T.C. ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANKARA BİLKENT ŞEHİR HASTANESİ

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

TAVŞANLARDA SUBARAKNOİD KANAMA SONRASI GLİMFATİK SİSTEMDE OLUŞAN DEĞİŞİKLİKLERE NİMODİPİN VE ENOKSAPARİN SODYUMUN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Dr. Kadir ÇETİNKAYA

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA/2023

T.C. ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANKARA BİLKENT ŞEHİR HASTANESİ

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

TAVŞANLARDA SUBARAKNOİD KANAMA SONRASI GLİMFATİK SİSTEMDE OLUŞAN DEĞİŞİKLİKLERE NİMODİPİN VE ENOKSAPARİN SODYUMUN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

DR. KADİR ÇETİNKAYA

TEZ DANIŞMANLARI
Prof. Dr. Gıyas AYBERK
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Özgür ÖZATEŞ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA/2023

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Dr. Ö. Üyesi M. Özgür ÖZATEŞ ve Prof. Dr. Gıyas AYBERK danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve 'Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesi'ne göre yazıldığını beyan ederim.

Dr. Kadir ÇETİNKAYA
Ankara/2023

TEŞEKKÜR

Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde başlayıp Ankara Şehir Hastanesi'nde devam eden asistanlığım süresince hayata ve çok sevdiğim mesleğime dair çok şey öğrendiğim, hiçbir zaman sabır, özveri ve hoşgörüsünü benden esirgemeyen, öğrencisi olmaktan ve birlikte çalışmaktan onur ve mutluluk duyduğum çok değerli hocam ve tez danışmanım, Prof. Dr. Gıyas AYBERK'e ve Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Özgür ÖZATEŞ'e, değerli bilgi ve tecrübelerinden faydalanma şansı bulduğum, uzmanlık eğitimim sırasında değerli katkılarından dolayı Prof. Dr. Ömer Faruk TÜRKOĞLU'na, Prof. Dr. Pınar ÖZIŞIK'a, Prof. Dr. Atilla KAZANCI'ya, Doç. Dr. Ahmet Gürhan GÜRÇAY'a, Doç. Dr. Oktay GÜRCAN'a, Doç. Dr. Ercan BAL'a, Dr. Öğr. Üyesi Harun DEMİRCİ'ye, Dr. Öğr. Üyesi Burak BAHADIR'a, Dr. Öğr. Üyesi Halil KUL'a, Op. Dr. Hakan TOSUN'a, Op. Dr. Naci ALTUNDAL'a, Op. Dr. Hümeyra KULLUKÇU'ya, Op. Dr. Fırat NARİN'e, Op. Dr. Salih Kürşat ŞİMŞEK'e, Op. Dr. Betül YAMAN'a;

Ankara Şehir Hastanesinde aynı çatı altında çalışmaya başlamamızla tanıma şansı bulduğum Beyin ve Sinir Cerrahisi Klinik ve İdari Sorumlusu Prof. Dr. Ahmet Deniz BELEN ve diğer hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma;

Tez çalışmalarım süresince her türlü desteğiyle yanımda olan Prof. Dr. Oktay ALGIN'a ve Radyoloji Teknisyeni Musa KURNAZ'a;

Aksaray Üniversitesi Biyoistatik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Can ATEŞ'e;

Asistanlığım boyunca birlikte çalışma şansı bulduğum başta kendi kliniğimizdeki asistan arkadaşlarım olmak üzere çalışan tüm hastane personeline;

Çok sevdiğim annem, babam, kardeşlerim ve tüm aileme;

Hayattaki en güzel şansım, eşim Yasemin ÇETİNKAYA'ya ve canım kızım Duru ÇETİNKAYA'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Kadir ÇETİNKAYA

ÖZET

Amaç: Subaraknoid kanama (SAK), subaraknoid mesafede kanın bulunmasıdır ve ciddi bir beyin hastalığının göstergesidir. Tüm serebral inmelerin %5'ini oluşturur, insidansı 10/100000/kişi/yıldır. İlk kez 2012 yılında beyin glimfatik sistemin gösterilmesini takiben yapılan çalışmalar sonucunda, beyin metabolik atıklarının temizlenmesinde glimfatik sistemin rolü olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmanın amacı tavşan SAK modelinde, klinik sonuçları etkileyen patofizyolojik olayların glimfatik sistem ile ilişkisini değerlendirmek, nimodipin ve enoksaparin sodyumun klinik sonuçlarda etkili olup olmadığını araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 3000-4000 gr ağırlığında 20 adet Yenizellanda cinsi beyaz erkek tavşan kullanılmıştır. Kontrol grubu ile SAK yapılıp ilaç verilmeyen, SAK yapılıp enoksaparin ya da nimodipin tedavileri başlanılan gruplar arasında, MR Sisternografi görüntülemeleri, nörolojik fonksiyonları, gıda alımları, beynin yaş/kuru ağırlık ölçümleri, beyin dokusundan alınan örneklerin hematoksilen eosin ile boyanıp değerlendirmeleri yapılmıştır. İnflamatuvar proceslerin değerlendirilmesi için serebrum, serum ve derin servikal lenf dokularında S100B, NSE düzeyleri, serebrum Aqp4 gen ekspresyon düzeyleri gruplar arasında karşılaştırılmıştır.

Bulgular: SAK sonrası enoksaparin sodyum ve nimodipin tedavileri alan gruplarda;

- nörolojik fonksiyonlarında, gıda alım değerlerinde anlamlı düzelme olduğu,
- MR sisternografi sonuçlarında, erken faz (1.gün) görüntülerinde optik ve olfaktor sinirlerin çevresindeki BOS mesafesinde, ventriküler sistemde, internal akustik kanallarda ve iç kulak yapılarında, ana ve aksesuvar olfaktor bulblardan vomeronasal sinirlere, facial ve nazal venlere kontrast maddenin birikimi, geç faz (3. ve 5. gün) görüntülerde, kontrast maddenin tama yakın oranda temizlendiği ve mesane içerisinde kontrast madde bulunduğu saptandı.

- beyin ödeminin azaltılmasında etkili olduğunu (yaş/kuru ağırlık ölçüm sonuçları),
- Aqp4 gen ekspresyon düzeylerinin daha düşük olduğu,
- histolojik çalışmalarda ödem alanlarının daha az olduğunu,
- glimfatik akışı değerlendirmeye yardımcı olan perivasküler alan/vasküler alan oranının ışık mikroskobu ile değerlendirilmesinde azaldığını,
- inflamatuvar belirteç olarak kullanılan S100B ve NSE'ın serum, lenf dokusu düzeylerinin tedavi verilmeyen gruba göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı.

Sonuç: SAK sonrası nimodipin ve enoksaparin sodyum tedavileri alan tavşanların;

- nörolojik fonksiyonlarında, gıda alımlarında anlamlı düzelme olduğu, tedavi edilmeyen grupta ise bir iyileşme olmadığını,
- MR sisternografi görüntülemelerinde glimfatik akışın gruplar arasında anlamlı farklılık olmadığını ve SAK oranlarında özellikle enoksaparin verilen grupta kanama miktarında artış gözlenmediği,
- glimfatik sistem üzerine enoksaparin sodyumun antitrombik, antikoagülan, profibrinolitik ve antiinflamatuvar etkisi ile nimodipinin de vazospazmı önleyerek, serebral ödemi azaltarak etkili olduğunu,
- ilaçların etkilerinin S100B, NSE'ın serum ve lenf dokusunda artışa, Aqp4 gen ekspresyon düzeylerinde azalmaya yol açtığını,
- kullanılan ilaçların beynin yaş/kuru ağırlık ölçümleri, perivasküler alan/vasküler alan oranları üzerinde istatiksel ve histolojik olarak anlamlı farklılık oluşturduğunu gözlemledik.

Anahtar Kelimeler: Subaraknoid Kanama, Glimfatik Sistem, Enoksaparin Sodyum, Nimodipin

ABSTRACT

Objective: Subarachnoid hemorrhage (SAH) is the presence of blood in the subarachnoid space and is a sign of serious brain disease. It accounts for 5% of all cerebral strokes, with an incidence of 10/100000/person/year. Following the first demonstration of the brain glymphatic system in 2012, studies have shown that the glymphatic system plays a role in the clearance of brain metabolic wastes. The aim of this study was to evaluate the relationship between the glymphatic system and pathophysiologic events affecting clinical outcomes in a rabbit model of SAH and to investigate whether nimodipine and enoxaparin sodium are effective in clinical outcomes.

Materials and Methods: In the study, 20 white male Yenizellanda rabbits weighing 3000-4000 g were used. MR cisternography imaging, neurologic functions, food intake, age/dry weight measurements of the brain, and hematoxylin and eosin staining of brain tissue samples were performed between the control group and the groups in which SAH was performed and no medication was given, or SAH was performed and enoxaparin or nimodipine treatment was started. For the evaluation of inflammatory processes, S100B, NSE levels in cerebrum, serum and deep cervical lymph tissues, cerebrum Aqp4 gene expression levels were compared between the groups.

Results: In the groups receiving enoxaparin sodium and nimodipine treatments after SAH;

- significant improvement in neurologic functions and food intake values,
- In MR cisternography results, early phase (day 1) images showed accumulation of contrast material in the CSF space around the optic and olfactory nerves, ventricular system, internal acoustic canals and inner ear structures, main and accessory olfactory bulbs, vomeronasal nerves, facial and nasal veins, and late phase (days 3 and 5) images showed almost complete clearance of contrast material and presence of contrast material in the bladder.

- (results of wet/dry weight measurements) were effective in reducing brain edema,
- Aqp4 gene expression levels were lower,
- There are fewer areas of edema in histologic studies,
- decreased in light microscopy evaluation of the perivascular area/vascular area ratio, which helps to assess glymphatic flow,
- Serum and lymph tissue levels of S100B and NSE, which are used as inflammatory markers, were found to be significantly higher in the untreated group.

Conclusion: Rabbits treated with nimodipine and enoxaparin sodium after SAH;

- had significant improvement in neurologic functions and food intake, whereas there was no improvement in the untreated group,
- MR cisternography imaging showed no significant difference in glymphatic flow between the groups and no increase in SAH rates, especially in the enoxaparin group,
- enoxaparin sodium has antithrombic, anticoagulant, profibrinolytic and anti-inflammatory effects on the glymphatic system and nimodipine prevents vasospasm and reduces cerebral edema,
- the effects of drugs lead to an increase in S100B, NSE in serum and lymph tissue and a decrease in Aqp4 gene expression levels,
- We observed statistically and histologically significant differences in the wet/dry weight measurements, perivascular area/vascular area ratios of the brain.

Keywords: Subarachnoid Hemorrhage, Glymphatic System, Enoxaparin Sodium, Nimodipine

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN i
TEŞEKKÜR ii
ÖZET iii
ABSTRACT v
İÇİNDEKİLER vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ix
TABLOLAR DİZİNİ x
ŞEKİLLER DİZİNİ xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. GLİMFATİK SİSTEM 4
2.1.1. Glimfatik Sistem Anatomi ve Fizyolojisi 4
2.1.2. Astrositlerin KBE ve Beyin İnterstisyel Sıvı Oluşumundaki Rolü 6
2.1.3. İnterstisyel Mesafede Interstisyel Sıvının Hareketi 8
2.2. SUBARAKNOİD KANAMA SONRASI OLUŞAN PATOFİZYOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER 10
2.3. GLİMFATİK SİSTEMİN HASTALIKLAR İLE İLİŞKİSİ 11
2.4. NİMODİPİN 12
2.5. ENOKSAPARİN SODYUM 12
3. GEREÇ VE YÖNTEM 14
3.1. DENEY HAYVANLARI VE BARINMA KOŞULLARI 14
3.2. DENEY GRUPLARI 15
3.3. TAVŞANLARDA SİSTERNAL SUBARAKNOİD KANAMA OLUŞTURULMASI 15
3.4. MANYETİK REZONANS GÖRÜNTÜLERİNİN ALINMASI 16
3.5. GIDA ALIMI VE NÖROLOJİK DEĞERLENDİRME 18
3.6. ELİSA TESTİ 19
3.7. SAKRİFİKASYON, PERFÜZYON VE BEYİN EKSTRAKSİYONU 19
3.8. KANTİTATİF REAL-TİME PCR (qRT-PCR) 20

3.9. BEYNİN YAŞ/KURU AĞIRLIĞI 21
3.10. SERVİKAL LENF NODLARININ ÇIKARILMASI VE İNCELENMESİ 22
3.11. HİSTOLOJİK İNCELEME 22
3.12. İSTATİKSEL ANALİZ 23
3.13. ETİK KURUL ONAYI 23
4. BULGULAR 24
4.1. MR SİSTERNOGRAFİ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ 24
4.2. NÖROLOJİK MUAYENE VE GIDA ALIM SONUÇLARI 25
4.2.1. Gruplar Arasında Nörolojik Muayene Bulguları 25
4.2.2. Gruplar Arasında Gıda Alım Bulguları 26
4.3. BEYNİN YAŞ/ KURU AĞIRLIK BULGULARI 27
4.4. S100B, NSE SONUÇLARI 28
4.4.1. S100B Beyin, Kan ve Derin Servikal Lenf Dokusundaki Düzeylerinin Sonuçları 28
4.4.2. NSE Beyin, Kan ve Derin Servikal Lenf Dokusundaki Düzeylerinin Sonuçları 29
4.5. KANTİTATİF REAL-TİME PCR SONUÇLARI 30
4.6. HİSTOLOJİK İNCELEMELER 32
4.6.1. Tüm Gruplarda Perivasküler Alan'ın/Vasküler Alana Oranlarının Değerlendirilmesi 32
5. TARTIŞMA 35
6. SONUÇ 40
7. KAYNAKÇA 41

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

aSAK	**:**	Anevrizmal Subaraknoid Kanama
AG	**:**	Araknoid Granülasyon
AQP	**:**	Akuaporin
BOS	**:**	Beyin Omurilik Sıvısı
Gd	**:**	Gadolinyum
EVT	**:**	Endovasküler Tedavi
GFAP	**:**	Glial Fibriler Asidik Protein
ISS	**:**	İnterstisyel Sıvı
KBE	**:**	Kan Beyin Engeli
LMWH	**:**	Düşük Moleküler Ağırlıklı Heparin
MRG	**:**	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MSS	**:**	Merkezi Sinir Sistemi
NSE	**:**	Nöron Spesifik Enolaz
PVA	**:**	Paravasküler alan
SAK	**:**	Subaraknoid Kanama
TBH	**:**	Travmatik Beyin Hasarı
UFH	**:**	Fraksiyone Olmayan Heparin
qRT-PCR	**:**	Kantitatif Real-Time PCR
VR	**:**	Virchow- Robin

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Deney gruplarına uygulanan işlemler 15
Tablo 3.2. 3 Tesla MRG incelemelerinin sekansları ve parametreleri..... 17
Tablo 3.3. Deney gruplarında Endo gıda alım sınıflandırması 18
Tablo 3.4. Deney gruplarında Endo nörolojik fonksiyon skorlaması 18
Tablo: 3.5. Q-PCR çalışmasında kullanılan primer genler 21
Tablo 4.1. Gruplar arasındaki nörolojik muayene bulguları 25
Tablo: 4.2. Gruplar arasında gıda alım bulguları 26
Tablo 4.3. Grupların yaş/kuru ağırlıktan elde edilen su yüzdeleri 27
Tablo: 4.4. Grupların yaş/kuru ağırlıkları 27
Tablo 4.5. Grupların beyin, kan ve derin servikal lenf nodlarındaki S100b düzeylerinin grafiksel olarak gösterimi 29
Tablo 4.6. Grupların beyin, kan ve derin servikal lenf nodlarındaki NSE düzeylerinin grafiksel olarak gösterimi 30
Tablo: 4.7. Aqp4 genin ve kontrol genlerinin grafiksel tablosu..... 31
Tablo: 4.8. Aqp4 gen ekspresyonunun gruplar arasındaki değişimleri..... 31
Tablo 4.9. Gruplara göre ödematöz alan skorlama sonuçları..... 33
Tablo 4.10. Perivasküler /vasküler alan oranlarının gruplar arasında dağılımı 34

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Fare modelinde beyin korteksinde glimfatik akışın in-vivo iki fotonlu mikroskop görüntüsü 4
Şekil 2.2. Perivasküler ünite 6
Şekil 2.3. Nörovasküler birim ve KBE'nin şematik yapısı 7
Şekil 2.4. SAK sonrası astrositlerde meydana gelen patofizyolojik süreçler 8
Şekil 2.5. Glimfatik sistemin anatomik yapısı 9
Şekil 2.6. aSAK sonrası glimfatik sistemde meydana gelen patofizyolojik değişiklikler 11
Şekil 3.1: Deney Hayvanları Barınma Koşulları 14
Şekil 3.2. Tavşanlarda sisternal sak oluşturulması 16
Şekil 3.3. Tavşanların MRG çekimlerini yapılış şekli 17
Şekil 3.4: Tavşanlarda sakrifikasyon sonrası beyin görüntüleri 20
Şekil 3.5. Tavşanlarda sakrifikasyon sonrası derin servikal lenf nodunun çıkarılması 22
Şekil 4.1: Kontrast madde verilmesinden 2 saat sonra elde olunan T1A MR sisternografi görüntüsü 24
Şekil 4.2. Gruplara ait beyin kesitlerinin mikrografları 32
Şekil 4.3. Gruplara ait perivasküler/ vasküler alan mikrografları 33

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Subaraknoid kanama (SAK), subaraknoid mesafede kanın bulunmasıdır ve ciddi bir beyin hastalığının göstergesidir. Anevrizmal SAK (aSAK), travmatik SAK'dan sonra en sık rastlanan SAK nedenidir ve tüm serebral inmelerin %5'ini oluşturur. İnsidansı 10/100000/kişi/yıldır (1). aSAK geçiren hastaların %12'si kanama sırasında, %40'ı da tedavi edilmesine rağmen kaybedilmektedir (1). Yaşayan hastaların ancak %35'i hastalık öncesi sağlık durumuna kavuşur ve %50'den fazlasında ciddi mental yavaşlama, yakın bellek probremleri, yorgunluk, anksiyete ve emosyonel bozukluklar görülür (2).

aSAK sonrası gelişen bu sekellerin ortadan kaldırılması için çok çeşitli tedavi yöntemleri kullanılıyor olsa da halen tatmin edici sonuçlar elde edilememiştir (3). Bunun nedeni aSAK sonrası ortaya çıkan ve beyin fonksiyonlarını bozan, çok iyi bilinmeyen patofizyolojik olayların devreye girmesidir.

Vücudumuzun diğer organlarında metabolik atıklar, interstisyel mesafeden lenfatik damarlar aracılığı ile venöz sisteme boşalır (4). Beyinde ise atıklar yine interstisyel mesafeye boşaltılmakta, ancak buradan nasıl temizlendiği tam olarak bilinmemektedir (5). İlk kez 2012 yılında beyin glimfatik sistemin gösterilmesini takiben yapılan çalışmalar sonucunda, beyin metabolik atıklarının temizlenmesinde glimfatik sistemin rolü olduğu fark edilmiştir (6). Daha sonra yapılan çalışmalarda, glimfatik sistemin histoloji ve anatomik yapısı detaylı olarak çalışılmıştır (7).

