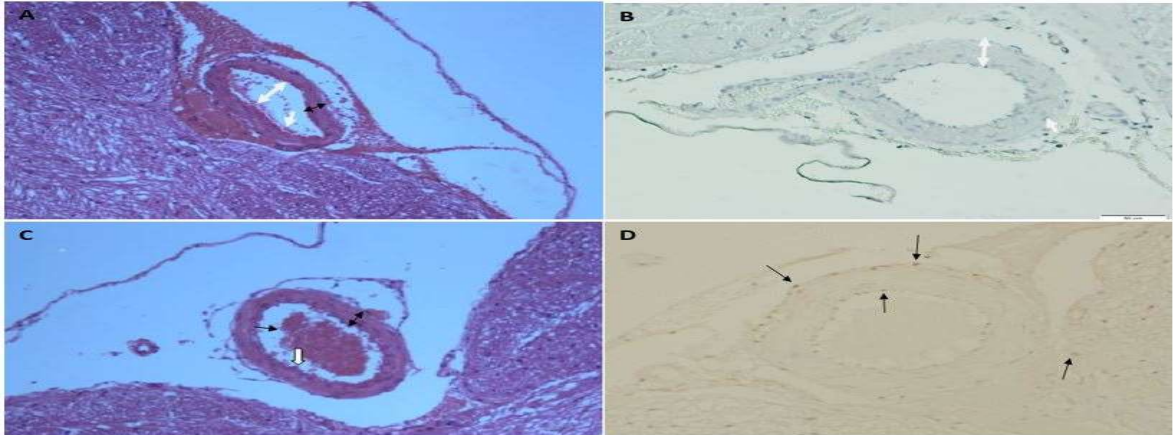
Grafik 2: Baziller arter duvar kalınlığının gruplardaki ortalama değerini gösteren grafik



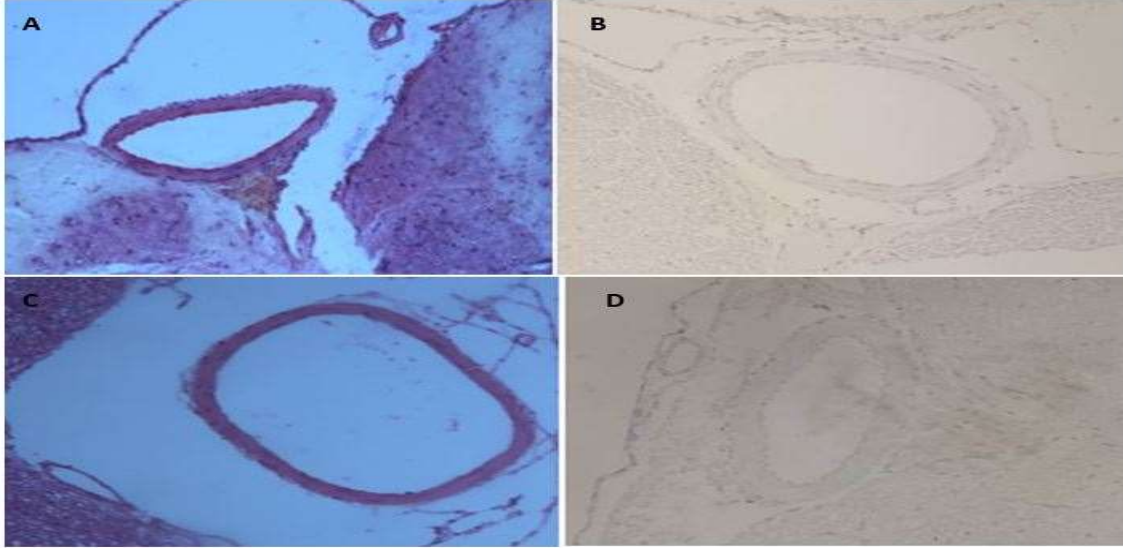
Resim 1: A ve C Grup 1-2'e ait normal morfolojiye sahip baziller arter görünümü (siyah ok), H&E, x200
B ve D Grup 1-2'e ait apoptoz ve nekroz görülmemiş baziller arter görünümü (siyah ok) TUNNEL, x200



