



Araştırma

Geliş Tarihi: 18.01.2024
Kabul Tarihi: 28.02.2024

DOI: 10.5137/1019-5157.TND.3298

DeneySEL Subaraknoid Kanama Sonrası Gelişen Vazospazmda Tadalafilin Damar Yapısı ve Apoptozis Üzerine Etkisi

Tadalafil on Vessel Structure and Apoptosis in Vasospasm After Experimental Subarachnoid Hemorrhage

Zühtü ÖZBEK¹, Emre ÖZKARA¹, İsmail Evren HANCIOĞLU², Gizem KİPER¹, Dilek BURUKOĞLU DÖNMEZ³, Didem TURGUT COŞAN⁴, Tevfik Erhan COŞAN¹¹Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye²T.C. Sağlık Bakanlığı Isparta Şehir Hastanesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye³Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye⁴Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye

Bu çalışma daha önce World Federation of Neurosurgical Societies XVI. Kongresinde 2017'de İstanbul/Türkiye'de bildiri olarak sunulmuştur.

Yazışma adresi: Gizem KİPER ✉ esen.gizem.94@outlook.com

ÖZ

AMAÇ: Bu çalışmanın amacı, deneySEL subaraknoid kanama (SAK) sonrası gelişen vazospazm üzerine güçlü seçici ve geri dönüşümlü fosfodiesteraz-5 (PDE-5) enzim inhibitörü olan tadalafilin etkinliğinin araştırılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEMLER: Sıçanlar kontrol salin, SAK, SAK + tadalafil 5 mg/kg, SAK + tadalafil 10 mg/kg ve SAK + tadalafil 15 mg/kg olarak 5 farklı gruba ayrıldı. Kontrol salin grubuna sisterna magna içinden subaraknoid mesafeye salin ve intraperitoneal boşluğa tadalafil çözücüsü uygulandı. SAK ve SAK + tadalafil gruplarında sisterna magna içinden subaraknoid mesafeye otolog arteriyel kuyruk kanı uygulandı. İntraperitoneal boşluğa SAK grubunda sadece çözücü, SAK + tadalafil gruplarında ayrı ayrı 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg tadalafil çözücü ile uygulandı. Tüm gruplarda sıçanlar üçüncü ve yedinci gün olarak sınıflandırılıp belirlenen günlerde dekapite edildi. Bütün gruplarda baziler arter damar duvarı kalınlığı, lümen alanı ve apoptozis miktarı incelendi.

BULGULAR: Tadalafil, tüm dozlarda hem 3. hem de 7. günde damar duvar kalınlığı ve lümen alanları ölçümüne göre vazospazm oluşumunu azaltmıştır. Tadalafil tüm dozlarda erken apoptoz (3 gün) gelişimini belirgin azaltmışken, geç apoptozda (7 gün) sadece yüksek dozda (15 mg/kg) azaltmıştır.

SONUÇ: Yapılan bu deneySEL çalışmanın sonuçları ile tadalafilin deneySEL SAK sonrası serebral vazospazm tedavisinde yararlı etkiye sahip olduğu görülmüştür. İleri incelemeler sonuçlarımızı desteklerse tadalafil anevrizmal SAK tedavisinde yararlı bir ajan olabilir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Tadalafil, DeneySEL çalışma, Subaraknoid kanama, Vazospazm, Apoptozis, Sıçan

ABSTRACT

AIM: The aim of this study is to investigate the effectiveness of tadalafil, a selective and reversible phosphodiesterase-5 (PDE-5) enzyme inhibitor, on the vasospasm developed after experimental subarachnoid hemorrhage (SAH).

MATERIAL and METHODS: Rats are divided into 5 groups as control saline, SAH, SAH + tadalafil 5 mg/kg, SAH + tadalafil 10 mg/kg and SAH + tadalafil 15 mg/kg. In control saline group; saline was given into subarachnoid space through cisterna magna and tadalafil solvent was administered intraperitoneally. Autologous arterial tail blood was given into subarachnoid space through cisterna magna in SAH and SAH + all tadalafil groups. In SAH group, only tadalafil solvent was applied intraperitoneally whereas in SAH + tadalafil groups tadalafil was applied at different dosages (5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg) intraperitoneally.

Zühtü ÖZBEK

ORCID: 0000-0003-0028-4181

Gizem KİPER

ORCID: 0000-0001-6939-0789

Tevfik E. COŞAN ORCID: 0000-0002-9642-6596

Emre ÖZKARA

ORCID: 0000-0001-5448-6446

Dilek BURUKOĞLU DÖNMEZ

ORCID: 0000-0002-6454-4424

İsmail E. HANCIOĞLU

ORCID: 0009-0001-0394-271X

Didem TURGUT COŞAN

ORCID: 0000-0002-8488-6405



Bu eser "Creative Commons Alıntı-GayriTicari-4.0 Uluslararası Lisansı" ile lisanslanmıştır.

Rats were sorted as 3rd day and 7th day and decapitated on the stated day. Basilar artery wall thickness, lumen space and the quantity of apoptosis were examined in all groups.

RESULTS: Tadalafil at all dosages reduced vasospasm when examined by vessel wall thickness and lumen space at 3rd and 7th days. Tadalafil reduced early apoptosis (3rd day) at all dosages, meanwhile late apoptosis (7th day) was reduced only in high dose (15 mg/kg) group.

CONCLUSIONS: Tadalafil has shown to be beneficial in treatment of cerebral vasospasm following experimental SAH in our study. If further investigations support our results, tadalafil may be a useful agent in treatment of aneurysmal SAH.

KEYWORDS: Tadalafil, Experimental study, Subarachnoid hemorrhage, Vasospasm, Apoptosis, Rat

■ GİRİŞ

Subaraknoid kanama (SAK) sonrası 3.-10. günlerde serebral kan akımında hızlı düşüş, intrakranial basınç (İKB) artışı, serebral arter ve arteriollerde patolojik daralma olarak gözlenen vazospazm gelişebilir. Vazospazm, başarılı aneurizma tedavisi sağlansa dahi mortalite ve morbiditeyi kötü yönde etkileyen ve henüz etkili cerrahi veya medikal tedavisi oluşturulamamış bir patolojidir (13,31). Patogeneizde kalsiyum bağımlı ve bağımsız vazokonstriksiyon, subaraknoid mesafedeki kan yıkım ürünleri, serbest radikallerin reaksiyonları, vazodilatör ve vazokonstriktör maddeler arası dengesizlik (nitrik oksit, endotelin gibi endotel kökenli maddeler; prostoglandin, prostasiklin gibi araşidonik asit metabolitleri), inflamatuvar süreçler, vasküler tonusu düzenleyen nöronal vasküler mekanizmalarda değişim, endotelial proliferasyon ve apoptozis gibi pek çok mekanizmanın rol oynadığı belirtilmiştir (16).

Deneysel hayvan modellerinde SAK sonrası vazospazm tedavisinde literatüre bakıldığında tirilazad, kalsiyum antagonistleri (nimodipin, nikardipin, silostazol, ekdisteron), eritropoietin, statinler (simvastatin, atorvastatin), endotelin antagonistleri veya endotelin dönüştürücü enzim inhibitörleri, fasudil, doku plazminojen aktivatörü (tissue-plasminogen activator, t-PA), magnezium, valproik asit, apolipoprotein E mimetik peptit, hidrojen zengin salin denenmiştir (18,28,32,37). Bunlardan t-PA, endotelin antagonistleri/dönüştürücü enzim inhibitörleri ve fasudil klinik ve deneysel çalışmalarda anlamlı olumlu etki göstermiştir (37).

