

T.C  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**TAVŞAN HİDROSEFALİ MODELİNDE MEMANTİN UYGULAMASININ  
FRONTAL KORTEKS NÖRON YAPISI ÜZERİNDEKİ KORUYUCU ETKİSİ:  
MAP-2 İMMÜNOREAKTİVİTESİ İLE DEĞERLENDİRME**

Dr. Nezh YASA

Nöroşirürji Uzmanlık Tezi

2011

T.C  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**TAVŞAN HİDROSEFALİ MODELİNDE MEMANTİN UYGULAMASININ  
FRONTAL KORTEKS NÖRON YAPISI ÜZERİNDEKİ KORUYUCU ETKİSİ:  
MAP-2 İMMÜNOREAKTİVİTESİ İLE DEĞERLENDİRME**

Dr. Nezh YASA

Nöroşirürji Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Volkan ETUŞ

Anabilim Dalı Başkanı  
Prof. Dr. Savaş CEYLAN

ETİK KURUL ONAYI: 09/06/2009-HAEK 10/9

2011

## **TEŐEKKÜR**

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam boyunca benden ilgi ve desteğini esirgemeyen, başta Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Savaş CEYLAN olmak üzere, tüm öğretim üyeleri ve asistan arkadaşlarıma teőekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

<b>1. AMAÇ VE KAPSAM</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>2</b>
2.1. HİDROSEFALİ.....	2
2.1.1. HİDROSEFALİ VE TARİHSEL GELİŞİMİ .....	2
2.1.2. HİDROSEFALİ PATOGENEZİ VE NÖRONAL HASARLANMA MEKANİZMASI.....	5
2.1.3. EKSİTOTOKSİSİTE .....	7
2.1.4. HİDROSEFALİDE KORTEKS NÖRONAL YAPISININ ETKİLENMESİ.....	10
2.2. MAP-2 VE MİKROTÜBÜL İLİŞKİLİ PROTEİNLER .....	11
2.3. HİDROSEFALİDE NÖROPROTEKTİF TEDAVİ YAKLAŞIMLARI.....	15
2.4. MEMANTİN.....	16
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>19</b>
3.1. DENEKLER .....	19
3.2. DENEYSSEL HİDROSEFALİ MODELİ .....	20
3.3. MEMANTİN UYGULAMASI .....	25
3.4. MAP-2 (MICROTUBULE ASSOCIATED PROTEIN-2) İMMÜNHİSTOKİMYA BOYAMA İLE FRONTAL KORTEKS NÖRONLARININ İŞARETLENMESİ .....	26
3.5. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME .....	26
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>27</b>
4.1. HİDROSEFALİK SÜRECE AİT GÖZLEMLER .....	27
4.2. HİDROSEFALİK SÜRECİN RADYOLOJİK KONTROLÜ .....	29
4.3. FRONTAL KORTEKS NÖRONLARINDA MAP-2 İMMÜNHİSTOKİMYASAL EKSPRESYONU.....	29
4.3.1 FRONTAL KORTEKS MAP-2 İMMÜNHİSTOKİMYASAL EKSPRESYONU GÖSTEREN NÖRON SAYILARININ GRUPLAR ARASI KARŞILAŞTIRILMASI.....	29
4.3.2 FRONTAL KORTEKS ALANLARINDAKİ NÖRONAL MAP-2 İMMÜNOREAKTİVİTESİ KESİTLERİNE ÖRNEKLER.....	31
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	<b>34</b>
<b>6. SONUÇ</b> .....	<b>39</b>
<b>7. ÖZET</b> .....	<b>40</b>
<b>8. ABSTRACT</b> .....	<b>41</b>
<b>9. KAYNAKLAR</b> .....	<b>42</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

**ATP:** Adenozin tri-fosfat

**BOS:** Beyin - omurilik sıvısı

**LTP:** Long term potentialization (Uzun süreli potansiyalizasyon)

**MAP:** Microtubule associated protein (mikrotübül ilişkili protein)

**MR:** Manyetik rezonans

**µm:** Mikrometre (mikron)

**NMDA:** N-Metil D-Aspartat

**NOS:** Nitrik oksit sentaz

**PKC:** Protein kinaz C

**PI-PLC:** Fosfoinositid-spesifik fosfolipaz C

**kD:** Kilo Dalton

**PCP:** Fensiklidin

**GTP:** Guanozin trifosfat

**GDP:** Guanozin difosfat

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Resim 1. Glutamat aracılı eksitotosite mekanizması .....	Sayfa 9
Resim 2. Nöronda mikrotubul ilişkili proteinlerin yerleşimi .....	Sayfa 11
Resim 3. MAP-2'nin mikrotübül ilişkili protein yapısı.....	Sayfa 13
Resim 4. Asetilkolin ve MAP-2 fosforilasyonu.....	Sayfa 14
Resim 5. Memantinin moleküler yapısı.....	Sayfa 16
Resim 6. NMDA reseptörünün yapısı.....	Sayfa 18
Resim 7. Denek, cerrahi pozisyon, cerrahi set ve ameliyat mikroskobu.....	Sayfa 21
Resim 8. Hidrosefali indüksiyonu cerrahi hazırlık.....	Sayfa 22
Resim 9. Atlanto-oksipital membranın ortaya konulması.....	Sayfa 22
Resim 10. Sisterna magna'ya girilerek BOS aspirasyonu.....	Sayfa 23
Resim 11. Sisterna magna içerisine kaolin verilmesi.....	Sayfa 23
Resim 12. Paravertebral ve oksipital adele grubunun kapatılması.....	Sayfa 24
Resim 13. Deneklerin kraniyal MR görüntülemesi için kullanılan cihaz.....	Sayfa 24
Resim 14. Sakrifikasyon sonrası hidrosefalik beynin gros morfolojik görünümü.....	Sayfa 25
Resim 15. MR: Normal ventriküler konfigürasyon.....	Sayfa 28
Resim 16. MR: Hidrosefalik denekte ventriküler dilatasyon.....	Sayfa 28
Resim 17. K Grubu için örnek MAP-2 immünboyası histolojik kesiti.....	Sayfa 32
Resim 18. H Grubu için örnek MAP-2 immünboyası histolojik kesiti.....	Sayfa 33
Resim 19. M Grubu için örnek MAP-2 immünboyası histolojik kesiti.....	Sayfa 33
Grafik 1. Grupların MAP-2 ekspresyon eden ortalama nöron sayıları.....	Sayfa 31

## TABLO DİZİNİ

Tablo 1. MAP-2 eksprese eden nöron sayısı verileri.....	Sayfa 29
Tablo 2. SPSS yazılımı ile çoklu varyans analizi değerlendirme sonuçları.....	Sayfa 30
Tablo 3. Post-Hoc Tukey testi ile deney grupları arası karşılaştırma.....	Sayfa 30

## 1. AMAÇ VE KAPSAM

Hidrocefali, intrakraniyal serebrospinal sıvı ile dolu serebral ventriküllerin patolojik genişlemesi olarak tanımlanabilir (1). Hidrocefalide periventriküler beyaz maddeki küçük damarların kompresyonu ve ventrikül endim dokusundaki destüksiyonun eşlik ettiği primer hasarlanmanın yanı sıra, astrositlerin ve mikroglial hücrelerin proliferasyonu ile aksonların gerilmesi, destrüksiyonu ve aralarındaki bağlantıların kaybına sebep olan ikinci bir hasarlanma süreci söz konusudur (1,2,3,4).

Travma ve iskemi sonrası oluşan sekonder hasarlanmanın etkilerini en aza indirmek için farmakolojik olarak birçok ajan son yıllarda yapılan çalışmalarda kullanılmıştır. N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonisti “memantin”in (5,6,7,8), travma ve iskemiyeye bağlı oluşan sekonder nöronal hasara karşı nöron koruyucu etkisi konusunda yapılan birçok çalışma mevcuttur ancak hidrocefali sürecindeki nöron koruyucu etkisi konusunda henüz yapılmış bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

Bu çalışmada; tavşanlarda kaolin ile oluşturulan hidrocefali modeli kullanılmıştır. Bu model üzerinde hidrocefali gelişimine bağlı frontal korteks nöron yapısında, hücre iskeleti-mikrotübül ve özellikle dendritik organizasyondaki hasarlanma süreci ve sistemik olarak uygulanan memantin bu hasarlanma süreci üzerindeki etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu etki, frontal kortikal bölge nöronlarından yapılan örneklemelerde mikrotübül ilişkili protein 2 (MAP-2) 'ye yönelik immünohistokimyasal değerlendirme yapılarak ortaya konmaya çalışılmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. HİDROSEFALİ

#### 2.1.1. HİDROSEFALİ VE TARİHSEL GELİŞİMİ

Hidrocefali tarih boyunca klinisyenleri şaşırtan ve aynı zamanda bir o kadar da zorlayan bir hastalıktır. 19. yüzyıldan önce ‘kafadaki su’ olarak tanımlanan bu hastalık için müdahaleden çok ancak gözlem yapılabilmıştır. Hidrocefalide ilk tedavi girişimini yapan ve bunu da doküman eden ilk hekim tıbbın babası olarak bilinen Hipokrat’tır (9,10,11). Hipokrat, ventriküler ponksiyonu yapan ilk hekim olmakla birlikte, bu konu tartışmalıdır. Büyük bir olasılıkla subaraknoid veya subdural aralıkta bulunan BOS’nu drene ettiği düşünülmektedir. Bu konu ile ilgili tanımlama ve çizimler Galen’in çalışmalarında bulunabilir. Galen durumun ventriküler genişlemeden değil de, BOS’nın extraaksiyel birikiminden kaynaklandığını düşünmüştür. Galen, ventriküllerin birbirleriyle bağlantılı olduklarını ve bu yapıların içindeki ruhun pitiuter bezde biriken atıkla birlikte arınma sürecine girdiğini belirtmiştir (10,12).

Vesalius (1514-1564)(13) , hidrocefalinin anatomik ve patolojik karakterlerini tanımlamış ve suyun kafatası ile beynin dış zarı arasında değil, ventriküller içinde bulunduğunu ileri sürmüştür. 1664 yılında Thomas Willis (14), koroid pleksusun BOS’u ürettiğini öne süren ilk kişi olmuştur. 1701 yılında Pachioni, yanlış olarak BOS ürettiğini düşündüğü araknoid granülasyonları tanımlamıştır ( 15) .1761 yılında Morgagni (16) hidrocefalinin kafada büyüme olmadan da olabileceğini öne sürmüş ve bu hastalık sürecinde bu fazla sıvının nereden kaynaklandığını açıklayamamıştır. Hidrocefali ile meningomiyelosele arasındaki ilişkiyi ortaya koyan ilk araştırmacıdır (17,18). 1774 yılında Cotugno serebral ventriküllerin hayat sırasında sıvı ile dolu olduğunu ve bu sıvının perkütan aspirasyonla örneklenebileceğini kanıtlamıştır (18,19). Monro her iki interventriküler foramenin varlığını göstermiştir. 18. yüzyılda Robert Whytt (20), ‘‘Beyinde Su Toplanması İle İlgili Gözlemler’’ isimli kitabında, tüberküloz memenjitle birkaç internal hidrocefali vakası yayınlamıştır. 1808 yılında West (21) ve akabinde Cheyne (1848), hidrocefalinin akut ve kronik formlarını ayırt etmiş, aynı zamanda

hidrosefalinin konjenital ve edinsel nedenlerini ortaya koymuşlardır (18). Hastalığın patofizyolojisinin çok az bilinmesinden dolayı hidrosefaliye yönelik tedavi edici yaklaşımlar çoğunlukla başarısızlıkla sonuçlanmıştır (22).

19. yüzyılda ventrikül fizyolojisi ve anatomisi, aynı zamanda BOS hakkındaki bilgiler olağanüstü gelişme kaydetmiştir. 1825 yılında Magendie, medial serebellar forameni tarif etmiş ve beyindeki BOS sirkülasyonunu tanımlamıştır (16). 1859 yılında Luschka foramen Magendi'nin varlığını doğrulamış ve iki adet ek lateral foromen tarif etmiştir.

BOS sirkülasyonu için temel yapıtaşlarından biri Key ve Retzius (23) 'un detaylı olarak meninksleri, subaraknoid aralığı, sisternleri, ventrikülleri, araknoid villusları üretimden emilime kadar olan tüm yolları tarif ettikleri anatomik atlaslarıdır (18).

20. yüzyılın başlarında Weed (24), koroid pleksus embriyolojisini tarif etmiş ve araknoid villusların emilim kapasitesini doğrulamıştır. 20. yüzyıldaki ilerlemelerle birlikte hidrosefali ve BOS dinamiklerine yönelik daha kapsamlı araştırmalar mümkün olmuştur. 1950 'lerde radyoaktif izleyicilerin kullanıma girmesiyle BOS'nın dolaşım dinamiklerine yönelik daha detaylı analizler yapmak mümkün olmuştur. Brihtman ve arkadaşları ekstraselüler sıvı ile BOS arasında serbest bir bağlantının olduğunu kanıtlamışlardır (25,26). Milhorat ve arkadaşları periventriküler permeabilededeki artışı göstermişler ve deneysel hidrosefalide transependimal absorpsiyon konseptini ortaya koymuşlardır (23,24,26). Bundan sonraki temel yapıtaşlarından biri de Milhorat ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmadır. Milhorat ve arkadaşları daha önceki inanışın aksine akut hidrosefalinin saatler içinde geliştiğini kanıtlamışlardır (27,28,29). Quincke (30), 1891 yılında lomber ponksiyonun hidrosefalide efektif bir tedavi seçeneği olduğunu göstermiştir. Miculicz, lateral ventrikülden subgaleal, subdural ve subaraknoid aralığa altın tüpler ve katgüt teller kullanarak drenajı ilk olarak deneyen araştırmacıdır (10,22,31). 1908'de Payr (32) juguler venlere ve sagittal sinüse ven greftleri kullanarak drenajı tarif etmiştir. Aynı yıl Kausch, lateral ventrikülü peritona drene etmek için lastik bir boru kullanmıştır (18,33). Bu süre zarfında Heile (34) periton içerisine spinal BOS drenajını, barsak serozasını dura matere dikerek yapmayı denemiştir. Aynı zamanda subaraknoid aralığı peritona ipek sütürler, venler ve lateks tüpler gibi materyaller kullanarak

birleştirmeye çalışmıştır. 1914 yılında Dandy (35) tek taraflı koroid pleksektomi ve foramen Monro obstrüksiyonu yaptığı çalışmada pleksektomi yaptığı ventrikülün küçülürken kontrlateral ventrikülün büyüdüğü tespit etmiş ve BOS'nın koroid pleksus tarafından yapıldığı sonucuna varmıştır. Bu çalışmanın sonucunda Dandy (35), 1918 yılında bilateral koroid pleksektomi işleminin BOS üretimini azalttığını öne sürmüştür (17,22). 1930'lu yılların sonlarında Putnam (38) ve Scarff (45), bu tekniği endoskop koterizasyonu kullanarak geliştirmişlerdir. Üçüncü ventrikülostomi prosedürü akuadukt stenozunu bypass etmek için Dandy tarafından tanımlanmıştır (10,22,18).

Hidrosefali cerrahisinde çığır açan en önemli gelişme biouyumlu sentetik materyallerin ve valv ile regüle şant sistemlerinin kullanıma girmesiyle olmuştur. 1952 yılında Nulsen ve Spitz, hidrosefalisi olan bir çocuğun babası olan Jhon Holter (10,22) ile birlikte valv sistemi tarafından regüle edilen bir ventrikülo-jugüler şant sistemini başarı ile uyguladıklarını bildirmişlerdir. Aynı zamanda Pudenz ve arkadaşları (36,37) silikondan yapılmış tek taraflı slit valvi olan bir şant üretmişlerdir (10). Valv sistemlerinin ve yeni biyolojik uyumlu materyallerin geliştirilmesiyle birlikte regüle edilemeyen BOS drenajı gibi birçok komplikasyonun ortadan kaldırılmasına çalışmıştır (10).

1980'ler ve 1990'lı yıllarda endoskobun nöroşirürji pratiğinde kullanılmaya başlaması ile birlikte ventriküler kateterlerin daha doğru yerleştirilmesine olanak sağlanmış ve akuadukt stenozunda endoskopik üçüncü ventrikülostomi uygulaması yeniden önem kazanmıştır (38).

Tıp tarihi boyunca ne kadar yeni gelişme ve buluş yapılsa da gelecek yüzyılda da klinisyenler hidrosefalinin zorluklarıyla başetmeye devam edeceklerdir. Moleküler biyoloji, gen terapisi ve nöronal rejenerasyondaki gelişmelerle birlikte ek bir fonksiyonel tedavi konseptinin geliştirilmesi gelecek için umud vaad edici olabilir.

