

T.C
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**İNFAnt SIÇANDA KAOLİN İLE OLUŞTURULAN
HİDROSEFALİ MODELİNDE SİSTEMİK UYGULANAN
MEMANTİNİN HİPOKAMPUS CA1, CA2 VE CA3 BÖLGELERİ
ÜZERİNDEKİ NÖROPROTEKTİF ETKİSİ :
HİSTOPATOLOJİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME**

Dr. Burak ÇABUK

Nöroşirürji Uzmanlık Tezi

2007

T.C
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**İNFAnt SIÇANDA KAOLİN İLE OLUŞTURULAN
HİDROSEFALİ MODELİNDE SİSTEMİK UYGULANAN
MEMANTİNİN HİPOKAMPUS CA1, CA2 VE CA3 BÖLGELERİ
ÜZERİNDEKİ NÖROPROTEKTİF ETKİSİ :**

**HİSTOPATOLOJİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL
İNCELEME**

Dr. Burak ÇABUK

Nöroşirürji Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Volkan ETUŞ

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Savaş CEYLAN

ETİK KURUL ONAYI: 17/2/2007-HAEK 20/2

2007

TEŐEKKÜR

Tez çalıőmam boyunca tım basamaklarda ilgisini ve yardımını esirgemeyen tez danıőmanım Doç. Dr. Volkan Etuş'a, bizi yōnlendiren Anabilim Dalı Baőkanımız Prof.Dr.Savaş Ceylan'a ; Radyolojik incelemelerde bizimle birlikte alıőan Y.Doç.Dr. Tahsin Sarısoy'a, ve radyolojik incelemelere olanak sağlayan Prof. Dr. Ali Demirci'ye; İmmün boyama ve histolojik incelemeler için bize fikirleriyle yol gōsteren ve uzun saatler birlikte çalıőtıėımız Y.Doç.Dr.Suheylyla Bozkurt ve Prof.Dr. Aydın Sav'a teőekkür ederim.

Ayrıca tım bu çalışma boyunca bana her Şekilde destek olan ailem, oğretim gōrevlisi Doç. Dr. Konuralp İlbay, Y.Doç.Dr. Kenan Koç, Y.Doç.Dr. İhsan Anık ve asistan arkadaşlarım Dr. Murat Yılmaz, Dr. Emin Vural, Dr. Mehmat Korkmaz, Dr. Nezh Yasa, Dr. Göliz. Göltekin 'e teőekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

1. AMAÇ VE KAPSAM	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. HİDROSEFALİ	2
2.1.1. HİDROSEFALİ TANIMI VE TARİHÇESİ	2
2.1.2. HİDROSEFALİDE PATOGENEZ VE NÖRONAL HASARLANMA	5
2.1.3. EKSİTOTOKSİSİTE VE HİDROSEFALİ NEDENLİ NÖRONAL HASARLANMA SÜRECİNDEKİ YERİ	7
2.1.4. HİPOKAMPUS VE HİDROSEFALİK SÜREÇTE HİPOKAMPUSUN ETKİLENMESİ	10
2.1.5. HİDROSEFALİK SÜREÇTE NÖROPROTEKTİF TEDAVİ YAKLAŞIMININ TEMELLERİ	11
2.1.6. MEMANTİN	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM	14
3.1. DENEKLER	14
3.2. DENEYSEL İNFANTİL HİDROSEFALİ MODELİ	15
3.3. MEMANTİN UYGULAMASI	16
3.4. HİPOKAMPAL NÖRONAL VİABİLİTE TAYİNİ	16
3.5. İMMÜN BOYAMA TEKNİĞİ İLE HİPOKAMPAL NÖRONAL NİTRİK OKSİT SENTAZ TAYİNİ	17
3.6. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	18
4. BULGULAR	19
4.1. HİDROSEFALİK SÜRECE AİT GÖZLEMLER	19
4.2. HİDROSEFALİK SÜRECİN RADYOLOJİK KONTROLÜ	19
4.3. HİPOKAMPUS ALANLARINDA NÖRON SAYIMI	21
4.4. HİPOKAMPUS ALANLARINDA NÖRONAL NİTRİK OKSİT SENTAZ AKTİVİTESİ	30
5. TARTIŞMA	39
6. SONUÇ	46
7. ÖZET	47
8. ABSTRACT	49
9. KAYNAKLAR	51