Tadalafil, guanozin monofosfat (GMP) yıkımı yapan fosfodiesterez-5 (PDE-5) enzimini güçlü, selektif ve tersinebilir şekilde inhibe eder. İnsanlarda vazodilatasyon etkisi için kullanılan üç PDE-5 enzim inhibitörü (sildenafil, vardenafil ve tadalafil) bulunur (6,15,24,26). Diğer PDE-5 enzim inhibitörleri ile kıyaslandığında tadalafil daha uzun etki süresi ve daha güçlü inhibisyon yapması nedeniyle SAK sonrası serebral vazospazmın tedavisinde faydalı olabilir (6,24,26,34). Deneysel çalışmalar sildenafil ve tadalafilin kan akımını, inme sonrası iskemik alanda anjiogenez ve nörojenezi artırdığını göstermektedir (25,34,35). Tadalafil, PDE-5 enziminin beyin damarlarında c-GMP selektif etkisinin en güçlü inhibitörüdür ve yarı ömrü diğer PDE-5 inhibitörlerinden daha uzundur (6,24,29,30,34). Klinik çalışmalar tadalafil tedavisi sonrası 36 saat devam eden etkiler bildirmişlerdir (26). Tadalafilin farmakokinetiği beslenme, diyabet ve karaciğer hastalıklarından etkilenmemektedir (34).

Literatürde deneysel hayvan modelleri ile tadalafilin vazospazm tedavisinde etkinliğini araştıran iki sıçan ve bir tavşan çalışması bulunmaktadır (15,22,33). Biz bu çalışmada SAK sonrası gelişen vazospazmda tadalafilin farklı dozlarda, erken (3. gün) ve geç (7. gün) dönemde, daha önce kullanılan ölçütlere ek olarak apoptozisi de değerlendirerek tedavideki etkinliğini araştırdık.

■ GEREÇ ve YÖNTEMLER

Deneysel hayvan çalışması için etik kurul onayı 25.11.2009 tarihinde 132 numarası ile alındı. Tüm deneysel işlemler etik ilkelere, hayvan haklarına ve Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün (National Institutes of Health) Laboratuvar Hayvanları Bakım ve Kullanım Rehberi'ne (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) uygun olarak yürütülmüştür.

Gruplar

Sıçanlar 5 ana gruba ayrıldı: kontrol salin, SAK, SAK + tadalafil 5 mg/kg, SAK + tadalafil 10 mg/kg, SAK + tadalafil 15 mg/kg. Hayvanlarda SAK sonrası vazospazmın pik günü insanlardan erken olması göz önüne alınarak her ana grupta iki alt grup şeklinde 3. ve 7. günlerde dekapitasyon ile değerlendirme yapıldı (Tablo I).

Örneklem Hayvan Grubu ve Çalışmanın Yöntemi

Yaklaşık 2,5-3 aylık, sağlıklı, 250-300 gram ağırlığında, 99 adet Sprague-Dawley sıçanı ile çalışmaya başlandı. Çalışma sürecinde intraoperatif/postoperatif mortalite, enfeksiyon, kan gazı anomalisi, dekapitasyon esnasında baziler arter rüptürü nedeniyle sonuç değerlendirmesi yapılamayan sıçanlar dışlandığında 70 sıçan ile çalışma tamamlandı. Sıçanlarda anestezi intramusküler yolla uygulanan 5 mg/kg xylazine (Rompun®, 5 mg/kg; Bayer AG, Leverkusen, Germany) ve 50 mg/kg ketamin hidroklorid (Ketaset®, Zoetis Inc, Girona, Spain) ile sağlandı. Sıçanlarda günlük olarak uyanık halde iken yapılan ölçümler ile kalp hızı ve kan basıncı takip edildi. Kan basıncı ölçümünde kuyruk-manşet yöntemi (MAY BPHR 9610-PC Tail-Cuff Indirect Blood Pressure Recorder; Commat, Ankara) kullanıldı.

Tüm gruplarda yüzüstü yatar pozisyonda oksipital kemik ve toraks arka duvarına lokal saha temizliği yapıldı. Cilt insizyonu ve kas diseksiyonu sonrası oksipital kemik ile C1 vertebra arasından 27 gauge iğne ile sisterna magnaya girildi. Sıçanlardan 0.3 – 0.5 ml beyin-omurilik sıvısı (BOS) kontrollü şekilde drene edildi. Kontrol salin grubunda subaraknoid mesafeye oda sıcaklığında 0.5 ml salin verildi. SAK ve SAK + tadalafil

Tablo I: Gruplar, Girişim ve Örneklem Dağılımı

Grup	Girişim	Sıçan sayısı (n)
Kontrol salin, 3. gün	Subaraknoid salin + intraperitoneal DMSO uygulaması sonrası 3. gün dekapitasyon	7
Kontrol saline, 7. gün	Subaraknoid salin + intraperitoneal DMSO uygulaması sonrası 7. gün dekapitasyon	7
SAK, 3. gün	Çift hemoraji + DMSO uygulaması sonrası 3. gün	7
SAK, 7. gün	Çift hemoraji + DMSO uygulaması sonrası 7. Gün	7
SAK + tadalafil 5 mg/kg, 3. gün	Çift hemoraji + 5 mg/kg tadalafil uygulaması sonrası 3. Gün	7
SAK + tadalafil 5 mg/kg, 7. gün	Çift hemoraji + 5 mg/kg tadalafil uygulaması sonrası 7. Gün	7
SAK + tadalafil 10 mg/kg, 3. gün	Çift hemoraji + 10 mg/kg tadalafil uygulaması sonrası 3. gün	7
SAK + tadalafil 10 mg/kg, 7. gün	Çift hemoraji + 10 mg/kg tadalafil uygulaması sonrası 7. gün	7
SAK + tadalafil 15 mg/kg, 3. gün	Çift hemoraji + 15 mg/kg tadalafil uygulaması sonrası 3. gün	7
SAK + tadalafil 15 mg/kg, 7. gün	Çift hemoraji + 15 mg/kg tadalafil uygulaması sonrası 7. gün	7

SAK: Subaraknoid kanama, **DMSO:** Tadalafil dimetil sülfoksit.

gruplarında ise BOS drenajı sonrası subaraknoid mesafeye 0.5 ml otolog arteriyel kan enjekte edildi. Otolog arteriyel kan her sıçanın kendi kuyruğundan heparin enjektörü ile alınarak elde edildi. Bazı sıçanlarda kanın subaraknoid mesafeye enjeksiyonu ile solunum ve dolaşım sıkıntısı görüldü, bu sıçanlar çalışmadan dışlandı. Çift hemoraji (double hemorrhage) modeli göz önüne alınarak tüm sıçanlarda iki gün sonra işlemler tekrarlanarak sisternal BOS drenajı sonrası kontrol salin grubuna 0.5 ml salin, SAK ve SAK + tadalafil gruplarına 0.5 ml otolog arteriyel kan enjeksiyonu yapıldı (1).

İkinci ponksiyondan sonra ilk günden başlanarak tadalafil gruplarına günlük intraperitoneal enjeksiyonlar ile tadalafil (Cialis®, Lilly, Madrid, Spain) verildi. Tadalafil dimetil sülfoksit (DMSO) çözeltisi içinde 5, 10, 15 mg/kg dozlarda 0.2 ml olacak şekilde verildi (17). Kontrol salin ve kontrol SAK grubuna ise yalnızca DMSO solventi 0.2 ml intraperitoneal enjekte edildi.