## 2.1.2. HİDROSEFALİ PATOGENEZİ VE NÖRONAL HASARLANMA MEKANİZMASI

Hidrosefali, intrakraniyal olarak serebrospinal sıvının doldurduğu boşluklar ve büyük ölçüde serebral ventriküllerin genişlemesi olarak tanımlanabilir (39). Serebrospinal sıvının büyük bir bölümü koroid pleksus tarafından yapılırken (40), %20'i kadarı glikolizin bir ürünü olan su ile kan beyin bariyerini geçen suyun birleşiminden meydana gelir (41). Serebrospinal sıvının birçok fonksiyonu vardır. Bunlar beyin metabolizması sonucu oluşan zararlı atıkların temizlenmesi, sinir iletiminden sorumlu faktörlerin transportu ve beynin darbelere karşı korunmasıdır (42). Hidrosefalide periventriküler ak maddedeki küçük damarların kompresyonu ve ependimal dokudaki destrüksiyonun eşlik ettiği primer hasarlanmanın yanı sıra astrosit ve mikroglial hücrelerin proliferasyonu, aksonal gerilme, nöronal bağlantıların azalmasına ve kaybına sebep olan ikinci bir hasarlanma süreci söz konusudur (1,2,3,4). Kademeli ventriküler genişleme ventrikülün daha yuvarlak bir şekil alması ile tolere edilir. Hidrosefali derecesi artıkça yüzey alanı genişlemeye başlar, korpus kallozum eleve olur ve dokulardaki gerilme sinir hücrelerinde harabiyete yol açar. Bu hasarın derecesi, hastanın yaşı, ventrikül genişlemenin boyutu, intrakraniyal basınç, diğer patolojik değişikliklerin eşlik etmesi ve hidrosefalinin süreci ile bağlantılıdır (43-44).

Hayvan çalışmaları, yaşamın erken dönemlerinde hücre proliferasyonu sürecinde ortaya çıkan hidrosefalinin beyin gelişiminde bozukluğa yol açabileceğini göstermektedir (45-46-47). Matürasyonun ileri safhalarında hidrosefali, şant uygulanmasından sonra bir miktar düzelebilecek olan myelinizasyon sürecini geciktirmektedir (48-49-50).

Beyinde meydana gelen hasarın patogenezi birçok faktöre bağlıdır. Genişleyen ventriküller, periventriküler aksonlarda gerilmeye neden olarak hasara yol açar. Hayvan çalışmalarında perivenriküler ak maddedeki kapiller miktarında azalma saptanmıştır (51-52-53). Bu süreç, serebral kan akımında azalmaya neden olur. Azalmış kan akımının kedilerde kortikal glukoz utilizasyonunun artmasına neden olduğu ancak bu süreçte devreye giren aneorobik yolların etkili olduğu gösterilmiştir (48). Kaolin ile oluşturulan hidrosefali modelinde oksidatif stresin protein

nitrozilasyonuna, lipid peroksidasyonuna (54) ve kalsiyum bağımlı proteolitik enzimlerin aktivasyonuna neden olarak aksonların harabiyetine yol açtığı gösterilmiştir (55). Hidrosefalik insanlarda yapılan çalışmalar hipoksik metabolizma ve lipid peroksidasyonu ile ilgili kanıtları desteklemektedir (56-57). Bu moleküler olaylar, kafa travmasında ve inmede görülen süreçle benzerlik göstermektedir. Lokal disfonksiyonun ve azalmış periventriküler kan akımının neden olduğu hasara ek olarak, ekstraselüler sıvı akımındaki değişiklikler de üzerinde durulması gereken bir mekanizmadır. Kan beyin bariyerinden uzaklaştırılmayan ve geri dönüştüremeyen metabolik artıklar, BOS sirkülasyonu ile uzaklaştırılacağı ventriküllere doğru akar (42). Hidrosefalik sıçan ve farelerde gri cevherin ekstraselüler kompartmanının basıya uğradığı (58-59) ve ekstraselüler sıvı akımının azaldığı gösterilmiştir (60-61). Sonuç olarak dejenerasyon sonucu oluşan atık ürünler ve nöromodülatör ajanlar beyin omurilik sıvısı içerisinde ve beyin dokusu içerisinde birikir (56-62). Bu sıvının dışarıya çıkışındaki dengesizlik, nöronların fonksiyonlarında bozukluğa yol açarak ekstraselüler çevrenin bozulmasına yol açar.

Bir diğer patolojik mekanizma ise beyin metabolizmasında meydana gelen değişikliklerdir. Da Silva ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada yenidoğan hidrosefalisi bulunan deneklerin manyetik rezonans spektroskopisi ile enerji indeksleri hesaplanmış ve kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı farklılıklar saptanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda fosfokreatin /inorganik fosfat oranı azalmış, inorganik fosfat/ ATP oranı ise artmış olarak saptanmıştır ve yüksek enerjili fosfat metabolizması ile ventrikül boyutları arasında anlamlı bir ilişkinin olduğu gösterilmiştir (63).

### 2.1.3. EKSİTOTOKSİSİTE

Glutamat bütün hücrelerde bol miktarda bulunan ve santral sinir sisteminde temel eksitator nörotransmitter olarak görev alan esansiyel bir aminoasittir (64). Glutamat presinaptik hücrelerde düzenlenir. Glutamatın fazla miktarda salınımı nörotoksiktir ve bu nedenle miktarının düzenlenmesi çok önemlidir. Bu yüzden nöronların membranlarında ve glial hücrelerdeki sinaptik aralıklarda fazla miktardaki glutamati ortamdaki uzaklaştırmak için taşıyıcılar bulunur. Glutamat presinaptik

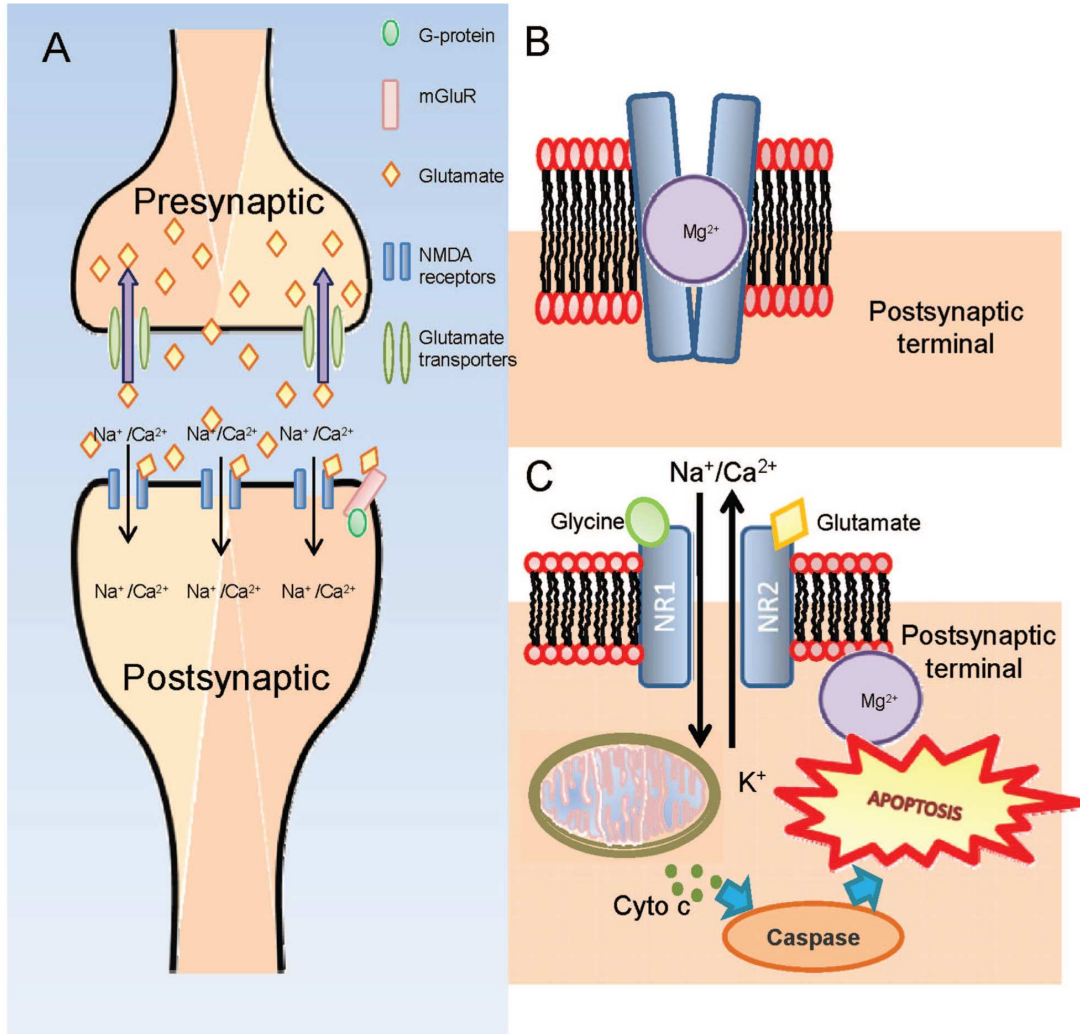
aralıktan sinir hücresinin uyarılması ile salınır ve postsinaptik terminaldeki NMDA reseptörüne bağlanır (Resim 1). Bu,  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Ca}^{++}$  iyonlarının hücre içine akımını sağlar. Artmış  $\text{Ca}^{++}$  iyonu; hücredeki endonükleaz, proteaz ve lipaz gibi enzimlerin aktivasyonuna yol açarak apoptotik süreci hızlandırır. Hücre içinde biriken  $\text{Ca}^{++}$  iyonları aynı zamanda mitokondriyal membranı geçerek mitokondrilerin içinde yüksek konsantrasyonlara ulaşır ve serbest oksijen radikallerinin oluşumuna, kaspaz enzimlerinin aktivasyonuna ve apoptozu tetikleyen faktörlerin oluşumuna neden olur (65). Artmış nitrik oksit sentaz (NOS) enzim aktivitesi eksitotoksik hücre ölümü ile ilişkilidir. Bu enzimin nöronal bir izoformu fiziksel olarak NMDA reseptörüne bağlıdır ve reseptör ile aktive edilen iyon kanalları vasıtasıyla hücre içine giren fazla miktardaki  $\text{Ca}^{++}$  iyonu tarafından aktive edilir. Artmış NOS aktivitesi inme ve birkaç nörodejeneratif hastalıkta da artmış olarak saptanmıştır (55). Eksitotoksikite fazla miktardaki glutamatın apoptoz yoluyla( programlı hücre ölümü ) hücrelerin ölümüne yol açması şeklinde açıklanabilir (66,67,68). Hücre apoptoz sürecine girerse ölmekte olan hücreden intraselüler glutamat salınır ve komşu hücrelere yayılarak sekonder dejenerasyona neden olur ve uzaktaki hücrelerin de ölümüne neden olan eksitotoksikite basamaklarının tetiğini çeker (69,70,71,72).

Eksitotoksikitenin mekanizmaları yoğun bir şekilde araştırılmıştır. Birkaç glutamat reseptörü saptanmıştır. Bunlar ionotropik (NMDA, Kainat, alfa amino-3 -hidroksi-5-metil-4-isoksazolepropionik asit (AMPA)) ve metabotropik reseptörlerdir. Bu reseptörlerin etkilerinin engellenmesi nörodejenerasyonun ve hücre ölümünün engellenmesine yardımcı olabilir ( 73).

Postsinaptik NMDA reseptörleri, iki NR1 ve iki NR2 reseptör alt unitelerinden oluşan heteromerik yapıda reseptörlerdir (74). Glutamat NR1 alt unitesindeki hedef hücreye bağlanırken koagonist olan glisin NR2 alt unitesindeki hedef bölgesine bağlanır. Normal fizyolojik koşullarda glutamat reseptöre bağlandıktan sonra reseptörün yapısında bir değişim meydana gelir ve bunun sonucunda kanalı kapalı tutan  $\text{Mg}^{2+}$  serbest kalır (75). Kanalin açılması  $\text{Ca}^{++}$  ve  $\text{Na}^+$  gibi ekstraselüler iyonların hücre içine girmesine neden olur (76,77,78,79). Patolojik durumlarda fazla miktardaki glutamat kanalın uzun süre açık kalmasına sebep olur ki bunun sonucunda serbest radikallerin oluşmasına ve apoptozun başlamasına neden olur. Glutamat geri emiliminde bir bozulma olduğu zaman sadece uzamış sinaptik transmisyon olmaz, aynı zamanda nöronal apoptoz ve hücre ölümü meydana gelir.

Glutamat duyusal bilgileri ve motor emirleri vücudun bir yerinden başka bir yerine taşımak, düşünceyi ve hafızayı oluşturmak için gerekli bir nörotransmitterdir (80). Beyinde başka eksitator nörotransmitterler de vardır ancak glutamat en yaygın olanıdır. Birçok nöron yüksek konsantrasyonda glutamat içerir (10mM) (81). Sinaptik veziküllerden sekrete edildikten sonra glutamat çok kısa bir süreliğine serbestleşir ve sinaptik sonlanmalar vasıtasıyla diğer nöronlarla bağlantı kurar. Glutamat çok güçlü bir eksitator nörotransmitter olmasından ötürü yüksek konsantrasyonlarda ve uzun zaman diliminde bulunması hücre ölümünü harekete geçirir.

Birçok hasar glutamatın aşırı miktarda salınımına neden olur ve eksitotoksik hücre ölümünü başlatır. Santral sinir sistemi mekanik bir hasara maruz kaldığında hasarlı hücrelerden yüksek miktarda glutamat salgılanır. Bu yüksek miktardaki glutamat hayatta kalmayı başaran komşu hücrelerin depolarize olmasına, şişmesine, lizisine ve ölümüne neden olur. Etkilinen bu hücreler bol miktarda glutamat salgılar ve otodestruktif olayların başlamasını tetikleyen kaskadın oluşmasına neden olur. Aynı fenomen iskemik olaylarda da meydana gelir. İskemik süreçte nöronlar iyonik hemostazı sağlamak için gerekli enerjiden yoksun kalır ve yine travmada görülen olaylara benzer şekilde depolarize olur, şişer ve apoptoza giderler (81,82).



**Resim 1: Glutamat aracılı eksitotoksiste mekanizması**

**1A:** Sinirin uyarılması ile oluşan eksitasyonda glutamat presinaptik terminalden sinaptik aralığa, postsinaptik terminaldeki NMDA reseptörlerine bağlanmak üzere salınır. **1B:** Glutamat ve Glisin reseptörlere bağlandıktan sonra meydana gelen etkileşim kanala bağlı bulunan ve kanalı bloke eden Mg<sup>2+</sup>'nin serbestleşmesine neden olur. Kanalın açılması Ca<sup>++</sup> ve Na<sup>+</sup> gibi ekstraselüler iyonik moleküllerin kanaldan hücre içine diffüzyonuna neden olur. Normal fizyolojik koşullarda NMDA reseptörleri kapalıdır ve sinir uyarısının oluşması için kısa süreliğine açılır. **1C:** Fazla miktarda glutamat ortamda bulunduğu zaman kanal açık kalır ve mitokondriyal membran potansiyalinin depolarizasyonu ile sonuçlanan Ca<sup>++</sup> ve Na<sup>+</sup> iyonlarının hücre içine akımına neden olur. Bu gibi durumlar aynı zamanda apoptoza yol açan kaspaz yollarının aktivasyonuna neden olan Sitokrom C 'nin salınımına yol açar.(64)



#### 2.1.4. HİDROSEFALİDE KORTEKS NÖRONAL YAPISININ ETKİLENMESİ

Hidrocefali progresyonu sırasında iskemiye duyarlı bölgelerde daha çok değişiklik olduğu saptanmıştır. Bu alanlardan bir tanesi de hipokampal piramidal katmandır (83). Nörönel dejenerasyonun bir başka göstergesi de nörofilament aktivitesindeki azalmadır ( 84).

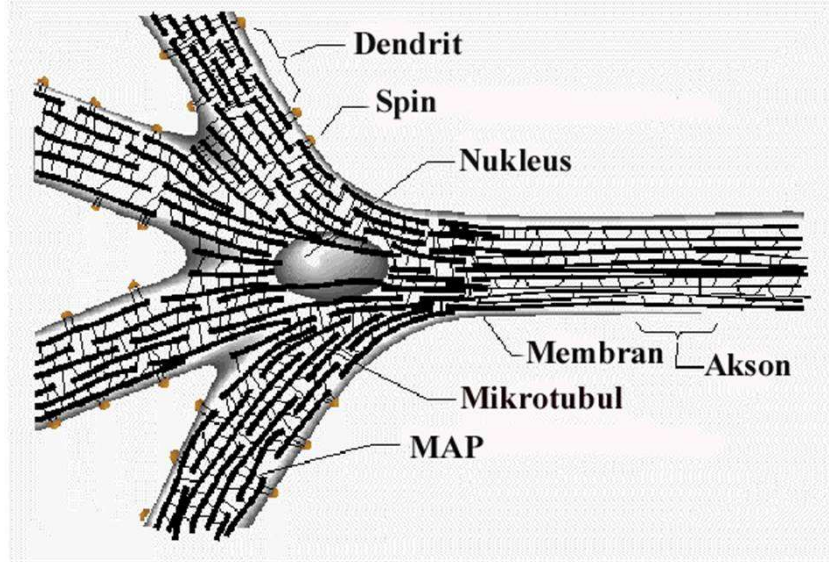
Yapılan araşırmalarda nöronların dendritlerinde sayıca azalma saptanmıştır. Korteks piramidal katman nöronlarının baziler dendritik yapısında dallama sayısının azaldığı gözlenmiştir. Bu hasar alkol alımı ve yaşlanmada meydana gelen hasarla aynı özellikler göstermektedir ( 85).