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BOS: Beyin - omurilik sıvısı

CA: Cornu Ammonis

HE: Hematoksilen-Eosin

mM: Milimol

MR: Manyetik rezonans

NMDA: N-Metil D-Aspartat

nNOS: Nöronal nitrik oksit sentaz

NO: Nitrik oksit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Hidrocefali grubuna ait MR görüntüsü	Sayfa 20
Şekil 2.	Kontrol grubuna ait MR görüntüsü	Sayfa 20
Şekil 3.	CA1 alanındaki ortalama korunmuş nöron sayısı verileri	Sayfa 23
Şekil 4.	CA2 alanındaki ortalama korunmuş nöron sayısı verileri	Sayfa 25
Şekil 5.	CA3 alanındaki ortalama korunmuş nöron sayısı verileri	Sayfa 27
Şekil 6.	Hematoksilen-Eosin ile boyanmış CA1, CA2 ve CA3 bölgeleri	Sayfa 28
Şekil 7.	Hematoksilen-Eosin ile boyanmış CA1 bölgesi	Sayfa 29
Şekil 8.	Hematoksilen-Eosin ile boyanmış CA2 bölgesi	Sayfa 29
Şekil 9.	Hematoksilen-Eosin ile boyanmış CA3 bölgesi	Sayfa 30
Şekil 10.	Nitrik Oksit Sentaz immünoreaktif CA1, CA2 ve CA3 bölgeleri	Sayfa 36
Şekil 11.	Nitrik Oksit Sentaz immünoreaktif CA1 bölgesi	Sayfa 37
Şekil 12.	Nitrik Oksit Sentaz immünoreaktif CA2 bölgesi	Sayfa 37
Şekil 13.	Nitrik Oksit Sentaz immünoreaktif CA3 bölgesi	Sayfa 38

TABLO DİZİNİ

Tablo 1.	Serebral parenkimal interstisyel alan bazında hidrosefali sınıflandırılması	Sayfa 4
Tablo 2.	Obstrüksiyon düzeyi temel alınan hidrosefali sınıflandırılması	Sayfa 5
Tablo 3.	CA1 alanındaki korunmuş nöron sayısı verileri	Sayfa 21
Tablo 4.	CA2 alanındaki korunmuş nöron sayısı verileri	Sayfa 21
Tablo 5.	CA3 alanındaki korunmuş nöron sayısı verileri	Sayfa 22
Tablo 6.	Post hoc Tukey testi p değerleri	Sayfa 27
Tablo 7.	CA1 alanı nitrik oksit sentaz konsantrasyonu verileri	Sayfa 31
Tablo 8.	CA2 alanı nitrik oksit sentaz konsantrasyonu verileri	Sayfa 31
Tablo 9.	CA3 alanı nitrik oksit sentaz konsantrasyonu verileri	Sayfa 31
Tablo 10.	Ki-Kare testi p değerleri	Sayfa 35

1. AMAÇ VE KAPSAM

Hidrosefali gelişimi sırasında, ventrikül dilatasyonuna bağlı birincil mekanik hasarlanma yanında, periventriküler dokularda oluşan destrüktif ve iskemik değişiklikler sonucu ikincil bir hasarlanma mekanizmasının varlığı gerek deneysel olarak oluşturulmuş hidrosefalik hayvan modellerinde (1, 2, 3), gerekse konjenital olarak hidrosefalik olan sıçanlarda gösterilmiştir (4). Özellikle hipoksiye ve iskemiyeye çok duyarlı olduğu bilinen CA1 (Cornu Ammonis 1) bölgesi başta olmak üzere hipokampus, hidrosefalik sürecin ortaya çıkarttığı sekonder nöronal hasar konusunda oldukça önemli bir hedefdir.