Deneysel hayvan modellerinde vazospazm ve pik noktası insandan daha erken günlerde gösterildiğinden her ana grup kendi içerisinde 3. ve 7. gün dekapitasyon olarak ayrıldı (4,8). Dekapitasyon öncesi sıçanlara anestezi verildi ve toraks açılışı ile sol ventrikülden %10 nötral tamponlu formaldehit perfüzyonu yapıldı. Dekapitasyon yapılarak beyin dokusu hasarsız olarak çıkarıldı. Dokular 5 gün formaldehit içerisinde bekletilerek baziler arter hedefine yönelik pons düzeyinde 5 µm kalınlığında koronal kesitler alındı. Kesitler parafin bloklara alınarak ışık mikroskopisi amacıyla hematoksilen eozin ile boyandı (Şekil 1, Şekil 2).

Baziler Arter Duvar Kalınlığı ve Luminal Alanı Ölçümleri

Baziler arter enine kesitleri ışık mikroskopunda incelenip medikal görüntüleme yazılımı (Osiris Medical Imaging Software Version 4:18, Geneva) kullanılarak duvar kalınlığı ve lümeni hesaplandı. Duvar kalınlığı ölçümleri 4 farklı alanda intima ve media tabakaları dahil olacak şekilde yapılarak ortalaması alındı. Damarın adventisya tabakası ölçüme dahil edilmedi (11,21).

Apoptozis ve Apoptoz İndeksi Hesaplanması

Apoptotik hücrelerin tespiti amacıyla TUNEL (Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP Nick-End Labelling) yöntemini kullanan immünohistokimyasal ApopTag Plus Peroksidaz İn Situ Apoptozis Deteksiyon Kiti (Chemicon, USA katalog no:7101) kullanıldı. Apoptozu kuantitatif değerlendirebilmek için apoptotik indeks hesaplandı. Baziler arter duvarındaki hücrelerden metil yeşili boyananlar normal hücre ve kahverengi boyanan hücreler apoptotik olarak değerlendirildi (Şekil 3). Apoptotik indeks apoptotik hücrelerin tüm hücrelere yüzdelik oranı olarak (Apoptotik indeks = Apoptotik hücre sayısı / Toplam hücre sayısı x 100) hesaplandı.

İstatistiksel Analiz

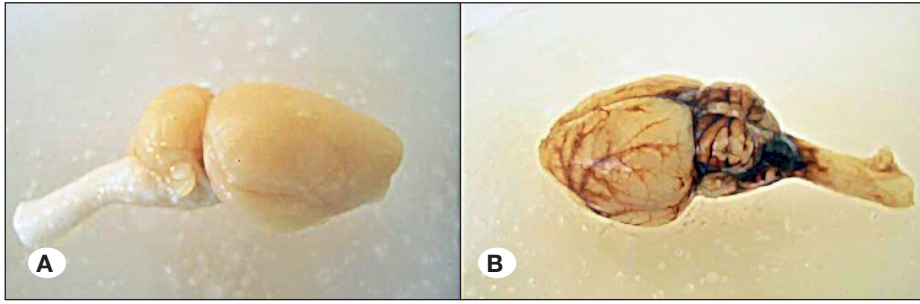
Gruplardan elde edilen veriler varyans testi, post-hok testi, Tukey çoklu karşılaştırma testi, Student-Newman-Keuls metodları kullanılarak analiz edildi. Anlamlı p değeri 0.05 altı kabul edildi.

■ BULGULAR

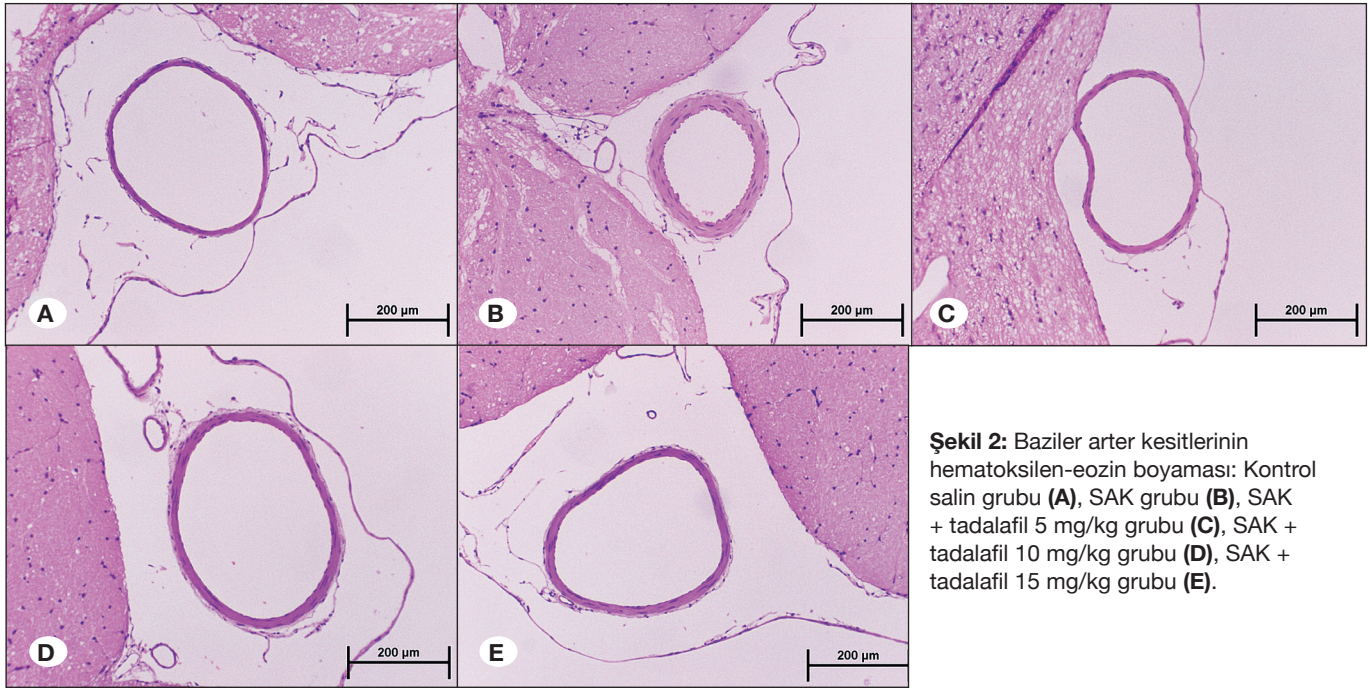
SAK gruplarında vasküler bazal laminada SAK ile uyumlu kıvrım ve katlantılı görünüm izlendi, damar musküler duvarının kalınlaştığı görüldü. Kontrol salin grubu ve tadalafil gruplarında bu değişiklikler saptanmadı (Şekil 4).