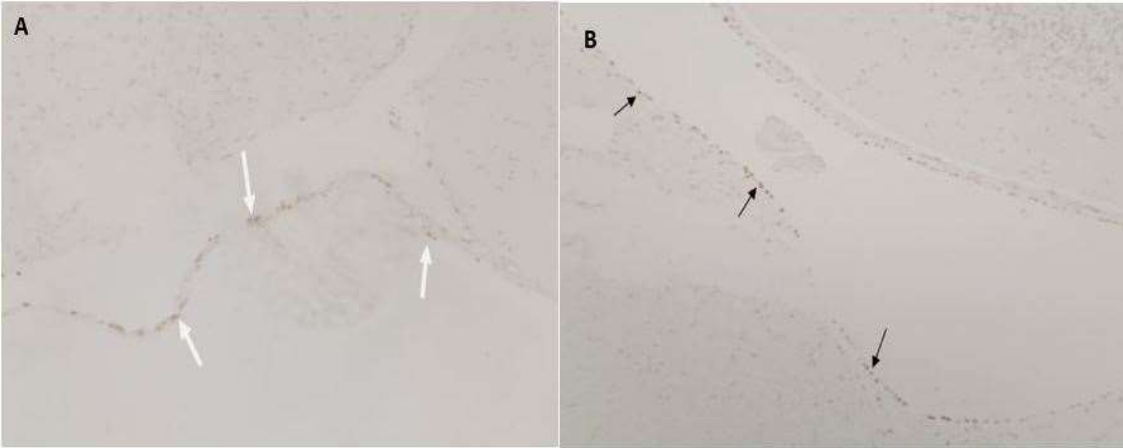
Resim 2: A- Grup 3'e ait deneğin baziller arter kesiti. Baziller arter duvar kalınlığında artış(çift uçlu siyah ok) Baziller arter lumen alanında daralma(çift uçlu beyaz ok), Endotelde kıvrımlaşma (beyaz ok),H&E,x200
B- Grup 3'e ait apoptoz ve nekrozun görülmediği, sitoplazmik vakuolizasyonun görüldüğü (beyaz ok), damar duvarında kalınlaşma (çift taraflı beyaz ok) görülen baziller arter görünümü. TUNNEL,x200
C- Grup 4'e ait damar lumen alanında daralma, damar duvarında kalınlaşma (çift uçlu siyah ok), perivasküler alanda kan ürünleri (tek uçlu siyah ok), endotelde kıvrılaşma izlenen baziller arter görünümü. (tek uçlu beyaz ok) H&E, x200
D- Grup 4'e ait entotel, adventisya ve çevre dokularda TUNEL metodu ile pozitivite izlenen baziller arter görünümü (Siyah oklar). TUNEL, x200.



Resim 3: A-B. Profilaktik olarak TQ verildikten sonra SAK oluşturulan grup 5'e ait deneğin baziller arter görünümleri. A. H&E, x200 B. TUNNEL, x200
C-D. SAK oluşturulan 3 doz TQ verildikten sonra dekapite edilen grup 6'ya ait deneğin baziller arter kesitleri. A. H&E, x200 B. TUNNEL, x200



Resim 4: A. Grup 5'de çevre dokularda apoptotik hücrelerde nükleer pozitivite izlenmiştir (beyaz ok). TUNEL, x200
B. Grup 6'da çevre dokularda apoptotik hücrelerde nükleer pozitivite izlenmiştir (siyah ok). TUNEL, x200



göre ise istatistiksel olarak ikinci ve beşinci gruplar hariç anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.

Grafik 1'e bakıldığında da baziller arter lümen alanlarının ortalama değerinin en düşük grup 3 de en yüksek grup 1 de olduğu ve ilaç verilen gruplardaki ortalama değerlerin bu iki grup arasında olduğu görülmektedir. Grafik 2'ye bakıldığında da baziller

arter duvar kalınlığının ortalama değerinin en yüksek grup 3 de en düşük grup 1 de olduğu ve ilaç verilen gruplardaki ortalama değerlerin bu iki grup arasında olduğu görülmektedir. Elde ettiğimiz istatistiksel verilere göre TQ'nin baziller arter lümen alanı üzerine etkisinin minimal olduğu asıl etkisinin baziller arter duvar kalınlığı üzerine olduğu sonucuna varılmıştır