Travma ve iskemideki sekonder nöronal hasarlanmayı en aza indirmek amacıyla ile farmakolojik olarak bu hasarlanma mekanizmasına etki edilebileceği gösterilmiştir. İskemik ve travmatik serebral hasarda nöroprotektif etkisi bilinen N-Metil D-Aspartat (NMDA) reseptör antagonisti “memantin”in (5, 6) hidrosefali sürecindeki nöron koruyucu etkisi konusunda henüz yapılmış bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

Bu çalışmada; infant sıçanlarda kaolin ile oluşturulan hidrosefali modeli kullanılmıştır. Bu model üzerinde hidrosefali gelişimine bağlı hipokampus bölgesindeki ikincil nöronal hasarlanma süreci ve sistemik olarak uygulanan memantin hipokampus CA1, CA2 ve CA3 bölgeleri üzerindeki muhtemel nöron koruyucu etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu etki, hipokampus bölgelerindeki nöronların sayılması ve bu bölgelerdeki nöronlarda nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) enzimine yönelik immünohistokimyasal inceleme yapılarak ortaya konmaya çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. HİDROSEFALİ

2.1.1. HİDROSEFALİ TANIMI VE TARİHÇESİ

Hidrocefali terimi, beyin - omurilik sıvısının (BOS) üretim, dolanım ve emilimindeki dengesizlikler sonucunda ventriküllerin genişlemesi ve kranyum içinde BOS birikmesini ifade etmek için kullanılır (7, 8, 9, 10, 11).

Hidrocefali hikayesi uygarlığın tarihi ile paralellik göstermektedir. Antik çağdan itibaren bilinmekte ise de, terim olarak hidrocefali sözcüğü eski Yunan uygarlığı zamanında geçerlilik kazanmıştır. Hidrocefali terimi ilk kez Hippocrates (M.Ö.460-377) tarafından beyin dışı sıvı toplanmasını tanımlamakta kullanılmıştır. Fisher'e göre (16) aşırı ve fazla sıvının, bariz veya şiddetli abnormaliteler oluşturduğunun Oribasis (M.S.325-405) tarafından bilindiği ve açıklandığı belirtilmektedir. Hidrocefalinin tanımlanarak şekillendirilmesinin ise, ilk kez İtalyan cerrah Severino tarafından (1632) yapılmış olduğu Lyons tarafından belirtilmektedir (12). Hippocrates kafada büyümeye neden olan sıvı kolleksiyonu tedavisinde ponksiyonu denemiş ama, düşündüğü patolojinin tedavisi şimdiki bulgularıyla subdural mesafe drenajı olmuştur (13). Daha sonraları, Claudius Galen ile hayvan deneylerinde anatomi ağırlık bulurken, fizyoloji aynı oranda gelişim gösterememiştir. Galen canlı hayvan deneylerinde, açık ventrikül sistemi ve BOS hakkında fikir sahibi olmuş, koroid pleksusları psişik ruhun kaynağı olarak tanımlamıştır. Hidrocefaliden bahsetmesine karşın, ventrikül dilatasyonu ile ilgisini belirtmemiştir. Daha sonraları üniversitelerde insan üzerinde yapılan diseksiyonların başlamasıyla, bilgi birikimi ve anatomik yapı daha iyi anlaşılmaya başlanmıştır. Padua Üniversitesinde Andreas Vesalius (1514-1564), BOS'nın ventriküler sistem içerisindeki akümülyasyonundan bahseden ilk yazar olmuştur (14). Ventriküllerin normalde BOS ile dolu olduğunu ve aşırı birikimde hidrocefalinin destrüksiyon yarattığını bildirmiştir. 17. asırda William Harvey insan vücudunda kan akımının

dinamik bir olaya bağlı olduğunu tanımlamış, Thomas Willis ise, BOS'nın venöz sisteme drenajını ve ilk defa, koroid pleksusların BOS sekresyonunu sağladığı fikrini ortaya koymuştur. Franciscus Sylvius (1614-1672) serebral aquadukt, Pacchioni, granular cisimleri (1701), Alexander Monro (1713-1817) interventriküler foramenleri, Morgagni'nin (1682-1771) hidrosefali patolojisi tanımları ardından, 18. asrın sonlarına doğru hidrosefali patolojisi hakkındaki bilgiler giderek gün ışığına çıkmaya başlamıştır (3,15).