Baziler Arter Duvar Kalınlığı

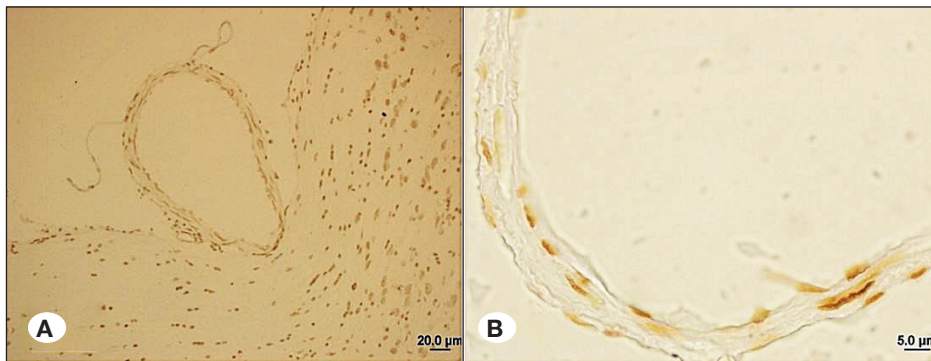
3. gün kontrol salin grubu ile 3. gün SAK + tüm tadalafil grupları (5,10,15 mg/kg) kıyaslandı, 7. gün kontrol salin grubu ile 7. gün SAK + tüm tadalafil grupları (5,10,15 mg/kg) kıyaslandı, anlamlı farklılık görülmedi ($p>0.05$). 3. gün SAK ile 3. gün SAK + tüm tadalafil grupları kıyaslandığında ($p<0.05$) ve 7. gün SAK ile 7. gün SAK + tüm tadalafil grupları kıyaslandığında ($p<0.01$) anlamlı farklılık ortaya kondu. Ayrıca 3. gün kontrol salin ile 3. gün SAK ($p<0.05$) ve 7. gün kontrol salin ile 7. gün SAK ($p<0.01$) grupları arasında da anlamlı fark izlendi (Tablo II, Tablo III, Şekil 5)



Şekil 1: Dekapitasyon sonrası çıkarılan beyin dokusu örnekleri: Kontrol salin grubu (A), SAK grubu (B).



Şekil 2: Baziler arter kesitlerinin hematoksilin-eozin boyaması: Kontrol salin grubu (A), SAK grubu (B), SAK + tadalafil 5 mg/kg grubu (C), SAK + tadalafil 10 mg/kg grubu (D), SAK + tadalafil 15 mg/kg grubu (E).



Şekil 3: TUNEL yöntemi ile hazırlanan baziler arter kesitleri (A). Daha büyük büyütmede kahverengi boyanan apoptotik hücrelerin sayısı (B).

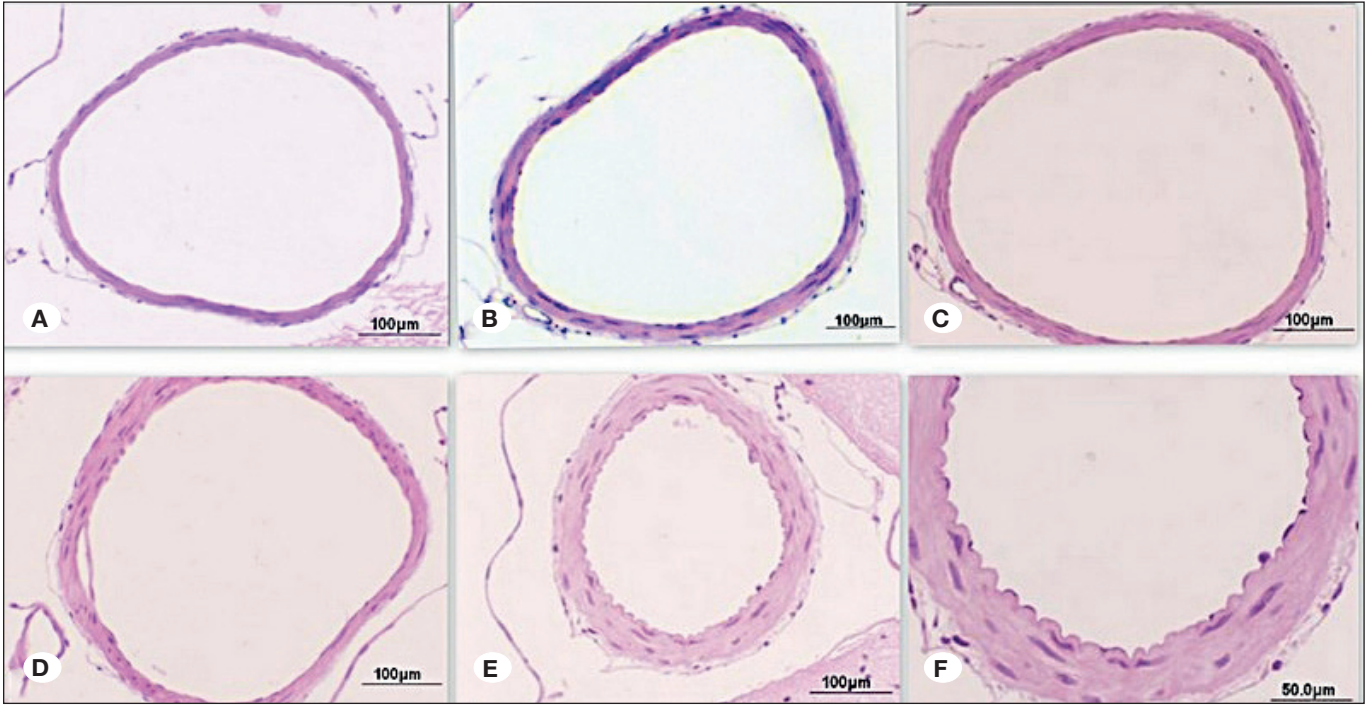
Baziler Arter Luminal Alanı

3. gün SAK ile 3. gün SAK + tüm tadalafil grupları kıyaslandığında ($p < 0.05$) ve 7. gün SAK ile 7. gün SAK + tüm tadalafil grupları kıyaslandığında ($p < 0.01$) anlamlı farklılık görüldü. 3. gün kontrol salin ile 3. gün SAK ve 7. gün kontrol salin ile 7. gün SAK grupları arasında anlamlı farklılık ($p < 0.01$) vardı. Ancak 3. gün kontrol salin grubu ile 3. gün SAK + tüm tadalafil grupları (5,10,15 mg/kg) ve 7. gün kontrol salin grubu ile 7. gün