Merkezi sinir sisteminin (MSS), enerji ihtiyacı çok fazla olduğundan kardiyak atımın %25'i beyine gider. Yüksek metabolizma hızı, beyinde fazla miktarda metabolik atık birikmesine yol açar. Eğer bu atıklar temizlenemezse başlangıçta kısa bellek kaybı, konsantrasyon bozukluğu gibi kognitif bozukluklara neden olur ve takiben Alzheimer, Parkinson gibi dejeneratif beyin hastalıklarına dek giden hastalıkların ortaya çıkmasına yol açar (4).

Beyin omurilik sıvısı (BOS), beyin interstisyel sıvı (ISS) hemostazının sağlamasında ve metabolik atıkların temizlenmesinde önemli rol oynar. BOS'nın beyin interstisyel mesafesine nasıl geçtiği ile ilgili yapılan ilk çalışmalardan birinde, kemirgenlerin beyin dokusuna horseradish peroxidase enjeksiyonu (HRP)

yapıldıktan sonra, HRP beyin dokusunun perivasküler alanlarında gösterilmiş ve tanımlanan perivasküler boşlukların BOS'nın interstisyel mesafeye geçişinde rol oynadığı düşünülmüştür (8). Daha sonra yapılan çalışmalarda BOS'nın interstisyel mesafeye geçtiği, glimfatik sistem ile metabolik atıkları temizledikten sonra dural venöz sinüslere ve derin servikal lenf nodlarına drene olduğu gösterilmiştir (9, 10).

Farelerde yapılan deneysel SAK modelinde, SAK'nın glimfatik sistemde ciddi fonksiyon bozukluğuna neden olduğu gösterilmiştir (11). Başka bir deneysel fare SAK modelinde de, SAK sonrası BOS'nın interstisyel mesafeye girişinde ve interstisyel sıvının beyinden çıkışında blokaj oluştuğu gösterilmiştir (12).

Günümüzde anevrizmaların endovasküler yöntemlerle tedavisi (EVT) özellikle kanamış anevrizmalarda giderek artmaktadır (13). Bu nedenle aSAK'larda subarakanoid mesafedeki kan, açık cerrahide olduğu gibi yeterince temizlenememekte, eritrositler ve mikropıhtılar glimfatik sistem fonksiyonlarını bozmakta, inflamatuvar yanıtın şiddetinin artmasına neden olmakta ve metabolik atıkların ortadan kaldırılamamasına yol açmaktadır (11). EVT sonrası subaraknoid kanın temizlenmesi için lomber drenaj, eksternal ventriküler drenaj gibi yöntemlerin kullanılması kanın temizlenmesi ve klinik sonuçların düzelmesine yardımcı olsa da tıkanma, drenajın yeterli süre tutulamaması ve infeksiyon gibi ciddi sorunlarla karşılaşmamıza neden olmaktadır (14).

Antitrombik, antikoagülan ve profibrinolitik etkisi olan ilaçlar ile oluşan mikropıhtıların ortadan kaldırılması ve inflamasyonun baskılanması, glimfatik sistemin fonksiyonlarının düzelmesine ve tedavi sonrası klinik sonuçların daha iyi olmasına neden olabilir. Literatürde aSAK sonrası fibrinolitik tedavi uygulaması ile ilgili kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur. Gaberel ve arkadaşlarının (11) farelerde yaptığı deneysel SAK modelinde, intraventriküler tissue plasminogen aktivatörü (t-PA) uygulanan farelerde, glimfatik perfüzyonunun arttığı gösterilmiştir. Başka bir fare SAK modelinde de, nimodipin verilen farelerde nörolojik defisit ve beyin ödeminin daha az olduğu gösterilmiştir (11). Çalışmamızda sisternal SAK oluşturulan tavşan modelinde, SAK'nın glimfatik sisteme etkilerini, kullanılan ilaçlarla (nimodipin ve enoksaparin) glimfatik sistem fonksiyonlarındaki değişimleri, glimfatik sistem perfüzyonunu intrasisternal gadolinyum (Gd) vererek manyetik

rezonans görüntüleme (MRG) ile değerlendirdik. Beyin ve derin servikal lenf dokusunda Aqp4 gen ekspresyon miktarını, inme ve nörodejeneratif hastalıklarda kullanılan, inflamatuar biomarker olan S100B ve NSE seviyelerini kan, beyin ve servikal lenf nodlarında ölçerek değerlendirdik. Ayrıca glimfatik sistemdeki histolojik değişiklikleri ilaç verilen ve verilmeyen gruplarda değerlendirdik. Kullanılan ilaçların tavşanların fonksiyonel skorlarına etki edip etmediğini Endo nörolojik fonksiyon skorlaması ile ölçtük (57). Bu çalışmada diğer çalışmalardan farklı olarak, enoksoparin sodyum ve nimodipinin, SAK sonrası glimfatik fonksiyonlarında ne gibi değişiklikler yaptığı incelenmiştir. Hou ve arkadaşlarının (15) farelerde yaptığı çalışmada, nimodipinin SAK sonrası erken beyin harabiyetini azalttığı gösterilmiştir. Literatürde SAK modeli sonrası, enoksaparin sodyumun kullanıldığı çalışmalarda sadece vazospazm değerlendirilmiş olup, kognitif fonksiyonlara etkisi değerlendirilmemiştir (87). Tavşanlarda SAK modeli sonrası nimodipinin, glimfatik sisteme etkisi ile ilgili veri yoktur. Bunlar çalışmamızın özgüllüğünü oluşturmaktadır.

Bu çalışmadaki amaç, tavşan SAK modeli sonrası gelişen ve klinik sonuçları etkileyen patofizyolojik olayların glimfatik sistem ile ilişkisini değerlendirmek ve kullanılan ilaçların klinik sonuçlarda etkili olup olmadığını araştırmaktır.

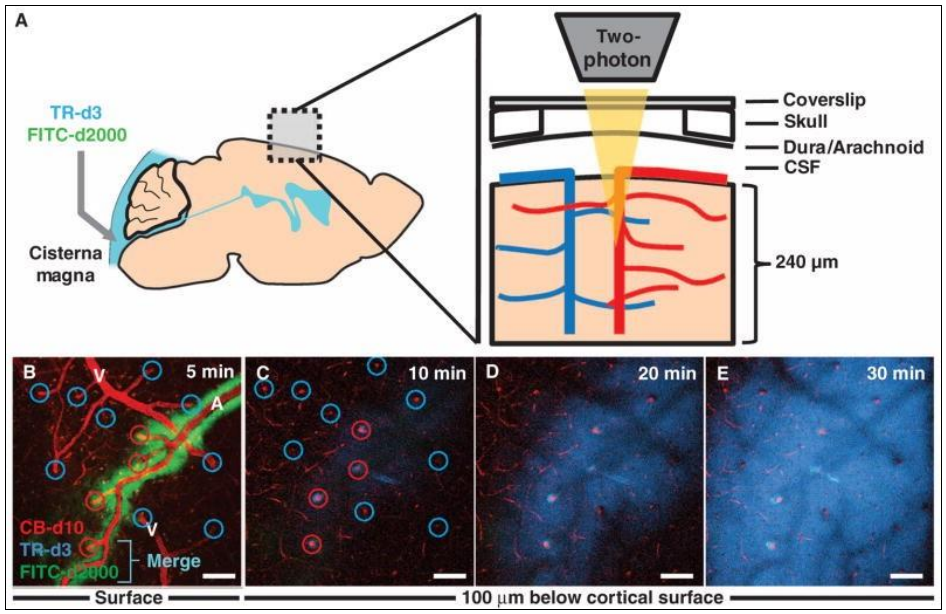
Cevap aradığımız sorular antikoagülan, antitrombik, profibrinolitik veya kalsiyum kanal blokörlerinin kullanılmasının klinik sonuçlara etkisinin olup olmadığını, laboratuvar sonuçları ve nörolojik fonksiyon skorları ile değerlendirilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. GLİMFATİK SİSTEM

2.1.1. Glimfatik Sistem Anatomi ve Fizyolojisi

Glimfatik sistem, astroglial hücreler tarafından oluşturulan, MSS'de biriken metabolitlerin ve proteinlerin temizlenmesinin sağlanmasından başka, glikoz, lipid, aminoasitler, nörotransmitterler gibi maddelerin beyin dokusuna iletimini sağlayan perivasküler bir kanal sistemidir (16). Klasik öğreti, BOS'nın araknoid granulasyonlardan emildiğini belirtir. Ancak glimfatik sistemin de emilimde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (17, 18). BOS'nın ekstrakranial mesafelere geçtiği, başlangıçta iyotla işaretli insan serum albumini kullanılarak gösterilmiştir (17, 18). Bu geçişi sağlayan Virchow-Robin (VR) boşluklarının gerçek anatomik tanımları ve klinik önemleri yıllar sonra anlaşılmıştır (19). 2012 yılında farelerde iki fotonlu mikroskop ile glimfatik sistemin gösterilmesinden sonra, BOS içerisine sisterna magna yolu ile verilen floresan madde takip edilmiş, subaraknoid boşluktan VR aralığına geçip, penetran arteriyoller boyunca ilerlediği görülmüştür (Şekil 2.1.) (6).

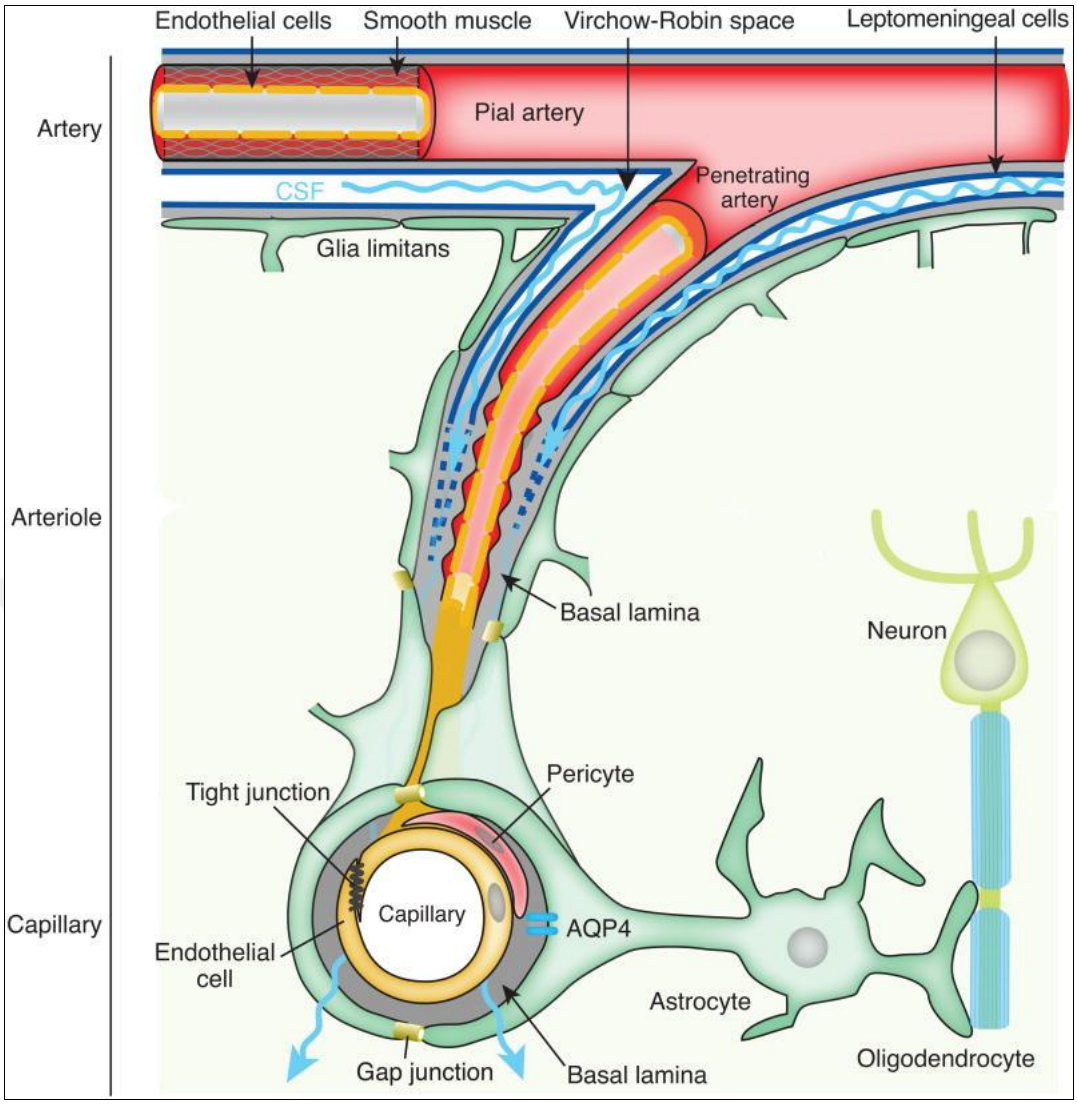


Şekil 2.1. Fare modelinde beyin korteksinde glimfatik akışın in-vivo iki fotonlu mikroskop görüntüsü

(A): sisternal enjeksiyon ve sistemin çalışma prensibi, (B-E): Büyük ve küçük moleküler ağırlıklı maddelerin enjeksiyondan 5, 10, 20 ve 30. dk sonraki görüntüleri. [(Iliff JJ et al. 2012 (6))].

Lenfatik sistem, MSS dışındaki organlarda hücre metabolizma atıklarının temizlenmesinde önemli rol oynar (4). Beyinde ise klasik anlamda bilinen bir lenfatik sistem yoktur ve bu görevi glimfatik sistem üstlenir. Koroid pleksuslarda üretilen BOS, subaraknoid mesafeye geçtikten sonra VR aralıklarına ilerler. VR aralıklarında BOS'nın ilerlemesini, arteryel pulsasyon, inspiryum ve ekspiryum sırasında oluşan basınç değişiklikleri ve koroid pleksuslarda BOS'nın üretimi sırasında oluşan basınç gradyenti sağlar. Yüzey arterlerinde arteriyel pulsasyon BOS'nın ilerlemesinde rol oynarken, derinlere inildikçe solunum sırasında oluşan basınç gradiyenti BOS'nın ilerlemesine yardım eder (20).

VR boşlukları, BOS akımına yüksek direnç göstermez, enerji metabolizması için gerekli substratların beyin dokusuna iletilmesinde ve kan akışının düzenlenmesinde önemli rol oynar. Penetran arteriyoller derin beyin dokularına ilerlerken, VR aralıkları daralarak kaybolur. Kapiller düzeyde ise perivasküler aralık bazal lamina tarafından oluşturulur (şekil 2.2). Bu düzeyde BOS, perivasküler boşluklar sayesinde parankime doğru ilerler (21, 22**).**



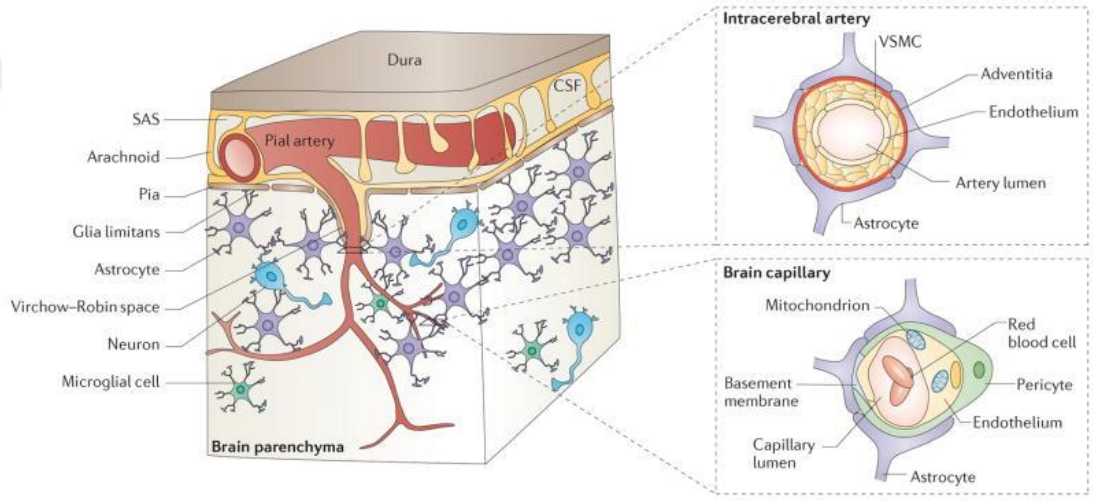
Şekil 2.2. Perivasküler ünite [(Zhang ET et al.(1990) (16))]

Bazal lamina; laminin, fibronektin, proteoglikan ve tip 4 kollajenden oluşur. Endotel hücreleri ve perisitler, bazal lamina ile astrositik hücrelerden ayrılır (Şekil 2.2).

2.1.2. Astrositlerin KBE ve Beyin İnterstisyel Sıvı Oluşumundaki Rolü

KBE, beyin ISS'sının hemostazında önemli rol oynar, belirli moleküllerin beyin dokusuna girişini engelleyen bir sistemdir. KBE'nin oluşmasında ve BOS'nın beyin interstisyel mesafeye geçişinde astrositik hücrelerin rolü büyüktür. Endotelyal hücrelerin sıkı bağlantısı, hidrofilik moleküllerin KBE'ni geçmesini sınırlar.