Yirmi olguluk muhtemel tuberküloz menenjitli otopsi serisinde, Fisher'e göre, Whytt (1714-1766) ilk kez internal ve eksternal hidrosefaliyi tanımlamıştır (16). Morgagni çocuklarda hidrosefali oluşumunda klinik tabloyu ve yanısıra etyolojide aquadukt stenozunu belirtmiş ve 1891'de Chiari'nin tanımladığı malformasyondan önce 1769'da Chiari II malformasyonunun hidrosefali ile beraber görülebileceğinden bahsetmiştir. Willis'den 200 sene sonra Faivre (1854), BOS sekresyonunun koroid pleksuslardan olduğunu desteklemiştir (3).

Son yıllarda gelişen teknoloji ve kaydedilen bilimsel gelişmelerin hidrosefalinin patofizyolojisine kattığı yenilikler ve serebral parenkimin hidrosefalide oynadığı rolün ortaya çıkartılması, bu antitenin çeşitli sınıflandırmalarını gündeme getirmiştir. Tıkanma seviyesine göre veya BOS dinamiği ve kafa içi basıncı karakteristiklerine göre yapılan değişik sınıflamalar mevcuttur (8,15,17).

Bunların en önemlilerinden biri olan Mori ve Raimondi ' nin geliştirmiş olduğu sınıflandırma (15), serebral parenkimal interstisyel sahanın hidrosefali patofizyolojisinde gerçekten önemli bir faktör olduğuna dikkat çekmektedir (Tablo1). Kabul edilmiş en pratik sınıflandırmalarından biri olan Naidich ve McLone 'un geliştirmiş oldukları sistem (3, 15), beynin görüntüleme teknikleri ile incelenmesi ile hidrosefaliyi obstrüksiyon seviyesine göre kategorilere ayırmaktadır (Tablo 2).

İntraparenkimal Hidrocefali	İntraselüler		
	Ekstraselüler		
Ekstraparenkimal Hidrocefali	Subaraknoidal	Sisternal	İntraventriküler
	a- Geçici, kendi kendini sınırlayan b- Bölgesel veya loküle araknoidal kistlere transforme olan c- "Kommünikan hidrocefali"nin erken dönemleri	a- Sisterna magna kistleri b- Bazal ve sagittal sisterna kistleri c- Parenkimal displazinin eşlik ettiği/etmediği sylvian fissür kistleri	a- Monoventriküler b- Biventriküler c- Triventriküler d- Tetraventriküler

Tablo 1. Mori ve Raimondi ' nin geliştirmiş olduğu sistemde hidrocefali, serebral parenkimal interstisyel alan bazında sınıflandırılmaktadır (15).