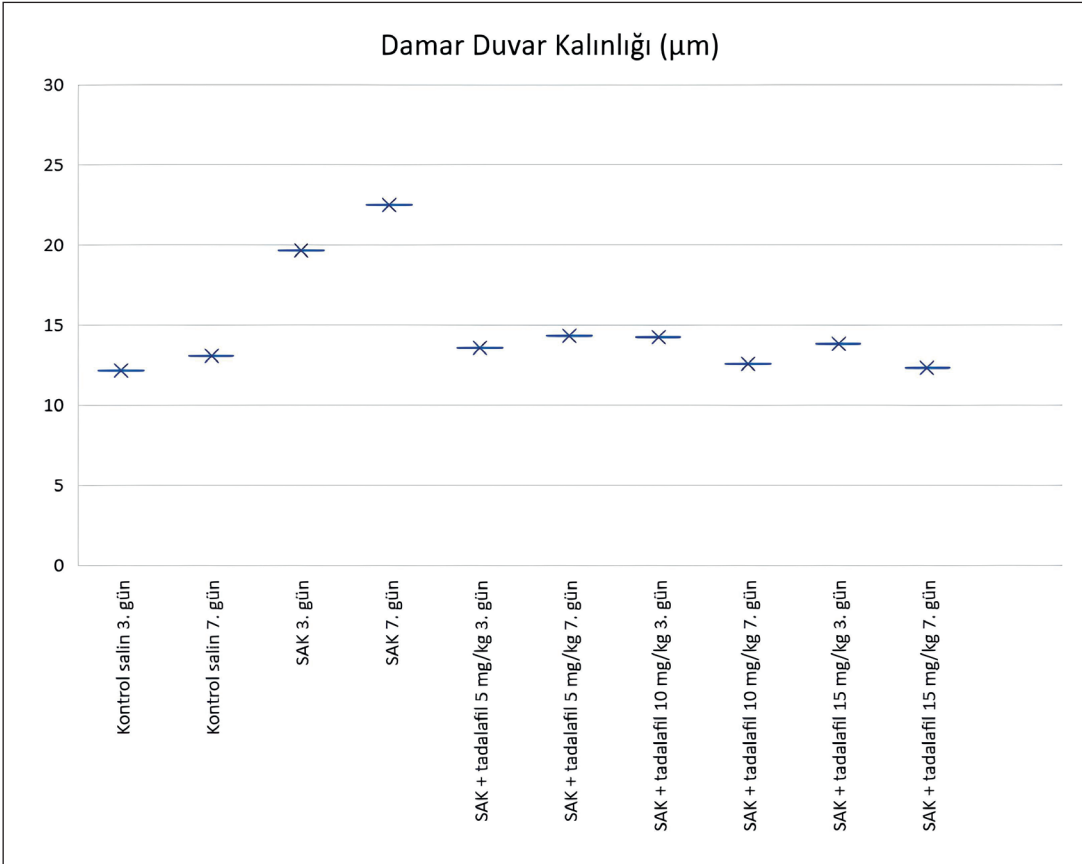
SAK + tüm tadalafil grupları (5,10,15 mg/kg) kıyaslandığında anlamlı farklılık görülmedi ($p > 0.05$). (Tablo II, Tablo III, Şekil 6)

Apoptozis

3. gün SAK ile 3. gün SAK + tüm tadalafil grupları kıyaslandığında anlamlı farklılık saptandı ($p < 0.05$). 7. gün SAK ile 7. gün SAK + tadalafil 5-10 mg/kg gruplarında anlamlı farklılık görülmedi ($p > 0.05$). Yüksek doz olan 7. gün SAK + tadalafil 15 mg/



Şekil 4: Vasküler bazal laminada kıvrım ve katlantıların değerlendirilmesi: Kontrol salin grubu (A), SAK + tadalafil 5 mg/kg grubu (B), SAK + tadalafil 10 mg/kg grubu (C), SAK + tadalafil 15 mg/kg (D) göstermemiştir; SAK grubu (E) göstermiştir. SAK grubu daha büyük büyütmeye (F).



Şekil 5: Baziller arter duvar kalınlığı (* 3. gün SAK ile 3. gün SAK + tüm tadalafil grupları kıyaslandığında $p < 0.05$, **7. gün SAK ile 7. gün SAK + tüm tadalafil grupları kıyaslandığında $p < 0.01$)

Tablo II: Baziler Arter Duvar Kalınlığı, Lümen Alanı ve Apoptotik İndeksin Tüm 3. Gün Gruplarında Ölçüm Sonuçları. Değerler Ortalama±SD (Standart Deviasyon) Olarak Belirtilmiştir

Grup	Damar duvar kalınlığı (µm) (ort ± SD)	Damar lümen alanı (mm ²) (ort ± SD)	Apoptotik indeks (%)
Kontrol salin	12.12 ± 1.84	0.59 ± 0.15	46.85 ± 14.93
SAK	19.63 ± 1.45	0.42 ± 0.15	65.57 ± 11.98
SAK + tadalafil 5 mg/kg	13.56 ± 2.83	0.56 ± 0.28	48.56 ± 17.11
SAK + tadalafil 10 mg/kg	14.18 ± 1.19	0.62 ± 0.09	45.28 ± 5.58
SAK + tadalafil 15 mg/kg	13.79 ± 1,89	0.69 ± 0.31	43.00 ± 9.83

SAK: Subaraknoid kanama.

Tablo III: Baziler Arter Duvar Kalınlığı, Lümen Alanı ve Apoptotik İndeksin Tüm 7. Gün Gruplarında Ölçüm Sonuçları. Değerler Ortalama±SD (Standart Deviasyon) Olarak Belirtilmiştir

Grup	Damar duvar kalınlığı (µm) (ort ± SD)	Damar lümen alanı (mm ²) (ort ± SD)	Apoptotik indeks (%)
Kontrol salin	13.07 ± 1.50	0.63 ± 0.007	47.42 ± 7.72
SAK	22.46 ± 3.60	0.23 ± 0.09	70.28 ± 19.83
SAK + tadalafil 5 mg/kg	14.32 ± 1.89	0.59 ± 0.26	64.57 ± 16,37
SAK + tadalafil 10 mg/kg	12.54 ± 1.88	0.57 ± 0.07	59.34 ± 16,61
SAK + tadalafil 15 mg/kg	12.28 ± 1.78	0.63 ± 0.12	38.00 ± 9.45

SAK: Subaraknoid kanama.

kg grubu ile 7. gün SAK grubu kıyaslandığında anlamlı farklılık olduğu görüldü ($p < 0.05$) (Tablo II, Tablo III, Şekil 7).

■ TARTIŞMA

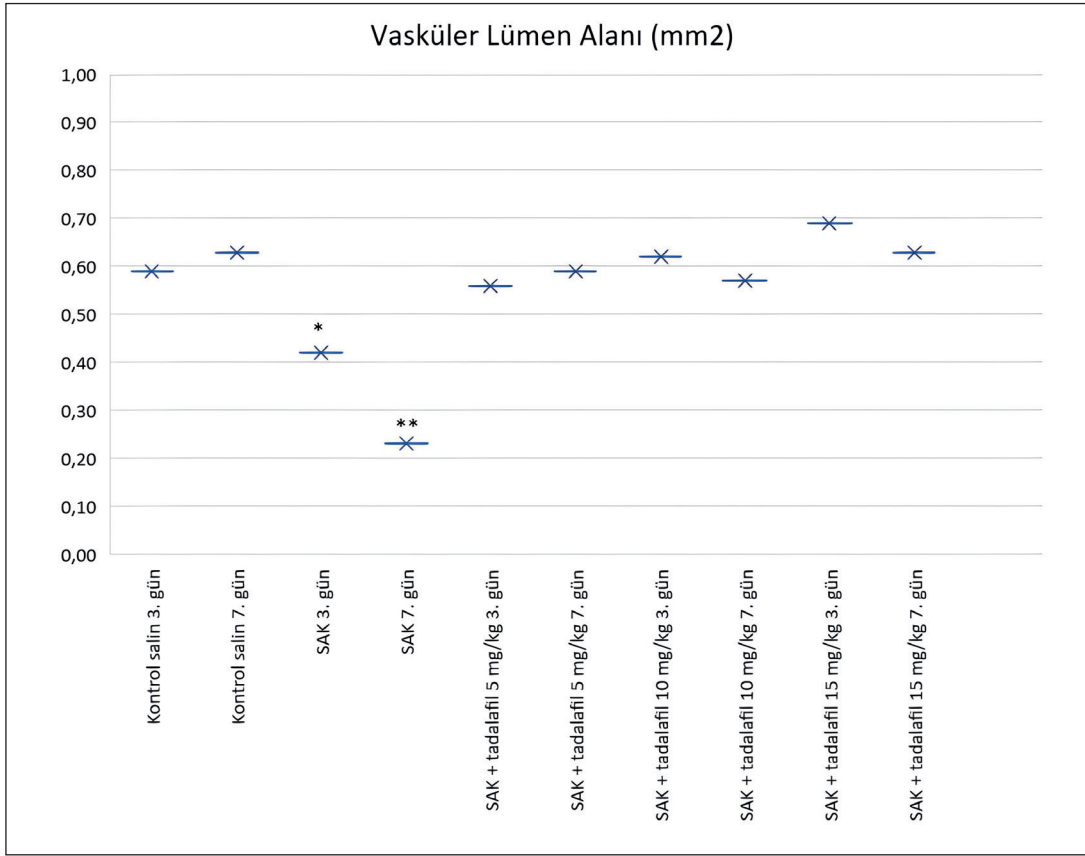
Çalışmamızda PDE-5 enzim inhibitörü olan tadalafil; SAK sonrası gelişen, mortalite ve morbidite artışına neden olan vazospazmın tedavisinde kullanıldı. Vazospazmın tedavisini değerlendirebilmek amacıyla çalışmada baziler arter duvar kalınlığı, lümen alanı ve apoptozis miktarı değerlendirildi.