Yapılan hayvan çalışmalarında perivenriküler beyaz maddedeki kapiller miktarında azalma saptanmıştır. Bu süreç serebral kan akımında azalmaya neden olur. Serebral kan akımında azalma, artmış Nitrik oksit sentaz (NOS) enzim aktivitesi ile birliktelik gösterir ve bu da eksitotoksik hücre ölümü ile ilişkilidir (86). Bu enzimin nöronal bir izoformu fiziksel olarak NMDA resptörüne bağlıdır ve reseptör ile aktive edilen iyon kanalları vasıtasıyla hücre içine giren fazla miktardaki  $Ca^{++}$  iyonu tarafından aktive edilir. Artmış NOS aktivitesi inme ve birkaç nörodejeneratif hastalıkta da artmış olarak saptanmıştır (87). NOS enzimi eksitotoksik hasarda önemli bir rol oynar ve hidrocefalide artmış olarak saptanması kortikal nöronal yapıda eksitotoksik mekanizmaların hidrocefali progresyonu sırasında etkili olduğunu düşündürmektedir.

## 2.2. MAP-2 VE MİKROTUBUL İLİŞKİLİ PROTEİNLER

Hücre iskeleti, mikrofilamentleri, nöroflamentleri ve mikrotubulleri içerir. Bu yapıların her biri üç temel protein tarafından oluşturulur. Bunlar sırasıyla, aktin, nöroflament proteini ve tubulindir. Mikrotübüller gelişim olaylarında gereklidir (88, 89).

Çeşitli hücrelerde mikrotubul polimerizasyonu gerçekleşirken çeşitli aksesuar yapılar mikrotubul yapısına katılır. Bunlardan biri de mikrotubul ilişkili proteinlerdir (microtubule-associated protein – MAP). Mikrotubul ilişkili protein'ler (MAP) iki ana gruba ayrılır. Yapısal MAP'ler ve hareketle ilgili olan MAP'ler (motor proteinler). Tip-1 MAP'ler, MAP-1a ve MAP-1b'dir. Tip-2 MAP'ler; MAP-2a, MAP-2b, MAP-2c ve Tau'dur (90). Yapısal MAP'ler, mikrotubullerin biraraya getirilmesi ve birarada tutulmasını sağlar (88, 90, 91). Mikrotubuller diğer mikrotubullere MAP'ler ile bağlanır ve hücre iskeletinin oluşumuna katılırlar (92). Resim 2'de MAP ve hücre iskelet yapısı ilişkisi görülmektedir.



**Resim 2:** Nöronda mikrotubul ilişkili proteinlerin yerleşimi (93).

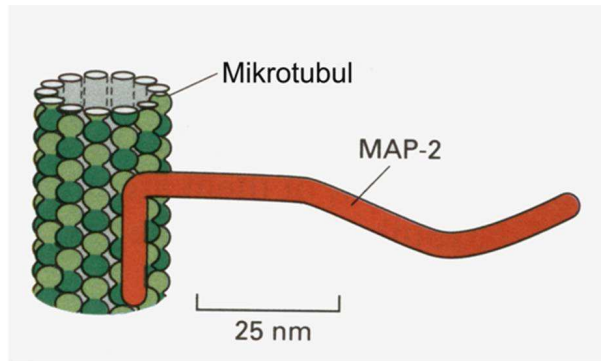
MAP-2, mikrotubulleri birbirine bağlayan bağlayıcı bir protein olup, özellikle perikaryon ve dendritlerde bulunur.

Yapısal MAP'ler ayrıca hücre haberleşmesinde de rol oynarlar. Örneğin MAP-5 (MAP-1b olarak da bilinir) retina sinapslarındaki hücre iskeleti olarak GABA reseptörlerine bağlanır (88). MAP'lerin ikinci grubu olan motor proteinler (dynein veya MAP-1c, kinezinler), mikrotubuller boyunca veziküllerin veya proteinlerin taşınmasından sorumludurlar (88, 92, 94).

Yapısal MAP'ler kendi arasında mikrotubule bağlanan kısmının özelliğine göre ikiye ayrılır. Tip-1 MAP'lerin mikrotubule bağlanan kısmı, birkaç düzensiz olarak yerleşmiş amino asit tekrarlarından oluşur. Tip-1 MAP'ler, MAP-1a ve MAP-1b'dir. Tip-2 MAP'ler polipeptid zincirlerinin C- terminal kısmında, 3 veya 4 kez 18 amino asitlik dizinin tekrarından oluşan kısımlarıyla mikrotubullere bağlanır. Tip-2 MAP'ler; MAP-2a, MAP-2b, MAP-2c ve Tau'dur (90).

Nörona ait MAP'ler, MAP-1, MAP-2 ve Tau'dur. MAP-4 ise, nörona ait olmayan MAP'dir (95, 96). Nörona ait MAP'ler nöronda değişik şekilde dağılmışlardır. MAP-2, yalnız perikaryon (nöron gövdesi) ve dendritlerde bulunurken, Tau başlıca aksonlarda bulunur (88, 91, 97, 98). Diğer MAP'ler, MAP-1 (MAP-1a olarak da adlandırılır) ve MAP-5 nöronun tüm kısımlarında bulunurlar (88). MAP-2c daha çok gelişen beyinde fazla miktarlarda bulunurken, erişkin beyinde de önemli miktarlarda saptanmıştır (99).

MAP-2, mikrotubulleri birbirine bağlayan bağlayıcı bir protein olup, özellikle perikaryon ve dendritlerde bulunur (88,100). Resim 3'de MAP-2'nin mikrotübül sistemine bağlantı ilişkisi gösterilmiştir.

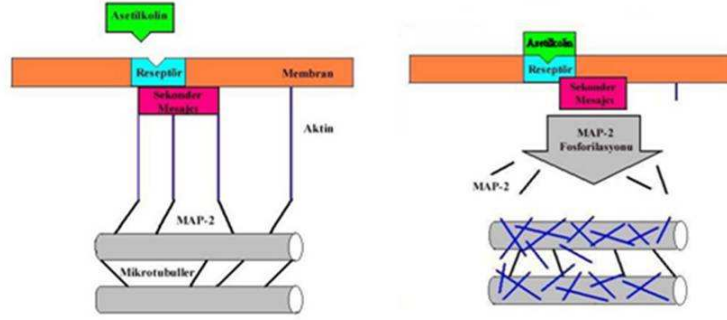


**Resim 3:** MAP-2'nin mikrotübül ilişkili protein yapısı (93).

MAP-2 aracılığıyla dendritlerde yeniden gerçekleşen yapısal düzenlenme, öğrenme olaylarına ve daha sonra bu olaylarla ilgili bilinç olaylarına eşlik eder (100).

Sitoiskeleti düzenleyen biyokimyasal enerji en az iki yolla sağlanır. Mikrotubullerdeki tubuline bağlı GTP' nin GDP'ye çevrilmesi MAP' lerin fosforilasyonu ile sağlanır (93). Asetilkolin, MAP-2' nin fosforilasyonunu arttıran, sinyal iletim yollarını uyarması nedeniyle bilinçli olayların işlevinde önemli bir rol oynar (100). Uzun süreli potansiyalizasyon (LTP), memeli hipokampusunda öğrenme ve hafıza olaylarında görev gören, bir sinaptik plastisite (yenilenme) şeklidir. LTP, MAP-2'ye ihtiyaç duyar. MAP-2'nin fosforilasyonu ve defosforilasyonu, beynin büyük miktarda biyokimyasal enerji tüketimine neden olur (93).

Asetilkolin, metabotropik muskarinik reseptör sayesinde etki göstererek, protein kinaz C (PKC) ve CAMK II adlı iki protein kinazı geri dönüşlü olarak aktive eden, fosfoinositid-spesifik fosfolipaz C (PI-PLC) denilen sekonder mesajcıyı aktive eder. Aktive olan protein kinazlar daha sonra MAP-2 molekülü üzerindeki özel kısımlara fosforil grupları ekler (101, 102). Serotonin, norepinefrin, glutamat ve histamin de kendi metabotropik reseptörleri sayesinde PI-PLC yi aktive ederek, MAP-2' nin fosforilasyonunu sağlarlar da asetilkolinden daha az etkilidirler. MAP-2'nin fosforilasyonu mikrotubullerden ve aktinden MAP-2 bağımlı koparır. Mikrotubuller, membrandan ve çevreden izole edilmiş olur. PI-PLC' nin aktive olması da aktin moleküllerini nöron membranından direkt olarak izole eder ve izole olan mikrotubuller de aktin jel içine gömülür (102). Asetilkolinin nöron membranına bağlanmasıyla gelişen olayların şematik şekli Resim 4'de gösterilmiştir.



**Resim 4:** Asetilkolin nörotransmitterinin membrana bağlanmasıyla gelişen olayların şematik şekli (102).

MAP-2 proteininin nöritogenezis, sinaps oluşumu, öğrenme ve hafıza olayları sırasında dendritlerin yeniden yapılanmasında görev alan oldukça önemli bir beyin proteini olduğu bilinmektedir (91, 99, 103). MAP-2'nin beyinde çeşitli izoformları mevcuttur. MAP-2a ve MAP-2b yüksek molekül ağırlıklı (sırasıyla 280 kD ve 270 kD), MAP-2c ve MAP-2d ise düşük moleküler ağırlıklıdır (sırasıyla 70 kD ve 75 kD) (91, 103, 104). MAP-2b erken ve ileri doğum sonrası gelişim sırasında (sinir sistemi gelişimi boyunca) görülür. MAP-2a, doğum sonrası gelişimin yalnızca ileri evresinde görülür (örneğin sıçanda doğum sonrası 10-20 günleri arasında) (91). MAP-2c, birçok beyin bölgesinde gelişimin erken dönemlerinde görülmekle beraber yaşam boyunca nörit oluşumunun devam ettiği birkaç beyin bölgesinde (olfaktor bulb, retina ve hipokampus) yüksek miktarlarda üretilmeye devam eder (99). MAP-2c, dendrit büyümesi ve sinaps oluşumu gibi özel fonksiyonlara sahiptir (104).

MAP-2, öğrenme ve hafıza olayları sırasında dendritlerin yapısal organizasyonundaki değişikliklerde oldukça önemli bir beyin proteindir (103). Erişkinde ve neonatal kemirgen beyninde MAP gibi sitoskelet proteinlerindeki değişiklikler travma, iskemik beyin hasarı ve nörotoksik maddelere cevapta oluşan ilk hücre içi yapısal olaylardan biri olarak bilinir. MAP dağılımı, doğum öncesi in vivo

çalışmalarda kullanıldığı gibi, kemirgen ve tavuk gibi hayvanlarda doğumdan sonra beyin gelişimi takibi için de kullanılmaktadır (105).

Bu çalışmada, hidrosefalik sürecin frontal korteks nöronal yapısını ve özellikle de dendritik organizasyonunu nasıl etkilediğini ortaya koymada MAP-2 proteininin analizi en uygun yöntem olarak tercih edilmiştir.

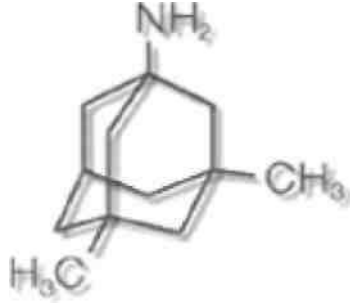
### 2.3. HİDROSEFALİDE NÖROPROTEKTİF TEDAVİ YAKLAŞIMLARI

Muhtelif laboratuar çalışmalarında nöron koruyucu maddelerin nöronal hasar öncesi veya hasar sonrası kullanımının olumlu sonuçlara yol açtığı gösterilmiştir (106, 107, 108). Hidrosefalide nöron hasarının nedeni yalnızca primer mekanik yaralanma olmayıp ikincil hasarlanma ve iskemik süreç de olaya katkıda bulunmaktadır(1). Kaolin ile indüklenen hidrosefalik sıçan modelinde Mangnezyum sülfat terapisinin astroglial reaksiyonu azalttığı, gaita inkontinensinde düzelme ve hafıza performansında önemli bir iyileşme sağladığı gösterilmiştir (109). Sonuçta hidrosefali tedavisinde, cerrahiye ek olarak nöronal hasarı engellemek için erken dönemde nöron koruyucu ajanların tedaviye eklenmesinin yararlı olacağı düşünülebilir.

Bu çalışmada da memantin nöron koruyucu etkisini araştırmak için deneysel olarak hidrosefali oluşturulmasından sonra erken dönemde memantin uygulanmıştır.

### 2.4. MEMANTİN

Memantin ilk olarak Eli Lilly tarafından sentezlenmiştir ve 1968 'de patenti alındıktan sonra Merck indeksinde anti-influenza ajanı olan amantadine türevi olarak yayımlanmıştır. Memantin 3 halkalı bir yapısı vardır. Yapısındaki –NH<sub>3</sub> fizyolojik koşullarda pozitif yüklüdür. Kimyasal adı 1-amino-3-dimetil admantan hidroklorid olan memantin bir admantan türevidir. Kimyasal şekli Resim 5'te gösterilmiştir.



**Resim 5:** Memantinin moleküler yapısı (118)

Memantin yapısındaki fizyolojik koşullarda pozitif yüklü NH<sub>3</sub> gurubu NMDA reseptör ilişkili kanaldaki mangnezyumun bağlandığı bölgenin yanına bağlanır (110-111). Amantadinin aksine memantin, kanala bağlı kalma süresini uzatan 2 adet metil gurubuna sahiptir (ayrılma zamanını yavaşlatır ve reseptöre olan afinitesini artırır). Tesadüfen influenza nedeniyle amantadine alan bir parkinson hastasında semptomların düzeldiğinin görülmesi bu bileşiklerin dopaminerjik veya anitikolinerjik ilaçlar olduğu düşüncesinin ortaya atılmasına neden olmuştur. Daha sonra yapılan çalışmalarda memantin antikolinerjik bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. 1989 yılında Borrmann, memantin embriyonik fare spinalkord nöronlarında NMDA blokajı yaptığını bildirmiştir (112). Daha sonraki yıllarda düşük konsantrasyonlarda da etkili olduğu ve açık kanal blokajı mekanizmasıyla da NMDA indüksiyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (113,114).

Memantin gastrointestinal sistemden tam olarak emilmekte ve doruk plazma konsantrasyonuna 6-8 saat sonra ulaşmaktadır. Tekrarlayan uygulamalarla plazma kararlı durum konsantrasyonuna 21 günde ulaşmaktadır. Denekler üzerinde yapılan çalışmalarda 10-40 mg dozlarında lineer farmokokinetik etki göstermektedir (115). % 42-45 oranında proteine bağlanmaktadır. Kan beyin engelini geçmektedir. İnsanda ana metabolitleri N-3,5 dimetil-gludantan, 4- ve 6-hidroksi memantin'in izomerik karışımı ve 1-nitroso-3,5-dimetil admantandır. Bu metabolitlerin hiçbiri NMDA reseptörü için antagonistik etki göstermemektedir. CYP450 enzim sistemini bozmaz veya indüklemeyebilir. Büyük çoğunluğu böbreklerden değişmeden atılmaktadır. Eliminasyon yarılanma ömrü 60-100 saattir. Memantin tedavisi ile ilişkili en sık görülen istenmeyen ilaç reaksiyonları vertigo, huzursuzluk, hipereksitasyon ve yorgunluk olmuştur (116).

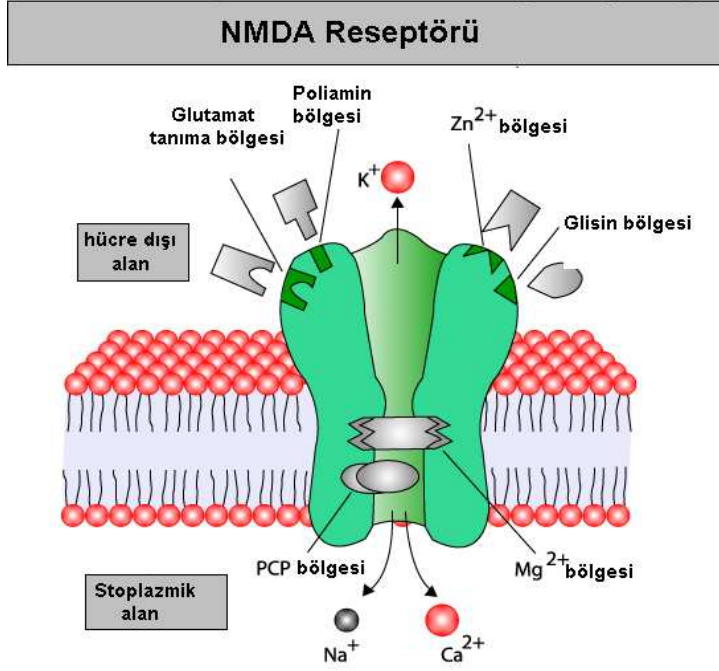
Memantin, güçlü voltaj-bağımlılığı, hızlı açma/kapama kinetiği ve orta derecede afiniteye sahip kompetitif olmayan N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistidir (117, 118). Yapılan çalışmalar memantin NMDA reseptöründe iyon kanalı içinde  $Mg^{2+}$ 'un bağlandığı bölgeye veya bu bağlanma bölgesinin yakınında bir bölgeye bağlanarak etki ettiğini göstermiştir (119). NMDA reseptör yapısı Resim 6'da gösterilmiştir.