- I. Obstrüktif hidrocefali
 - A. İnternal obstrüktif hidrocefali
 - 1. Lateral ventriküler
 - a. Atriumda
 - b. Gövdede
 - c. Foramen Monroda (birinde veya her ikisinde)
 - 2. Üçüncü ventriküler
 - a. Orta-üçüncü ventrikül
 - b. Posterior üçüncü ventrikül
 - 3. Akvaduktal
 - a. Proksimal iter
 - b. Distal iter
 - 4. Dördüncü ventriküler
 - a. Dördüncü ventrikülün ana gövdesi içi
 - b. Foramen çıkışları (Dandy-Walker malf. dahil)
 - B. Eksternal obstrüktif hidrocefali
 - 1. Sisternal
 - a. Bazal sisternlerde (Chiari malf. dahil)
 - b. İnsisura düzeyinde (Chiari II malf. dahil)
 - c. Konveksitede
 - d. Parasagital (Normal basınçlı hidrocefali dahil)
 - 2. Araknoid villi ile ilişkili
 - a. Araknoid villi konjenital aplazisi
 - b. Araknoid villinin tümör hücreleri, protein, kan vd. ile tıkanması (Koroid pleksus papillomu dahil)
 - c. Absorbsiyon kapasitesinin aşılması (Koroid pleksus papillomu dahil)
 - 3. Dural venöz sinüsler ile ilişkili
 - a. Majör tromboz
 - b. Patent sinüste arteriovenöz şant sonucu sinüs basıncında yükselme
 - 4. Ekstrakranial venöz drenaj ile ilişkili
 - a. Bilateral juguler ven düzeyinde
 - 1. Parenteral alimentasyon kateterleri
 - 2. Akondroplazi
 - 3. Kafa tabanı stenozuna yol açan diğer durumlar
 - b. Süperior vena kava düzeyinde
 - C. Multiseviye obstrüktif hidrocefali
 - 1. Tamamı ile intraventriküler
 - 2. İntraventriküler ve ekstraventriküler kombine
 - 3. Tamamı ile ekstraventriküler
- II. Disfonksiyonel hidrocefali
 - A. Baziller arter ile ilişkili
 - 1. Ektazi
 - 2. Anevrizma
 - B. Bilinmeyen

Tablo 2. Naidich ve McLone ‘un geliştirmiş oldukları hidrocefali sınıflama sisteminde saptanan obstrüksiyon düzeyi temel alınmaktadır (15).

2.1.2. HİDROSEFALİDE PATOGENEZ VE NÖRONAL HASARLANMA

Deneysel ve klinik hidrosefalide oluşan nöropatolojik değişiklikler geniş kapsamlı olarak araştırılmıştır. Nöral dokuda hidrosefali nedeniyle oluşan hasarın tip ve derecesi ventrikül genişlemesinin oluşma hızına, büyüklüğüne ve hidrosefalinin hangi yaş döneminde geliştiğine bağlıdır. BOS akımının engellenmesi kafa içi basıncı artmasa bile beyin kompliyansının ve serebral kan akımının azalmasına neden olur. Ventrikül genişlemesinin devam etmesi epandimi yırtabilir ve mikrovasküler yapılarda iskemik ve mekanik etkiler sonucunda axonal ve ikincil miyelin hasarları oluşturur. Doku hasarı astroglial reaksiyonu uyarak kortekste deafferentasyona neden olur. Direkt hasar ancak ventrikül genişlemesi çok fazla veya serebral kan akımı anlamlı derecede azalmış ise görülür. Özellikle periventriküler ekstrasellüler alanın kompresyonu, lenfatik kanalları bulunmayan nöral dokudan ventriküle olan atık maddeler akım yolunun kesilmesine ve bu alanda genişlemeye neden olur (18). Deneysel çalışmalar ve insan beyinlerinde yapılan dikkatli patolojik incelemelerden, oluşan hasarın kronik iske mi sonucunda gelişen myelin hasarına bağlı olduğu anlaşılmıştır. McAllister II ve arkadaşları ise nöronların dendritlerinde sayıca azalma olduğunu tespit etmişlerdir (19).

Hidrosefali oluşturulan hayvanlarda beyaz maddede lokal glukoz utilizasyonunun normale göre arttığı ancak bunun anaerobik yolla oluştuğu gösterilmiştir. Ayrıca serebral laktat konsantrasyonunun arttığı, beyaz maddede glukoz, ATP ve fosfokreatinin azaldığı (20) ve periventriküler beyaz maddede ortalama serebral kan akımının anlamlı ölçüde düştüğü bulunmuştur. Serebral korteks ve nukleus kaudatus ise bu kan akımı azalmasından etkilenmemektedir (21, 22, 23). Bu nedenle bu metabolik değişikliklerin periventriküler beyaz maddede hipoksik-iskemik bir sürecin sonucunda oluştuğu ve zamanla lokal bir beyaz madde enfarktına neden olacağı kabul edilmektedir (20, 24, 25). DaSilva ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, neonatal hidrosefalili deneklerin magnetik rezonans spektroskopisi ile saptanan enerji indeksleri kontrol grubundan anlamlı şekilde farklı bulunmuştur. Buna göre fosfokreatinin / inorganik fosfat oranı azalmakta, inorganik fosfat / ATP oranı ise artmaktadır. Şant takılan deneklerde bu oranlar normale

dönmektedir. Bu yüksek enerjili fosfat metabolizması ile ventrikül boyutu arasında anlamlı bir ilişki bulunduğu saptanmıştır (26).