Damar duvar kalınlığı ve lümen alanı değerlendirildiğinde tüm tadalafil dozları vazospazmı azalttı. Başka çalışmalarda da deneysel SAK sonrası gelişen vazospazmda tadalafil ile vazodilatasyon bildirilmiştir (15,22,33). Nitrik oksit (NO) serebral vasküler tonusun ana modülatörlerindendir (10). Deneysel SAK modellerinde, vazospazmda yetersiz NO sekresyonu görülmektedir (9,11,21). NO, guanilat siklazı aktive ederek guanozin trifosfattan (GTP) siklik guanozin monofosfat (c-GMP) üretimi sağlar. Artan c-GMP vasküler düz kas relaksasyonu ile vazodilatasyon yapan bir nükleotiddir. Ayrıca, c-GMP anjiogenez ve nörogenez de dahil olmak üzere, fizyolojik ve patolojik durumlarda beyin fonksiyonlarının yerine getirilmesinde kritik öneme sahiptir (5,14,26,36). c-GMP, PDE-5 enzimi tarafından guanozin monofosfata (GMP) hidrolize edilir. Düz kas ve penil kavernöz korpusunda bulunan PDE-5 enzimi inhibisyonu ile c-GMP artışı ve dolayısıyla vazodilatasyon görülür (3,27,29,34). SAK sonrası vazospazm, serebral damar duvarındaki PDE-5 enzim aktivitesine bağlı c-GMP hidrolizi ve sonuç olarak azalmış NO aracılı vazodilatasyon sebebiyle olabilir (12,22).

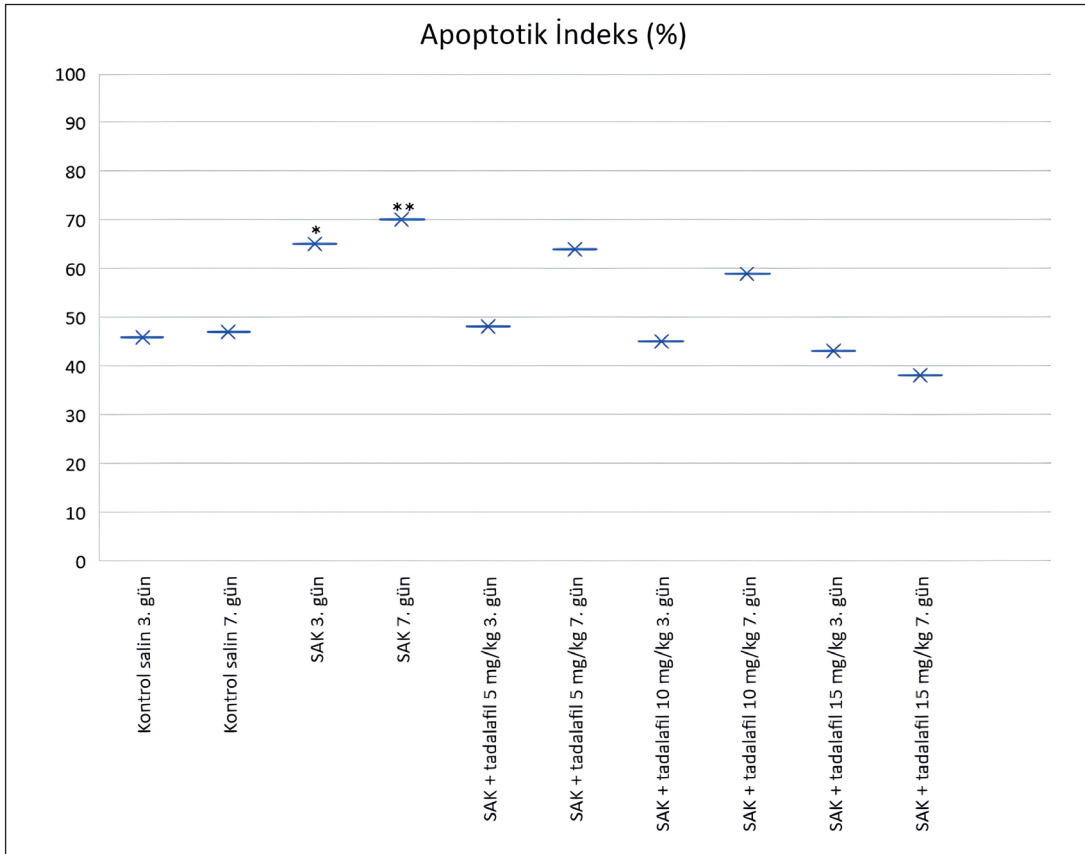
Tadalafil, tüm 3. gün SAK + tadalafil gruplarında apoptozise etkili görülürken 7. günde sadece yüksek doz grubunda (15 mg/kg) etkiliydi. Bu durum SAK sonrası apoptozisin tek bir mediatör değil çok sayıda mediatörle ilişkili olmasına ve şiddetinin her gün artmasına bağlandı. Örneğin kaspaz-3 apoptoziste anahtar rol oynayan temel bir proteindir ve inhibitörlerinin deneysel çalışmalarda apoptozisi azalttığı gösterilmiştir (7,20,27,38). SAK sonrası her gün kaspaz-3 düzeyinin arttığı ve 7. günde pik yaptığı bilinmektedir (14). Hayvan deneyleri ile tadalafilin peniste apoptozisi azalttığı; uzun dönem (4 hafta) kullanım ile endotelial disfonksiyonu, insülin, c reaktif protein (CRP), VCAM (vasküler selüler adhezyon molekülü), ICAM (intraselüler adhezyon molekülü), ET-1(endotelin-1) gibi bazı endotelial moleküllere vazodilatör yanıtta azalmayı önlediği gösterilmiştir (3,19). SAK sonrası serebral damarlarda benzer apoptozis mekanizması işliyor olabilir.

SAK sonrası apoptozis belirgin olarak artmıştır. Ancak apoptozisin kısıtlanması vazospazmın çözülmesinde tek yol olmayabilir. Serebral vazospazmda apoptozisin sebep mi yoksa sonuç mu olduğu konusu hâlâ tartışmalıdır (34). Tadalafilin damar duvar kalınlığı ve lümen alanı ile ölçülen direkt vazodilatör etkisi vazospazmın tedavisinde apoptozise olan etkisinden daha duyarlı olabilir (2).