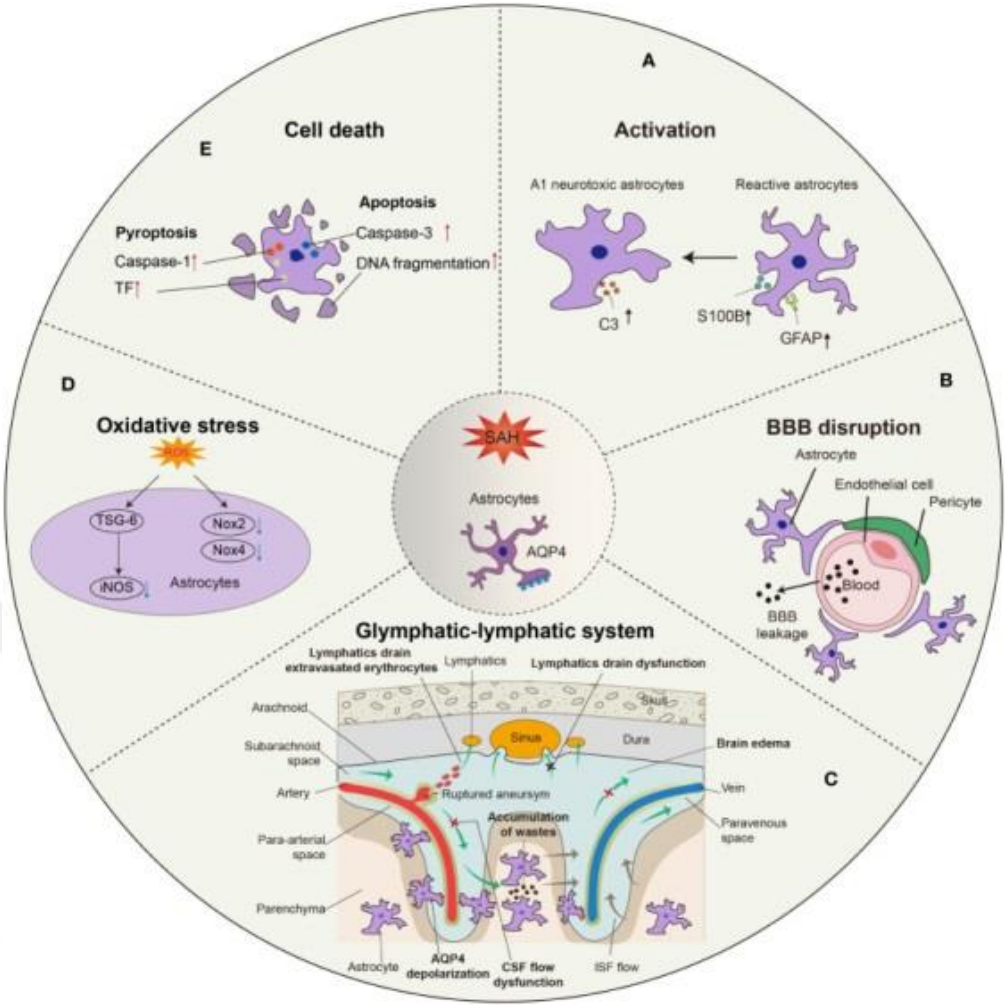
Nörovasküler birim olarak da adlandırılan bu yapı, endotel, perisitler, vasküler düz kas hücreleri, glial hücrelerden (astrositler, mikroglia ve oligodendroglia) ve nöronlardan oluşur (Şekil 2.3). Nörovasküler birimde endotel hücreleri oldukça özelleşmiş bir yapı oluşturur (24). Birimin her bir üyesi, mikrovasküler geçirgenliğin kontrolü, iyon değişimi, besin alımı, toksik maddelerin uzaklaştırılması ve serebral hemodinamiğin kontrolünde rol oynamaktadır. O2 ve CO2 gibi küçük lipofilik moleküller, difüzyonla plazma membranından geçerken, glikoz, aminoasitler, insülin, leptin ve demir gibi beyin metabolizması için gerekli materyaller ise özelleşmiş taşınma ile beyine geçerler (25, 26).



Şekil 2.3. Nörovasküler birim ve KBE'nin şematik yapısı [(Berislav et al. (2011)(24))].

MSS'deki arter ve venöz damarların kapiller endotelinin etrafını, astrositlerin ayaksı çıkıntıları çevreler. Ayaksı çıkıntılar Aqp4 su kanallarını içerir, işlevleri beyin interstisyel mesafesine sıvı taşınmasıdır (27). Bu nedenle glimfatik sistemin çalışmasında kilit rol oynamaktadır (7).

KBE'nin yapısında yer almanın dışında astrositlerin diğer işlevleri, nöral koruma, nöronal metabolizmanın düzenlenmesi, inflamasyonun başlatılması ve oksidatif stres'e karşı savunmadır (28) (şekil 2.4).



Şekil 2.4. SAK sonrası astrositlerde meydana gelen patofizyolojik süreçler

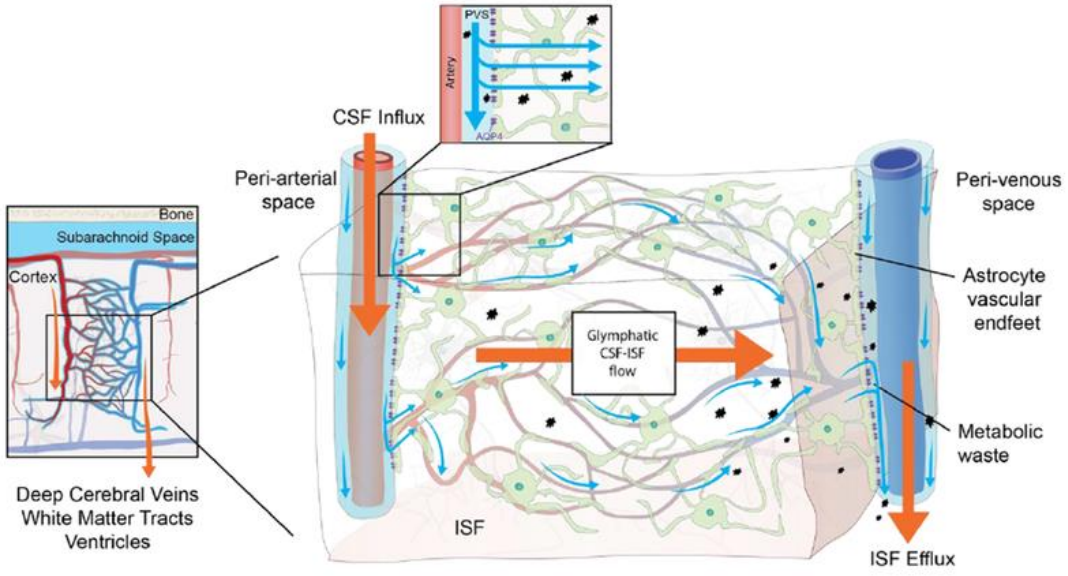
(a:reaktif astrositlerden S100B ve GFAP salgılanması, b: SAK sonrası KBE'nin hasarlanması sonucunda astrositlerin nörotoksik maddelerin parankime geçişindeki rolü, c:astrositik ayaksı çıkıntılarda yer alan Aqp4 polarizasyonu bozularak glimfatik sistemde meydana gelen değişiklikler, d:oksidatif stres, e:astrositlerin apoptozu)[(Rong Li et al. (2022) (29))]

2.1.3. İnterstisyel Mesafede Interstisyel Sıvının Hareketi

Interstisyel mesafe, hücrelerarası haberleşme ve metabolik atıkların temizlenmesinde, önemli rol oynar. İnsan beynindeki total su miktarının yaklaşık %10'u interstisyel mesafede bulunur (16). Yapılan çalışmalarda BOS'nın ISS ile sürekli bir değişim içerisinde olduğu gösterilmiştir (6). Glimfatik sistem, bu hemostazın sağlanmasında, interstisyel mesafeye sıvı girişinde ve solütlerin beyinden atılmasında önemli rol alır (30).

MSS'de sıvı transportu, KBE ve klasik anlamdaki lenfatik sistemin yokluğu nedeniyle periferik lenfatik sistemden farklılık gösterir (7). ISS'nın interstisyel

mesafedeki hareketini konvektif akım sağlar (7). ISS, konvektif akımla beyin parankimini kateder ve post-kapiller venüllere doğru ilerler. Konvektif akımın fazla direnç görmeden ilerlemesinde, ekstra-sellüler matriksin gözenekli yapısı rol oynar (31). Glimfatik sıvının akışını etkileyen diğer faktörler; vasodilatasyon, vasokonstriksiyon ya da astrositik ödemdir (30). Venöz tarafa doğru gidildikçe endotelyal hücrelerin bazal membranı ve astrositler tekrar genişleyerek BOS geçişi için perivasküler boşlukları oluşturur (31, 32). Venöz tarafta da ISS'nın perivenöz boşluklara geçişinde de Aqp4 reseptörleri rol oynar (30). Perivenöz boşlukta toplanan ISS, buradan meningeal lenfatik damarlar ve kranial sinirler yoluyla servikal lenf nodlarına ve memelilerde spinal ekstradural lenf damarlarına drene olur (14, 7). Çok sayıda peptiderjik nöromodulatör de, BOS/ISS yoluyla oluşturulan sıvının hareketine katkıda bulunur (30). Şekil 2.5'de glimfatik sistemin anatomik yapısı görülmektedir.



Şekil 2.5. Glimfatik sistemin anatomik yapısı [(Martin et al. (2018) (23))]

Glimfatik sistem aktivitesi, sirkadiyen ritm gösterir. Yapılan bir çalışmada, farelerde anestezi ya da non-REM uyku fazında, ekstraselüler boşluğun %14'ten %24'e dek arttığı gösterilmiştir, böylece atık maddelerin beyinden temizlenmesi sırasında direncin en aza düşmesi sağlanır (33).

Preklinik çalışmalarda, BOS'un %5-50 arasındaki kısmının glimfatik sistem yoluyla atıldığı bildirilmiştir (14). Bu kadar farklı değerler elde edilmesinin nedeni, çalışmalarda farklı molekül ağırlıklı maddelerin kullanılmış olmasıdır.

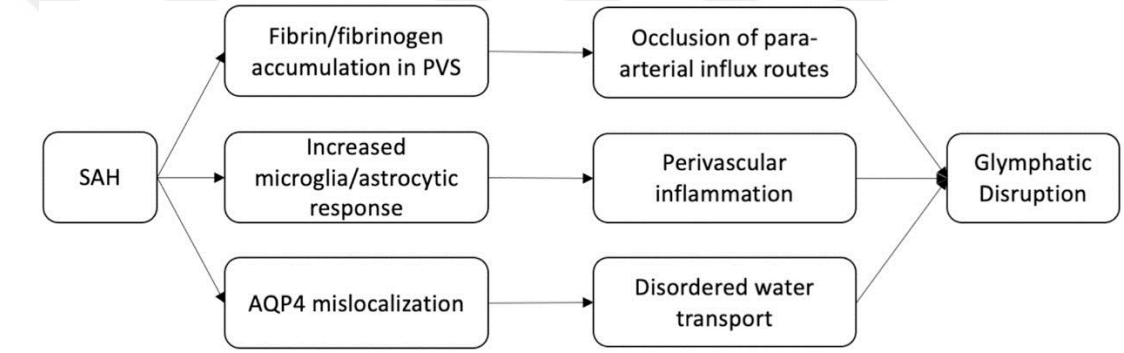
2.2. SUBARAKNOİD KANAMA SONRASI OLUŞAN PATOFİZYOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER

İlk kez 2004 yılında, aSAK geçiren hastalarda, vazospazm gelişmeden önceki ilk 72 saatte oluşan akut patofizyolojik olayları açıklamaya yönelik 'erken beyin hasarı' kavramı ortaya atılmıştır (34). Glimfatik sistemin, erken ve geç dönem beyin hasarında rolü olduğu gösterilmiştir (37). Erken beyin hasarı; reperfüzyon hasarı, KBE harabiyeti, beyin ödemi, eksitotoksisite, nöroinflamasyon ve metabolik bozukluklar gibi patofizyolojik süreçleri tanımlar (35). aSAK geliştikten yaklaşık 15 dakika sonra, intrakranial basınç kanama öncesine yakın değerlere ulaşır. Klinik ve deneysel çalışmalarda, henüz büyük arterlerde vazospazmın görülmediği bu erken dönemde serebral perfüzyon basıncının yeterli olmasına rağmen, serebral kan akımının bozulmasının nedeninin mikrodamarlarda meydana gelen dolaşım bozukluklarının olduğu bildirilmiştir (38). SAK, mikrovasküler damarları oklüzif hastalıklara göre erken dönemde daha fazla etkiler (76). Akut dönemde büyük arterlerin rüptürü sırasında oluşan mekanik vazospazm yanında, glimfatik sistemin bozulmasının da erken beyin hasarında rolü olduğu bildirilmiştir (36). SAK'tan hemen sonra erken dönemde bazal lamina yıkımı, PVA'da kan ve kan yıkım ürünlerine bağlı gerçekleşen oklüzyonlar, mikrosirkülasyonda görülen azalma, astrositik hücrelerin başlattığı inflamasyon ve Aqp4'ün subsellüler düzeyde yerleşiminin değişmesi glimfatik fonksiyonları bozar (şekil 2.6) (37, 76).

Nöroinflamasyon, birçok nörolojik hastalıkta özellikle SAK'da fonksiyonel sonuçların kötü olmasına neden olur. SAK'ta ortaya çıkan inflamatuvar olaylar, sellüler ve moleküler inflamasyon olarak ikiye ayrılır (40). Subaraknoid mesafede kanın olması, mikrogliaların aktivasyonu ile birlikte adezyon moleküllerini tetikleyerek inflamatuvar hücrelerin subaraknoid mesafeye girmesine yol açarak sellüler inflamasyonu başlatır (40). Mikroglialar aynı zamanda serebral inflamasyonun yayılmasında önemli rol oynarlar (40). Astrositlerden salınan proinflamatuvar sitokinlerde moleküler inflamasyonu başlatır (40).

aSAK sonrası 3. saatte başlayan ve 72 saate kadar süren vazojenik ödem, KBE'nin bozulmasına ve intrakranial basıncın yükselerek beyin perfüzyonunun bozulmasına neden olur (39, 40).

Kanamış bir anevrizma hastasında anevrizma tedavi edilse bile kötü nörolojik sonuçlar ve morbiditenin nedeni, erken ve geç beyin hasarıdır. Son yıllardaki çalışmalarda, vazospazmın dışında gecikmiş beyin hasarı nedenleri arasında mikrodolaşım bozuklukları, otoregulasyon bozuklukları, yayılan depolarizasyon, glimfatik sistemde meydana gelen patolojik değişiklikler üzerinde durulmaktadır (41).



Şekil 2.6. aSAK sonrası glimfatik sistemde meydana gelen patofizyolojik değişiklikler [(Stephan et al. (2022) (37))]

2.3. GLİMFATİK SİSTEMİN HASTALIKLAR İLE İLİŞKİSİ

MSS, histolojik olarak gösterilebilen lenfatik damarlar içermez ve otofaji, ubikinasyon dahil olmak üzere hücre içi ve hücre dışında oluşan metabolitlerin uzaklaştırılması sağlanamaz (44, 45). Protein agregatlarının birikmesi, Alzheimer hastalığı, demans, amyotrophic lateral skleroz ve diğer nörodejeneratif hastalıklarda yaygın olarak görülmektedir (42, 43). Preklinik çalışmalarda amiloid beta proteinin atılımında glimfatik yolun önemi gösterilmiştir (46). Farelerin striatumlarına enjekte edilen amiloid-b 40 proteini, Aqp4 (-) ve Aqp4 (+) gruplar arasında karşılaştırılmış ve Aqp4 (-) grupta atılımında %55'lik azalma gösterilmiştir (46).

Normal basınçlı hidrosefali hastaları, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kontrast madde enjeksiyonundan 24 saat sonra slyvian fissür, verteks ve büyük damarların perivasküler alanlarında kontrast maddenin temizlenmesinde belirgin azalma gözlenmiştir (48, 49). Hayvan deneylerinde travmatik beyin hasarı sonrası ortaya çıkan inflamatuvar belirteçlerin genel dolaşıma katılmasında glimfatik sistem aktif rol oynar. Özellikle S100B, NSE ve GFAP seviyeleri Aqp4 (-) farelerde kan serumunda düşük seviyelerde iken, Aqp4 (+) grupta yüksek seviyelerde bulunmuştur (50).

2.4. NİMODİPİN

Nimodipin, aSAK sonrası vazospazmın tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Nimodipinin, SAK sonrasında mortaliteyi azaltıp ve nörolojik fonksiyonları düzelttiği bildirilmiştir (51, 36). Nimodipin, kalsiyum akışını inhibe ederek T-hücrelerin enerji metabolizmasını ve fonksiyonlarını baskılayarak, SAK sonrası immün modülasyonu sağlayan Th1 farklılaşmasında rol oynar (79). Nimodipin, CAMP/PKA yolunu aktive ederek serebral ödemi azaltıp, glimfatik sistemin fonksiyonlarını düzeltir (15).

2.5. ENOKSAPARİN SODYUM

Enoksaparin, uzun zamandır tıbbi kullanımda olan heterojen fraksiyone olmayan heparin (UFH)'in homojen, düşük moleküler ağırlıklı bir türevidir (53). Heparin, glikozaminoglikanlar olarak adlandırılan polianyonik polisakkarit ailesinin bir üyesidir (80). Düşük moleküler ağırlıklı heparinin (LMWH) moleküler ağırlığı 3 ila 6 kDa arasında değişir (80). Heparin bilinen en yüksek negatif yoğunluğa sahip moleküller içerisinde yer almasından dolayı, pozitif yüklü proteinlere ve yüzeylere bağlanma eğilimleri yüksektir (81). Bu proteinlerin başlıcaları; plazma proteini, trombositlerden salınan proteinler, sitokinler, kemokinler ve diğer küçük biyolojik olarak aktif moleküllerin yanı sıra endotel hücrelerinin kendileridir (81). Enoksaparinin antitrombotik etkisi, anti-faktör Xa kompleksi'nin ve trombin-antitrombin oluşumunu katalize etmesi, doku faktörü yolu inhibitörünün (TFPI) salınımını inhibe ederek koagülasyonu önlemesidir (55). Ayrıca doku plazminogen aktivatörünün endotelyal salınımını uyararak fibrinolitik aktiviteye sahiptir (55).

UFH ve LMWH, lökositlerin, damar duvarlarından iltihap alanlarına geçişine (leukocyte rolling) aracılık eden yapışma molekülleri P- ve L-selektinin güçlü inhibitörleridir (82). Enoksaparin, SAK sonrası gelişebilecek iskemik yanıta sekonder serebral inflamasyonu nötrofil birikimini engelleyerek ve kompleman aktivasyonunu inhibe ederek önler (85). Enoksaparin'in başka bir etkisi de, astrositlerin immün aktivitesini azaltmasıdır (56). UFH, düz kas hücrelerinde gerçekleşen proliferasyonu ve anjiogenezisi inhibe eder (83). Spastik arterlerden çevre dokulara trombüs yayılmasını engeller (83). UFH, ayrıca serbest radikallerin oluşumunu engeller ve trombin aktivasyonunu sağlayarak KBE'ni koruyabilir (84). Enoksaparinin antikoagülan etkisi trombüs oluşumunu engeller, mevcut trombüsü fibrinolitik etkisi ile azaltır ya da yok eder, iskemik hasar riskini azaltır. SAK sonrası vazospazma sekonder gelişen iskemik lezyonları hafifleterek kafa içi basıncını düşürür (87). Enoksaparin, iskemi sonrası ortaya çıkan glutamat salınımını ve intranöronal kalsiyum girişini UFH'den daha fazla engelleyerek nöroprotektif etki gösterir (85).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. DENEY HAYVANLARI VE BARINMA KOŞULLARI

Çalışmada 3000-4000 gr ağırlığında, 20 adet Yenizellanda cinsi beyaz erkek tavşan kullanıldı. Her grupta 5 tane tavşan olması koşulu ile 4 grup oluşturuldu. 20 tane hayvanın 5 gün süre ile oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık 12 saat karanlığın olduğu, %50 nem oranının sağlandığı fiziki ortamda, standart tavşan yemi ve musluk suyu ile beslenerek bakılması planlandı. Hayvanlara cerrahi işlem sonrası antibiyotik verilerek 5 gün süreyle yaşatılması planlandı. Araştırma Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarında yapılmıştır. Tavşanlar üzerinde uygulanan deney protokolü, ulusal ve uluslararası hayvan deneyleri mevzuatına ve kılavuzlarına uygun olup, Kobay Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından 23.12.2022 tarih ve 648 karar numarası ile onaylanmıştır.