Hidrocefalik süreç içerisinde birçok biyokimyasal değişimin olduğu gözlenmiştir. Lomber yoldan alınan BOS örneklerinde hücre veya akson hasarını gösteren protein enolaz ve myelin tabanlı proteinin artıkları kaydedilmektedir (3). Ventriküler BOS örneklerinde ksantin ve hipoksantin düzeylerinin yüksek bulunması ise hipoksinin bir göstergesi olarak yorumlanmaktadır (27, 28, 29, 30).

2.1.3. EKŞİTOKSİSİTE VE HİDROSEFALİ NEDENLİ NÖRONAL HASARLANMA SÜRECİNDEKİ YERİ

Sinir sisteminin duysal haberleşmesi ve kompleks motor emirleri hızla vücudun bir bölgesinden başka bir bölgesine yayması, düşünce ve belleğin oluşması büyük ölçüde eksitator bir aminoasit olan glutamat ile ilintilidir. Çoğu nöron yüksek konsantrasyonda glutamat içerir (yaklaşık 10 mM). Miktarı sıkı kontrol edilir ve çok kısa zamanda (milisaniye) sinaptik sonlanmalardan geçerek diğer nöronlar ile bağlantı kurar (31). Glutamat çok güçlü bir eksitatorüdür. Bununla beraber, glutamatın çok fazla miktarda veya normalden fazla süre ortamda bulunması hücrenin ölümüne neden olabilir.

Sinir sistemi çeşitli mekanik hasarlara maruz kaldığında (kafa travması veya spinal kord yaralanması gibi), iskemi durumlarında hasarlı hücrelerden aşırı miktarda glutamat salgılanır. Yüksek düzeylerdeki bu glutamat, yakındaki özgün travmadan sonra hayatta kalabilmiş binlerce hücreyi hasarlar ki onların depolarize olmasına, şişmesine, çözülmesine ve sonuçta ölmesine sebep olur. Bu lizise uğrayan hücreler, otodestruktif olaylara doğru ilerleyen kaskadı başlatacak daha da çok glutamatın salgılanmasına sebep olurlar. Böylece hücre ölümü, özgün kazadan sonra bile progresif olarak devam eder. Benzer bir fenomen inmede de görülür. İskemik olay nöronlardaki enerji yoksunluğuna neden olur ve travmatik yaralanmadaki gibi

hücrelerin depolarize olmasına, şişmesine, çözülmesine ve sonuçta ölmesine sebep olan aynı otodestruktif olaylar gerçekleşir (31, 32).

Eksitotoksisite; eksitatör aminoasit reseptörlerinin aşırı uyarılması ile meydana gelen nöronal hasar süreci olarak tanımlanır. Hasarın bu formu ilk olarak retinada tanımlanmıştır ve sonradan santral sinir sisteminde travmatik ve iskemik hasarlanmanın patogenezinin önemli bir komponenti olarak gösterilmiştir. Bununla beraber, çok sayıda kronik nörolojik hastalıkta eksitotoksisitenin rol aldığına dair artan kanıtlar vardır ve anti-eksitotoksik tedavi bu durumların bazılarında halihazırda kabul görmüştür (33).

1959'da Curtis ve arkadaşları, sıçan spinal nöronlarında glutamatın depolarize edici etkisini tanımlamışlardır ve bir eksitatör aminoasit geliştirilebileceği fikri doğmuştur (34). Bir dekad sonra, Olney monosodyum glutamat verilen farelerde meydana gelen beyin lezyonlarını tanımlamış ve eksitotoksik aminoasit nörotransmitterlerin reseptörlerinin aşırı ve uzun süreli devam eden aktivasyonlarının sebep olduğu nöronal ölümü 'eksitotoksisite' olarak adlandırmıştır (35).