Literatürde önceki deneysel çalışmalar incelendiğinde tadalafilin günlük 4 mg/kg, 6 mg/kg, 10 mg/kg, 12 mg/kg tek veya iki doz halinde uygulandığı görülebilir (15,17,22,33). Çalışmamızda 5-10-15 mg/kg günlük tek doz tadalafil uygulaması yapılmış olup önceki çalışmalara göre tedavinin doz bağımlılığı



Şekil 6: Baziler arter lümen alanı. (* 3. gün SAK ile 3. gün SAK + tüm tadalafil grupları kıyaslandığında $p < 0.05$, **7. gün SAK ile 7. gün SAK + tüm tadalafil grupları kıyaslandığında $p < 0.01$).



Şekil 7: Baziler arter apoptotik indeksi. (* 3. gün SAK ile 3. gün SAK + tüm tadalafil grupları kıyaslandığında $p < 0.05$, **7. gün SAK ile 7. gün SAK + tadalafil 15 mg/kg grupları kıyaslandığında $p < 0.05$).

Tablo IV: Deneysel SAK Sonrası Vazospazmda Tadalafil Etkinliğini Araştıran Çalışmalar

Çalışma	Deneysel SAK modeli	Tadalafil dozu	Vazospazm/vazodilatasyon ölçütleri	Sonuç
Youm ve ark. (33)	Sisternal arterial kan enjeksiyonu	2 mg/kg (günde 2 kez)	Anjiyografik baziler arter çapı (üst, orta ve alt bölgeden), arter çap oranı (SAK 3. gün çap/SAK öncesi çap x 100), baziler arter tunika media kalınlığı	Tadalafil ile tümparametrelerde kontrol grubuna göre anlamlı iyileşme.
Narin ve ark. (22)	Sisternal arterial kan enjeksiyonu	6 mg/kg (12-24-36. saatlerde)	Baziler arter luminal alanı	Tadalafil ve SAK grubunda sadece SAK ile kıyaslandığında anlamlı iyileşme, SAK olmayan tadalafil grubu ile kontrol grubu kıyaslandığında anlamlı fark yok.
Koktekir ve ark. (15)	Sisternal arterial kan enjeksiyonu	10 ml/kg (günde 1 kez)	SAK sonrası 2. ve 4. günlerde anjiyografik baziler arter çapı (üst, orta ve alt bölgeden)	Tadalafil ve SAK 2. gün grubunda sadece SAK ile kıyaslandığında anlamlı iyileşme; Tadalafil ve SAK 4. gün grubunda sadece SAK ile kıyaslandığında arterin üst ve alt bölgelerinde anlamlı iyileşme. SAK olmaksızın tadalafil verilen gruplar ile kontrol grubu veya SAK ve tadalafil grupları kıyaslandığında anlamlı fark yok (vazospazm olmayan damarda vazodilatasyon etkisi oluşmamış).

SAK: Subaraknoid kanama.

da incelenebilmiştir. Deneysel SAK sonrası vazospazmda tadalafil etkinliğini inceleyen 3 çalışma mevcut olup Tablo IV'te özetlenmiştir.

Tadalafilin vazodilatör etkisinin SAK olmadan değerlendirildiği bir deneysel hayvan modelinde çalışmamıza benzer şekilde tadalafil vazodilatör etki göstermemiştir (17). Bir sistematik derlemede PDE-5 inhibitörlerinin insanda serebral kan akımını üzerine etkileri değerlendirilmiş, SAK dışında serebral kan akımının sağlıklı veya hasta bireylerde PDE-5 inhibitörü ile değişmediği ancak endotelial vazodilatör yanıtın bozulduğu klinik durumlarda serebral vasküler düzenlemenin PDE-5 inhibitörleri ile iyileştiği bildirilmiştir (23). Derlemede SAK ilişkili çalışmalar incelendiğinde tadalafilin araştırılmadığı görülmektedir. Deneysel SAK modelinde klinik pratikte en sık kullanılan farmakolojik ajan nimodipin ile tadalafilin vazodilatör etkisini değerlendiren başka bir çalışmada iki ilaç ile de benzer ve olumlu sonuçlar bildirilmiştir (33). Çalışmamızın sonuçları da göz önüne alındığında tadalafilin yapılacak klinik çalışmalar ile değerlendirilmesi vazospazm tedavisinde yeni imkânlar yaratabilir.

Çalışmanın kısıtlı yanı deneysel hayvan modeli çalışmalarında gecikmiş serebral iskemi/enfarktın değerlendirilememesi nedeniyle kötü klinik sonuçta etkili olabilecek pek çok mekanizmanın içinden sadece vazospazmın kuantatif olarak değerlendirilmiş olmasıdır (37).

■ SONUÇ

Çalışmamızda tadalafil 3. ve 7. günlerde damar duvar kalınlığı ve lümen alanına etkili iken apoptozis incelendiğinde erken dönemde (3. gün) etkili, geç dönemde (7. gün) sadece yüksek doz (15 mg/kg) grubunda vazospazmı azaltmada istatistiksel olarak anlamlı şekilde etkili görülmüştür.

YAZAR KATKILARI

Çalışmanın fikri veya tasarımı: ZÖ, EÖ, İEH, GK, DBD, DTC, TEC
Veri toplama: ZÖ, EÖ, İEH, GK, DBD, DTC, TEC
Veri analizi ve yorumlama: ZÖ, EÖ, İEH, GK, DBD, DTC, TEC
Makale taslağının hazırlanması: ZÖ, EÖ, İEH, GK, DBD, DTC, TEC
Makalenin kritik revizyonu: ZÖ, EÖ, İEH, GK, DBD, DTC, TEC
Diğer (çalışma denetimi, fonlar, materyal, vb...): ZÖ, EÖ, İEH, GK, DBD, DTC, TEC
Tüm yazarlar (ZÖ, EÖ, İEH, GK, DBD, DTC, TEC) sonuçları gözden geçirmiş ve makalenin son hâlini onaylamıştır.

■ KAYNAKLAR

- Alexander Z, Robert E, Kazuya A, John Z: Prevention of vasospasm in penetrating arteries with mapk inhibitors in dog double-hemorrhage model. Surg Neurol 54(3):221-227, 2000
- Atalay B, Caner H, Cekinmez M, Ozen O, Celasun B, Altınors N: Systemic administration of phosphodiesterase V inhibitor, sildenafil citrate, for attenuation of cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage. Neurosurgery 59(5):1102-1107, 2006