Normal sinaptik aktivite gerçekleşirken NMDA içerisindeki kanal sadece bir kaç milisaniye açık kalır ve bu durumda memantin kanal içerisine girip bağlanamaz, böylece sinaptik aktivite bozulmadan devam eder. Ancak reseptörün aktivasyon süresinin uzadığı durumlarda (eksitotoksisite de olduğu gibi) memantin kanal içine girip bağlanarak etki göstermektedir. Bu özelliğinden dolayı normal sinaptik iletimi ve LTP' yi (uzun süreli potansiyalizasyon) olumsuz yönde etkilemez.(80)

Tavşanda oluşturulan optik sinir iskemisi modelinde 1mg/kg/gün dozunda tek sefer intramüsküler olarak uygulanan sistemik memantin etkin bir nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir (120). Bu çalışmada da tavşanlarda nöroprotektif etki göstermiş olduğu bildirilen aynı doz ( 1mg/kg/gün İM 1X1) tercih edilmiştir.

Memantin nöroprotektif etkisi son çalışmalarda, hayvan modellerinde optik sinir iskemisi ( 120), spinal kord iskemisi (121), retinal iskemi (122), invitro glutamat nedenli nöronal ölümdede (123) gösterilmiştir. Memantin hidrosefali sürecindeki nöron koruyucu etkisi konusunda henüz yapılmış bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.





**Resim 6.** NMDA reseptörünün yapısı (118)

Travma, multipl skleroz, hipoksik iskemik beyin hasarları, epilepsi, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, HIV ile ilişkili demans, amiyotropik lateral skleroz, Huntington Koresi gibi nörodejeneratif hastalıklar farklı mekanizmalarla oluşsalar da neticede NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılması ile nöron dejenerasyonuna neden olan benzer bir yol izlerler. Bu patolojik durumlarda, açık olan NMDA reseptörlerine bağlanıp inaktive edebilme potansiyelinden dolayı memantinin iyi bir tedavi seçeneği olabileceği düşünülmüştür. Memantinin normal sinaptik aktiviteyi ve LTP'yi olumsuz yönde etkilememesi, deney hayvanları ile yapılan bazı çalışmalarda ise LTP süresini uzattığının bildirilmesi ( 124, 125, 126), reseptöre bağlanma ve ayrılma kinetiğinin hızlı olması klinik olarak kullanılabilme potansiyelini artırmaktadır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışmada; hidrosefali indüksiyonu ve enjeksiyonlar Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıbbi Araştırma Birimi (DETAB)'nde yapılmıştır. Deneklerin postoperatif bakımı, takibi, deneklerin sakrifikasyonu, beyinlerin çıkartılması aynı merkezde gerçekleştirilmiştir. Histopatolojik – immünohistolojik analiz ve ölçümler, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışma Helsinki Bildirgesi'nde deneysel araştırmalarda belirtilmiş olan esaslara uygun olarak yürütülmüştür.

#### 3.1. DENEKLER

Çalışmada toplam 22 adet genç erişkin erkek New Zeland türü tavşan kullanıldı. Deneklerin ortalama ağırlığı  $3000 \pm 190$  gram olarak hesaplandı. Denekler, Kocaeli Üniversitesi DETAB ünitesindeki standart kafeslerde 2'li gruplar halinde, ad libidum standart yem ve su verilerek, ısısı ( $21 \pm 2$  °C) ve nem oranı kontrollü odalarda barındırıldı.

Denekler, hidrosefali indüksiyonu uygulanan (8 adet denek), hidrosefali indüksiyonu sonrası sistemik memantin verilen (8 adet denek) ve kontrol grubu (K) denekleri (6 adet denek) olarak üç gruba ayrıldı. Hidrosefali indüksiyonu işleminde, ve iki haftalık izlem sürecinde komplikasyon oluşan veya ikinci hafta sonundaki manyetik rezonans görüntüleme incelemesinde hidrosefali gelişmemiş olan toplam 3 adet denek (hidrosefali grubundan 1 adet, memantin uygulanan hidrosefali grubundan 2 adet denek) deney protokolünden çıkartıldı. Deneysel çalışmanın sonunda bulguların değerlendirildiği toplam 19 adet denek şu şekilde gruplandı:

1. Kontrol Grubu (K): Hidrosefali indüksiyonu yapılmamış olan grup (6 adet denek).
2. Hidrosefali Grubu (H): Hidrosefali oluşturulmuş, ancak memantin yerine serum fizyolojik verilmiş grup (7 adet denek).
3. Memantin Grubu (M): Hidrosefali oluşturulmuş ve memantin verilmiş grup (6 adet denek).

### 3.2. DENEYSEL HİDROSEFALİ MODELİ

Denekler, 20 mg/kg ketamin (Ketalar ® ,Parke-Davis) + 5 mg/kg xylazin (Rompun ® ,Bayer) intramüsküler ile oluşturulan anestezi altında oksipito-servikal bölge tıraşını takiben cerrahi alan %10 polyvinylpyrrolidone iod (Batticon Solüsyon ® ,Adeka) ile iyice temizlenip silindikten sonra, oksiput-C2 arası lineer vertikal insizyon ile cilt açıldı. DETAB deney hayvanları ameliyat mikroskobu kullanılarak, büyütme altında oksipital ve servikal paravertebral adele grubu orta hattan her iki kenara doğru disseke edildikten sonra atlanto-oksipital membran identifiye edildi (Resim 7, Resim 8, Resim 9). 27 G insülin enjektörü ile sisterna magnaya girilerek BOS gelişi kontrol edildikten sonra, önce yaklaşık 0.25 ml. BOS aspire edilip ardından aynı miktarda (0.25 ml) steril Kaolin (Kaolin Hydrated Aluminum Silicate K-7375, Sigma Chemical Co.) süspansiyonu (250 mg/ml -%0.09 NaCl ) sisterna magnadan içeriye 2 dakikalık sürede yavaş enjeksiyon şeklinde verilerek hidrosefali indüksiyonu işlemi yapıldı (Resim 10, Resim 11). Enjeksiyon ile birlikte atlanto-oksipital subaraknoidal bölgenin beyaz renkte opaklaşmaya başlaması ve iğnenin çıkartılmasından sonra ponksiyon yerinden küçük bir miktar BOS ile karışık kaolin süspansiyonunun geldiğinin görülmesi, kaolinin doğru yere verildiğinin göstergesi olarak kabul edildi. Kontrol grubunda atlantooksipital membran identifiye edildikten sonra aspire edilen 0.25 ml BOS, tekrar geri enjekte edildi (sham operasyonu). Enjeksiyon işlemlerini takiben, atlanto-oksipital membran üzerine steril gelfoam parçası yerleştirildikten sonra, paravertebral ve oksipital adele grubu ve ardından cilt separe dikişler ile anatomik katlara uygun bir şekilde kapatıldı (Resim 12). Hidrosefali indüksiyonu ve sham operasyonlarını takiben denekler 2 haftalık süre boyunca takip edildiler. İki haftalık sürenin sonucunda deneklere kraniyal manyetik rezonans görüntüleme yapılarak ventriküler sistemdeki genişleme kontrol edildi. MR inceleme için Philips Intera 1.5 Tesla MR cihazında C3 koil sirküler yüzeyi kullanılarak görüntüler elde edildi (Resim 13). Aynı düzeyden geçen koronal kesitler karşılaştırılarak ventriküler dilatasyon verifiye edildi.

Denekler, manyetik rezonans görüntüleme incelemesi sonrasında sakrifiye edilerek tüm beyin servikomeduller bileşkedен itibaren bütünüyle çıkartıldı. Hidrosefali indüksiyonu gerçekleşmiş olan deneklerin çıkartılan beyin spesimenlerde sisterna magna superior serebellar sistern ve tüm bazal sisternalar yüzeyinde yaygın

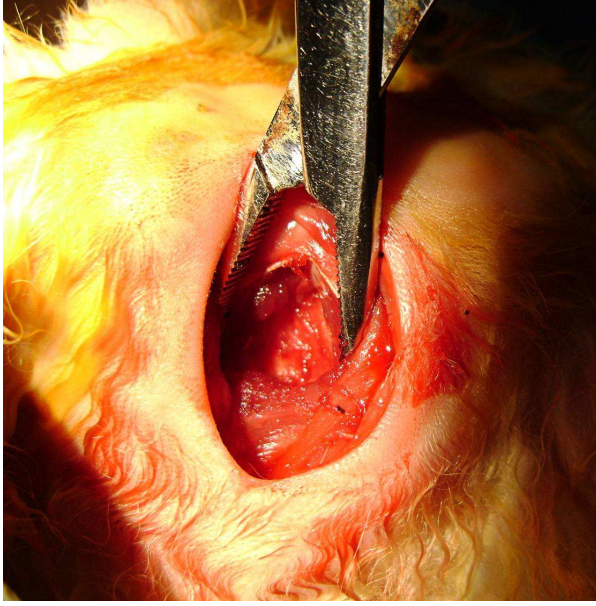
dağılmış kaolin depozitleri izlendi (Resim 14). Çıkartılan serebrumlardan frontal korteks bölgeleri ayrı olarak kodlanmış steril kaplar içerisinde, yapılacak histolojik ve immünohistokimyasal çalışmalar için Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı' na ulaştırıldı. Histolojik ve histokimyasal analiz için, örnekler tek kör çalışma prensibi çerçevesinde kodlar saklı tutularak teslim edildi.



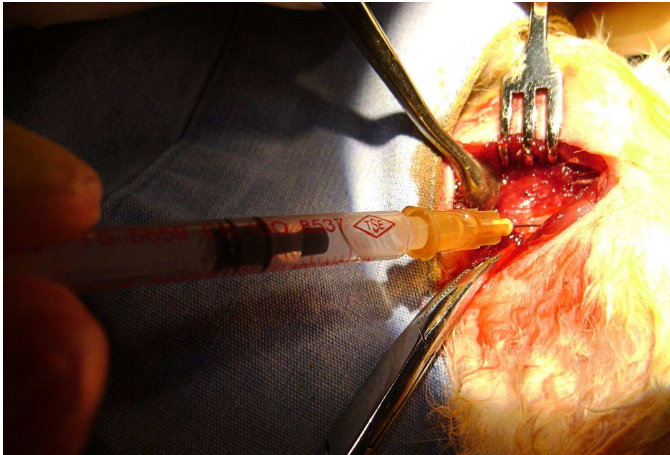
**Resim 7:** New Zeland türü tavşan anestezi verildikten sonra, cerrahi pozisyonu ve cerrahi işlem seti ile ameliyat mikroskobu görülüyor.



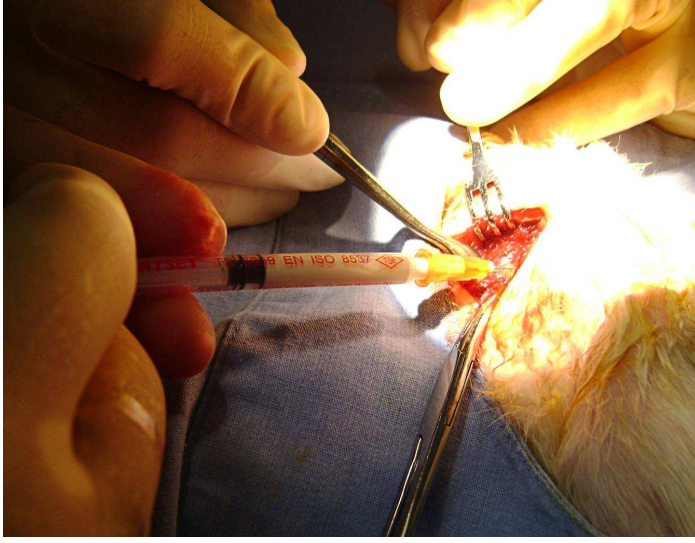
**Resim 8:** Oksipito-servikal bölgenin traşlanıp, %10 polivinylpyrolidone iod ile silinerek hazırlanması.



**Resim 9:** Oksiput-C2 arası lineer vertikal insizyon ile cilt açıldıktan sonra ameliyat mikroskobu kullanılarak, büyütme altında oksipital ve servikal paravertebral adele grubunun orta hattın her iki kenara doğru disseke edilmesi ve atlanto-oksipital membranın ortaya konulması.



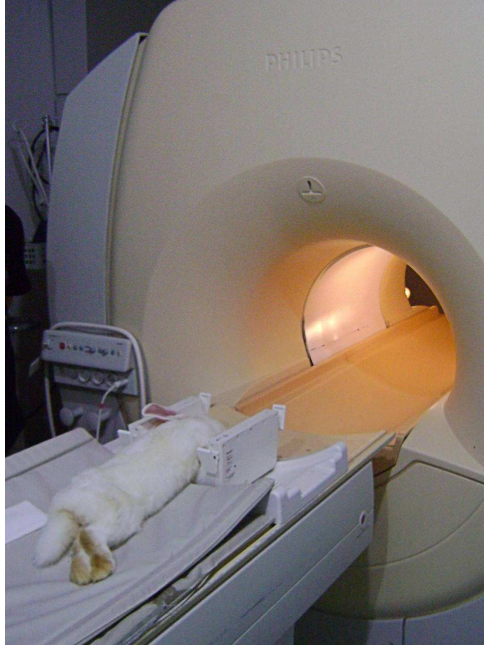
**Resim 10:** 27 G insülin enjektörü ile atlanto-oksipital membrandan sisterna magna girilerek BOS gelişi kontrol edildikten sonra, 0.25 ml BOS'nın aspire edilmesi.



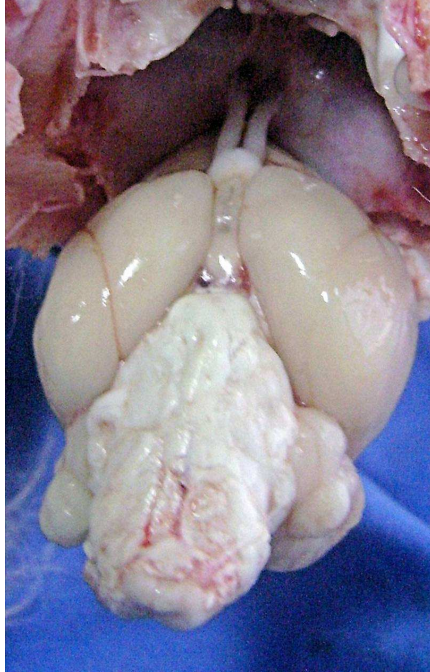
**Resim 11:** 27 G insülin enjektörü ile sisterna magnaya girilerek BOS'nın aspire edilmesinin ardından 0.25 ml steril Kaolin süspansiyonunun sisterna magna içerisine verilerek hidrosefali indüksiyonu yapılması.



**Resim 12:** Paravertebral ve oksipital adele grubunun separe dikişler ile anatomik katlara uygun bir şekilde kapatılması.



**Resim 13:** Hidrosefali indüksiyonu ve sham cerrahisinden iki hafta sonra deneklerin kraniyal MR görüntülemeleri Philips Intera 1.5 Tesla MR cihazı (Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji Anabilim Dalı) kullanılarak yapıldı.



**Resim 14:** Hidrosefali indüksiyonu yapılmış olan deneklerin çıkartılan beyin spesimenlerinde gros morfolojik olarak izlenen bazal sisternalar yüzeyinde yaygın dağılmış kaolin depozitleri.

### 3.3. MEMANTİN UYGULAMASI

Memantin Grubuna (M) , hidrosefali indüksiyonu sonrası 2 hafta boyunca günde tek doz 1 mg/kg/gün memantin distile su ile çözelti halinde (Ebixa® saf etken madde; Lundbeck İlaç Tic.Ltd. Şti.) intramüsküler yoldan enjeksiyon ile verildi.

Hidrosefali Grubuna (H), ise hidrosefali indüksiyonu sonrası 2 hafta boyunca günde tek sefer serum fizyolojik (plasebo) intramüsküler yoldan enjeksiyon ile verildi.