Eksitotoksisite; dakikalar içerisinde glutamatın kontrolsüz bir şekilde salınımını takiben; NMDA iyonoforik reseptörlerinin yoğun aktivasyonu, membran depolarizasyonu, sonrasında ise Ca, Na ve su moleküllerinin hücre içerisine aşırı geçişi şeklinde tanımlanmaktadır. Bu hücre içi su artışı intraselüler organellerin şişmesine ve neticede hücrenin nekrotik tipte ölüm ile lizise uğramasına, intraselüler içeriğin serbestleşmesine, ekstraselüler çevrede çok miktarda glutamat birikmesine sebep olmaktadır (36). Bu noktada artmış hücre içi Ca ile; lipaz, endonükleaz ve proteazların aktif konuma geçmesi hücreyi ölüme götürmektedir. Glutamat gibi uyarıcı aminoasitlerin meydana getirdiği NMDA reseptörleri üzerinden ve hücre içi Ca miktarında artış ile tetiklenen eksitotoksik reaksiyonlar, bu moleküller olmadan, hipoksiye sekonder (membran potansiyelindeki değişikliklerle) NMDA reseptörlerinin pasif olarak açılmasıyla da gelişebilir.

NMDA reseptörü aktive olduğunda, bir kanal açılır ve bu kanal, Ca ve diğer katyonların hücre içine doğru hareketine izin verir. Sinaptik geçişin normal olduğu durumlarda NMDA reseptörü çok kısa bir süreliğine aktiftir. Patolojik koşullarda ise, sinir hücresinden içeri aşırı miktarda Ca akımına sebep olacak şekilde reseptör uzun bir süre aktif halde kalır. Bu olay dendritik ve sinaptik hasara, sonuçta da

nöronal hücre ölümüne kadar ilerleyebilecek biyokimyasal olayları tetikler. Hücre içine aşırı Ca akımı sonucu çok miktardaki Ca, hücrenin enerji depoları olan mitokondrilerin içinde birikebilir ve sonucunda serbest oksijen radikalleri oluşabilir, kaspas aktivasyonu ve apoptoz oluşturuca faktörler serbestlenebilir (37). NMDA reseptör ilişkili kanallar boyunca Ca'un nöron içerisine akışı nöronal NO sentetazı aktive edebilir (38), bu NO üretiminde artışa sebep olur ve NO, süperoksit anyonu ile reaksiyona girdiği zaman toksik peroksinitrit meydana gelir. Peroksinitrit hücrede ağır hasara sebep olur. Aynı zamanda, mitojen ile aktive edilmiş protein kinazlarında uyarılması transkripsiyon faktörlerini aktive eder ki, bunun da çekirdek içerisine girmesi ile nöronal hasar ve apoptozis başlar (36).

Hidrocefali gelişiminde akut dönemde ortaya çıkan; ependimal hasar, ak madde ödemi, kapiller kompresyon, ak madde hipoksi ve iskemisi, aksonal şişme ve nöronal piknozis ile karakterize olan primer yaralanmanın da aynen iskemi ve travmatik süreçler gibi, eksitatör aminoasit toksisitesinin oluşturduğu kısır döngüyü çevirmeye başlattığı düşünülmektedir (3). Hidrocefalik süreçte olduğu bilinen periventriküler ak maddedeki ekstrasellüler atık madde birikiminin, mikrovasküler kompresyonun yarattığı iskeminin (lokal serebral kan akımı azalmasının), anaerobik glukoliz ve laktik asidoz oluşumunun ve nörotransmitter değişimlerinin hücresel düzeydeki anormal biokimyasal süreçleri tetiklemekte ve hidrocefalinin gelişme süresi ve şiddeti ile ilgili olmakla beraber periventriküler yapılar ve ependimde oluşan serbest oksijen radikali-lipid peroksidasyonu ve eksitatör aminoasit reaksiyonları ikincil bir hasar sürecini de beraberlerinde getirmektedir (3). Hidrocefalik sürecin erken döneminde nöronal immünohistokimyasal reaksiyon olarak gözlemlenmiş olan kortikal ve hipokampal nitrik oksit sentaz boyanmasındaki artışın toksik nöronal yanıtı ifade ettiği ileri sürülmektedir. Nitrik oksit sentaz aktivasyonundaki bu artışın ekstrasellüler glutamat düzeylerindeki artışa bağlı olduğu düşünülmektedir (39). Nitekim hidrocefali indüksiyonundan hemen sonra ekstrasellüler glutamat taşıyıcılarında anlamlı bir artış olduğu gösterilmiştir (40).