Şekil 3.1. Deney Hayvanları Barınma Koşulları

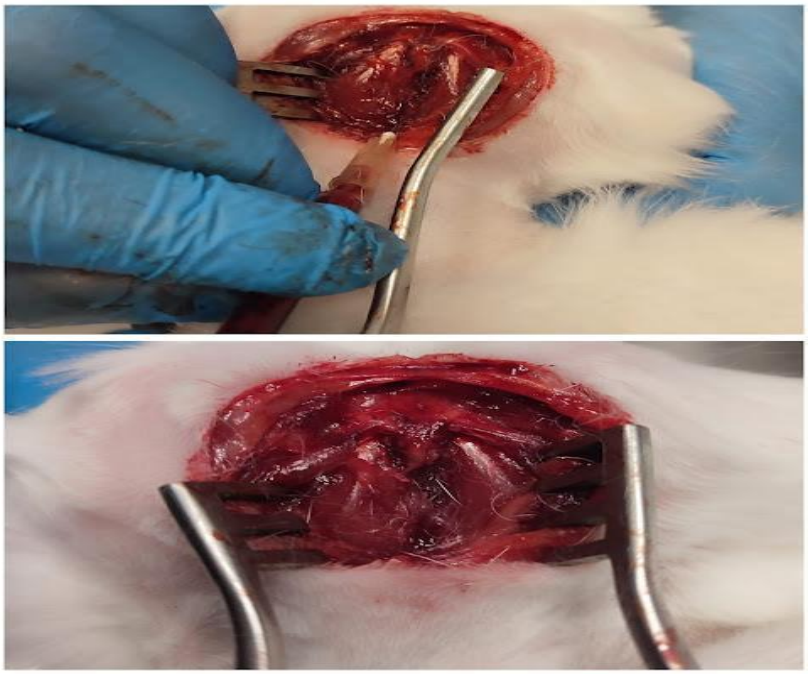
3.2. DENEY GRUPLARI

Tablo 3.1. Deney gruplarına uygulanan işlemler

Deney Grubu	SAK	İntraperitoneal enjeksiyon	MRG çekimleri
1. grup	-	% 5 dekstroz	1., 3., 5. gün
2. grup	+	% 5 dekstroz	1.,3., 5.gün
3. grup	+	Nimodipin 0,05 mg/kg (Nımotop, Bayer, Almanya)	1., 3., 5. gün
4. grup	+	Enoksaparin 1 mg/kg (Clexane, Sanofi Aventis, France)	1., 3., 5. gün

3.3. TAVŞANLARDA SİSTERNAL SUBARAKNOİD KANAMA OLUŞTURULMASI

Tavşanlar intraperitoneal 80 mg/kg ketamine hydrochloride (Ketamine, Alfasan, Hollanda) ve 5 mg/kg xylazine hydrochloride (Xylased, Alfasan, Hollanda) enjekte edilerek genel anestezi altında prone pozisyonda işlemlere alındı. 1 cm orta hat kesisi suboksipital bölgede yapıldı, oksipital bileşke ve altında atlanto-oksipital membran açığa çıkarıldı. 27 gauge insülin iğnesi ile sisterna magna içerisine girilerek BOS gelişi gözlendikten sonra, kulaktan alınan 1 ml taze venöz kan yaklaşık 100 sn içerisinde uygulandı. Ardından hayvanlar tredelenburg'a getirildi ve kanın bazal sisternalara ve subaraknoid boşluklara yayılmasını sağlamak için 30 dk boyunca bekletildi. Baş altı ısıtma pedi yerleştirildi. Cerrahi işlem süresince EKG kaydı yapıldı ve kalp hızı 190-260 arasında tutuldu.



Şekil 3.2. Tavşanlarda sisternal sak oluşturulması

3.4. MANYETİK REZONANS GÖRÜNTÜLERİNİN ALINMASI

Glimfatik sistemi değerlendirebilmek amacı ile Ulusal Manyetik Rezonans Araştırma merkezinde (UMRAM; Bilkent Üniversitesi, Ankara, Türkiye) 3 tesla MR (Trio, Siemens, Almanya) ve transmit-receive 15-kanallı koyil ile prone pozisyonda tüm tavşanlar görüntülendi (şekil 3. 3). Tavşanlar ketamine hydrochloride ve xylazine hydrochloride ile uyutuldu. Tavşanlara 0,5 ml gadolinyum butrol (Gadovist, Germany) sisternal enjeksiyonundan sonra, MR Sisternografi görüntülemeleri Tablo 3.2'deki parametrelere göre alındı ve gerektiğinde çeşitli planlarda rekonstrükte edildi. Görüntüler sisternografi konusunda 20 yıl deneyimli bir radyolog tarafından değerlendirildi**.**

Tablo 3.2. 3 Tesla MRG incelemelerinin sekansları ve parametreleri

Sequences	3D-T1W (VIBE)	3D-PDW (SPACE)	T1W 3D-MPRAGE	3D-T1 mapping	3D-T2 mapping	T2W 3D-SPACE	DTI & Tractography
TR/TE (ms)	9.81/4.9	1300/50	2130/3.9	15/1.98	39/3.73*	3000/430	7560/98
TI (ms)	-	-	1100	-	-	-	-
Slice thickness(mm)	0.59	0.49	0.47	0.45	0.5	0.68	1.17
FOV* (mm)	150x150	160x160	120x100	1.60x160	160x160	174x100	150x100
Acquisition time	6.5 min	5.5 min	1 min	20 min	15 min	5 min	6 min
Fat saturation	+	+	+	-	-	-	+
NEX	1	1	1	1	1	1	1
Slice number	176	256	192	288	240	192	45
Flip angle	10	160	12^0	5/26	60	Variant	NA
Imaging plane	Sagittal	Sagittal	Sagittal	Sagittal	Sagittal	Sagittal	Sagittal
Distance factor	-	-	-	-	-	-	20%
Pixel size (mm)	0.59x0.59	0.49x0.49	0.47x0.47	0.45x0.45	0.5x0.5	0.68x0.68	1.17x1.17

TI: inversiyon zamanı; 3D-SPACE: farklı çevirme açısı evrimleri kullanılarak uygulama için optimize edilmiş kontrastlarla üç boyutlu örnekleme mükemmelliği; NEX: uyarım sayısı; FOV: görüş alanı; NA: Geçerli değil; *: T2 haritalama sekansının TE değerleri = 3,73/ 11,59/ 18,73/ 25,87/ 33,01.



Şekil 3.3. Tavşanların MRG çekimlerini yapılış şekli

3.5. GIDA ALIMI VE NÖROLOJİK DEĞERLENDİRME

Tüm tavşanlar standart yem ve musluk suyu ile beslendi. SAK oluşturulduktan sonra gıda alımındaki değişiklikler ve nörolojik muayeneler Endo gıda alım ve Endo nörolojik fonksiyon skalasına göre 5 gün boyunca kaydedildi (tablo 3.3 ve tablo 3.4).

Tablo 3.3. Deney gruplarında Endo gıda alım sınıflandırması [(Endo S et al.1988 (57))]

GIDA ALIMINDA DEĞİŞİKLİK	PUAN
Değişiklik yok	1
>%50-90 gıda alımı	2
<%50 gıda alımı	3
Gıda alımı yok	4

Tablo 3.4. Deney gruplarında Endo nörolojik fonksiyon skorlaması [(Endo S et al.1988 (57))]

NÖROLOJİK SKALA	Grade
Herhangi bir defisit yok	1
Hafif veya şüpheli fonksiyon bozukluğu (uyuşukluk, halsizlik,boyun rijiditesi, yavaş reaksiyon,düzensiz saç)	2
Orta derecede nörolojik fonks. bozukluğu (çiğneme bozk, uzuv felci)	3
Ciddi nörolojik defisit (çember hareketi, yürüme güçlüğü)	4

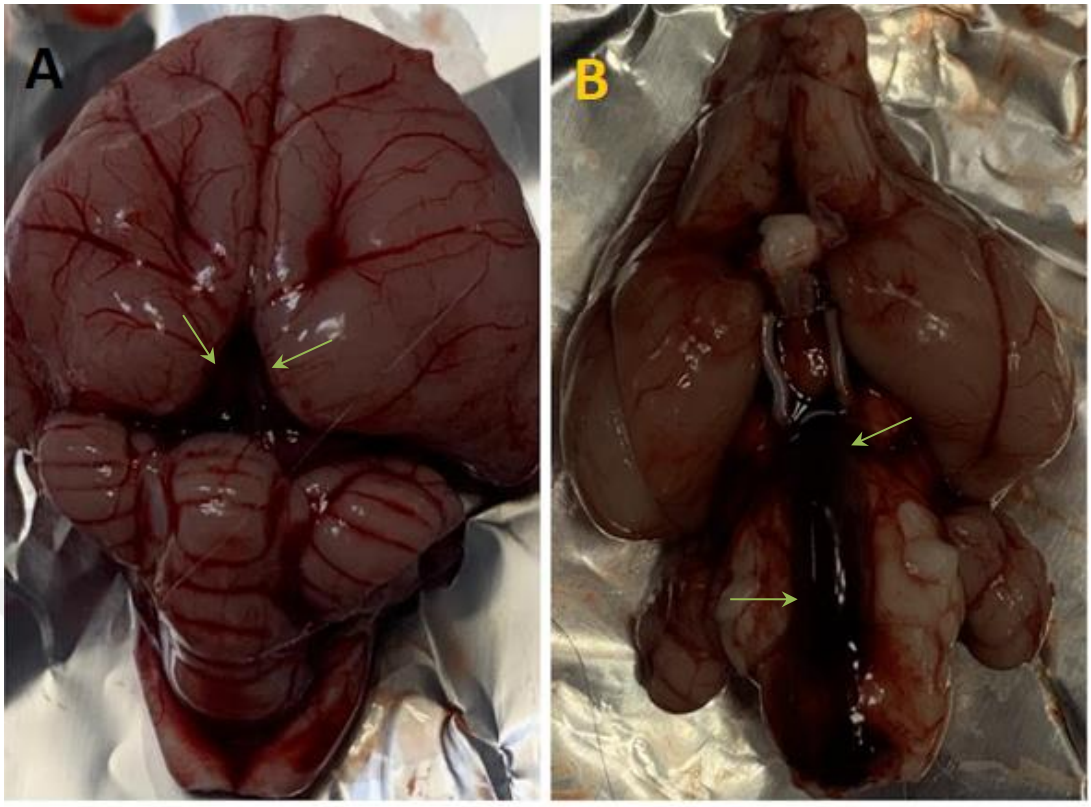
3.6. ELİSA TESTİ

Enzime bağlı immünosorbent (ELISA) tahlilleri serumdaki ve dokulardaki inflamatuar belirteçlerin düzeylerini belirlemek için, tüm gruplarda SAK sonrası 5. günde venöz kan, serebrum dokusu ve derin servikal lenf nodlarında çalışıldı. Serum ve dokulardaki S100B ve NSE düzeyleri ticari olarak temin edilebilen kitlerle ölçüldü.

ELISA kiti, Sandviç-ELISA prensibi ile kullanıldı. Bu kitte sağlanan mikro ELISA plakası, tavşan NSE ve S100B'ye özgü bir antikorla önceden kaplanmıştır. Numuneler (veya Standartlar), mikro ELISA plaka oyuklarına eklenip ve spesifik antikor ile birleştirildi. Daha sonra, Tavşan NSE ve S100B'ye özgü biyotinlenmiş saptama antikoru ve Avidin-HRP konjugatı, her bir mikroplak kuyucuğuna art arda eklenip ve inkübe edildi. Serbest bileşenler yıkandı. Substrat solüsyonu her kuyucuğa eklendi. Yalnızca tavşan NSE ve S100B, biyotinlenmiş saptama antikoru ve Avidin-HRP konjugatı içeren oyuklar mavi renkte göründü. Enzim-substrat reaksiyonu stop solüsyonu eklenerek sonlandırılıp ve renk sarıya döndüğünde, optik yoğunluk (OD) 450 nm ± 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. OD değeri, tavşan NSE ve S100B'nin konsantrasyonu ile orantılandı.

3.7. SAKRİFİKASYON, PERFÜZYON VE BEYİN EKSTRAKSİYONU

Tavşanlar 1., 3. ve 5. günde görüntüleme alındıktan sonra yüksek doz kloralhidrat verilerek sakrifiye edildi. Sonrasında torakotomi yapılan tavşanın kalbi ortaya konuldu. %5 heparin ve %4 paraformaldehit solusyonu tavşanın ventrikülüne infüzyon yapılırken atrium kesildi. Perfüzyon bittikten sonra kafatası açılarak beyinler zedelenmeden tek parça halinde çıkarılarak paraformaldehit içine bırakıldı (şekil 3.4).



Şekil 3.4. Tavşanlarda sakrifikasyon sonrası beyin görüntüleri

(a: posteriyor, b: anteriyor görünüm, ⟶ subaraknoid kanama alanları)

3.8. KANTİTATİF REAL-TİME PCR (qRT-PCR)

Aqp4 gen ekspresyon düzeyini belirlemek için, qRT-PCR testi subaraknoid kanamadan 5 gün sonra yapıldı. Tüm gruplarda derin frontal kortikal doku numunelerinde, Aqp4 gen ekspresyon seviyelerini belirlemek için real time PCR analizleri yapılmıştır.

Çalışma kapsamında RT-qPCR yöntemi kullanılarak BMAL1, REV-ERB Alpha, PER2 ve CLOCK genlerinin ekspresyon seviyeleri kontrol geni olarak kullanılmıştır (tablo 3.5). RT-qPCR işlemleri Biorad CFX96 (Biorad, USA) cihazında gerçekleştirilmiştir. RT-qPCR cihazları her döngü sonunda floresan şiddetini saptayan flurometre ve thermal cycler'dan meydana gelmektedir. Ters transkriptaz işlemiyle RNA'lardan çift iplikli yapıya dönüştürülen cDNA zincirleri arasına girerek floresan ışıma veren SYBR Green I boyası, gen ekspresyon

analizlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Çalışma kapsamında gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit (Bioline, UK) kullanılmıştır. Tasarımları tamamlanan primer setlerinin optimizasyonları yapılarak bağlanma sıcaklıkları belirlenmiştir. Her bir Gen bölgesi için uygun Tm değerinde kurulumlar gerçekleştirilmiş ve döngü eğrileri ve Melting Curve verileri incelenmiştir. Deney uygulamalarında uygun housekeeping gen (ACTB) normalizatör olarak kullanılmıştır. Analiz grupları içerisinde tüm grupların gen ekspresyon analizlerini çıkartmak için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak, 2001) metodu kullanılmıştır. Hasta grubu baz alınarak kontrol grubunun kat değişimi (Fold change, FC) hesaplanmıştır.

Tablo: 3.5. Q-PCR çalışmasında kullanılan primer genler

Primer Adı	Sekans (5'->3')	Uzunluk	Tm °C	Amplikon length
AQP4_ocu_F	**GAGTCACCACGGTTCAT**	17 bp	61 °C	195 bp
AQP4_ocu_R	**TGGCACCAGTATAATTGATTG**	21 bp		
ACTB-ocu-F	**GCACCATGAAGATCAAGAT**	19 bp	60 °C	119 bp
ACTB-ocu-R	**ATACTCCTGCTTGCTGAT**	18 bp		

3.9. BEYNİN YAŞ/KURU AĞIRLIĞI

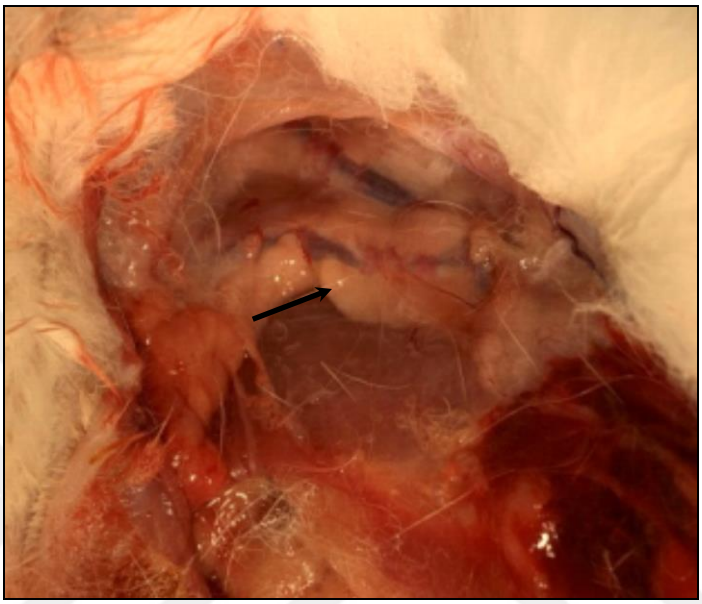
Ödem miktarını ölçmek için her gruptaki tavşanların 5. gün sol hemisferleri alındı, 100ºC'de 24 saat fırında kurutuldu. Aşağıdaki formül ile su yüzdeleri hesaplandı.

Toplam Su İçeriği (%):

$$\frac{\text{(yaş ağırlık – kuru ağırlık)}}{\text{yaş ağırlık}} \text{ x100}$$

3.10. SERVİKAL LENF NODLARININ ÇIKARILMASI VE İNCELENMESİ

Sakrifikasyon ve perfüzyon işlemlerinden sonra derin servikal lenf nodları tüm gruplarda çıkarıldı. Alınan örneklerden NSE ve S100B düzeylerini saptamak için örnekler hazırlandı (şekil 3.5).



Şekil 3.5. Tavşanlarda sakrifikasyon sonrası derin servikal lenf nodunun çıkarılması (⟶ Servikal lenf nodu)

3.11. HİSTOLOJİK İNCELEME

Sakrifikasyon sonrası alınan beyin dokusu %10 tamponlu formaline alınarak fikse edildi. Rutin takip işlemleri otomatik takip cihazında (Leica TP 1020) yapıldıktan sonra dokular parafin bloklara gömüldü. Kızaklı mikrotom (Leica SM2000R) ile 4 mikrometrelik kesitler alındıktan sonra deparifinize edildi. Deparifinizasyon sonrası dereceli alkollerle rehidrate edilen kesitler Mayer's hematoksilen ve eozin boyaları ile boyandı. Sonrasında dehidrate edilip ksilol ile şeffaflandırılıp entellan ile kapatılarak incelemeye hazır hale getirildi. Kamera ataçmanlı upright ışık mikroskopuyla (U-TV0.5XC-3 ve BX53 Olympus, Japan) her kesitten en az 5 tane alınan rastgele 400x'lük büyütme mikrograflarda yine bilgisayar yardımıyla (ImageJ program Version 1.53j; NIH, USA) perivasküler/vasküler alan

oranları ölçüldü. Önceki çalışmalardaki skorlama yöntemi mevcut kesitlere uyarlanarak 0'dan 3'e kadar skorlandı (0 hiç rastlanmamıştır, 1 hafif, 2 yaygın ve 3 şiddetli) (90). Tüm sayım, ölçüm ve skorlamalar 2 kör histolog tarafından gerçekleştirildi.