### 3.4. MAP-2 (MICROTUBULE ASSOCIATED PROTEIN-2) İMMÜNHİSTOKİMYA BOYAMA İLE FRONTAL KORTEKS NÖRONLARININ İŞARETLENMESİ

Doku kesitleri deparafinize ve rehidrate edildi. Kesitlerin boyanmasında mouse ABC Staining sistem (Santa Cruz Biotechnology, Inc. sc-2017) kullanıldı. Kesitler non spesifik endojen peroksidaz arkafon boyanmasını engellemek amacıyla 5 dakika % 0.1–1 hidrojen peroksidaz blok solusyonuyla inkübe edildi. Fosfat tamponuyla yıkanıp, 10 dk sitrat tamponunda mikrodalgada antijen retrieval işlemi yapıldı. Fosfat tamponuyla yıkanıp, nonspesifik arkafon boyanmasını engellemek amacıyla oda sıcaklığında 1.5% Blok serum solusyonu uygulandı. Daha sonra MAP2-[SMI-52] (ab28032) primer antikoru (abcam) uygulanarak 1 gece +4 C de bekletildi. Kesitler fosfat tamponuyla yıkandıktan sonra 30 dk biyotinli sekonder antikor ile muamele edildi. Kesitler fosfat tamponuyla yıkanıp 30 dk AB enzim reagent ile inkübe edildi. Kesitler fosfat tamponuyla yıkandıktan sonra 3-Amino-9-ethylcarbazole (AEC) kromojeniyle boyanıp, sıvı bazlı kapatma solusyonuyla kapatılarak, Olympus ışık mikroskopunda incelenip, fotoğraflandı.

Her denekten alınan 6 korteks kesitinde (3 sağ ve 3 sol hemisferden), 100x100 µm<sup>2</sup> lik 6 alanda, MAP-2 pozitif boyanmış nöronlar sayılarak, her denek için ortalama bir değer kaydedildi.



### 3.5. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Tüm istatistiksel analizler, “Windows XP Professional” işletim sistemi altında “SPSS for Microsoft Windows (version 17)” programı kullanılarak yapıldı.

MAP2 pozitif nöron sayılarının gruplar arası karşılaştırmalarında çoklu varyans analizi (One-Way ANOVA) testi; grupların kendi aralarındaki karşılaştırılmasında ise post hoc değerlendirme (Tukey testi) kullanıldı.

İstatistiksel anlamlılık sınırı  $p < 0,05$  olarak kabul edildi.

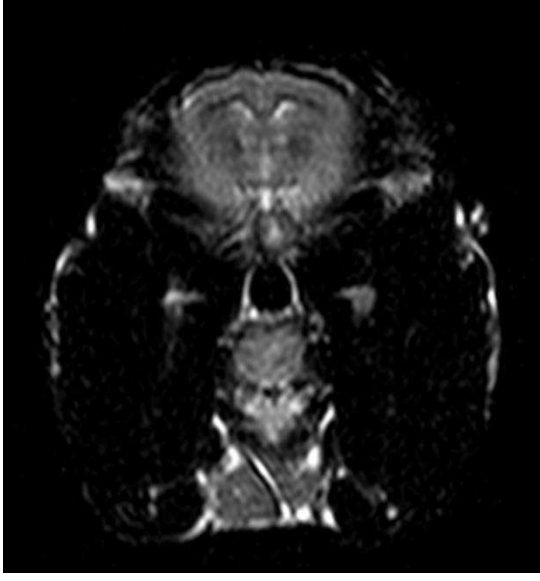
## 4. BULGULAR

### 4.1. HİDROSEFALİK SÜRECE AİT GÖZLEMLER

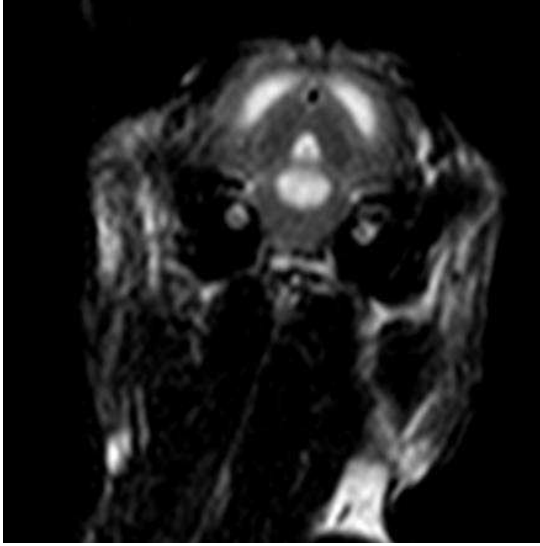
Hidrocefali indüksiyonundan yaklaşık 3-4 gün sonra deneklerde oluşan ilk değişiklikler birçok araştırmada da gözlemlendiği gibi deneklerin su ve yiyecek alımlarının azalması ve buna bağlı kilo kaybı, dış uyaranlara aşırı ya da geç yanıt verme şeklinde idi. Daha ileri dönemlerde letarji, ekstensor rijiditesi veya spastisite şeklinde bulguların çıktığı gözlemlendi.

### 4.2. HİDROSEFALİK SÜRECİN RADYOLOJİK KONTROLÜ

Kaolin ile hidrocefali indüksiyonu amaçlanan 16 adet deney hayvanının 15 tanesine ve 6 adet kontrol grubu (sham operasyon) deneğe, cerrahi işlemden 2 hafta sonra (postoperatif 15. günde) kraniyal manyetik rezonans görüntüleme incelemesi yapıldı. MR görüntüleme incelemesi sonrasında hidrocefali gelişmediği saptanan 2 adet denek, deney dışı bırakıldı. Resim 15'de kontrol grubuna ait normal ventriküler yapıyı gösteren MR kesiti örneği görülmektedir. Resim 16'da ise hidrocefali indüksiyonundan sonra, yapılan kraniyal MR incelemesinde ventriküler genişleme gösteren deneklere örnek radyolojik kesit sunulmuştur.



**Resim 15:** T2 ağırlıklı koronal görüntü. Normal ventriküler konfigürasyonun izlendiği sham operasyonu yapılmış olan kontrol grubuna ait denek.



**Resim 16:** T2 ağırlıklı koronal görüntü. Belirgin ventriküler dilatasyon izlenen hidrosefali indüksiyonu başarılı olmuş deneğe ait inceleme.

### 4.3. FRONTAL KORTEKS NÖRONLARINDA MAP-2 İMMÜNHİSTOKİMYASAL EKSPRESYONU

Gruplara ait frontal korteks alanları için saptanmış olan MAP-2 eksprese eden nöron sayısı verilerinin, minimum değer, maksimum değer, ortalama değer, standart hata, standart sapma ve varyans özellikleri hesaplanmış olup, bu veriler Tablo 1’de özetlenmiştir.

Grup	Denek Sayısı	Örnek Sayısı	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma	Varyans
K	6	36	24.00	39.00	30.6111	0.64399	3.86396	14.930
H	7	42	1.00	5.00	2.6429	0.16633	1.07797	1.162
M	6	36	9.00	17.00	12.8611	0.37618	2.25709	5.094

**Tablo 1:** Gruplara ait frontal korteks alanları için saptanmış olan MAP-2 eksprese eden nöron sayısı verileri.

#### 4.3.1. FRONTAL KORTEKS MAP-2 İMMÜNHİSTOKİMYASAL EKSPRESYONU GÖSTEREN NÖRON SAYILARININ GRUPLAR ARASI KARŞILAŞTIRILMASI

Frontal korteks alanlarına ait grupların ortalama MAP-2 eksprese eden nöron sayıları ve standart sapma değerleri Grafik 1’de gösterilmiştir. Frontal korteks ortalama MAP-2 eksprese eden nöron sayılarının gruplar arası karşılaştırılmasında çoklu varyans analizi (One-Way ANOVA) testi; grupların kendi aralarındaki karşılaştırılmasında ise post hoc değerlendirme (Tukey testi) kullanılmıştır. SPSS programı özgün istatistiksel çıktı verileri Tablo 2 ve Tablo 3’te sunulmuştur.

### One-Way ANOVA

MAP-2 (+) Nöron sayısı

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15341.356	2	7670.678	1137.529	<0.001
Within Groups	748.504	111	6.743		
Total	16089.860	113			

**Tablo 2:** SPSS yazılımı ile çoklu varyans analizi değerlendirme sonuçları.

### Post Hoc Test (Tukey)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: MAP-2 (+) Noron sayısı

Tukey HSD

#### Multiple Comparisons

MAP+ hücreler

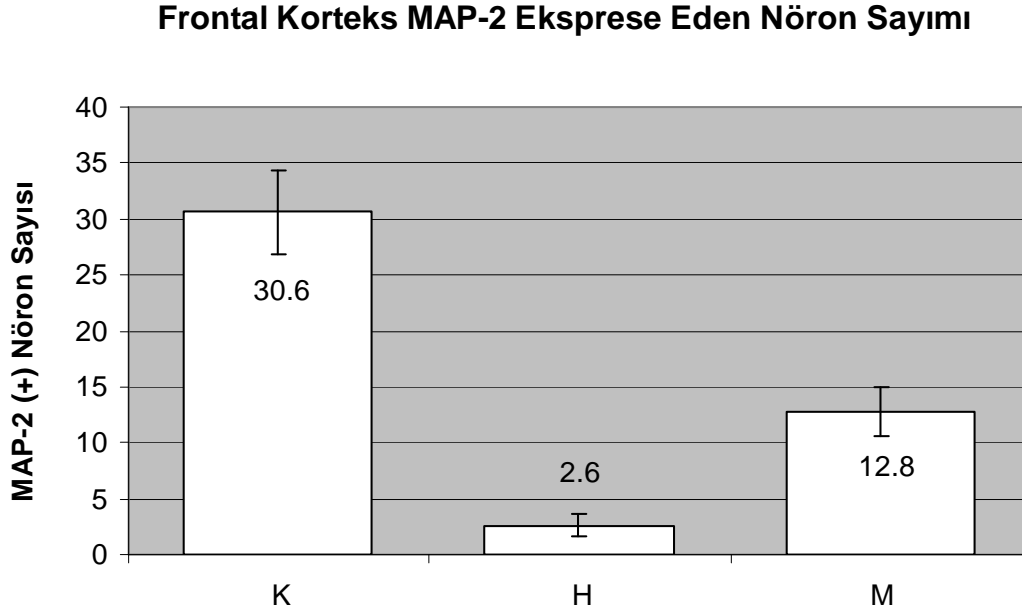
Tukey HSD

(I) Gruplar	(J) Gruplar	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
H	Mm	-10.21825*	0.58980	<0.001	-11.6194	-8.8171
	K	-27.96825*	0.58980	<0.001	-29.3694	-26.5671
Mm	H	10.21825*	0.58980	<0.001	8.8171	11.6194
	K	-17.75000*	0.61207	<0.001	-19.2040	-16.2960
K	H	27.96825*	0.58980	<0.001	26.5671	29.3694
	Mm	17.75000*	0.61207	<0.001	16.2960	19.2040

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

**Tablo 3:** SPSS yazılımı ile çoklu varyans analizi – Post Hoc Tukey testi ile deney grupları arası karşılaştırma testlerinin değerlendirme sonuçları.

Gruplar arası karşılaştırmada çoklu varyans analizi (One-Way ANOVA) testi, gruplar arası farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir ( $p < 0,001$ ). Grupların kendi aralarındaki karşılaştırılmasında ise (Post Hoc Tukey testi), tüm gruplar arası karşılaştırmalarda farkın istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olduğu görülmüştür ( $p < 0,001$ ).



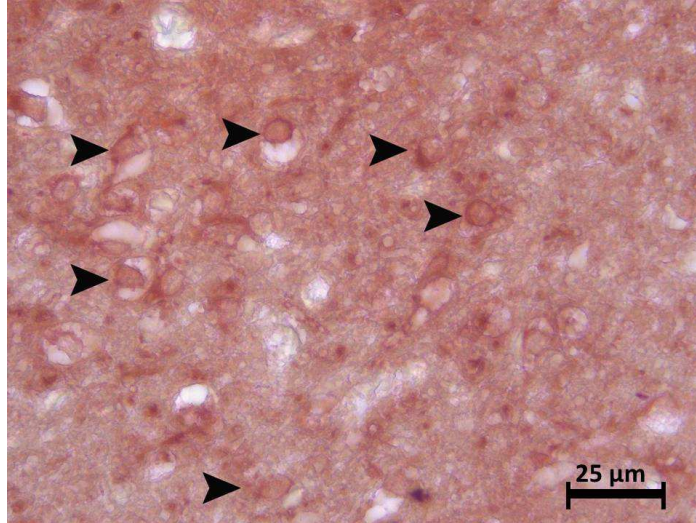
**Grafik 1:** Frontal korteks alanlarına ait grupların MAP-2 eksprese eden ortalama nöron sayısı verileri (ortalama değerler  $\pm$  standart sapma). *K: Kontrol grubu, H: Hidrosefali grubu, M: Memantin verilmiş hidrosefali grubu.*

#### 4.3.2. FRONTAL KORTEKS ALANLARINDAKİ NÖRONAL MAP-2 İMMÜNOREAKTİVİTESİ KESİTLERİNE ÖRNEKLER

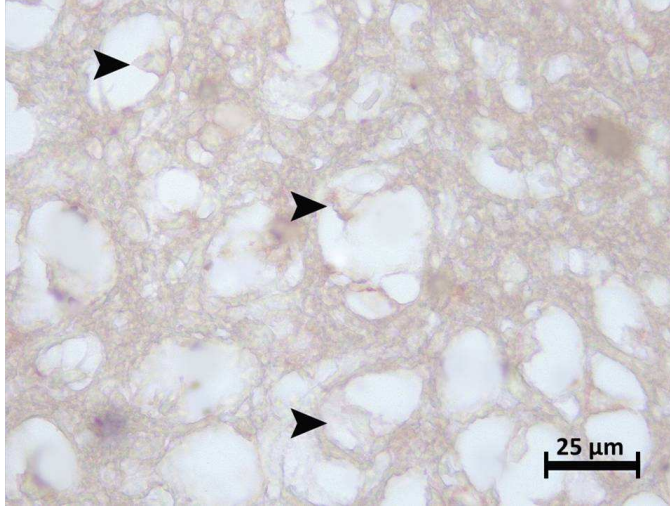
Kontrol grubu deneklerde MAP-2'nin frontal korteks nöronlarında belirgin bir şekilde eksprese olduğu dikkat çekti. H Grubu hidrosefalik tavşanların frontal korteks nöronal yapısında ise MAP-2'nin immünoboyanma paterninin oldukça zayıf olduğu görüldü. Bu paternin ciddi sitoiskelet bozukluğuna işaret ettiği ve özellikle dendritik yapı ve perikaryonik nöronal somadaki bozulma ile birlikte olduğu izlendi. Memantin uygulanmış olan hidrosefalik tavşanların oluşturduğu M Grubu deneklerde ise bu bozulmanın daha az olduğu, MAP-2 immünoboyanma gücünün H Grubu

deneklere kıyasla belirgin şekilde korunduğu dikkat çekti. Bu yapısal niteliğin özellikle nöronların dendritik yapılarının daha az deformasyonu ve hasarlanmış olması ile paralellik göstermiş olması, MAP-2 immünboyama ile nöronal yapının dendritik organizasyon sağlamlığı arasındaki ilişkinin bir kez daha ortaya konmuş olması açısından önemlidir. Aynı zamanda çalışmada uygulanan memantin tedavisinin göstermiş olduğu MAP-2 immünekspresyon düzeyindeki farklılığın nöronlardaki dendritik organizasyon farklılığını yansıtacağını ifade etmesi bakımından yorumlanabileceğinin göstergesi olmuştur.

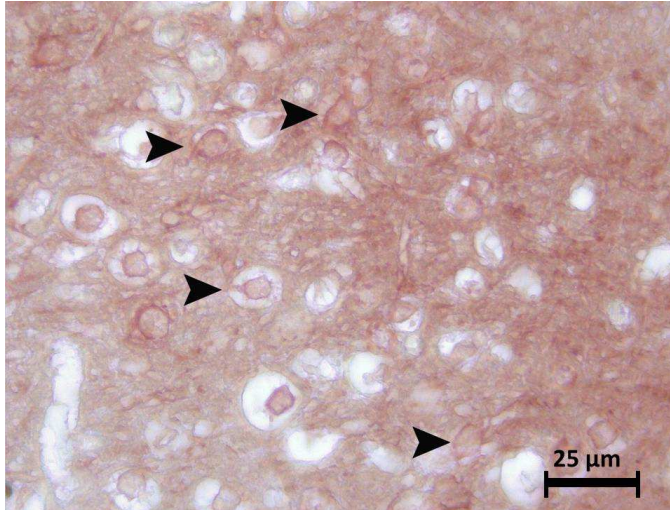
Gruplar için MAP-2 immünboyası kullanılarak hazırlanan kesitlere ait örnekler Resim 17, Resim 18 ve Resim 19’da ayrı ayrı gösterilmektedir.



**Resim 17:** Kontrol grubunda koyu boyanmış MAP-2 pozitif nöronların (okbaşları) hücre gövdeleri ve dendritleri görölmekte.



**Resim 18:** Hidrosefali grubunda, nöronların (okbaşları) hücre gövdeleri ve dendritlerinde çok zayıf bir boyanma gözlenirken, nöronların çevresinde ve doku genelinde doku hasarının bir belirtisi olan vakuolizasyonun da ileri derecede belirgin oluşu görülmekte.



**Resim 19:** M grubunda nöronların (okbaşları) hücre gövdeleri H grubuna göre orta şiddette, ve dendritleri ise belirgin olarak daha koyu boyanmış olarak gözlemlendi. Bu grup (Grup M) kontrol deneklerine göre doku genelinde MAP-2 boyanma şiddetinin azlığı ancak H grubuna göre MAP-2 pozitif nöronların sayısındaki anlamlı düzeyde korunma dikkat çekmektedir.