4. TARTIŞMA

Vazospazm morbite ve mortaliteye en fazla sebep olan SAK komplikasyonudur. Serebral vazospazm kanla dolu subaraknoid mesafeden geçen büyük arterlerin fokal, segmental ve diffüz uzun süreli, şiddetli ve geri dönüşümlü belirgin daralması olarak tanımlanabilir. Kasılma sadece serebral damarlarda görülür, periferik damarlar etkilenmez. Subaraknoid mesafedeki kan yıkım ürünlerine karşı damar duvarının farmakolojik reaksiyonu olup mesafedeki kan miktarı ile vazospazm şiddeti ilişkilidir. 1980'li yıllarda Sasaki ve arkadaşları (15) oksihemoglobinin otooksidasyon ile methemoglobine dönüşmesi sırasında açığa çıkan serbest oksijen radikallerinin membran fosfolipidlerinde peroksidasyona yol açtığını, bunun da serebral vazospazmın etyopatogenezinde önemli bir rolü olduğunu ileri sürdüler. Serebral vazospazm olduğu düşünülen hastalarda klinik ve radyolojik değerlendirme birlikte yapılmalıdır. Klinik vazospazm beyin iskemisi sonucu geç başlayan nörolojik kayıpla karakterizedir. Klasik olarak kanamanın 3 ile 7. günleri arasında başlar ve 14. günden sonra geriler. Tanıda transkraniyal doppler ultrasonografi (TDUS) ilk tercih edilen noninvaziv, kolay ve yatak başı uygulanabilir bir yöntemdir. Serebral arterlerdeki akımı gösterebilmesi açısından önemli bir tetkiktir (16). Anjiyografik vazospazm yaklaşık %70-80 oranında gözlenirken, klinik vazospazm ise %30 gözlenir. Serebral vazospazm klasik olarak anevrizma rüptürüne bağlı SAK'ın komplikasyonu olmasına rağmen % 5-10 oranında ağır kafa travması ve daha az oranlarda meningeal enfeksiyon ve diğer serebrovasküler hastalıklarda görülebilir. (17,18).

Kanda bulunan granülositler, monositler, lenfositler inflamasyon sahasına gelir ve TNF α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6 ve IL-8 substratlarını salgılatarak inflamasyonun akut evresini başlatmış olur. Bu inflamatuvar mediatörlerin sentezi ve düzenlenmesi ise normalde hücre sitoplazmasında inaktif halde bulunan bir transkripsiyon faktörü, Nükleer Faktör kappaB (NF- κ B) tarafından sağlanır. İnaktif halde bulunan NF- κ B'yı reaktif oksijen türevleri (ROT), hidroksiradikal (OH $^{\cdot}$) ve superoksit (O $^{\cdot-}$) gibi serbest radikaller ve hidrojen peroksit (H $_2$ O $_2$), aktive ederek vazospazmın inflamasyon kaskadını başlatır. NF-kappaB adezyon molekülleri ve sitokinlerin düzenlenmesini sağlayarak serebral vazospazmda etkili olabileceği düşünülmektedir (19,20,21).

Yine yapılan çalışmalarda bir başka teoride ise SAK 'da subaraknoid mesafedeki oksihemoglobinin oksidasyonu ile subaraknoid aralıkta methemoglobin ve superoksit anyon radikallerini oluşturduğu gösterilmektedir. Bunlarında lipit peroksidasyonuna yol açtığı ve serbest radikallerin, lipit peroksidasyonu sonucu oluşan hidroksil radikaller ile lipit peroksitlerin güçlü vazospazm etkinliğe sahip olduğu gösterilmektedir (8,22).