3.12. İSTATİKSEL ANALİZ

Çalışmada elde edilen verilerin değerlendirilmesinde IBM SPSS for Windows, version 21.0 (Armonk, NY: IBM Corp.) kullanılmıştır. Datanın sürekli değişkenler için gruplar özelinde test etmek amacıyla Kruskal Wallis Varyans Analizi tekniği kullanılmıştır. Zamana göre değişimin, gruplar arası farklılığın ve grupların zamana göre değişimlerinin incelenmesi amacıyla Tekrarlanan Ölçümlü ANOVA modellerinden yararlanılmış, Mauchly's W istatistiği ve ilgili p değerine göre küresellik değerlendirilmiş ve sağlanmıyorsa Multivariate testlerden Pillai's trace istatistiğine göre değerlendirme gerçekleştirilmiştir. İstatistik anlamlılık sınırının <0,05 alındığı çalışmada, elde edilen sonuçlar sürekli değişkenler için; Ortalama ±St. Sapma ve Ortanca (%25-%75) gibi tanımlayıcı istatistiklerle özetlenmiştir.

3.13. ETİK KURUL ONAYI

Bu tez çalışması Kobay Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 23.12.2022 tarih ve 648 karar numarası ile Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunmuştur.

4. BULGULAR

4.1. MR SİSTERNOGRAFİ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Sisternografi yapılan tüm gruplarda sisternal yolla verilen kontrast maddenin subaraknoid boşluğa diffüz bir şekilde dağıldığı izlendi. Grupların tamamında, erken faz (1.gün) postkontrast yağ baskılı T1W MR sisternografi görüntülerinde optik ve olfaktor sinirlerin çevresindeki BOS mesafesinde, ventriküler sistemde, internal akustik kanallarda ve iç kulak yapılarında kontrast maddenin birikimi izlendi. Ayrıca, ana ve aksesuvar olfaktor bulblardan vomeronasal sinirlere, facial ve nazal venlere doğru kontrast madde geçişi görüldü (şekil 4.1).

Geç faz (3. ve 5. gün) görüntülerde, kontrast maddenin tama yakın oranda temizlendiği ve yalnızca bağırsak venlerinde kontrast madde bulunduğu saptandı. Tüm olgularda bilateral olarak birinci, ikinci ve beşinci kraniyal sinirlerde daha belirgin olmak üzere tüm kraniyal sinirlerin kılıflarına ve bazı perinöral divertiküllere kontrast madde geçişi izlendi. Diğer sekanslarda yukarıda belirtilenler dışında ek bir bulgu veya gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı.



Şekil 4.1. Kontrast madde verilmesinden 2 saat sonra elde olunan T1A MR sisternografi görüntüsü

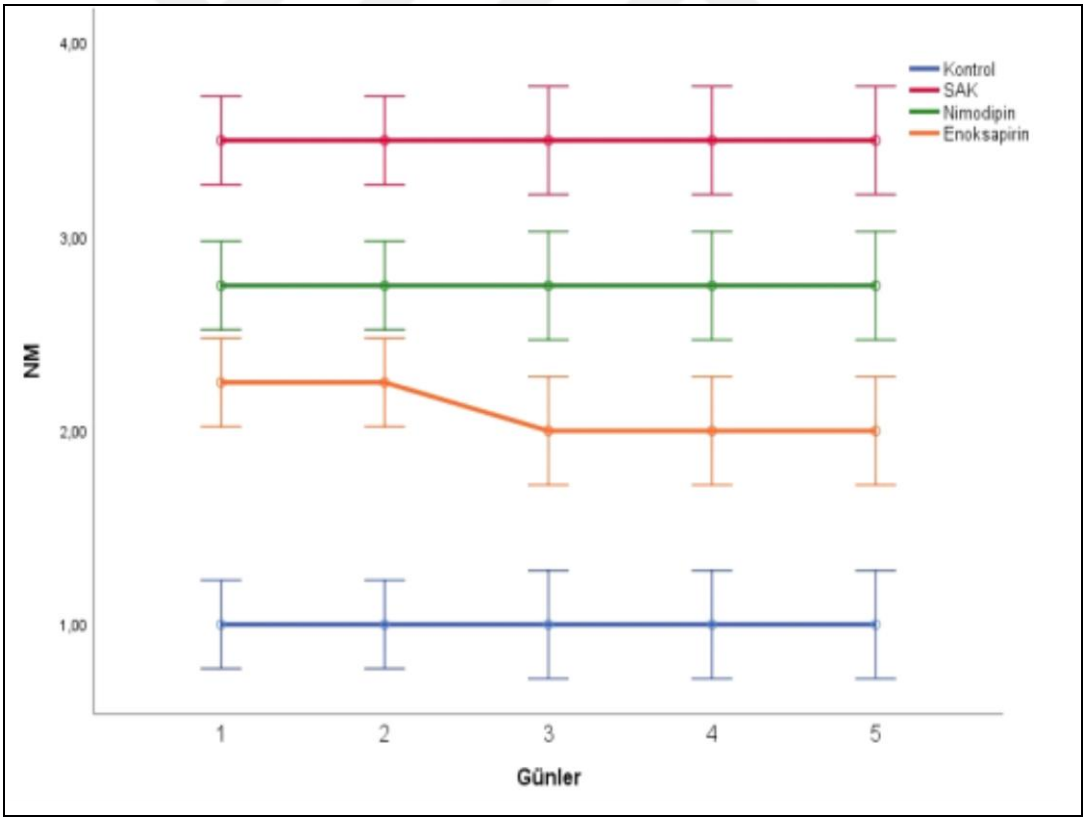
(enoksaparin grubu) a: dorsal görünüm, b: koronal görünüm, c: 3D görünüm, d-e:sagittal kesitler, kontrast maddenin dorsal meatus (kalın oklar), optik sinir kılıfları (ince oklar) ve iç kulak (kıvrık oklar) oluşumlarına geçtiği izlenmektedir.

4.2. NÖROLOJİK MUAYENE VE GIDA ALIM SONUÇLARI

4.2.1. Gruplar Arasında Nörolojik Muayene Bulguları

Gruplar arasındaki nörolojik muyane skorları Endo nörolojik muayene skalası'na göre değerlendirilmiş olup, SAK (+, ilaç-) gruptaki tavşanların sonuçları SAK (+, nimodipin +) ve SAK (+, enoksaparin +) gruplara oranla daha olumsuz çıkmıştır. Gruplar arasındaki nörolojik muayene değerlendirilmesi istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$) (Tablo 4.1). SAK (+, nimodipin +) ve SAK (+, enoksaparin +) gruplarda nörolojik fonksiyon kaybının daha az olduğu gözlenmiştir. SAK (+, enoksaparin +) olan grupta diğer gruplara göre nörolojik muayene sonuçları daha iyi saptanmıştır. Gruplar zaman içindeki değişimleri bakımından benzerdir.

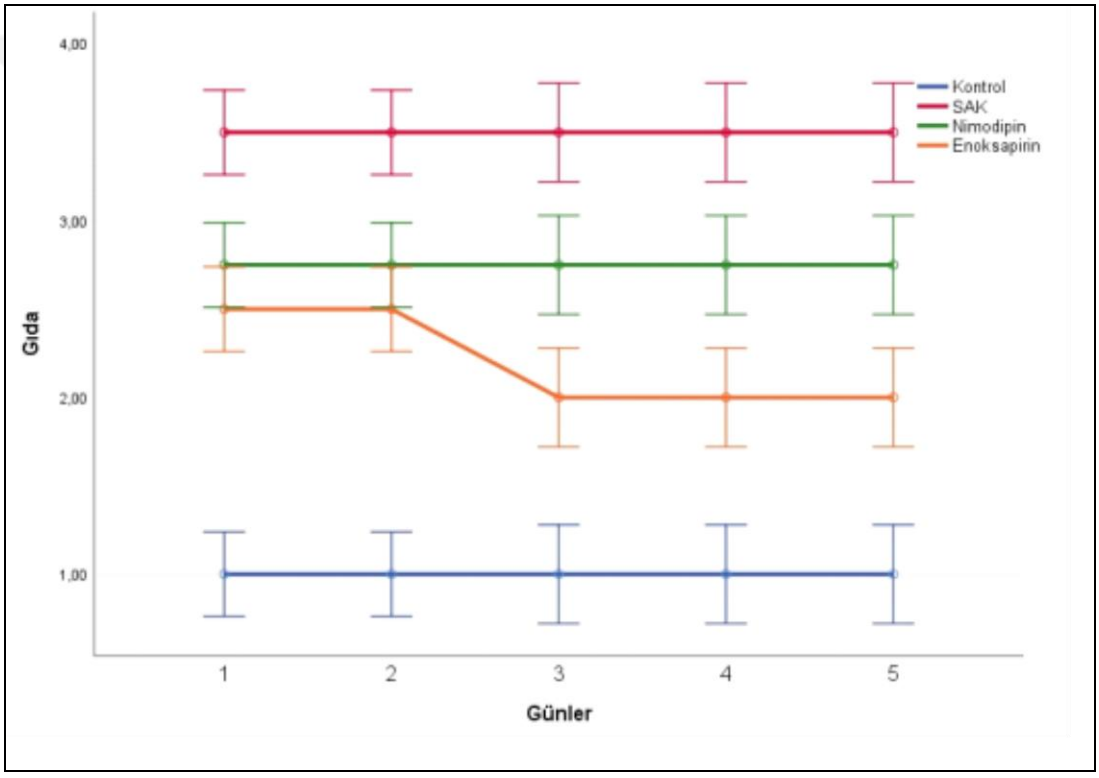
Tablo 4.1. Gruplar arasındaki nörolojik muayene bulguları



4.2.2. Gruplar Arasında Gıda Alım Bulguları

Gruplar arasındaki gıda alım skorları Endo gıda alım skalası'na göre değerlendirilmiş olup, SAK(+, ilaç-) gruptaki tavşanların sonuçları, SAK (+, nimodipin +) ve SAK (+, enoksaparin +) gruplara kıyasla daha olumsuz çıkmıştır. Gruplar arasındaki gıda alım değerlendirilmesi istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$) (Tablo 4.2). SAK (+, nimodipin +) ve SAK (+, enoksaparin +) gruplardaki gıda alım sonuçları, nörolojik muayeneleri destekleyecek nitelikte SAK(+, ilaç-) olan gruba göre daha iyi olduğu gözlenmiştir.

Tablo: 4.2. Gruplar arasında gıda alım bulguları



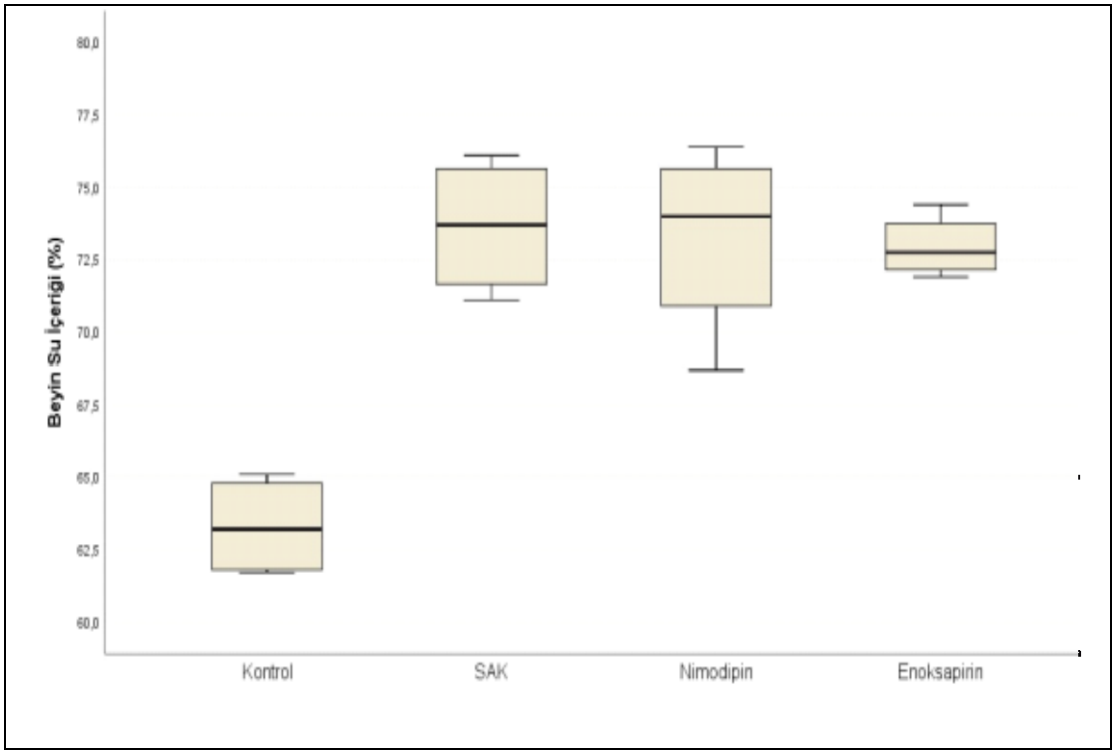
4.3. BEYNİN YAŞ/ KURU AĞIRLIK BULGULARI

Deney hayvanlarının beyinlerinin yaş/kuru ağırlık ölçümlerinde su yüzdesi oranları, Dunn'ın çoklu karşılaştırma testleri uygulanarak değerlendirilmiş olup, SAK(-, ilaç-) grubuna göre SAK(+, ilaç-, p= 0.014), SAK (+, nimodipin +, p=0.01) ve SAK (+, enoksaparin +, p=0.034) gruplarda belirgin artış gözlenmiştir. Bu artış istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur (tablo 4.3). Tablo 4.4'de gruplar arasındaki beynin yaş/kuru ağırlık düzeyleri grafiksel olarak gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Grupların yaş/kuru ağırlıktan elde edilen su yüzdeleri

	Islak Ağırlık		**Kuru Ağırlık**		**Beyin Su İçeriği**	
Kontrol	3,33±0,22	3,38(3,19-3,47)	1,22±0,07	1,21(1,16-1,28)	63,30±1,75	63,2(61,8-64,8)
SAK	3,77±0,35	3,76(3,48-4,07)	0,99±0,16	0,96(0,89-1,08)	73,65±2,38	73,7(71,65-75,65)
Nimodipin	3,67±0,33	3,7(3,44-3,89)	0,99±0,21	0,96(0,85-1,12)	73,28±3,34	74(70,9-75,65)
Enoksapirin	3,47±0,16	3,53(3,37-3,57)	0,94±0,04	0,94(0,9-0,97)	72,95±1,08	72,75(72,15-73,75)
p	0,222		0,135		**0,034**	

Tablo: 4.4. Grupların yaş/kuru ağırlıkları



4.4. S100B, NSE SONUÇLARI

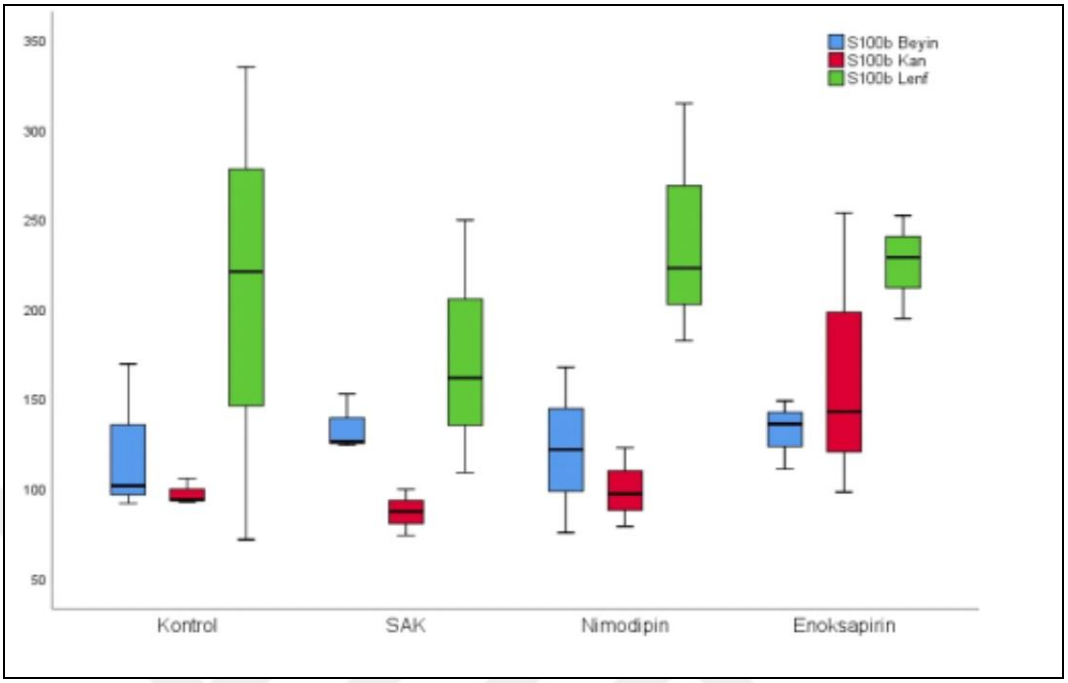
4.4.1. S100B Beyin, Kan ve Derin Servikal Lenf Dokusundaki Düzeylerinin Sonuçları

Gruplar arasında derin frontal kortikal dokudan alınan örneklerden çalışılan S100B sonuçları değerlendirildiğinde gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamış (p=0,716) olsa da, gruplar arasında ortanca değerler karşılaştırıldığında SAK (-, ilaç-) grubuna göre SAK(+, ilaç-), SAK (+, nimodipin +) ve SAK (+, enoksaparin +) gruplarda S100B değerlerinde artış olduğu gözlenmiştir (tablo 4.5).

Gruplar arasında 5. günde alınan kan örneklerinde çalışılan S100B sonuçları değerlendirildiğinde gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiş (p=0,667) olsa da, gruplar arasında S100B ortanca değerleri karşılaştırıldığında SAK(-, ilaç-) (93,59)'e göre diğer gruplarda artış olduğu gözlenmiş olup, SAK (+, ilaç-) (93,75), SAK (+, nimodipin +)(97,44) ve SAK (+, enoksaparin +) (120,87) olan gruplar arasında farklılıklar olduğu gözlenmiştir (tablo 4.5).

Gruplar arasında derin servikal lenf nodlarında çalışılan S100B sonuçları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiş(p=0,740) olsa da, SAK(+, ilaç-) (162,07) grubu ile SAK (+, nimodipin +) (223,42) ve SAK (+, enoksaparin +) (229,37) grupları arasında S100B ortanca değerleri arasında farklılıklar olduğu gözlenmiştir (tablo 4.5).