## 5. TARTIŞMA

Hidrocefali tarih boyunca en çok incelenen hastalıklardan biridir. Hidrocefali sırasında meydana gelen fizyopatolojik süreçler son yıllarda gelişen teknoloji ve bilimsel gelişmeler neticesinde daha ayrıntılı olarak aydınlatılmıştır.

Literatür hidrocefaliyle ilgili olarak yapılan birçok mikropatolojik çalışma ile doludur. İnsan kortikal biopsileri ve otopsi materyalleri incelenmiştir (127,128,129,130). Laboratuvar hayvanlarında serebrospinal dolaşımı mekanik olarak engellemek için, kaolin ve silastik gibi inert materyaller kullanılarak oluşturulmuş birçok deneysel model ortaya konmuştur (128,131,132,133).

Bu çalışmaların büyük çoğunluğu ependim ve subependimal doku üzerine yoğunlaşmıştır. Işık ve elektron mikroskopunu kullanarak ependimal hücrelerdeki silyaların düzleşmesini, kaybını, bozulmasını, ödemi ve periventriküler astrositlerin proliferasyonunu göstermişlerdir (127,131,133,134).

Kortikal gri madde daha az olarak incelenmiştir. Bazı yazarlar hidrocefalinin genel patolojik özelliklerini incelemişler ve seyrek aksonal dejenerasyonun olduğunu ve sonuç olarak kortikal gri maddenin artmış intrakraniyal basınçtan nispeten etkilenmediği sonucuna varmışlardır (135,136,137,138). Diğer bazı çalışmalar ise kortikal nöronlarda önemli değişmelerin olduğunu bildirmektedir. Bu çalışmalardan Weller ve Williams'ın yaptığı çalışmada, iki hidrocefalik infanttın kortikal biopsi yapılmış ve fokal hücre kaybı gösterilmiştir (138). Yine Gopinath ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, elektron mikroskopu kullanarak hidrocefali oluşturulmuş genç tavşanlarda hücre membranı ve sitoplazması bozulmuş bir kortikal nöronun fotoğrafını göstermişlerdir (135).

Dendritler nöron hücre yüzeyinin önemli bir bölümünü oluşturduğundan, nöronal fonksiyonun önemli bir belirtecidir (139,140). Mc Allister ve arkadaşları deneysel olarak hidrocefali oluşturulmuş yenidoğan sıçanlarda parietookspital bölgeden aldıkları doku örneklerini ışık mikroskopu ile incelemişler ve dendritik hücrelerde belirgin olarak azalma ve yapılarında bozulma tespit etmişlerdir (85).

Hidrocefalite süreçte meydana gelen ikincil nöronal hasarın nedeni hipoksik metabolizma ve lipid peroksidasyonudur (52,53). Bu hasarlanma mekanizması hipoksi ve iskemide görülen mekanizma ile benzer özellikler göstermektedir. Literatürde, memantin hidrosefalide nöron koruyucu etkisi üzerine yapılan çok fazla çalışma mevcut değildir. Yapılan bir çalışmada memantin kaolin ile hidrosefali oluşturulmuş sıçan modelinde hipokampusun CA1, CA2 ve CA3 bölgelerinde nöron koruyucu ajan olarak etkinliği incelenmiş ve hidrosefalite sürecin erken döneminde başlayan sistemik memantin tedavisinin özellikle CA1 ve CA2 bölgelerinde anlamlı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (141).

Memantin, fokal serebral iskemili neonatal sıçan modelinde yapılan çalışmada, pre-iskemik olarak uygulanmasından sonra çekilen manyetik rezonans görüntüleme enfarkt alanında %36,3 gibi bir oranda azalma sağladığı gösterilmiştir (142). Bu çalışma memantin NMDA reseptör ilişkili eksitotoksiteyi önemli bir oranda engellediğini göstermiştir.

Memantin tek başına preiskemik olarak nöroprotektif etkinliği olmakla beraber diğer nöroprotektif ajanlarla beraber kullanılabilir. Memantin ile Clenbuterol'un kombine olarak kullanıldığı bir çalışmada iskemi sonrası sıçan hipokampal nöronlarında oluşan enfarkt alanında radyolojik olarak anlamlı bir küçülme sağlanmıştır (143). Yine memantin çay polifenollerini ile kombine edilerek kullanıldığı başka bir çalışmada beyinde meydana gelen eksitotoksitede nöroprotektif olarak etkili oldukları görülmüştür (144).

Tüm bu çalışmalar ışığında memantin iskemi sürecinde beyinde yaygın nöroprotektif etki gösterdiği söylenebilir. Hidrosefalide de sekonder hasarın altında yatan temel nedenin iskemi olduğu düşünülecek olursa, memantin hidrosefalide nöroprotektif bir ajan olarak kullanılabilir.

Hidrosefalideki iskemik süreç hemen hemen tüm beyni etkilemekte ve özellikle kognitif fonksiyonların merkezi olan frontal korteks nöronlarında yapısal değişikliklere neden olduğu düşünülmektedir. Bu konuda yapılmış olan deneysel çalışmaların sonuçları bu savları destekler görünmektedir (85,145).

MAP-2 protein ailesi, nöronlarda predominant olarak eksprese edilen fosfotaz ve protein kinazların bir substratı niteliğindeki hücrel iskelet proteinlerinin önemli bir grubunu oluşturmaktadır. MAP ile hücrel iskeletin bağlanma özelliklerini, fosforilasyon ve bireyin gelişim süreci tayin etmektedir (146). MAP-2 immünreaktivitesinin kaybı, daha çok iskemik sürecin indüklediği ve kalpain aracılı hücre içerisine kalsiyum girişi ve MAP-2'nin proteolizisi sonucu mikrotübül yapısının bozulmasını ifade etmektedir (147). Bu fenomen gerek hayvan deneylerinde (148, 149) gerekse insanlarda gösterilmiştir (150, 151). Yenidoğan global iskemili sıçan beyni modelinde, lezyona uğratılmış hipokampus, korteks, kaudat çekirdek ve talamusta MAP-2 immünreaktivitesinde belirgin şekilde bozulma gözleendiği bildirilmiştir (147). Bu özelliği nedeniyle MAP-2, dendrosomatik nöronal hasarın bir işaretleyicisi olarak kabul edilmektedir (152).

MAP-2, nöron plastisitesinde (özellikle dendritik yapıların organizasyonunda) önemli bir rol oynamakta olup aynı zamanda iskemik hasar durumunda tüm hücrel iskelet proteinleri içerisinde en kırılğan yapıya sahip olma özelliğini taşımaktadır (153, 154, 155).

Hücrel iskelet bozulması, iskemiye takip eden hasarlanma sürecinin kritik bir bölümünü oluşturur. En kırılğan hücrel iskelet proteinlerinden olan MAP-2, iskemik kaskad içerisinde yer aldığı için, erken iskemik hasarın tespitinde oldukça duyarlı bir bio-işaretleyici olma özelliğini taşımaktadır. Nöronal iskemiden sonra glutamat gibi eksitator aminoasitlerin artışı ile birlikte hücre içine aşırı kalsiyum girişi ve bunun da kalpainlerin aktivasyonuna yol açtığı iyi bilinmektedir (156, 157, 158, 159, 160). MAP-2'nin proteolitik kalpainler için tercih edilen bir substrat oluşu ve iskemiden sonra hemen bozulmaya başlaması sonucu antiijenitesindeki azalma, erken nöronal hasarlanmanın ve özellikle dendritik organizasyondaki bozulma ile giden hücre iskeleti etkilenmesinin iyi bir göstergesi olarak kabul edilebilir (161).

Hidrocefalide nöronal apoptozisin nedeni primer mekanik hasarlanmanın yanı sıra, ortaya çıkan ikincil hasarlanma ve iskemi olduğu düşünüldüğünde hidrocefali tedavisinde, cerrahinin yanı sıra nöronal kaybı engellemek üzere kullanılabilir nöron koruyucu ajanların hidrocefalinin erken döneminde kullanılmaya başlanması uygun gözükmektedir (141, 162, 163).

Bu çalışmada, hasarlanma mekanizmasını glutamat NMDA reseptör blokajı yaparak engelleyen “memantin” in, hidrosefalik süreçte etkilendiği gösterilmiş frontal korteks nöronal yapısı üzerindeki olası koruyucu etkisi araştırılmıştır. Araştırmadan elde edilen sonuçlar, deneysel olarak obstrüktif hidrosefali oluşturulmuş genç erişkin tavşanların frontal kortekslerinde indüksiyondan iki hafta sonra, kontrol deneklere göre MAP-2 eksprese eden nöron sayısında istatistiksel olarak anlamlı düşüş olduğunu göstermiştir. Hidrosefali oluşturulmuş ve herhangi bir tedavi verilmemiş olan deneklerin frontal korteks örneklerindeki MAP-2 eksprese eden ortalama nöron sayısı (100x100  $\mu\text{m}^2$  lik örnek alanlarda) 2,64 iken bu değer, kontrol grubunda 30,61 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Hidrosefali indüksiyonu sonrası ertesi gün sistemik olarak 1mg/kg/gün memantin uygulanmış olan deneklerde ise bu sayı, 12,86 olarak bulunmuştur. Bu sayı, kontrol grubu denekleri ile kıyaslandığında yine oldukça anlamlı bir azalma ifade etmekle birlikte, tedavi verilmemiş hidrosefalik deneklerin ortalama sayısı ile kıyaslandığında ise frontal kortekste “memantin verilmesi” ile MAP-2 eksprese eden nöron sayısının istatistiksel olarak oldukça anlamlı derecede korunduğu dikkat çekmektedir.

Kontrol grubuna ait frontal korteks histolojik görüntü örneklerinde immün-pozitif nöronlara ait sayısal üstünlüğün yanısıra, MAP-2'nin oldukça belirgin bir şekilde eksprese olduğu (koyu boyanma paterni) gözlemlenmiştir. H Grubu hidrosefalik tavşanların frontal korteks histolojik görüntülerinde ise anlamlı sayısal düşüşün yanısıra, MAP-2 immün-boyanma paterninin oldukça zayıf (açık renk boyanma) olduğu görülmüştür. Ayrıntılı histolojik incelemelerde, bu boyanma paterninin ciddi sitoiskelet bozukluğuna işaret ettiği ve özellikle de dendritik yapı ve perikaryonik nöronal somadaki bozulma ile birlikte olduğu izlenmiştir. Bu bulgular, hidrosefalik süreçte frontal korteks nöronlarında anlamlı sitoiskelet bozulmasının söz konusu olabileceğini düşündürmektedir. Memantin uygulanmış olan hidrosefalik tavşanların oluşturduğu M Grubu deneklere ait histolojik görüntülerde ise bu bozulmanın rölatif olarak daha az olduğu, ekspresyon gösteren hücre sayısının yanısıra, MAP-2 immünboyanma gücünün de H Grubu deneklere kıyasla belirgin şekilde korunduğu fark edilmiştir. Bu yapısal niteliğin özellikle “nöronların dendritik yapılarının daha az deformasyonu ve hasarlanmış olması” ile paralellik göstermiş

olması, MAP-2 immünboyama ile nöronal yapının dendritik organizasyon sağlamlığı arasındaki ilişkinin bir kez daha ortaya konmuş olması açısından önemlidir.

Memantin; Alzheimer, Parkinson gibi hastalıkların klinik tedavisinde kullanılmaktadır. Literatürde memantin Hidrosefalide etkinliği üzerinde yapılmış bir çalışma yoktur. Yapılacak olan yeni çalışmalar ışığında memantin hidrosefali tedavisinde gelecekte yardımcı bir medikal tedavi seçeneği olarak kullanılabilir.

Bu çalışmanın sonuçları göstermektedir ki, hidrosefalik sürecin başlangıcında uygulanan “antieksitotoksik aktiviteye sahip” memantin, büyük olasılıkla iyi bilinen “NMDA reseptör blokajı mekanizması” yolu ile hidrosefalinin ilerlemesiyle ortaya çıkan frontal korteks nöronal iskemi ve hasarlanma üzerinde koruyucu etki gösterebilmektedir. Ancak bu çalışmada, deneklerde maalesef eş zamanlı olarak serebral kan akımı ölçümleri yapılamadığı için, memantin bu etkisinin, serebral kan akımı üzerindeki olası bir etki ile gerçekleştirip gerçekleştirmediği konusunda yorumda bulunabilmek mümkün değildir. Bu etkinin mekanizması ile ilgili daha detaylı verilerin ortaya konabilmesi için, yapılacak daha ayrıntılı çalışmalara gereksinim vardır. Ancak, elde edilmiş olan mevcut veriler ışığında, tavşanda kaolin ile oluşturulan hidrosefali modelinde frontal korteks nöronlarında iki haftalık süre sonucunda MAP-2 ekspresyonunda anlamlı bir azalma olduğu ve bu azalmaya nöronal sitoiskelet yapısında ve özellikle dendritik organizasyonda bozulmanın eşlik ettiğini söylemek mümkündür. Hidrosefalik sürecin başlaması ile birlikte erken dönemde sistemik (intramüsküler enjeksiyon) olarak 1 mg/kg/gün dozunda verilen memantin, frontal korteks nöronlarındaki MAP-2 ekspresyon yitimini anlamlı şekilde azalttığı ve hidrosefaliye sekonder gelişen frontal korteks nöronal sitoiskelet yapısı ve dendritik organizasyondaki bozulma sürecinde koruyucu bir etkisi olduğu söylenebilir.

## 6. SONUÇ

Sonuç olarak, hidrosefalik süreç ilerledikçe, ortaya çıkan değişikliklerin daha çok sekonder iskemiye bağlı olarak üst kortikal merkezlerde de söz konusu olduğu bu çalışmanın sonuçları ile bir kez daha gösterilmiştir. Bu çalışmanın en önemli özelliği, bu hasarlanma sürecinde özellikle sitoskeletal ve dendritik organizasyonun bozulmasında eksitotoksik mekanizmanın etkili olabileceğine dair bulguların sunulduğu ilk çalışma olmasıdır. Çalışmanın verileri, eksitotoksik nöronal hasarlanmada değişik iskemi ve travma modellerinde etkinliği araştırılmakta olan bir NMDA reseptör antagonisti olan “memantin” in hidrosefalik süreçte frontal korteks nöronal yapısının sitoskeletal ve dendritik organizasyondaki bozulma üzerindeki olumlu koruyucu etkisinin olabileceğini göstermiştir.

Günümüzde nöron koruyucu bir çok ajanın araştırılmasının altında yatan sebep, beyin dokusunda dejeneratif veya travmatik süreçlerin tetiklediği nöronal kayıpların engellenmesine yönelik ek tedavi modalitelerine olan gereksinimdir. Hidrosefali açısından bu tip bir tedavi modalitesi ancak hidrosefalik sürecin oluşturduğu hasarlanma mekanizmalarının daha iyi anlaşılması sonucu geliştirilebilecektir. Mevcut çalışma, bu amaçla yapılmış olup, özellikle hidrosefalik süreçte frontal korteks nöronal yapısının eksitotoksik hasarlanma mekanizması sonucu hücre iskeleti ve dendritik organizasyondaki bozulma üzerine dikkat çekmektedir.

## 7. ÖZET

### **TAVŞAN HİDROSEFALİ MODELİNDE MEMANTİN UYGULAMASININ FRONTAL KORTEKS NÖRON YAPISI ÜZERİNDEKİ KORUYUCU ETKİSİ: MAP-2 İMMÜNOREAKTİVİTESİ İLE DEĞERLENDİRME**

**AMAÇ:** Kaolin ile oluşturulmuş deneysel hidrosefalinin erken döneminde verilen sistemik memantin frontal korteks nöron yapısı üzerindeki koruyucu etkinliğinin araştırılması.

**YÖNTEM-GEREÇLER:** Çalışmada genç erişkin New Zeland türü tavşanlar kullanılmıştır. Deneklerde sisterna magnaya kaolin enjeksiyonu ile hidrosefali modeli oluşturulmuştur. Denekler, kontrol grubu (K, n=6), hidrosefali grubu (H, n=7), memantin uygulanan hidrosefali grubu (M, n=6) şeklinde sınıflandırılmıştır. M grubuna hidrosefali induksiyonu sonrası 2 hafta süre ile 1 mg/kg/gün memantin intramuskuler yoldan verilmiştir. Bu sürenin sonunda denekler, MR görüntüleme incelemesi sonrasında sakrifiye edilerek serebrumları çıkartılmıştır. Frontal korteks örneklemelerinde birim alanda “mikrotübül ilişkili protein 2” (MAP-2) eksprese eden ortalama nöron sayıları tespit edilerek gruplar-arası karşılaştırma yapılmıştır.

**BULGULAR:** Hidrosefali oluşturulmuş deneklerin frontal korteks yapısında, kontrol deneklerine göre MAP-2 eksprese eden nöron sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu görülmüştür. Bu azalma, nöronal sitoiskelet yapısında ve özellikle dendritik organizasyondaki bozulmaya işaret etmektedir. Hidrosefali induksiyonu sonrası memantin uygulanmış olan deneklerde ise frontal kortekste MAP-2 eksprese eden nöron sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede korunduğu görülmüştür.