Endotel hücreleri NO gibi vazodilatator ve endotelin (ET) gibide vazokonstriktör maddeler üretmektedir. Serebral vazospazma yol açan en önemli faktörlerin endotel kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Hayvan deneylerinde ve klinik çalışmalarda SAK sonrası NO düzeylerinin 10. dakikada düştüğü gösterilmiştir. Bu durumda endotel disfonksiyonuna sebep olan asıl faktörün oksihemoglobin veya bilirubin olduğu tahmin edilmektedir. SAK sonrasında hemoglobin NO'ye bağlanarak etkisini azaltmaktadır. SAK'ın inflamatuvar sürecinde ET-1 de sentezlenmektedir. Subaraknoid mesafedeki kan pıhtısının hemolizi sonrasında lökositlerden ET-1 sentezi indüklemektedir. ET-1 hem vazokonstriksiyona yol açar hem de endotelial ve düz kas hücrelerinde proliferatif etki göstererek vazospazm oluşturmaktadır (23). Subaraknoid aralıktaki pıhtı kaynaklı oksihemoglobin endotelden ET-1 sekresyonunu arttırır. ET bilinen endojen vazokonstriktör maddelerin en güçlüsüdür (24).

TQ, demir bağımlı lipit peroksidasyonun güçlü bir şekilde engeller. Bu etkisini vazospazmotik etkinliği olan serbest oksijen radikallerinin ve peroksit radikallerinin oluşumunu engelleyerek sağladığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Yine yapılan çalışmalarda TQ'nun vazospazmotik etkisi olan proinflamatuvar sitokinlerin yapımını azalttığı görülmektedir (21). Yapılan çalışmalarda TQ'nun vazospazmotik etkisi olan IL-1, TNF-alfa, IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin "NF-KB patolojik sinyal yolağı" üzerinden yapımını azalttığı görülmektedir (11,12).

TQ'nun anti oksidatif potansiyeli, molekülün kuinon yapısının redoks özellikleri, TQ'nun fizyolojik engeller arasında çapraz geçiş yapma kabiliyeti ve subselüler bölümlere kolay erişimine bağlı olarak ortamdaki serbest radikallerin etkilerini yok eder (25). TQ, bir dizi oksido redüksiyon sonrası oluşan metabolitler ile endojen anti-oksidan savunma moleküllerini aktive ederek serbest radikallerin zararlı etkilerini önler. Bu metabolitler, hemoglobin ve miyoglobin'in oksidatif stresini önlemede etkindirler. GSH, SOD, katalaz (CAT), glutatyon-S-transferaz (GST) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) hücrelerin anti-oksidan sistemini oluşturmaktadır. Antioksidan enzimlerin, serbest radikal kaynaklı oksidatif hasarı nötralize etmesinden sorumlu olduğu iyi bilinmektedir (26).

Oksidatif hasara bağlı hastalıklarda tedavi amacıyla doğal antioksidan bileşikler ve fitokimyasalların kullanılması, serbest radikalleri azaltarak oksidatif hasar kaynaklı patogeneze iyileşme sağlamıştır (27). Antioksidan enzimler hücresel savunma sisteminde reaktif oksijen türlerine (ROT) karşı vücudu korur. TQ ROT'a karşı güçlü bir fitokimyasal antioksidan etki oluşturur (11). TQ 'nun antioksidan, antiinflamatuvar, antiapoptotik, antitümör ve

antimetazatik etkinliği olduğu bilinmektedir. Bu etkinliği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Yaptığımız bu çalışmada ilk olarak Solomon ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olan sisterna magnaya kan enjeksiyonu yöntemi kullanılmıştır. SAK modellerinde birçok hayvan kullanılmış olup, biz çalışmamızda en yaygın olarak kullanılan ratları tercih ettik. SAK oluşturmak için en fazla kullanılan 3 yöntemden birincisi; arter içerisine bir kateter yardımı ile girilip, bifurkasyon noktasının rüptüre edilerek SAK oluşturulmasıdır, ikincisi; arterin uygun diseksiyonu sonrasında otolog kanın arter etrafına enjekte edilmesidir, ncs ise; başka bir bölgeden alınan otolog kanın sisterna magnaya enjekte edilmesi suretiyle oluşturulan SAK'tır. (13,28) Kullandığımız tekli kanama modelinde SAK sonrası vazospazmın en şiddetli birinci saat sonlarına doğru oluştuğu, 48 saat devam ettiği ve daha sonrasında vazospazmın yavaş yavaş azaldığı bilinmektedir. (14)