Tablo 4.5. Grupların beyin, kan ve derin servikal lenf nodlarındaki S100b düzeylerinin grafiksel olarak gösterimi



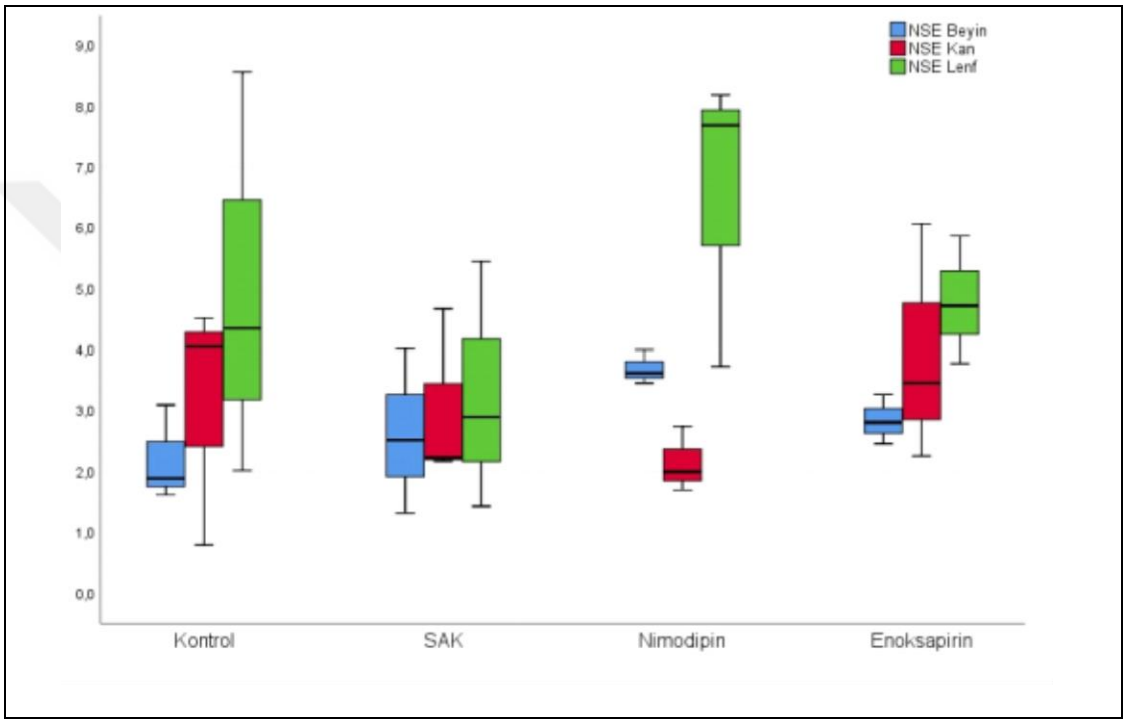
4.4.2. NSE Beyin, Kan ve Derin Servikal Lenf Dokusundaki Düzeylerinin Sonuçları

Gruplar arasında derin frontal kortikal dokudan alınan örneklerde çalışılan NSE sonuçları değerlendirildiğinde gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiş (p=0,265) olsa da, gruplar arasında ortanca değerler karşılaştırıldığına SAK(-, ilaç-)(1,89) olan gruba kıyasla SAK(+, ilaç-) (2,52), SAK (+, nimodipin +) (3,54) ve SAK (+, enoksaparin +) (2,88) NSE düzeylerinde artış olduğu gözlenmiştir (tablo 4.6).

Gruplar arasında 5.günde alınan kan örneklerinde çalışılan NSE sonuçları değerlendirildiğinde gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiş (p=0,936) olsa da, SAK(+, ilaç-)(2,2) ile SAK (+, nimodipin +)(2,38) ve SAK (+, enoksaparin +) (2,86) olan gruplar arasında NSE ortanca düzeylerinde artış olduğu gözlenmiştir (tablo 4.6).

Gruplar arasında derin servikal lenf nodlarında çalışılan NSE sonuçları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiş (p:0,516) olsada, SAK(+, ilaç-) grubu (2,9) ile SAK (+, nimodipin +) (7,69) ve SAK (+, enoksaparin +) (4,72) tedavileri başlanan gruplar arasında NSE ortanca düzeylerinde artış olduğu gözlenmiştir (tablo 4.6).

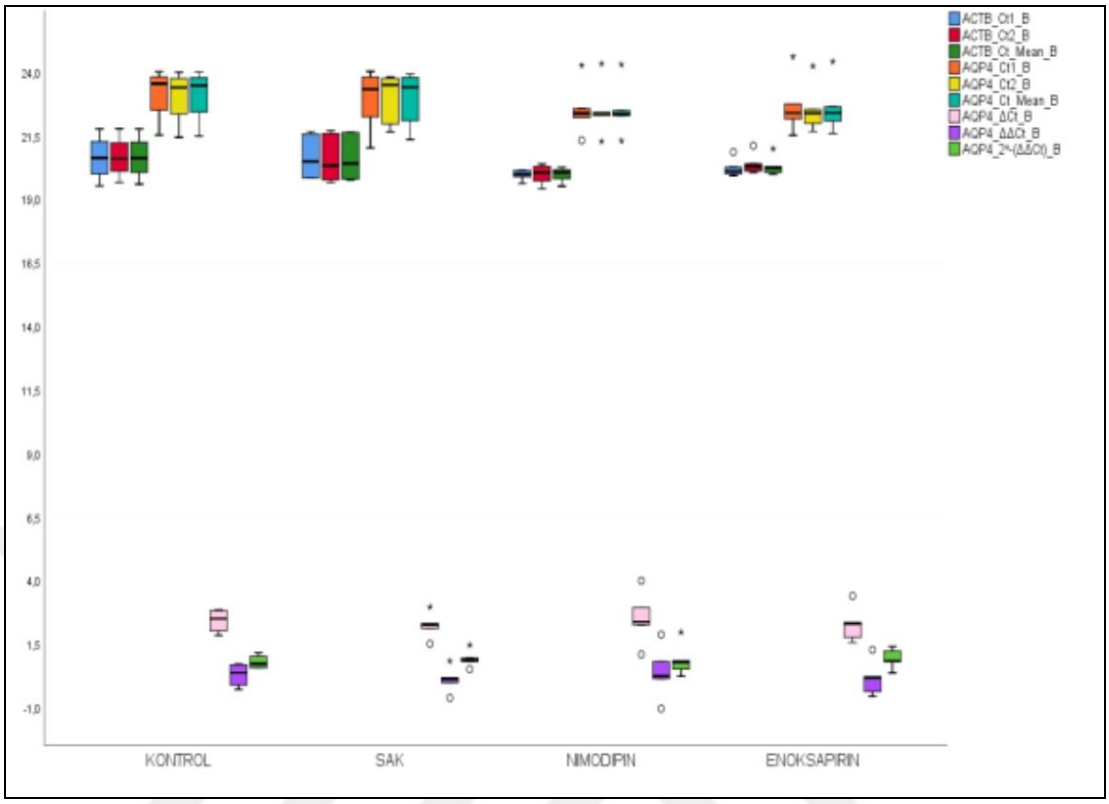
Tablo 4.6. Grupların beyin, kan ve derin servikal lenf nodlarındaki NSE düzeylerinin grafiksel olarak gösterimi



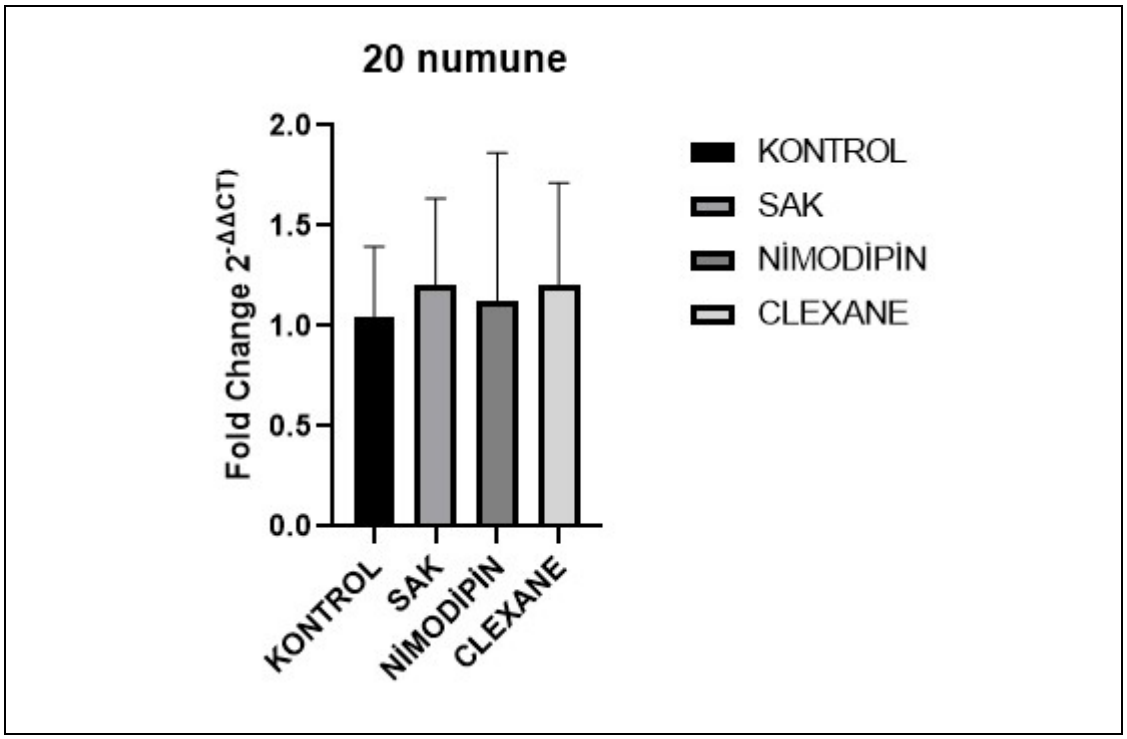
4.5. KANTİTATİF REAL-TİME PCR SONUÇLARI

Gruplar arasında derin frontal kortikal dokudan alınan örneklerde Aqp4 gen ekspresyon düzeyleri çalışıldı. Gruplar arasında istatiksel analizlerde Fold Chance değişimleri kullanılmıştır. Fold Change değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ olarak gösterilmiştir (Tablo 4.8). Gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p=0.996).

Tablo: 4.7. Aqp4 genin ve kontrol genlerinin grafiksel tablosu



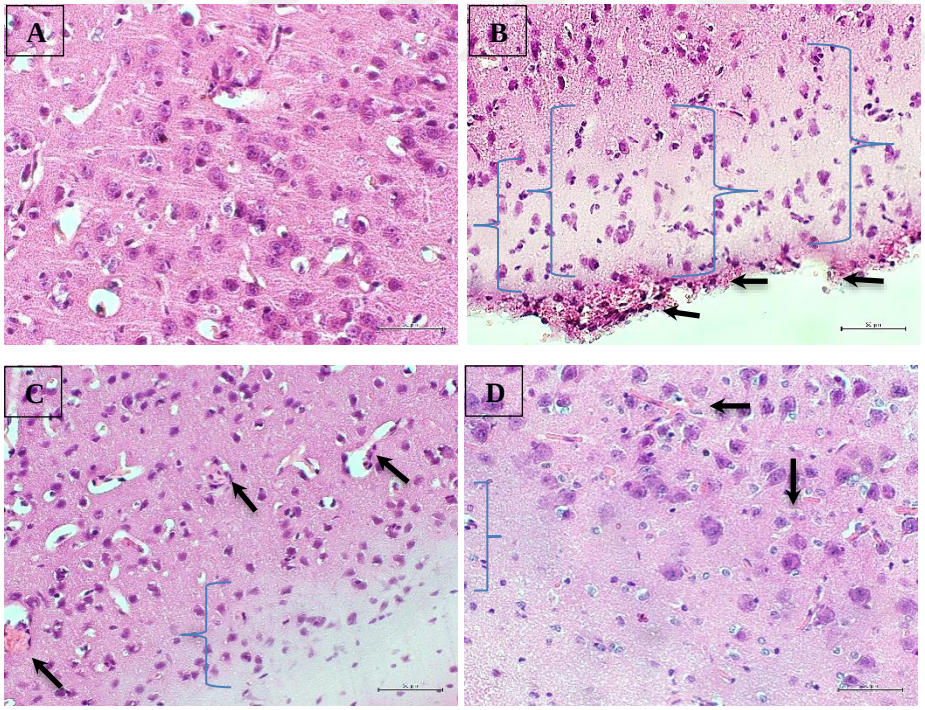
Tablo: 4.8. Aqp4 gen ekspresyonunun gruplar arasındaki değişimleri



4.6. HİSTOLOJİK İNCELEMELER

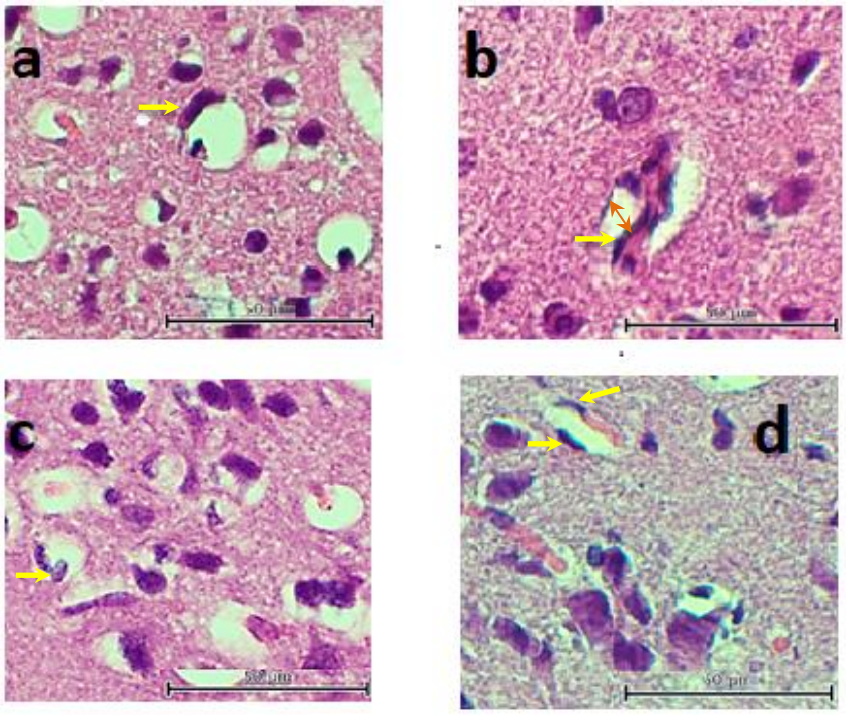
4.6.1. Tüm Gruplarda Perivasküler Alan'ın/Vasküler Alana Oranlarının Değerlendirilmesi

SAK(+, ilaç-) grubunun 5. gün dokularına ait kesitlerinde piamater komşuluğunda yoğun hemorajik alanlar tespit edildi (Şekil 4.2). Fokal güve yeniği şeklinde görülen ödematöz boyanma paterni, moleküler tabakanın tamamında görülmekteydi (Şekil 4.2, tablo 4.9). SAK(+, ilaç-) grubunda (0,274), SAK(-, ilaç-) (0,087) grubuna oranla belirgin miktarda perivasküler alan/vasküler alan oranında artış gözlenmiştir (tablo 4.10, şekil 4.3). SAK (+, enoksaparin +), SAK(+, nimodipin +) grupların da moleküler tabakada gözlenen ödem bulguları, SAK(-, ilaç-) grubuna göre artmış şekilde izlenmiştir (Şekil 4.2). SAK(+, ilaç-), SAK(+, nimodipin +) ve SAK (+, enoksaparin +) gruplarına ait kesitlerde, perivasküler /vasküler alan oranında, SAK(-, ilaç-) grubuna göre belirgin artış izlenmiştir (Şekil 4.3). SAK(+, nimodipin +) grupta perivasküler /vasküler alan oranının diğer gruplara göre azalma olduğu görülmüştür (Şekil 4.3).



Şekil 4.2. Gruplara ait beyin kesitlerinin mikrografları

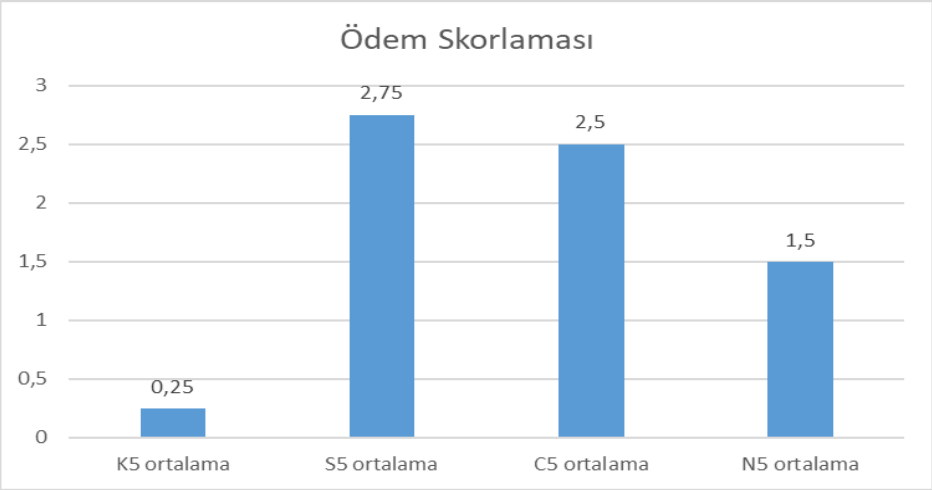
({ ödemli alanları (boyanma azalmasıyla karakterize), → konjesyon ve hemorajik alanları göstermektedir. (A: kontrol grubu; B: sak grubu, C: enoksaparin grubu, D: nimodipin grubu). Hematoksilen-eozin boyaması, 200x büyütme.



Şekil 4.3. Gruplara ait perivasküler/ vasküler alan mikrografları

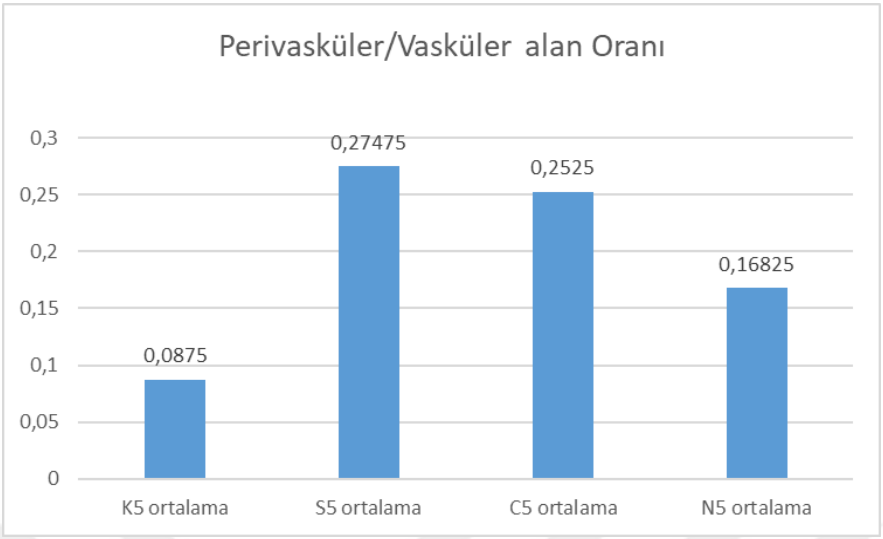
(a: kontrol grubu; b: sak grubu, c: enoksaparin grubu, d: nimodipin grubu. → endotel hücrelerini, ↕ perivasküler alanları göstermektedir. Hematoksilen-eozin boyaması, 200x büyütme.