**TARTIŞMA:** Mevcut çalışma, hidrosefalik süreçte frontal korteks nöron yapısının hücresel iskelet yapısı ve dendritik organizasyonundaki bozulma üzerine dikkat çekmektedir. Hidrosefalik süreçte sistemik memantin uygulamasının ise antioksidotoksik mekanizma ile hidrosefaliye sekonder gelişen bu hasarlanma süreci üzerinde kısmen koruyucu bir etkisi olduğu söylenebilir.

**ANAHTAR KELİMELER:** Frontal korteks, hidrosefali, MAP-2, memantin, tavşan

## 8. ABSTRACT

### **PROTECTIVE EFFECT OF SYSTEMIC MEMANTINE ADMINISTRATION ON FRONTAL CORTEX NEURONAL STRUCTURE IN EXPERIMENTAL RABBIT HYDROCEPHALUS: EVALUATION WITH MAP-2 IMMUNOREACTIVITY**

**PURPOSE:** To investigate the protective effect of early systemic memantine administration on frontal cortex neuronal structure in kaolin induced experimental hydrocephalus.

**MATERIALS AND METHOD:** Experimental hydrocephalus was induced by injecting kaolin into the cisterna magna of young adult New Zeland rabbits. Animals were grouped as follows: control group (K, n=6), hydrocephalus induced group (H, n=7), memantine-treated hydrocephalic animals (M, n=6). M group received a single daily dose of 1mg/kg memantine i.m. following the hydrocephalus induction for a period of two weeks. At the end of the two weeks period, animals were radiologically evaluated by magnetic resonance imaging and then sacrificed to get their cerebrums removed. Microtubule-associated protein 2 (MAP-2) immunoreactivity was determined in histologic sections of the frontal cortex. Mean number of immunoreactive neurons per determined area were calculated and compared within the groups.

**RESULTS:** Statistically significant reduce in the number of MAP-2 reactive neurons was observed in all hydrocephalus induced animals as compared to control group. This reduce indicated the deformation in the cytoskeletal structure, especially the disorganization of the dendrites. Memantine treatment seemed to significantly attenuate the loss of MAP-2 immunoreactivity in frontal cortex neurons of the hydrocephalus induced animals.

**DISCUSSION:** The present study underlines the deformation in the cytoskeletal and dendritic structure in frontal cortex neurons following experimental hydrocephalus induction. Memantine, when administered in the early phase of the hydrocephalic process, seems to have a partial protective effect on this hydrocephalus-related structural deformation throughout its anti-excitotoxic mechanism.

**KEY WORDS:** Frontal cortex, hydrocephalus, MAP-2, memantine, rabbit



## 9. KAYNAKLAR

1. Del Bigio MR: Neuropathology and structural changes in hydrocephalus *Developmental disabilities research reviews* 2010: 16:16-22
2. Ding Y, Mcallister JP, Yao B, Yan N, Canady AI: Neuron tolerance during hydrocephalus. *Neuroscience* 2001: 106;4:659-667
3. Del Bigio MR, Vriend JP: Monoamine neurotransmitters and amino acids in the cerebrum and striatum of immature rats with kaolin-induced hydrocephalus. *Brain Research* 1998;**798**; 119-126
4. Socci DJ, Bjugstad KB, Jones HC, Pattisapu JV, Arendash GW: Evidence that oxidative stress is associated with the pathophysiology of inherited hydrocephalus in the H-Tx rat model. *Experimental Neurology* 1999; **155**: 109-117
5. Babu CS, Ramanathan M: Pre-ischemic treatment with memantine reversed the neurochemical and behavioural parameters but not energy metabolites in the middle cerebral artery occluded rats .*Pharmacology ,Biochemistry and Behavior*. 2009; **92**: 424-432
6. Chipana C, Torres I, Camarasa J, Pubill D, Escubedo E: Memantine protects against amphetamine derivatives-induced neurotoxic damage in rodents. *Neuropharmacology*.2008; **54**: 1254-1263
7. Danysz W, Parsons CG: The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatic and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2003; **18**: 23-32
8. Block F, Schwarz M: Memantine reduces functional and morphological consequences induced by global ischemia in rats: *Neuroscience Letter*.1996;208:41-44
9. Davidoff LE: Treatment of Hydrocephalus: *Arch surg* 1929;**18**:1737-1762
10. Drake JM, Saint Rose C: *The Shunt Book*: Cambridge, MA: Blackwell Science, 1995: pp 3-12
11. Hippocrates: De Morbis. Cited by Whytt R: Observations on the dropsy of the brain. Edingburg: Balfour: 1768: p 4
12. Fisher RG: Surgery of congenital anomalies, in Walker AE(ed): A history of neurological surgery, Baltimore: *Williams & Wilkins*. 195; pp 334-347

13. Vesalus A:De humani Corporis Fabrica Librorum Epitome :Basileae:Joannis Oporini: 1543
14. Willis T: Cerebri Anatomie: Londini: Roycroft: 1664
15. Roth PA, Cohen AR: Management of hydrocephalus in infants and children, in Tindall GT, Cooper PR, Barrow DL (eds): *The Practice of Neurosurgery*. Baltimore: Williams & Wilkins. 1996;**3**: pp. 2707–2711
16. Morgagni GB: the seats and Causes of Disease Investigated by Anatomy :London :Millar&Caddell .1761
17. Milhorat TH: Hydrocephalus and the Cerebrospinal Fluid. Baltimore: Williams & Wilkins.1972 :pp 1–178
18. Milhorat TH: Hydrocephalus: Historical notes, etiology, and clinical diagnosis, in McLauren RL ( ed) :Pediatric Neurosurgery. New York: Grune &Stratton: 1984:pp 197-210
19. Cotugno D: De Ischiade Nervosa Commentarius: Neapoli: Apud Fratres Simonios: 1764
20. Whytt R: Observations on the Dropsy of the Brain: Edinburgh, Balfour: 1768
21. West C: Lectures on the Diseases of Infancy and Childhood: London: Longman: 1848
22. Mcullough DC: History of the treatment of hydrocephalus, in Scott MR (ed) :Hydrocephalus. Baltimore: Williams &Wilkins: 1990:vol 3:pp 1-10
23. Key A,Retzius G: Studien in der Anatomie des Nervensystems und des Bindegewebes: Stocholm: Samson &Wallin: 1875-1876
24. Weed LH: Certain anatomical and Physiological aspects of the meninges and cerebrospinal fluid: *Brain* 1935: 58.383-397
25. Reese TS, Karnovsky MJ: Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase: *Journal Of Cell Biology* 1967: **34**: 207-217
26. Sato H, Matsumato S: Hydrocephalus: Histological review, in Matsumato S, Tamaki N ( eds): *Hydrocephalus: Pathogenesis and treatment*: Tokyo: Springer-Verlag: 1991: pp 3-6
27. Milhorat TH: Experimental hydrocephalus: Part1: A technique for producing obstructive hydrocephalus in the monkey: *Journal Of Neurosurgery*. 1970: **32**: 385-389
28. Milhorat TH, Clark RG, Hammock MK: Experimental Hydrocephalus. Part2. Gross Pathological findings in acute and subacute obstructive hydrocephalus

- in the dog and monkey: *Journal of Neurosurgery*. 1970 : **32**: 390-399
29. Milhorat TH: Acute hydrocephalus: *New England Journal Of Medicine* 1970: **283**: 857-859
  30. Quincke H: Ueber Hydrocephalus: *Verh Congr in Med* 1891: **10**: 321-339
  31. Davidoff LE: Treatment of hydrocephalus: *Archives Of Surgery*: 1929: **18**: 1737-1762
  32. Payr E: Drainage der Hirnventrikel Mitteltst frei Transplantirter Blutgefasse; Bemerkungen ueber Hydrocephalus: *Archiv Für Klinische Chirurgie*: 1908: **87**: 801-885
  33. Kausch W: Die Behandlung des Hydrocephalus der Cleinen Kinder: *Archiv Für Klinische Chirurgie*: 1908: **87**: 709-796
  34. Heile B: Zur Behandlung des Hydrocephalus: *Deutsche Medizinische Wochenschrift*: 1908: **24**: 1468-1470
  35. Dandy WE: An operative procedure for hydrocephalus: *Bulletin of Johns Hopkins Hospital*: 1922: **33**: 189
  36. Pudenz RH: The Surgical treatment of hydrocephalus ,im fields WS(ed) ,;*Disorders of the developing nervous system*:springfield ,IL :Thomas :1961:pp468-489
  37. Pudenz RH, Russel FE, Hurd AH: Ventriculoauriculostomi. A technique for shunting cerebrospinal fluid into the right auricle. Prelimany report: *Journal of Neurosurgery*: 1957,14: 171-179
  38. Walker ML, Macdonald J, Wright LC: The history of ventriculoscopy: Where do we go from here? : *Pediatric neurosurgery*: 1992: **18**: 218-223
  39. Del Bigio MR: Neuropathology and structurala changes in hydrocephalus: *Developmental Disabilities Research Reviews*: 2010: **16**: 16-22
  40. Rapoport SI: *Blood Brain Barrier in Phsicology and medicine*: New York: Raven Pres, 1976, 316
  41. Cao Y, Brown SL, Knight RA: Effect of intravascular –to extravascular water exchange on the determination of blood to tissue transfer constant by magnetic resonance imaging: *Magnetic Resonans In Medicine*:2005; **53**:282-293
  42. Schiller F: The cerebral ventricles. From soul to sink: *Archieves of neurology* 1997; **54**: 1158-1162
  43. Graff-Radford NR, Godersky JC: Idiopathic normal pressure Hydrocephalus and systemic hypertension: *Neurology*: 1987; **37**: 868-871

44. Hoffmann E, Becker E, Jackel M: The corpus callosum in communicating hydrocephalus: *Neuroradiology*. 1995; **37**: 212-218
45. Mashayekhi F, Draper CE, Bannister CM: Deficient cortical development in the hydrocephalic Texas (H-TX) rat: a role for CSF: *Brain* **125**:8,2002; 1859-1874
46. Owen-Lynch PJ, Draper CE, Mashayekhi F: Defective cell cycle control underlies abnormal cortical development in the hydrocephalic Texas rat. *Brain* **126**.2003; **3**: 623-631
47. Khan OH, Enno TL, Del Bigio MR: Brain Damage in neonatal rats following kaolin induction of hydrocephalus. *Experimental Neurology*.2006; **200**: 311-320
48. Chumas PD, Drake JM, Del Bigio MR: Anaerobic glycolysis preceding whitematter destruction in experimental neonatal hydrocephalus. *Journal Of Neurosurgery*. 1994; **80**: 491-501
49. Del Bigio MR, Da Silva MC, Drake JM: Acute and Chronic cerebral white matter damage in neonatal hydrocephalus. *Canada Journal Of Neurological Sciences*. 1994; **21**: 299-305
50. Del Bigio MR, Kanfer JN, Zhang YW: Myelination delay in the cerebral white matter of immature rats with kaolin-induced hydrocephalus is reversible. *Journal Of Neuropathology&ExperimentalNeurology*. 1997; **56**,1053-1066
51. Del Bigio MR, Bruni JE, Vriend JP: Monoamine neurotransmitters and their metabolites in the mature rabbit brain following induction of hydrocephalus. *Neurochemistry Research*. 1998; **23**: 1379-1386
52. Jones HC, Rivera KM, Haris NG: Learning deficits in congenitally hydrocephalic rats and prevention by early shunt treatment. *Child's Nervous system*.1995;**11**: 655-660
53. Luciano MG, Skarupa DJ, Booth AM: Cerebrovascular adaptation in chronic hydrocephalus. *Journal Of Cerebral Blood Flow Metabolism*. 2001; **21**: 285-294
54. Socci DJ, Bjugstad KB, Jones HC: Evidence that oxidative stress is associated with the pathophysiology of inherited hydrocephalus in the H-Tx rat model. *Experimental Neurology*. 1999;**155**: 109-117
55. Del Bigio MR: Calcium mediated proteolytic damage in white matter of hydrocephalus rats? *Journal Of Experimental Neurology*.2000; **59**: 946-954

56. Del Bigio MR: Hydrocephalus –induced changes in the composition of cerebrospinal fluid. *Neurosurgery*.1989; **25**: 416-423
57. Kruger RC: Use of a novel double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay method for assaying chondroitin sulfate proteoglycans that bear 3-nitrotyrosin core protein modifications, a previously unrecognized proteoglycan modification in hydrocephalus. *Analytical Biochemistry*. 2004;**325**,52-61
58. Mc Lone DG, Bondareff W,Raimodi AJ: Brain edema in the hydrocephalic hy3mouse:submicroscopicmorphology.*JournalOfNeuropathology&Experimental Neurology*. 1971; **30**: 627-637
59. Del Bigio MR, Enno TL: Effect of hydrocephalus on rat brain extracellular compartment. *Cerebrospinal Fluid Resarch*. 2008; **5**:12
60. Shoesmith CL, Buist R, Del Bigio MR: Magnetic resonance imaging study of extracellular fluid tracer movement in brains of immature rats with hydrocephalus. *Neurological Research*.2000; **22**: 111-116
61. Sykova E, Fiala J,Antonova T:Extracellular space volume changes and diffusion barriers in rats with kaolin-induced and inherited hydrocephalus. *European Journal Of Pediatric Surgery*.2001; **11**: 34-37
62. Tarnaris A,Watkins LD, Kitchen ND: Biomarkers in chronic Adult hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Research*.2006; **3**:11
63. DaSilva MC, Drake JM, Lemaire C, Cross A, Tuor UI: High-energy phosphate metabolism in a neonatal model of hydrocephalus before and after shunting. *Journal OF Neurosurgery*. 1994;**81**:544-553
64. Cheung W, Guo L, Cordeiro MF: Neuroprotection in Glaucoma: Drug-Based Approaches. *Optometry and Vision Science*. 2008;**6**.406-416
65. Danesh-Meyer HV: Neuroprotection in glaucoma:recent and future directions.*Current Opinion in Ophtalmology*.2011;**22**:78-86
66. Lucas DR, Newhouse JP: The toxic effect of sodium glutamate on the inner layers of the retina. *A.M.A Archieves Of Ophtalmology*.1957; **58**:193-201
67. Olney JW: Glutaate-induced retinal degeneration in neonatal mice. Electronmicroscopy of the acutely evolving lesion. *Journal Of Neuropathology &Experimental Neurology*.1969; **28**:455-474
68. Olney JW, Ho OL:Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine.*Nature* 1970;**227**:609-611

69. Danysz W, Parsons CG, Möbius HJ: Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease-a unified hypothesis on the mechanism of action. *Neurotoxicity Res* 2000;**2**:85-97.
70. Kornhuber J, Weller M, Schoppmeyer K: Amantadine and memantine are NMDA receptor antagonists with neuroprotective properties. *Journal of Neural Transmission*. 1994; Suppl. **43**:91-104.
71. Vorwerk CK, Lipton SA, Zurakowski D: Chronic low-dose glutamate is toxic to retinal ganglion cells: toxicity blocked by memantine. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1996; **37**:1618-1624
72. Parsons CG, Danysz W, Quack G: Memantine is a clinically well tolerated N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor antagonist. *Neuropharmacology* 1999; **38**: 735-767.
73. Guo L, Salt Te, Maas A, Loung V, Moss SE, Fitzke FW, Corderio MF: Assessment of neuroprotective effects of glutamate modulation on glaucoma-related retinal ganglion cell apoptosis in vivo. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2006; **47**:626-633
74. Fletcher EL, Hack I, Branstatter JH, Wassle H: Synaptic localization of NMDA receptor subunits in the rat retina. *Journal Of Comparative Neurology*. 2000; **420**:98-112
75. Johnson JW, Ascher P: Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*. 1987; **325**:529-531
76. Tenneti L, D'Emilia DM, Troy CM, Lipton SA: Role of caspases in N-methyl-d-aspartate induced apoptosis in cerebrocortical neurons. *Journal Of Neurochemistry*. 1998; **71**:946-959
77. Budd SL, Tenneti L, Lishank T, Lipton SA: Mitochondrial and extramitochondrial apoptotic signaling pathways in cerebrocortical neurons. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 2000; **97**: 6161-6166
78. Okamoto S, Li Z, Ju C, Scholze MN, Mathews E, Cui J, Salvesen GS, Bossy-Wetzel E, Lipton SA: Dominant-interfering forms of MEF2 generated by caspase cleavage contribute to NMDA induced neuronal apoptosis. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 2002; **99**: 3974-3999