Günümüzde geçerliliğini sürdüren SAK tedavilerini değerlendirdiğimizde; ilk olarak "3H" tedavisinden bahsetmek gerekir. Hipertansiyon, hipervolemi ve hemodilüsyon triadından oluşan bu yöntemle intravasküler hacmin artırılması ile doku perfüzyonunun yeniden sağlanarak iskeminin geri döndürülmesi amaçlanmaktadır. Ancak pulmoner ödem, serebral dem, İKB artışı, hemorajik enfarkt gelişimi, yeniden kanama, kardiyak aritmi, miyokart iskemisi gibi komplikasyonlardan dolayı tedavinin kullanım alanı ve güvenirliliği daralmakta olup, bakım maliyetinde artışa sebep olmaktadır. (29)

Kalsiyum kanal blokörleri de tedavi de kullanılmakta olup, damar düz kas hücrelerine Ca girişini engelleyerek vazospazmdan beyni korumaktadır. En sık ve yaygın olarak kullanılanı Nimodipin olup, nörolojik hasarı ve kötü prognozu düzelttiği bilinmektedir (30). Ancak fibronolitik aktiviteyi arttırması sebebiyle yeniden kanama riskine yol açmasının yanı sıra, karaciğerden itrah edilmesinden dolayı karaciğer fonksiyon bozukluğu olan hastalarda dikkatli kullanılması gerekir. Başka bir kalsiyum kanal blokörü olan Nikardipin ise intraatriyel bolus olarak verilmesiyle anjiyografik vazospazmı azalttığı görülmüştür, lakin invaziv bir yöntem olması kullanımını sınırlamaktadır (31).

Kanama sonrasında ve iskemik süreç boyunca oluşabilecek dem için, kortikosteroid kullanılması sitotoksik ödemi çözücü etkisi bulunmasına rağmen; uzun dönemde enfeksiyon, GIS kanama, hiperglisemi gibi etkilere sebep olmaktadır. Bu da kullanımını kısıtlayıcı bir etmendirdir. (32)

Son yıllarda vazospazmın tedavisinde statinlerin kullanımını gündeme gelmiştir. SAK ncesi statin kullanan hasta grubunda vazospazmın görülme sıklığı normal popülasyon ile kıyaslandığında

belirgin olarak azalmıştır. Kanama sonrası statin başlananlarda da anjiyografik vazospazmın ve iskemik hasarın daha az görünmesi sevindirici bir gelişmedir. (33)

Milrinon inotropik bir ilaç olup, fosfodiesteraz-3 inhibisyonu yaparak damarlarda vazodilatatör etki gösterir. Serebral vazospazmı azaltarak nörolojik düzelme sağlaması yanında pulmoner ödem, miyokardiyal iskemi, hipotansiyon gibi komplikasyonları da azaltmaktadır. (34)

ETA reseptör antagonisti olan Clazosontan'ın kullanıldığı çalışmalarda; vazospazmı önlediği, bazı hastalarda spazmı tamamen tedavi ettiği bildirilmiştir. Fakat ciddi hipotansiyon gelişme riski kullanımı sırasında göz ardı edilmemelidir. (35)

Bunların yanı sıra invazif bir yöntem olan Papaverin paletlerinin operasyon sonrasında arter segmentlerinin üzerine yerleştirilmesinin de vazospazmı postoperatif olarak engellediği ve herhangi bir yan etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Papaverin'in buradan yola çıkarak intraatriyal infüzyon yöntemi ile kullanılmasının nrodefesit oluşumu ve vazospazmı azaltacağı dşnlmekle beraber, refleks vazokonstriksiyona neden olabileceği de öne sürülmektedir. (36)

Mevcut tedavilerle kıyaslandığında; antispazm, antiapopitotik, antienflamatuar ve nöroprotektif etkileri bulunan ajanlarla, TQ'nun etkilerinin benzer olduğu görülmektedir. Deneyimiz sonucunda çıkan istatistiksel verilere bakıldığında da TQ'nin umut vaat edici bir ajan olarak karşımıza çıkmaktadır. Henüz klinik çalışması bulunmaması nedeniyle insanda SAK'taki etki profili tam olarak bilinemese de, yaygın olarak kullanılan, temini kolay olan, maliyeti düşük bir madde olması ve kayda değer bir yan etkisinin görülmemiş olması, güven aralığının geniş olması; TQ'un ilaç geliştirilmesi için uygun bir aday olarak görünmektedir. Deneyimizde elde ettiğimiz veriler sonucunda TQ'nun SAK gelişmeden önce kullanımının apopitoz ve vazospazmda azalmaya yol açtığı sonucuna varılmıştır. Buradan yola çıkarak TQ'nun risk grubunda profilaktik bir ajan olarak kullanımının olabileceğini düşünmekteyiz. Var olan tedavilerin halen SAK'ın medikal sağaltımında yeterli olmadığı ve bu ilaçların yan etkilerinin mortalite ve morbidite üzerinde olumsuz etkileri ya da kullanım alanlarını kısıtlaması, halen bu sahada daha etkin ve güvenilir ilaçlara ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇ

Yaptığımız deneysel çalışmada elde ettiğimiz verilere göre, literatürde daha önce santral sinir sistemi ile ilgili yapılan SAK modeli dışındaki

çalışmalarda antioksidan, antiinflamatuvar, antiapoptotik etkinliği gösterilmiş olan TQ'nun yaptığımız SAK sonrası ana vasküler yapılarda gelişen vazospazmı tedavi edici ve apoptozu önleyici etkisini tespit ettik.

Literatür taraması sonucunda TQ'nun etkinliği, güvenilirliği, kullanım kolaylığı, ulaşılabilirliği hakkında anlamlı sonuçlara ulaşılmıştır. Deneyimiz sonucunda elde ettiğimiz patolojik bulgular ve istatistikî değerlendirmeler ilacın etkinliğini ve güvenilirliğinin olduğunu gösterdi. Sonuç olarak bu ajan ile ilgili ayrıntılı çalışmalara başlanmasının SAK'ın en mortal komplikasyonu olan vazospazmı önlemekte faydalı olacağı kanaatindeyiz.

6. KAYNAKLAR

- 1.Weir B. (ed)Subarachnoid Hemorrhage: Causes and cures. Oxford University Press. NY. 1998; 144-176
- 2.Bederson JBi Connolly ES, Batjer HH, et al. 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 2009; 40: 994-1025
- 3.Kocaeli H, Korfalı E. Anevrizmal subaraknoid kanama ve komplikasyonları. Temel Nöroşirurji. Korfalı E, Zileli M (ed). Türk Nöroşirurji Derneği Yayınları, Ankara, 2010, sayfa 803-814
- 4.De Rooij NK, Linn FH, van der Plas JA, et al. Incidence of subarachnoid haemorrhage: a systematic review with emphasis on region, age, gender and time trends. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2007 Dec; 78(12): 1365-72.
- 5.Van Gijn J, Kerr RS, Rinkel GJ. Subarachnoid haemorrhage. Lancet 2007; 369: 306-18
- 6.Findlay JM. Cerebral Vasospasm in Youmans' Neurological Surgery, Winn HR(ed), Elsevier, Philadelphia 2014, sayfa 3791-3800
- 7.Eisenhut M. Vasospasm in cerebral inflammation. Int J Inflam. 2014;2014: 509-707
- 8.Cook DA, Volrath B: Free radicals and intracellular events associated with cerebrovascular spasm. Cardiovasc Res 1995; 30: 493-500
- 9.Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of Nigella Sativa. Phytother. Res. 2003; 17: 299-305
- 10.Taborsky J, Kunt M, Kloucek P, et al. Identification of potential sources of thymoquinone and related compounds in Asteraceae, Cupressaceae, Lamiaceae, and Ranunculaceae families. Cent Eur J Chem. 2012; 10: 1899-1906
- 11.Mansour MA, Nagi MN, El-Khatib AS, et al. Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice a possible mechanism of action. Cell Biochem Funct 2002; 20: 143-151
- 12.Vaillancourt F, Silva P, Shi Q, et al. Elucidation of molecular mechanisms underlying the protective effects of thymoquinone against rheumatoid arthritis. J Cell Biochem. 2011; 112: 107-117
- 13.Marbacher S, Fandino J, Kitchen ND. Standard intracranial in vivo animal models of delayed cerebral vasospasm. Br J Neurosurg. 2010; 24: 415-34
- 14.Barry KJ, Gogjian MA, Stein BM. Small animal model for investigation of subarachnoid hemorrhage and cerebral vasospasm. Stroke. 1979; 10: 538-41.
- 15.Sasaki T, Wakai S, Asano T, Watanabe T, Kirino T, Şano K. The effect of a lipid hydroperoxide of arachidonic acid on the canine basilar artery. An experimental study on cerebral vasospasm. J Neurosurgery. 1981;54: 357-365.
- 16.Mills JN, Mehta V, Russin J, et al. Advanced imaging modalities in the detection of cerebral vasospasm. Neurol Res Int. 2013;2013:415960.
- 17.Findlay JM: Cerebral vasospasm in Youmans' Neurological Surgery, Winn HR (ed), Elsevier, Philadelphia 2014; sayfa: 3791-3800
- 18.Haley EC Jr, Kassell NF, Apperson-Hansen C, Maile MH, Alves WM: A randomized, double blind, vehicle controlled trial of tirilazad mesylate in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A cooperative study in North America. J neurosurg 1997;86: 467-474
- 19.Bowman G, Bonneau RH, Chinchilli VM, Tracey KJ, Cockroft KM. A novel inhibitor of inflammatory cytokine production(CNI-1493) reduces rodent post- hemorrhagic vasospasm. Neurocrit Care. 2006; 5: 222-9
- 20.Gallia GL, Tamargo RJ. Leukocyte-endothelial cell interactions in chronic vasospasm after subarachnoid hemorrhage. Neurol Res. 2006; 28: 750-8
- 21.Zhou ML, Shi JX, Hang CH, Cheng HL, Qi XP, Mao L, Chen KF, Yin HX. Potential contribution of nuclear factor-kappa B to cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage in rabbits. J Cereb Blood Flow Metab. Feb 7 2007.
- 22.Misra HP, Fridovich I. The generation of superoxide radical during the autooxidation of hemoglobin. J Biol Chem 1972; 10: 6960-62
- 23.Grasso G: An overview of new pharmacological treatments for cerebrovascular dysfunction after experimental subarachnoid hemorrhage. Brain Res Brain Res Rev 2004; 44 : 49-63
- 24.Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobaya-shi M, Mitsui Y. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature 1988;332:411-5.