Tablo 4.9. Gruplara göre ödematöz alan skorlama sonuçları



(k: kontrol grubu, s:sak grubu, c: enoksaparin grubu, n: nimodipin grubu)

Tablo 4.10. Perivasküler /vasküler alan oranlarının gruplar arasında dağılımı



(k: kontrol grubu, s: sak grubu, c: enoksaparin grubu, n: nimodipin grubu)

5. TARTIŞMA

Glimfatik sistem, iki önemli komponenti içerir; perivasküler boşluk ve astrositik ayaksı çıkıntı. Astrositik ayaksı çıkıntılarda bulunan Aqp4 su kanalları, BOS-ISS değişimi yoluyla interstisyel mesafedeki hassas dengenin sağlanmasında önemli rol oynar (16). aSAK sonrası astrositlerin ayaksı çıkıntılarında bulunan Aqp4 su kanallarının polarizasyonu bozulur, aynı hücrenin farklı bölgelerinde yerleşmeye başlar (64). Bu farklı yerleşim sonucunda beyin dokusunda ödem gelişir. MSS'de Aqp4, patolojik durumlarda sitotoksik ödeme yol açarken, vazojenik ödemin temizlenmesinde de rol almaktadır (67).

Çalışmamızda Aqp4 gen ekspresyonunun gruplar arasındaki ilişkisi, beyin dokusunda q-pcr testi ile değerlendirildi. Tedavi verilmeyen SAK grubunda Aqp4 gen düzeyleri yüksek bulunmuştur, enoksaparin ya da nimodipin verilen SAK grubunda ise gen ekspresyon düzeyleri düşük bulunmuştur (tablo 4.8). Aqp4 düzeyinin artışının nedeni, SAK sonrası astrositik hücrelerdeki aktivasyondur (12). Astrositik hücrelerden salgılanan inflamatuar sitokinler, Aqp4 gen ekspresyon sekresyonunda artışa neden olur (37). Liu ve arkadaşlarının (12) yaptığı fare SAK modelinde, Aqp4 knockout farelerde gen ekspresyonunda değişiklik olmazken, SAK yapılan farelerde Aqp4 gen ekspresyonunun önemli derecede arttığı gözlenmiştir. SAK ya da travma dışında cerrahi sırasında ortaya çıkan iskemik komplikasyonların da gen ekspresyonunda artışa yol açtığı bildirilmiştir (74). Tavşanlarda yapılan karotid arter iskemi modelinde de, karotid stenozu endovasküler yolla tedavi edilen tavşanlarda, tedavi edilmeyenlere göre Aqp4 gen ekspresyonunun düşük olduğu saptanmıştır (74). LMWH, antiinflamatuvar, immun modülatör ve fibrinolitik özellikleri vardır (55, 85, 86) Çalışmamızda enoksaparin verdiğimiz grupta, Aqp4 gen ekspresyon düzeyinin düşük olmasının nedenini enoksaparinin bu özelliklerine bağlı olarak ortaya çıktığını düşünmekteyiz.

Yaş/ kuru ağırlık ölçümleri, beyin ödemini kantitatif olarak gösteren bir testtir (57). Çalışmamızda, yaş/ kuru ağırlık ölçümleri, kontrol grubuna göre diğer gruplarda daha yüksek değerlerde çıkmıştır (tablo 4.3, tablo 4.4). Gruplar arasında yapılan histolojik değerlendirmelerde elde edilen ödematöz alan skorlama sonuçları

ile beynin yaş/kuru ağırlık ölçümleri ve Aqp4 gen ekspresyon düzeylerinin yüksek çıkması, SAK sonrası Aqp4 gen ekspresyonunun artmasına bağlı olduğunu düşündürmektedir. Manley ve ark. (67) yapmış oldukları çalışmada, gen ekspresyonundaki artış, Aqp4'ün ödem gelişimindeki rolünü desteklemektedir (67). SAK yapılan farelerde Aqp4 gen ekspresyonu arteriyel tarafta arttığı, venöz tarafta artmadığı bildirilmiştir (12). Bu sonuçlar, Aqp4 gen ekspresyonu artışı sonucu, Aqp4'lerin hücre içinde, astrositik ayaksı çıkıntılar dışındaki yerleşiminin sonucunda ödemin geliştiğini düşündürmektedir. Enoksaparin verilen grupta, serebral ödemin daha düşük olmasının, PVA'larda fibrinolitik, antiinflamatuvar etkileri sonucunda ortaya çıktığını düşündürmektedir (84, 87). Çalışmamızda nimodipin verilen grupta da histolojik çalışma sonucunda elde edilen ödematöz alan skorlamasının, beynin yaş/kuru ağırlık ölçümlerinin ve Aqp4 gen ekspresyonun daha düşük olduğu görülmüştür. Ödem miktarındaki azalmanın nedenleri; nimodipinin parankimal BOS geçişini artması, mikroglial aktivasyonu azaltması ve antispazmolitik etkisine bağlı olduğu düşünülmüştür. Yapılan bir çalışmada, nimodipin verilen ve verilmeyen gruplar karşılaştırıldığında, nimodipin verilen grupta 2 saat sonra, Aqp4 polarizasyonunun ve GFAP miktarının düşük düzeyde de olsa azaldığı, parankimal BOS geçişinin de aynı yönde arttığı gösterilmiştir (15). Nimodipin SAK sonrası, endojen fibrinolizi arttırdığı gösterilmiştir (77). Fibrinolizis sonucunda, kortikal yayılma iskemisinin engellenmesi ve nöronlara kalsiyum akışını engellediği bilinmektedir (78). Ayrıca L-tipi kalsiyum kanal blokajı, mikroglia aktivasyonunu baskılayarak nöroproteksiyona ve proinflamatuvar faktör inhibisyonuna katkıda bulunur (79).

Elektron mikroskopik çalışmalarda, SAK'lı farelerin PVA'larında altın nanopartiküllerinin birikimi, glimfatik sistemin fonksiyonunun bozulduğunu, apoptotik ve inflamatuar maddelerin burada biriktiğini göstermiştir (12). Çalışmamızda tüm gruplarda erken faz (1.gün) postkontrast yağ baskılı T1W MR sisternografi görüntülerinde; olfaktor bulbuslardan vomeronasal sinirlere, facial ve nazal venlere doğru kontrast madde geçişi, tüm olgularda bilateral olarak birinci, ikinci ve beşinci kraniyal sinirlerde daha belirgin olmak üzere tüm kraniyal sinirlerin kılıflarına ve bazı perinöral divertiküllere kontrast madde geçişi izlenmiştir. Geç faz (3-5 gün) görüntülerde ise kontrast maddenin tama yakın oranda temizlendiği ve

yalnızca mesane içerisinde kontrast madde bulunduğu görüldü. Çalışmamızda gruplar arasında radyolojik görüntüleme ile glimfatik sistemin ilişkisi arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiş olsa da, yapılan çalışmalarda Gabarel ve ark. (11) farelerde SAK sonrası 24. saatte glimfatik sistemdeki fonksiyon bozukluğunun, kontrol grubuna göre ciddi derecede bozulduğunu, Gd enjeksiyonu sonrası sadece serebellumda kontrast madde bulunduğunu, MRG ile göstermişlerdir. Başka bir çalışmada farelere SAK sonrası hemen intrasisternal gadolinyum enjekte edilmiş, 0.5., 1., 2. ve 5. saatlerde MR çekildiğinde, Gd'un sisterna magna ya da ventriküllerde kaldığı, beyin interstisyel mesafesine geçmediği gözlenmiştir (12). Çalışmamızda tüm gruplarda, kontrast maddenin glimfatik sistem yoluyla derin servikal lenf nodlarına ve brakiyal pleksusa drene olduğu görülmüştür. Çalışmamızda gruplar arasında glimfatik sistem fonksiyonlarında anlamlı farklılık görülmemesinin nedeni; teknik nedenlerle ortaya çıktığını düşünmekteyiz. Ancak ilaç verilen gruplarda gözlenen biyokimyasal ve histolojik olarak elde edilen veriler, glimfatik fonksiyonlarının ilaçlar tarafında etkilendiğini kanıtlamaktadır.

Çalışmamızda nimodipin tedavisi başlanılan grupta nörolojik fonksiyonlarda ve gıda alımında SAK(+ ilaç-) gruba göre nörolojik fonksiyonların daha iyi olduğu gözlenmiştir. Nimodipin ile tedavi verilen grupta nörolojik fonksiyon skoru 14, enoksaparin ile tedavi verilen grupta 12 iken, herhangi bir tedavi almayan SAK(+ ilaç-) grupta 18 idi. Enoksaparin verilen grupta, nörolojik fonksiyonların SAK(+ ilaç-) gruba göre daha iyi olmasının nedeni, PVA'daki mikropıhtıların trombolizisi olabilir. SAK sonrası intraventriküler rekombinant doku plazminojen aktivatörü uygulanan kemirgenlerde, PVA'daki koagülasyonun, immün reaksiyonun ve vazospazmın azaldığı ve nörolojik iyileşmenin arttığı gösterilmiştir (69). Hou ve ark. (15), fare SAK modelinde yapmış oldukları, literatürde nimodipin'in glimfatik sistem ile ilişkisini araştıran tek çalışmada; nimodipinin glimfatik sistem fonksiyonunu iyileştirdiğini ve farelerin nörolojik muayenelerinin düzeldiğini belirtmişlerdir ancak bunun nasıl olduğunu açıklamamışlardır (15). Çalışmamızda, nimodipin verilen tavşanlarda beyin ödeminin histolojik incelemede daha az olduğu, Aqp4 gen ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna yakın değerlerde olduğu ve nörolojik muayene-gıda alım skorlarının daha iyi olduğu gözlenmiştir. Bu etkilerin,

nimodipinin vazospazmı engelleyerek glimfatik sistemin daha az hasarlanarak erken dönemde fonksiyonel olmasını sağladığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda S100B ve NSE düzeyleri beyin, kan ve derin servikal lenf nodunda ölçülmüştür. Beyin dokusunda S100B ve NSE düzeyleri, gruplar arasında ortanca değerler karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre diğer gruplarda artış olduğu gözlenmiştir. SAK'ın erken döneminde proinflamatuvar monositlerin, T hücrelerinin ve proinflamatuvar sitokinlerin arttığı gösterilmiştir (61). Bunun nedeni SAK sonrası ortaya çıkan reaktif astrogliozistir. Reaktif astrogliozis'e sekonder sitokin üretimi artar ve inflamatuvar sürecin şiddetinin artarak devam etmesine neden olur (63). Oluşan nöroinflamasyon, KBE'ini oluşturan tüm nörovasküler ünit fonksiyonlarının bozulmasına neden olur. S100B düzeylerinin arttığı önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (63). SAK sonrasında KBE'nin fonksiyonlarının bozulmasında astrositlerin rolü bilinmektedir (29). SAK'tan sonra immun hücreler ile birlikte kan komponentlerinin ortama girmesiyle inflamatuvar süreç hızlanır (59,60). Çalışmamızda S100B ve NSE kan düzeyleri, SAK(+ ilaç-) grup ile nimodipin ve enoksaparin tedavileri başlanan gruplar arasında ortanca değerler karşılaştırıldığında, nimodipin ve enoksaparin sodyum tedavileri başlanan gruplarda serum S100B ve NSE düzeylerinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Derin servikal lenf nodlarında da S100B ve NSE düzeyleri, serum düzeyleri ile benzer şekilde SAK (+, ilaç -) grup ile nimodipin veya enoksaparin tedavileri verilen gruplar arasında ortanca değerler karşılaştırıldığında, nimodipin ve enoksaparin sodyum tedavileri verilen gruplarda S100B, NSE düzeylerinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bunun nedenleri; a-) nimodipinin vazospazmı önleyerek PVA'da BOS'ının parankimal geçişini arttırması, b-) enoksaparinin trombolitik, antikoagülan ve antiinflamatuvar etkisi sonucu mikropıhtıları ortadan kaldırarak, glimfatik sistemin fonksiyonlarını düzeltmesi ve ISS akımının artmasıdır. Bu etkilerin sonucunda inflamatuvar belirteçler, kan ve lenf dokusunda yüksek oranda saptanmıştır.

Çalışmamızda SAK(+, ilaç-) grubunda, SAK(-, ilaç-) grubuna oranla belirgin miktarda perivasküler alan/vasküler alan oranında artış gözlenmiştir (tablo 4.10, şekil 4.3). Bu artışın nedeni, SAK sonrası gelişen vazospazm ve inflamasyona bağlı olduğu düşünülmüştür. SAK(+, ilaç-) grubunda perivasküler/vasküler alan oranındaki artışın, nimodipin ve enoksaparin tedavileri başlanan gruplarda az olduğu

histolojik incelemelerde gözlenmiştir. Enoksaparin sodyumun trombolitik, profibrinolitik ve antiinflamatuvar etkisi ile, nimodipinin vazospazmı önleyerek perivasküler/vasküler alan değişikliklerini meydana getirdiği düşünüldü (tablo 4.10, şekil 4.3). İlaç verilen gruplardaki perivasküler alan/vasküler alan oranınındaki azalmanın, gruplar arasında ödematöz alan skorlama sonuçları orantılı olduğu gözlendi. Hem nimodipin hem de enoksaparin sodyum tedavileri başlanan grupların, perivasküler alan/ vasküler alan oranları, histolojik incelemeler ile hesaplanan ödematöz alan skorlama sonuçları, beynin yaş/kuru ağırlık oranları ve nörolojik fonksiyon değerlendirmeleri, SAK(+, ilaç-) grup ile karşılaştırıldığında, glimfatik sistemin etkilenmesi ile orantılı bir şekilde daha iyi olduğu görüldü. Piu ve ark. (75) farelerde SAK sonrası yaptıkları çalışmada, glimfatik akışın bozulması ile doğru orantılı bir şekilde perivasküler alanlarda anormal genişlemelerin olduğunu, perivasküler alan/vasküler alan oranlarında artışların olduğunu belirtmişlerdir (75).

Luo ve ark. (69) yaptıkları çalışmada SAK' tan bir saat sonra perivasküler fibrinojen de birikme, inflamatuvar belirteçlerde belirgin artma, 6 saat sonra ise oluşan mikrovasküler trombozlara sekonder mikro-sirkülasyon da bozulma olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca doku plazminojen aktivatörü uyguladıkları grupta belirgin glimfatik fonksiyonda iyileşme olduğunu belirlemişlerdir (69). Literatürde SAK'ı olan tavşanlarda enoksaparin sodyum'un glimfatik sistem ile ilişkisini ve PVA'daki koagülasyona enoksaparin sodyumun etkilerini inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda SAK'ı olup enoksaparin sodyum tedavisi başlanılan gruplarda nörolojik fonksiyonlarda ve gıda alımında belirgin düzelme olduğu gözlenmiştir. Serum ve derin servikal lenf nodlarında ki S100B, NSE düzeylerindeki artış, glimfatik sistemin daha etkili çalıştığını göstermektedir. Enoksaparinin mikrotrombüs oluşumunu azaltarak ve antiinflamatuvar etkisi ile nörolojik fonksiyonlarının ve gıda alımının düzeldiği gözlenmiştir. Travmatik beyin hasarından sonra enoksaparin uygulanan hayvan modellerinde beyin ödeminde azalma ve bilişsel işlevlerde iyileşme ile sonuçlanmıştır (70, 71). Enoksaparin, potansiyel kanama riski nedeniyle SAK'ı olan hastalarda günümüzde nadiren kullanılmaktadır. Ancak çoğu çalışmada subkutan enoksaparin kullanımının SAK'ı olan hastalarda herhangi bir risk oluşturmayacağı belirtilmiştir (88, 89).

6. SONUÇ

Glimfatik sistem, SAK sonrası nörolojik hasarın tedavisinde önemli bir hedeftir. Çalışmamızda gösterildiği gibi glimfatik sistemin korunması, SAK sonrası serebral ödemi azaltır, nörolojik fonksiyonları koruyup doku hasarını azaltmaktadır. Bu etkinin nimodipinin ve enoksaparin sodyumun glimfatik sistemi aktive ederek sağladığını düşünmekteyiz. Çalışmamızda enoksaparin sodyumun, PVA'da mikrotrombüs formasyonunu önleyerek ve antiinflamatuvar etkisi ile glimfatik sistemin fonksiyonunun düzelttiği görülmüştür. Nimodipinin glimfatik sistem fonksiyonlarına nasıl etki ettiği literatürde bilinmemektedir. Bunun nedeninin, vazospazmı engellemesi sonucu arteryel pulsasyonun artmasına sekonder perivasküler BOS akımının artmasına bağlı olduğu düşünülmüştür.

Derin servikal lenf nodlarında biyobelirteçlerin gösterilmesi, diğer santral sinir sistemi hastalıklarında lenf nodu değerlendirilmesi yapılarak hastalıkların tanı ve tedavisinde yönlendirici olabilir.

7. KAYNAKÇA

1. Macdonald RL, Schweizer TA. Spontaneous subarachnoid haemorrhage. Lancet. 2017;389:655-66.
2. Passier PE, Visser-Meily JM, van Zandvoort MJ, et al. Prevalence and determinants of cognitive complaints after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Cerebrovasc Dis 2010; 29: 557–63
3. Wanchoo S, Khazanehdari S, Patel A, Lin A, Rebeiz T, DeMatteo C, et al. Ketamine for empiric treatment of cortical spreading depolarization after subdural hematoma evacuation. Clin Neurol Neurosurg. 2021; 200:106318
4. Trevaskis NL, Kaminskas LM, Porter CJH. From sewer to saviour-targeting the lymphatic system to promote drug exposure and activity. Nat Rev Drug Discov. 2015;14: 781–803.
5. Plog BA, Nedergaard M. The glymphatic system in central nervous system health and disease: past, present, and future. Annu Rev Pathol. 2018;13: 379–94
6. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β. Sci Transl Med. 2012; 4: 147
7. Tomas Bohr, Poul G. Hjorth, Sebastian C. Holst, Sabina Hrabetova, Vesa Kiviniemi, Tuomas Lilius, Iben Lundgaard, Kent-Andre Mardal, Erik A. Martens, Yuki Mori, U. Valentin Na¨gerl, Charles Nicholson, Allen Tannenbaum, John H. Thomas, Jeffrey Tithof, Helene Benveniste, Jeffrey J. Iliff, Douglas H. Kelley, Maiken Nedergaard. The glymphatic system: Current understanding and modeling. iScience 29, 104987, September 16, 2022
8. Rennels ML, Gregory TF, Blaumanis OR, Fujimoto K, Grady PA. Evidence for a ‘paravascular’ fluid circulation in the mammalian central nervous system, provided by the rapid distribution of tracer protein throughout the brain from the subarachnoid space. Brain Res. 1985; 326: 47–63.
9. Lenck S, Radovanovic I, Nicholson P, Hodaie M, Krings T, Mendes-Pereira V. Idiopathic intracranial hypertension: the veno glymphatic connections. Neurology. 2018;91: 515–22.
10. Simon MJ, Iliff JJ. Regulation of cerebrospinal fluid (CSF) flow in neurodegenerative, neurovascular and neuroinflammatory disease. Biochim Biophys Acta. 2016;1862: 442–51
11. Gaberel T, Gakuba C, Goulay R, De Lizarrondo SM, Hanouz JL, Emery E, et al. Impaired glymphatic perfusion after strokes revealed by contrast-enhanced MRI: a new target for fibrinolysis? Stroke. 2014;45: 3092–6.
12. Liu E, Peng X, Ma H, Zhang Y, Yang X, Zhang Y, et al. The involvement of aquaporin-4 in the interstitial fluid drainage impairment following subarachnoid hemorrhage. Front Aging Neurosci. 2021;12: 611494.