79. Wang H, Yu SW, Koh DW, Lew J, Coombs C, Bowers W, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL: Apoptosis-inducing factor substitutes for Caspase executioners in NMDA triggered excitotoxic neuronal death. *Journal Of Neuroscience* .2004; **24**: 10963-10973
80. Lipton SA: Pathologically-activated theurapeutics for neuroprotection: mechanism of NMDA receptor block by memantine and S-nitrosylation .*Current Drug Targets*.2007; **8**: 621
81. Lipton SA: Rosenberg PA. Excitatory aminoacids as a final common pathway for neurologic disorders. *New England Journal Of Medicine* .1994; **330**: 613-622
82. Lipton SA: Molecular mechanisms of trauma induced degeneration. *Current Opinion in Neurology and Neurosurgery* .1993; **6**: 588-596
83. Kirino T: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res*. 1982; **239**: 57–69
84. Nakamura M, Araki M, Oguro K, Masuzawa T: Differential distribution of 68 Kd and 200 Kd neurofilament proteins in the gerbil hippocampus and their early distributional changes following transient forebrain ischemia. *Experimetal Brain Resarch*. 1992; **89**:31–39.
85. McAllister II JP, Maugans TA, Shah MV, Truex JrRC: Neuronal effects of experimentally induced hydrocephalus in newborn rats. *Journal Of Neurosurgery* 1985; **63**:776-783
86. Eliasson MJ, Huang Z, Ferrante RJ, Sasamata M, Molliver ME, Snyder SH, Moskowitz MA: Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. *J Neurosci* 1999; **19**:5910–5918
87. Miyazawa T, Sato K, Obata K: A synaptic vesicle-associated protein (SVP-38) as an early indicator of delayed neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1995; **15**:462–466.
88. Kaufmann WE, MacDonald SM, Altamura CR: Dendritic cytoskeletal protein expression in mental retardation: An immunohistochemical study of neocortex in rett syndrome. *Cerebral cortex*. 2000; **10**: 992-100
89. Ramirez G, Alvarez A, Garcia-Abreu J, Gomes FCA, Neto-Moura V, Maccioni RB: Regulatory roles of microtubule-associated proteins in neuronal

- morphogenesis. Involvement of the extracellular matrix. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1999; **32**: 611-618
90. Sapir T, Cahana A, Seger R, Nekhai S, Reiner O: LIS1 is a microtubule-associated phosphoprotein. *European Journal of Biochemistry*. 1999; **265**: 181-188
91. Quinlan EM, Halpain S: Emergence of activity-dependent, bidirectional control of microtubule-associated protein MAP2 phosphorylation during postnatal development. *The Journal of Neuroscience*. 1996; **16**: 7627-7637.
92. Rabalio R, Rhee J, Lyn-Cook R, Leckman JF, Schwartz ML, Vaccarino FM: Basic Fibroblast Growth Factor (Fgf2) is necessary for cell proliferation and neurogenesis in the developing cerebral cortex. *The Journal of Neuroscience*. 2000; **20**: 5012-5023
93. Hameroff SR, Kasziak AW, Scott AC: Orchestrated objective reduction of quantum coherence in brain microtubules: The "Orch OR" model for consciousness. In *towards a science of consciousness. The first tucson discussions and debates*. MIT press. 1996; 507-54
94. Mandelkow E, Mandelkow EM: Microtubules and microtubule-associated proteins. *Current Opinion in Cell Biology*. 1995; **7**: 72-81.
95. Tokuraku K, Katsuki M, Nakagawa H, Kotani S: A new model for microtubule-associated protein (MAP)-induced microtubule assembly. *European Journal of Biochemistry*. 1999; **259**: 158-166
96. Katsuki M, Tokuraku K, Nakagawa H, Kotani S: Purification and characterization of a new, ubiquitously distributed class of microtubule-associated protein with molecular mass 250 kDa. *European Journal of Biochemistry*. 2000; **267**: 7193-7200
97. Murakami K, Fellous A, Baulieu EE, Robel P: Pregnenolone binds to microtubule-associated protein 2 and stimulates microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000; **97**: 3579-3584.
98. Trinczek B, Ebner A, Mandelkow EM, Mandelkow E: Tau regulates the attachment/detachment but not the speed of motors in microtubule-dependent transport of single vesicles and organelles. *Journal of Cell Science*. 1999; **112**: 2355-2367



99. Woolf NJ, Zimmerman MD, Johnson GVW: Hippocampal microtubule-associated protein-2 alterations with contextual memory. *Brain Research*. 1999; **821**: 241-249
100. Sanchez C, Diaz-Nido J: Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuron cytoskeleton function. *Progress in Neurobiology*. 2000; **61**: 133-168
101. Woolf NJ: Global and serial neurons form a hierarchically arranged interface proposed to underlie memory and cognition. *Neurosciences*. 1996; **74**: 625-651.
102. Woolf NJ, Hameroff SR: A quantum approach to visual consciousness. *Trends in Cognitive Sciences*. 2001; **5**: 472-477
103. Woolf NJ : A structural basis for memory storage in mammals. *Progress in Neurobiology*. 1998; **55**: 59-77.
104. Ozer RS, Halpain S: Phosphorylation-dependent localization of microtubule-associated protein MAP2c to the actin cytoskeleton. *Molecular Biology of the Cell*. 2000; **11**: 3573-3587
105. Scwab M, Antonow-Schlorke I, Kühn B, Müller T, Schubert H, Walter B, Sliwka U, Nathanielsz PW: Effect of antenatal betamethasone treatment on microtubule-associated proteins MAP1B and MAP2 in fetal sheep. *Journal of Physiology*. 2001; **530**: 497-506
106. The European Ad Hoc Consensus Group: Neuroprotection as initial therapy in acute stroke. Third Report of an Ad Hoc Consensus Group Meeting. *Cerebrovasc Dis* 1998; **8**: 59-72
107. Dyker AG, Lees KR: Duration of neuroprotective treatment for ischemic stroke. *Stroke* 1998; **29**: 535-542
108. Del Zoppo GJ, Wagner S, Tagaya M: Trends and future developments in the pharmacological treatment of acute ischaemic stroke. *Drugs* 54: 9-38, 1997
109. Khan O, Enno T, Del Bigio M :Magnesium sulfate therapy is of mild benefit to young rats with kaolin-induced hydrocephalus. *Pediatric research* 2003;**53**:1-7
110. Lipton SA: Prospects for clinically tolerated NMDA antagonists :open-channel blockers and alternative redox states of nitric oxide .*Trends in neuroscience* .1993;**16**:527-532

111. Chen HS, Wang YF , Rayudu PV, Edgecomb P, Neill JC, Segal MM, Lipton SA, Jensen FE: Neuroprotective concentrations of the N-Methyl- D-aspartate open-channel blocker memantine are effective without Cytoplasmic vacuolation following post-ischemic administration and do not block maze learning or long-term potentiation. *Neuroscience* 1998; **86**:1121-1132
112. Lipton SA, Rayudu PV, Choi YB, Sucher NJ, Chen HS: Redox modulation of NMDA receptor by NO-related species. *Progress in Brain Research*. 1998; **118**: 73-82
113. Choi YB, Tenneti L, Ortiz J, Bai G, Chen HS, Lipton SA: Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S Nitrosylation. *Nature Neuroscience* .2000; **3**:15-21
114. Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P: Glutamate induced neuronal death. A succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 1995; **15**: 961-973
115. Kornhuber J, Quack G: Cerebrospinal fluid and serum concentrations of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist memantine in man. *Neurosci Lett*. 1995; **195**: 137-139
116. Winblad B, Poritis N: Memantine in severe dementia: results of the 9M-Best Study (Benefit and efficacy in severely demented patients during treatment with memantine). *Int J Geriatr Psychiatry* 1999 ; **14**: 135-146
117. Chen HS ve Lipton SA: Mechanism of memantine block of NMDA-activated channels in rat retinal ganglion cells: uncompetitive antagonism. *J Physiol*. 1997; **15499**: 27-46
118. Parsons CG, Gruner R, Rozental J, Millar J, Lodge D: Patch clamp studies on the kinetics and selectivity of N-methyl-D-aspartate receptor antagonism by memantine (1-amino-3,5-dimethyladamantan). *Neuropharmacology* 1993; **32**: 1337-1350
119. Lipton SA: Failures and successes of NMDA receptor antagonists: molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults. *NeuroRX* 2004; **1**: 101-110
120. Kim TW, Kim DM, Park KH, Kim H. Neuroprotective effect of memantine in a rabbit model of optic nerve ischemia. *Korean J Ophthalmology* 2002; **16**: 1-7.

121. Ehrlich M, Knolle E, Ciovica R, Bock P, Turkof E, Grabenwoger M, Cartes-Zumelzu F, Kocher A, Pockberger H, Fang WC, Wolner E, Havel M. Memantine for prevention of spinal cord injury in a rabbit model. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1999;**117**:285–291.
122. Osborne NN: Memantine reduces alterations to the mammalian retina, in situ, induced by ischemia. *Vis Neurosci* 1999; **16** :45–52.
123. Erdo SL, Schafer M. Memantine is highly potent in protecting cortical cultures against excitotoxic cell death evoked by glutamate and N-methyl-D-aspartate. *Eur J Pharmacol* 1991; **198** :215–217.
124. Barnes CA, Danysz W, Parsons CG: Effects of the uncompetitive NMDA receptor antagonist memantine on hippocampal long-term potentiation, short term exploratory modulation and spatial memory in awake, freely moving rats. *Eur J Neurosci.* 1996; **8**: 565-571.
125. Zajackowski W, Quack G, Danysz W: Infusion of (+) -MK-801 and memantine contrasting effects on radial maze learning in rats with entorhinal cortex lesion. *Eur J Pharmacol.* 1996; **5**: 239-246
126. Winblad B, Mobius HJ, Stoffler A. Glutamate receptors as a target for Alzheimer's disease--are clinical results supporting the hope? *J Neural Transm Suppl.* 2002; **62**: 217-225.
127. Bannister CM, Chapman SA. Ventricular ependyma of normal and hydrocephalic subjects: a scanning electronmicroscopic study. *Develepmental medicine and child neurology.*1980; **22**: 725-735
128. Bannister CM, Mundy JE: Some scanning electron microscopic observations of the ependymal surface of the ventricles of hydrocephalic hy3 mice and a human infant. *Acta Neurochirurgia.*1979; **46**: 159-168
129. Torvik A, Stenwig AE: The pathology of experimental obstructive hydrocephalus:Electronmicroscopicobservations.*Acta Neuropathologia.*1977; **38**: 21-26
130. Weller RO, Shulman K: Infentile hydrocephalus: clinical, histological and structural study of brain damage. *Journal of Neurosurgery.* 1972; **36**: 255-265
131. De Sn: A study of the changes in the brain in experimental internal hydrocephalus. *Journal Of pathology and Bacteriology .* 1950; **62**: 197-208

132. Edwards MSB, Harrison MR, Halks-Miller M: Kaolin-induced congenital hydrocephalus in utero in fetal lambs and rhesus monkeys. *Journal Of Neurosurgery*. 1984; **60**: 115-122
133. Flor WJ, James AE Jr, Ribas JL: Ultrastructure of the ependyma in the lateral ventricles of primates with experimental communicating hydrocephalus. *Scan Electron Microscope*. 1979; **3**: 47-54
134. Gonzales-Darder J, Barbera J, Cerda-Nicolas M: Sequential morphological and functional changes in kaolin-induced hydrocephalus. *Journal Of Neurosurgery*. 1984; **61**: 918-924
135. Gopinath G, Bhatia R, Gopinath PG: Ultrastructural observations in experimental hydrocephalus in the rabbit. *Journal Of Neurological Sciences*. 1979; **43**: 333-344
136. Nakayama DK, Harrison MR, Berger MS: Correction of congenital Hydrocephalus in utero. The model: intracisternal kaolin produces hydrocephalus in fetal lambs and rhesus monkeys. *Journal Of pediatric Surgery*. 1983; **18**: 331-338
137. Weller RO, Mitchell J, Griffin RL: The Effects of hydrocephalus upon the developing brain. Histological and Quantitative studies of the ependyma and subependyma in hydrocephalic rats. *Journal Of Neurological Sciences*. 1978; **36**: 383-402
138. Weller RO, Williams BN: Cerebral Biopsy and assesment of brain damage in hydrocephalus. *Arch Dis Child*. 1950; **50**: 763-768
139. Pappas GD, Waxman SG: Synaptic fine structure morphological correlates of chemical and electronic transmission. *Structure and Function of Synapses*. New York. Raven Pres. 1972: pp 1-43
140. Wise SP, Fleshman JW, Jones EG: Maturation of pyramidal cell form in relation to developing afferent and efferent connections of the rat somatic sensory cortex. *Neuroscience* 1979; **4**: 1275-1979
141. Çabuk B: İnfant sıçanda kaolin ile oluşturulan hidrosefali modelinde sistemik uygulanan memantin hipokampus CA1, CA2 ve CA3 bölgeleri üzerindeki nöroprotektif etkisi: Histopatolojik ve immünohistokimyasal inceleme. *T.C. Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi*, 2007

142. Stieg PE, Sathi S, Warach S, Le Da , Lipton SA: Neuroprotection by the NMDA receptor-associated open-channel blocker memantine in a photothrombic model of cerebral focal ischemia in neonatal rat .*European Journal Of Pharmacology* 1999; **375**: 115-120
143. Culmsee C, Junker V, Kremers W, Thal S, Plesnila N , Krieglstein J :Combination Therapy in ischemic stroke :Synergistic neuroprotective effects of memantine and clenbuterol .*Stroke* .2004; **35**: 1197-1202
144. Chen CM, Lin JK, Liu SH, Shiau SH: Novel regimen through combination of memantine and tea polyphenol for neuroprotection against brain excitotoxicity.*Journal Of Neuroscience Research* .2008; **86**: 2696-2704
145. Wright LC, McAllister JP 2nd, Katz SD, Miller DW, Lovely TJ, Salotto AG, Wolfson BJ. Cytological and cytoarchitectural changes in the feline cerebral cortex during experimental infantile hydrocephalus. *Pediatr Neurosurg*. 1990-1991; **16**:139-55
146. Sanchez C, Diaz-Nido J, Avila J: Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog Neurobiol* 2000; **61**:133–168
147. Malinak C, Silverstein FS: Hypoxic-ischemic injury disrupts microtubule-associated protein 2 immunostaining in neonatal rat brain. *Biol Neonate* 1996; **69**: 257–267
148. Tomimoto H, Yaegihara T: Vulnerability of dendrites and nerve cell bodies in cerebral ischemia. In: Oehmichen M (ed) Brain hypoxia and ischemia:2000; *Schmidt Römhild, Lübeck*, pp 65–84
149. Yanagihara T, Brengman JM, Mushynski WE: Differential vulnerability of microtubulus components in cerebral ischemia: *Acta Neuropathol* 1990; **80**:499–505
150. Kühn J, Meissner C, Oehmichen M: Microtubule-associated protein 2 (MAP2)—a promising approach to diagnosis of forensic types of hypoxia-ischemia. *Acta Neuropathol* 2005; **110**: 579–586
151. Qi JP, Wu AP, Wang DS, Wang LF, Li SX, Xu FL: Correlation between neuronal injury and Caspase-3 after focal ischemia in human hippocampus. *Chin Med J*: 2004; **117**:1507–1512.

152. Oehmichen M, Woetzel F, Meissner C: Hypoxic–ischemic changes in SIDS brains as demonstrated by a reduction in MAP2-reactive neurons: *Acta Neuropathol.* 2009; **117**: 267-74.
153. Hirokawa N: Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins: *Curr Opin Cell Biol* 1994; **6**:74–81.
154. Johnson GW, Jope RS: The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration: *J Neurosci Res* 1992; **33**: 505–51.
155. Tucker RP: The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Res Brain Res Rev* 1990; **15**:101–120
156. Kitagawa K, Matsumoto M, Niinobe M, Mikoshiba K, Hata R, Ueda H, Handa N, Fukunaga R, Isaka Y, Kimura K, Kamada T: Microtubule-associated protein 2 as a sensitive marker for cerebral ischemic damage—immunohistochemical investigation of dendritic damage. *Neuroscience* 1989; **31**: 401–411
157. Lipton P: Ischemic cell death in brain neurons: *Physiol Rev* 1999; **79**: 1431–1568.
158. Malinak C, Silverstein FS: Hypoxic-ischemic injury acutely disrupts microtubule-associated protein 2 immunostaining in neonatal rat brain. *Biol Neonate* 1996; **69**: 257–267
159. Ota A, Ikeda T, Ikenoue T, Toshimori K: Sequence of neuronal responses assessed by immunohistochemistry in the newborn rat brain after hypoxia-ischemia. *Am J Obstet Gynecol* 1997; **177**: 519–526.
160. Tomimoto H, Yanagihara T: Vulnerability of dendrites and nerve cell bodies in cerebral ischemia. In: Oehmichen M (Ed) *Brain hypoxia and ischemia*. Research in legal medicine, 1st edn, vol 24. 2000, Schmidt-Römhild, Lübeck, pp 65–84.
161. Kühn J, Meissner C, Oehmichen M: Microtubule-associated protein 2 (MAP2)—a promising approach to diagnosis of forensic types of hypoxia-ischemia: *Acta Neuropathol.* 2005; **110**:579-86
162. Etuş V, Gazioğlu N, Belce A: N-Acetylcystein reduces cerebral lipid peroxidation in a rat model of infantile hydrocephalus. *The Online Journal of Neurological Sciences* 2001; **18**: 1.

163. Etuş V: Deneysel neonatal hidrosefali modelinde N-asetilsisteinin lipid peroksidasyonu üzerine etkisi. T.C. İ.Ü. *Cerrahpařa Tıp Fakóltesi Nöroşirürji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi* 1999