25. Badary OA, Taha RA, Gamal El-Din AM, et al. Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug Chem Toxicol* 2003; 26: 87-98
26. Darakhshan S, Pour AB, Colagar AH, Sisakhtnezhad S, et al. Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacological Research*. 2015; 95-96: 138-158.
27. Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* seed. *Int Immunopharmacol*. 2005; 5: 1749-1770
28. Solomon RA, Antunes JL, Chen RY, et al. Decrease in cerebral blood flow in rats after experimental subarachnoid hemorrhage: a new animal model. *Stroke*. 1985; 16: 58-64.
29. Sen J, Belli A, Albon H, Morgan L, Petzold A, Kitchen N. Triple-H therapy in the management of aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Lancet Neurol*. 2003; 2: 614- 621
30. Roos YB, Levi M, Carroll TA, et al. Nimodipine increases fibrinolytic activity in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2001; 32: 1860-2.
31. Linfante I, Delgado-Mederos R, Andreone V, et al. Angiographic and hemodynamic effect of high concentration of intra-arterial nicardipine in cerebral vasospasm. *Neurosurgery*. 2008;63: 1080-6; discussion 86-7.
32. Lannes M, Teitelbaum J, del Pilar Cortes M, et al. Milrinone and hemeostasis to treat cerebral vasospasm associated with subarachnoid hemorrhage: the Montreal Neurological Hospital Protocol. *Neurocrit Care*. 2012;16: 354-62
33. McGirt MJ, Blessing R, Alexander MJ, et al. Risk of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage reduced by statin therapy: A multivariate analysis of an institutional experience. *J Neurosurg*. 2006; 105: 671-4.
34. Huang D, Shenoy A, Cui J, et al. In situ detection of AP sites and DNA strand breaks bearing 3'-phosphate termini in ischemic mouse brain. *FASEB J*. 2000; 14: 407-17.
35. Bautista C. Unresolved issues in the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *AACN Adv Crit Care*. 2012; 23: 175-85.
36. Dalbasti T, Karabiyikoglu M, Ozdamar N, et al. Efficacy of controlled-release papaverine pellets in preventing symptomatic cerebral vasospasm. *J Neurosurg*. 2001; 95: 44-5