3. Aversa A, Greco E, Bruzziches R, Pili M, Rosano G, Spera G: Relationship between chronic tadalafil administration and improvement of endothelial function in men with erectile dysfunction: a pilot study. *Int J Impot Res* 19(2):200-207, 2007
4. Baek WI, Yim MB, Lee CY, Lee JC, Son EI, Kim DW: An analysis of factors related to symptomatic vasospasm and outcome in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Korean Neurosurg Soc* 26:814-821, 1997
5. Boess FG, Hendrix M, van der Staay FJ, Erb C, Schreiber R, van Staveren W: Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP, synaptic plasticity and memory performance. *Neuropharmacol* 4:1081-1092, 2004
6. Brock GB, McMahon CG, Chen KK, Costigan T, Shen W, Watkins V, Anglin G, Whitaker S: Efficacy and safety of tadalafil for the treatment of erectile dysfunction: Results of integrated analyses. *J Urol* 168:1332-1336, 2002
7. Cahill J: Vasospasm and p53-induced apoptosis in an experimental model of subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 37(7):1868-1874, 2006
8. Delgado TJ, Brismar J, Svendgaard NA: Subarachnoid haemorrhage in the rat: Angiography and fluorescence microscopy of the major cerebral arteries. *Stroke* 16(4):595-602, 1985
9. Durmaz R, Ozkara E, Kanbak G, Arslan OC, Dokumacioğlu A, Kartkaya K, Atasoy MA: Nitric oxide level and adenosine deaminase activity in cerebrospinal fluid of patients with subarachnoid hemorrhage. *Turk Neurosurg* 18(2):157-164, 2008
10. Faraci FM, Brian JE: Nitric oxide and cerebral circulation. *Stroke* 25:692-703, 1994
11. Gules I, Satoh M, Clower BR, Nanda A, Zhang JH: Comparison of three rat models of cerebral vasospasm. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:2551-2559, 2002
12. Haley JE, Wilcox GL, Chapman PF: The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 8:211-216, 1992
13. Inagawa T: Risk factors for cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A review of the literature. *World Neurosurg* 85:56-76, 2016
14. Kacira T, Kemerdere R, Atukeren P, Hanimoglu H, Sanus GZ, Kucur M, Tanriverdi T, Gumustas K, Kaynar MY: Detection of caspase-3, neuron specific enolase, and high-sensitivity C-reactive protein levels in both cerebrospinal fluid and serum of patients after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 60(4):674-679, 2007
15. Koktekir E, Erdem Y, Akif Bayar M, Gokcek C, Karatay M, Kilic C: A new approach to the treatment of cerebral vasospasm: The angiographic effects of tadalafil on experimental vasospasm. *Acta Neurochir (Wien)* 152(3):463-469, 2010
16. Koliass AG, Sen J, Belli A: Pathogenesis of cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: Putative mechanisms and novel approaches. *J Neurosci Res* 87(1):1-11, 2009
17. Kruuse C, Gupta S, Nilsson E, Kruse L, Edvinsson L: Differential vasoactive effects of sildenafil and tadalafil on cerebral arteries. *Eur J Pharmacol* 674(2-3):345-351, 2012
18. Liu J, Zhou G, Kolls BJ, Tan Y, Fang C, Wang H, Laskowitz DT: Apolipoprotein E mimetic peptide CN-105 improves outcome in a murine model of SAH. *Stroke Vasc Neurol* 3(4):222-230, 2018
19. Lysiak JJ, Yang SK, Klausner AP, Son H, Tuttle JB, Steers WD: Tadalafil increases Akt and extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation, and prevents apoptotic cell death in the penis following denervation. *J Urol* 179(2):779-785, 2008
20. Meguro T, Chen B, Parent AD, Zhang JH: Caspase inhibitors attenuate oxyhemoglobin-induced apoptosis in endothelial cells. *Stroke* 32:561-566, 2001
21. Meguro T, Clower BR, Carpenter R, Parent AD, Zhang JH: Improved rat model for cerebral vasospasm studies. *Neurol Res* 23:761-766, 2001
22. Narin F, Bilginer B, Isikay AI, Onal MB, Soylemezoglu F, Akalan N: The effect of phosphodiesterase inhibitor tadalafil on vasospasm following subarachnoid hemorrhage in an experimental rabbit model. *Acta Neurochir Suppl* 110:13-16, 2011
23. Pauls MM, Moynihan B, Barrick TR, Kruuse C, Madigan JB, Hainsworth AH, Isaacs JD: The effect of phosphodiesterase-5 inhibitors on cerebral blood flow in humans: A systematic review. *J Cereb Blood Flow Metab* 38(2):189-203, 2018
24. Rosen RC, Kostis JB: Overview of phosphodiesterase 5 inhibition in erectile dysfunction. *Am J Cardiol* 92:9-18, 2003
25. Royl G, Balkaya M, Lehmann S, Lehnardt S, Stohlmann K, Lindauer U, Endres M, Dirnagl U, Meisel A: Effects of the PDE5-inhibitor vardenafil in a mouse stroke model. *Brain Res* 1265:148-157, 2009
26. Seftel AD: Phosphodiesterase type 5 inhibitor differentiation based on selectivity, pharmacokinetic, and efficacy profiles. *Clin Cardiol* 27:14-19, 2004
27. Sen O, Caner H, Aydin MV, Ozen O, Atalay B, Altinors N, Babek M: The effect of mexiletine on the level of lipid peroxidation and apoptosis of endothelium following experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurol Res* 28(8):859-863, 2006
28. Shao A, Wu H, Hong Y, Tu S, Sun X, Wu Q, Zhao Q, Zhang J, Sheng J: Hydrogen-rich saline attenuated subarachnoid hemorrhage-induced early brain injury in rats by suppressing inflammatory response: Possible involvement of NF- κ B pathway and NLRP3 inflammasome. *Mol Neurobiol* 53(5):3462-3476, 2016
29. Sobey CG: Cerebrovascular dysfunction after subarachnoid haemorrhage: Novel mechanisms and directions for therapy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28(11):926-929, 2011
30. Vila-Petroff MG, Younes A, Egan J, Lakatta EG, Sollott SJ: Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiomyocytes. *Circ Res* 84:1020-1031, 1999
31. Vural M, Cosan TE, Ozbek Z, Cosan D, Sahin F, Burukoglu D: Digoxin may provide protection against vasospasm in subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir* 151:1135-1141, 2009
32. Wu CH, Tsai YC, Tsai TH, Kuo KL, Su YF, Chang CH, Lin CL: Valproic acid reduces vasospasm through modulation of AKT phosphorylation and attenuates neuronal apoptosis in subarachnoid hemorrhage rats. *Int J Mol Sci* 22(11):5975, 2021

33. Youm JY, Park B, Park KH, Il Won Y, Byoun HS, Lim J: Vasodilatory effects of tadalafil in an animal model of cerebral vasospasm: Comparative analysis with oral nimodipine. *Clin Neurol Neurosurg* 232:107857, 2023
34. Zhanga L, Zhanga Z, Zhanga RL, Cuia Y, Margot C: Tadalafil, a long-acting type 5 phosphodiesterase iso enzyme inhibitor, improves neurological functional recovery in a rat model of embolic stroke. *Brain Res* 1118(1):192-198, 2006
35. Zhang R, Wang Y, Zhang L, Zhang Z, Tsang W, Lu M, Zhang L, Chopp M: Sildenafil (Viagra) induces neurogenesis and promotes functional recovery after stroke in rats. *Stroke* 33:2675-2680, 2002
36. Zhang R, Wang L, Zhang L, Chen J, Zhu Z, Zhang Z, Chopp M: Nitric oxide enhances angiogenesis via the synthesis of vascular endothelial growth factor and cGMP after stroke in the rat. *Circ Res* 92:308-313, 2003
37. Zoerle T, Ilodigwe DC, Wan H, Lakovic K, Sabri M, Ai J, Macdonald RL: Pharmacologic reduction of angiographic vasospasm in experimental subarachnoid hemorrhage: Systematic review and meta-analysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 32(9):1645-1658, 2012
38. Zubkov AY, Aoki K, Parent AD, Zhang JH: Preliminary study of the effects of caspase inhibitors on vasospasm in dog penetrating arteries. *Life Sciences* 70:3007-3018, 2001