13. Pedram Golnari, Pouya Nazari, Roxanna M Garcia, Hannah Weiss, Ali Shaibani, Michael C Hurley, Sameer A Ansari, Matthew B Potts, Babak S Jahromi. Volumes, outcomes, and complications after surgical versus endovascular treatment of aneurysms in the United States (1993-2015): continued evolution versus steady-state after more than 2 decades of practice. J Neurosurg. 2020 Feb 7;134(3):848-861.
14. Yuanjian Fang, Lei Huang, Xiaoyu Wang, Xiaoli Si, Cameron Lenahan, Hui Shi, Anwen Shao, Jiping Tang, Sheng Chen, Jianmin Zhang and John H Zhang. A new perspective on cerebrospinal fluid dynamics after subarachnoid hemorrhage: From normal physiology to pathophysiological changes. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 2022, Vol. 42(4) 543–558
15. Hou C, Liu Q, Zhang H, Wang W, Wang B, Cui X, et al. Nimodipine attenuates early brain injury by protecting the glymphatic system after subarachnoid hemorrhage in mice. Neurochem Res. 2022; 47:701–12.
16. Nadia Aalling Jessen, Anne Sofie Finmann Munk, Iben Lundgaard and Maiken Nedergaard. The Glymphatic System – A Beginner's Guide. Neurochem Res. 2015 December; 40 (12): 2583–2599
17. A. Zakharov, C. Papaiconomou, L. Koh, J. Djenic, R. Bozanovic-Sosic, and M. Johnston. Integrating the roles of extracranial lymphatics and intracranial veins in cerebrospinal fluid absorption in sheep. Microvascular Research 67 (2004) 96–104
18. Gurjit Nagra, Lena Koh, Andrei Zakharov, Dianna Armstrong and Miles Johnston. Quantification of cerebrospinal fluid transport across the cribriform plate into lymphatics in rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol (2006) 291: 1383.
19. Humberto Mestre, Natasha Verma, Thom D. Greene, LiJing A. Lin, Antonio Ladron-de-Guevara, Amanda M. Sweeney, Guojun Liu, V. Kaye Thomas, Chad A. Galloway, Karen L. de Mesy Bentley, Maiken Nedergaard & Rupal I. Mehta. Periarteriolar spaces modulate cerebrospinal fluid transport into brain and demonstrate altered morphology in aging and Alzheimer's disease. Nature Communıcatıons. 2022 Jul 6;13(1):3897
20. Thomas JH. 2019 Fluid dynamics of cerebrospinal fluid flow in perivascular spaces. J. R. Soc. Interface. 2019 Oct 31;16(159)
21. Prince E, Ahn S. Basic vascular neuroanatomy of the brain and spine: what the general interventional radiologist needs to know. Semin Intervent Radiol. 2013 Sep;30(3):234-9
22. Zhang ET, Inman CB, Weller RO. Interrelationships of the pia mater and the perivascular (Virchow-Robin) spaces in the human cerebrum. J Anat. 1990; 170:111–123
23. Martin Kaag Rasmussen, Humberto Mestre and Maiken Nedergaard. The glymphatic pathway in neurological disorders. Lancet Neurol. 2018 November; 17(11): 1016–1024

24. Berislav V. Zlokovic. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. Nat Rev Neurosci. 2011 Nov 3;12(12):723-38.

25. Cserr, H.F. Physiology of the choroid plexus. Physiol Rev. 1971 Apr;51(2):273-311

26. Grieb, P., Forster, R.E., Strome, D., Goodwin, C.W., Pape, P.C. (1985). O2 exchange between blood and brain tissues studied with 18O2 indicator-dilution technique. J Appl Physiol, 58(6), 1929-41.

27. Zhang, Y., Pardridge, W.M. (2001). Rapid transferrin efflux from brain to blood across the blood-brain barrier. J Neurochem, 76(5), 1597-600.

28. Khakh BS, Sofroniew MV. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. Nat Neurosci (2015) 18(7):942–52.

29. Rong Li, Min Zhao, Di Yao, Xiangyue Zhou, Cameron Lenahan, Ling Wang, Yibo Ou and Yue He. The role of the astrocyte in subarachnoid hemorrhage and its therapeutic implications. Frontiers in İmmunology. 2022 Sep 29;13: 1008795

30. Lauren M. Hablitz, Virginia Plá, Michael Giannetto, Hanna S. Vinitsky, Frederik Filip Stæger, Tanner Metcalfe, Rebecca Nguyen, Abdellatif Benrais & Maiken Nedergaard. Circadian control of brain glymphatic and lymphatic fluid flow. Nature Communıcatıons. Sep 2;11(1):4411

31. Del Zoppo GJ, Moskowitz M, Nedergaard M. The Neurovascular Unit and Responses to Ischemia. Stroke Pathophysiol. Diagnosis, Manag. 2015

32. Engelhardt B, Ransohoff RM. Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. Trends Immunol. 2012; 33: 579

33. Xie, L., Kang, H., Xu, Q., Chen, M.J., Liao, Y., Thiyagarajan, M., O'Donnell, J., Christensen, D.J., Nicholson, C., Iliff, J.J., et al. (2013). Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. Science 342, 373–377.

34. Kusaka G, Ishikawa M, Nanda A, Granger DN, Zhang JH. Signaling pathways for early brain injury after subarachnoid hemorrhage. J Cereb Blood Flow Metab. 2004; 24 (8): 916

35. Gaasch M, Schiefecker AJ, Kofler M, Beer R, Rass V, Pfausler B, et al. Cerebral Autoregulation in the Prediction of Delayed Cerebral Ischemia and Clinical Outcome in Poor-Grade Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage Patients. Crit Care Med. 2018 May; 46 (5): 774-780.

36. Wessell A, Kole MJ, Badjatia N, Parikh G, Albrecht JS, Schreibman DL, et al. High compliance with scheduled nimodipine is associated with better outcome in aneurysmal subarachnoid hemorrhage patients cotreated with heparin infusion. Front Neurol. 2017; 8: 268.

37. Stephan Quintin, Arnav Barpujari, Yusuf Mehkri, Jairo Hernandez, Brandon Lucke-Wold. The glymphatic system and subarachnoid hemorrhage: disruption and recovery. Explor Neuroprotective Ther. 2022; 2(3): 118–130

38. Schubert GA, Seiz M, Hegewald AA, Manville J, Thome C. Hypoperfusion in the acute phase of subarachnoid hemorrhage. Acta Neurochir Suppl. 2011; 110 (Pt 1): 35-8.

39. Kamiya K, Kuyama H, Symon L. An experimental study of the acute stage of subarachnoid hemorrhage. J Neurosurg. 1983; 59 (6): 917-24

40. Sehba FA, Friedrich V. Cerebral microvasculature is an early target of subarachnoid hemorrhage. Acta Neurochir Suppl. 2013; 115: 199-205.

41. Zheng Z, Sanchez-Porras R, Santos E, Unterberg AW, Sakowitz OW. Delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage: from vascular spasm to cortical spreading depolarizations. Curr Neurovasc Res. 2012; 9(4): 310-9

42. Brown RH, Al-Chalabi A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. N Engl J Med 2017; 377(2): 162–72.

43. Sevigny J, Chiao P, Bussiere T, et al. The antibody aducanumab reduces Abeta plaques in Alzheimer's disease. Nature 2016; 537 (7618)

44. Labbadia J, Morimoto RI. The biology of proteostasis in aging and disease. Annu Rev Biochem 2015; 84: 435–64.

45. Hjerpe R, Bett JS, Keuss MJ, et al. UBQLN2 Mediates Autophagy-Independent Protein Aggregate Clearance by the Proteasome. Cell 2016; 166 (4): 935–49.

46. Xu Z, Xiao N, Chen Y, et al. Deletion of aquaporin-4 in APP/PS1 mice exacerbates brain Aβ accumulation and memory deficits. Molecular Neurodegeneration 2015; 10 (1): 1–16

47. Eide PK, Ringstad G. Delayed clearance of cerebrospinal fluid tracer from entorhinal cortex in idiopathic normal pressure hydrocephalus: A glymphatic magnetic resonance imaging study. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 2019 Jul;39(7):1355-1368

48. Ringstad G, Vatnehol SAS, Eide PK. Glymphatic MRI in idiopathic normal pressure hydrocephalus. Brain 2017; 140(10): 2691–705

49. Ringstad G, Valnes LM, Dale AM, et al. Brain-wide glymphatic enhancement and clearance in humans assessed with MRI. JCI Insight. 2018 Jul 12;3(13):e121537

50. Kiviniemi V, Wang X, Korhonen V, et al. Ultra-fast magnetic resonance encephalography of physiological brain activity - Glymphatic pulsation mechanisms? J Cereb Blood Flow Metab 2016; 36(6)

51. Tomassoni D, Lanari A, Silvestrelli G, Traini E, Amenta F. Nimodipine and its use in cerebrovascular disease: evidence from recent preclinical and controlled clinical studies. Clin Exp Hypertens. 2008;30: 744–66.

52. Mestre H, Tithof J, Du T, Song W, Peng W, Sweeney AM, et al. Flow of cerebrospinal fluid is driven by arterial pulsations and is reduced in hypertension. Nat Commun. 2018; 9: 4878

53. Noble S., Peters D.H., Goa K.L. Enoxaparin: A Reappraisal of Its Pharmacology and Clinical Applications in the Prevention and Treatment of Thromboembolic Disease. Drugs. 1995; 49: 388–410.

54. Whitaker I.S., Rao J., Izadi D., Butler P.E. Historical Article: Hirudo Medicinalis: Ancient Origins of, and Trends in the Use of Medicinal Leeches throughout History. Br. J. Oral Maxillofac. Surg. 2004; 42:133–137

55. Gesa Wiegand, Vanya Icheva, Martin Schöning and Michael Hofbeck. Successful thrombolysis following enoxaparin therapy in two pediatric patients with congenital heart disease presenting with intracardiac and cerebral thrombosis. Thromb J. 2014; 1477-9560-12-19

56. Bergamaschini L., Rossi E., Storini C., Pizzimenti S., Distaso M., Perego C., De Luigi A., Vergani C., De Simoni M.G. Peripheral Treatment with Enoxaparin, a Low Molecular Weight Heparin, Reduces Plaques and β-Amyloid Accumulation in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. J. Neurosci. 2004; 24: 4181–4186.

57. Endo S, Branson PJ, Alksne JF. Experimental model of symptomatic vasospasm in rabbits. Stroke. 1988;19: 1420–1425.

58. Jackowski A, Crockard A, Burnstock G, Russell RR, Kristek F. The time course of intracranial pathophysiological changes following experimental subarachnoid haemorrhage in the rat. J Cereb Blood Flow Metab. 1990;10: 835–49.

59. Sehba FA, Pluta RM, Zhang JH. Metamorphosis of subarachnoid hemorrhage research: from delayed vasospasm to early brain injury. Mol Neurobiol. 2011;43:27–40.

60. Wan H, Brathwaite S, Ai J, Hynynen K, Macdonald RL. Role of perivascular and meningeal macrophages in outcome following experimental subarachnoid hemorrhage. J Cereb Blood Flow Metab. 2021; 41:1842–57.

61. Mohme M, Sauvigny T, Mader MMD, Schweingruber N, Maire CL, Rünger A, et al. Immune characterization in aneurysmal subarachnoid hemorrhage reveals distinct monocytic activation and chemokine patterns. Transl Stroke Res. 2020; 11:1348–61.

62. Murakami K, Koide M, Dumont TM, Russell SR, Tranmer BI, Wellman GC. Subarachnoid hemorrhage induces gliosis and increased expression of the pro-inflammatory cytokine high mobility group box 1 protein. Transl Stroke Res. 2011; 2:72–9.

63. Jha MK, Kim JH, Song GJ, Lee WH, Lee IK, Lee HW, et al. Functional dissection of astrocyte-secreted proteins: implications in brain health and diseases. Prog Neurobiol. 2018; 162:37–69.

64. Igarashi H, Tsujita M, Suzuki Y, Kwee IL, Nakada T. Inhibition of aquaporin-4 significantly increases regional cerebral blood flow. Neuroreport. 2013; 24:324–8.

65. Ren Z, Iliff JJ, Yang L, Yang J, Chen X, Chen MJ, et al. 'Hit & Run' model of closed-skull traumatic brain injury (TBI) reveals complex patterns of post-traumatic AQP4 dysregulation. J Cereb Blood Flow Metab. 2013; 33:834–45.

66. Badaut J, Brunet JF, Grollimund L, Hamou MF, Magistretti PJ, Villemure JG, et al. Aquaporin 1 and aquaporin 4 expression in human brain after subarachnoid hemorrhage and in peritumoral tissue. Acta Neurochir Suppl. 2003; 86:495–8.

67. Manley, G.T., Binder, D.K., Papadopoulos, M.C., Verkman, A.S. (2004). New insights into water transport and edema in the central nervous system from phenotype analysis of aquaporin-4 null mice. Neuroscience, 129(4), 983-91.

68. Ito U., Ohno, K., Nakamura, R., Suganuma, F., Inaba, Y. (1979). Brain edema during ischemia and after restoration of blood flow. Measurement of water, sodium, potassium content and plasma protein permeability. Stroke, 10(5), 542-7.

69. Luo C, Yao X, Li J, He B, Liu Q, Ren H, et al. Paravascular pathways contribute to vasculitis and neuroinflammation after subarachnoid hemorrhage independently of glymphatic control. Cell Death Dis. 2016 Mar 31;7(3):e2160

70. Wahl F., Grosjean-Piot O., Bareyre F., Uzan A., Stutzmann J. marie Enoxaparin Reduces Brain Edema, Cerebral Lesions, and Improves Motor and Cognitive Impairments Induced by a Traumatic Brain Injury in Rats. J. Neurotrauma. 2000 Nov;17(11):1055-65

71. Li S., Marks J.A., Eisenstadt R., Kumasaka K., Samadi D., Johnson V.E., Holena D.N., Allen S.R., Browne K.D., Smith D.H., et al. Enoxaparin Ameliorates Post-Traumatic Brain Injury Edema and Neurologic Recovery, Reducing Cerebral Leukocyte Endothelial Interactions and Vessel Permeability in Vivo. *J*. Trauma Acute Care Surg. 2015; 79:78–84.

72. D.P. Pelvig, H. Pakkenberg, A.K. Stark, B. Pakkenberg. Neocortical glial cell numbers in human brains. Neurobiology of Aging 29 (2008) 1754–1762

73. Colin Unruh, Nicolas Van Bavel, Max Anikovskiy and Elmar J. Prenner. Benefits and Detriments of Gadolinium from Medical Advances to Health and Ecological Risks. Molecules 2020, 25, 5762

74. Hongliang Wang, Jiajia Hua, Shuai Huang, Hongwei Shen, Fei Chen. Effects of interventional therapy on AQP4 gene expression and neuron apoptosis in rabbits with ischemic brain injury caused by carotid artery stenosis. Int J Clin Exp Pathol 2021;14(6):786-793

75. Tinglin Pu, Wenyan Zou, Weixi Feng, Yanli Zhang, Linmei Wang, Hongxing Wang and Ming Xiao. Persistent Malfunction of Glymphatic and Meningeal Lymphatic Drainage in a Mouse Model of Subarachnoid Hemorrhage. Exp Neurobiol. 2019 Feb;28(1):104-118.

76. Judith Weiland, Alexandra Beez, Thomas Westermaier, Ekkehard Kunze, Anna-Leena Sirén and Nadine Lilla. Neuroprotective Strategies in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage (aSAH). Int. J. Mol. Sci. 2021; 22, 5442

77. Vergouwen M, Vermeulen M, de Haan RJ, Levi M, Roos YB. Dihydropyridine calcium antagonists increase fibrinolytic activity: a systematic review. J Cereb Blood Flow Metab (2006) 27:1293–308.

78. Airton Leonardo de Oliveira Manoel and R. Loch Macdonald. Neuroinflammation as a Target for Intervention in Subarachnoid Hemorrhage. Frontiers in Neurology (2018) May 2:9

79. Jing Jin, Jian Duan, Leiya Du, Wenli Xing, Xingchen Peng and Qijie Zhao. Inflammation and immune cell abnormalities in intracranial aneurysm

subarachnoid hemorrhage (SAH): Relevant signaling pathways and therapeutic strategies. Frontiers in İmmunology (2022). Jin et al.10.338

80. Hirsh J, Anand SS, Halperin JL, Fuster V. Mechanism of action and pharmacology of unfractionated heparin. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001;21:1094-96.
81. Coombe DR. Biological implications of glycosaminoglycan interactions with haemopoietic cytokines. Immunol Cell Biol. 2008; 86:598–607.
82. Koenig A, Norgard-Sumnicht K, Linhardt R, Kjellén L. Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents. J Clin Invest 1998;101(4):877–89.
83. Tekkök IH, Tekkök S, Özcan OE, Erbengi T, Erbengi A. Preventive effect of intracisternal heparin for proliferative angiopathy after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. Acta Neurochir (Wien) 1994;127:112–7
84. Bazzoni G, Nunez AB, Mascellani G, Bianchini P, Dejana E, Del Maschio A. Effect of heparin, dermatan sulfate, and related oligo-derivatives on human polymorphonuclear leukocyte functions. J Lab Clin Med 1993;121:268–75.
85. Libersan D, Khalil A, Degenais P, Quan E, Delorme F, Uzan A, et al. The low molecular weight heparin enoxaparin limits infarct size at reperfusion in the dog. Cardiovasc Res 1998;37:656–66
86. Stutzmann JM, Mary V, Wahl F, Grosjean-Piot O, Uzan A, Pratt J. Neuroprotective profile of enoxaparin, a low molecular weight heparin, in in vivo models of cerebral ischemia or traumatic brain injury in rats: a review. CNS Drug Rev 2002;8:1–30.
87. Xi G, Wagner KR, Keep RF, Hua Y, de Courten-Myers GM, Broderick JP, et al. Role of blood clot formation on early edema development after experimental intracerebral hemorrhage. Stroke 1998;29:2580–6.
88. Macdonald RL, Amidei C, Lin G, Munshi I, Baron J, Weir BK, et al. Safety of perioperative subcutaneous heparin for prophylaxis of venous thromboembolism in patients undergoing craniotomy. Neurosurgery 1999;45:245–52.
89. Iorio A, Agnelli G. Low-molecular-weight and unfractionated heparin for prevention of venous thromboembolism in neurosurgery: a meta-analysis. Arch Int Med 2000;160:2327–32.
90. Gibson-Corley KN, Olivier AK, Meyerholz DK. Principles for valid histopathologic scoring in research. Vet Pathol. 2013 Nov; 50(6): 1007-15.