2.1.4. HİPOKAMPUS VE HİDROSEFALİK SÜREÇTE HİPOKAMPUSUN ETKİLENMESİ

Hidrosefalik süreç ilerledikçe, ortaya çıkan değişikliklerin daha çok iskemiye duyarlı alanlarda olduğu gözlemlenmektedir. Özellikle hipokampusun CA1 alt ünitesindeki piramidal katmanın etkilendiğine dair veriler mevcuttur (41). Yine hidrosefalik sürecin ilerlemesi ile azalan nörofilament reaktivitesi de nöronal dejenerasyonun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (42). Hidrosefalik sürecin belirginleşmesi ile birlikte hipokampusta özellikle CA1 alt ünitesinde sinaptofizin reaktivitesindeki tedrici azalma, geçici global iskemi sonrası görülen “gecikmiş nöronal ölüm” fenomenini anımsatmaktadır (41, 43).

Az sayıda çalışma erişkin hidrosefalisinde hipokampal yapıdaki hasar mekanizmasını ayrıntılı olarak tarif etmektedir (44, 45, 46, 47). İmmatür beyindeki hidrosefalinin hipokampus üzerindeki olumsuz etkilerine işaret eden bir çalışma da mevcuttur (48).

Klinge ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, deneysel olarak kaolin ile oluşturulmuş hidrosefali modelinde serebral kan akımı ile aynı zaman diliminde hipokampustaki nöronal hücre değişimleri araştırılmıştır (44). Hidrosefali indüsyonundan iki hafta sonra, kortikal ve hipokampal nöronlarda nöronal nitrik oksit sentaz aktivitesinde anlamlı artış saptanmıştır. Bu artışın, hidrosefalinin erken dönemindeki serebral kan akımındaki azalma ile korele olduğu gösterilmiştir. Nöronal nitrik oksit sentaz enziminin, sinir sisteminin akut eksitotoksik hasarında önemli rol oynadığı göz önünde bulundurulacak olursa (49), hipokampusta hidrosefalik süreçte eksitotoksik hasarın söz konusu olduğu ifade edilebilir. Klinge ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, hidrosefalik sürecin ilerleyen dönemlerinde de özellikle hipokampus CA1 bölgesinde nöronal nitrik oksit sentaz aktivitesindeki artışın sürdüğü belirtilmekte; bu da hipokampus CA1 bölgesindeki nöronal etkilenmenin erken dönemde başlayarak hidrosefalinin ilerleyen evrelerinde anlamlı devamlılık gösterdiğine işaret etmektedir (44). Araştırmacılar, CA1 bölgesindeki bu bulguların geçici iskemik atak tablosundaki gecikmiş nöronal ölüme benzerlik gösterdiğini ifade etmişlerdir.

2.1.5. HİDROSEFALİK SÜREÇTE NÖROPROTEKTİF TEDAVİ YAKLAŞIMININ TEMELLERİ

Beyindeki nöronal hasarı azaltacak nöron koruyucu maddelerin araştırıldığı çeşitli laboratuvar çalışmalarında, kullanılan nöroprotektan maddeler hasar oluşmadan önce veya hasar anında kullanıldığında olumlu sonuçlara varılmıştır (50, 51, 52). Hidrosefalik süreçte nöronal kaybın sebebi primer mekanik hasarlanmanın yanısıra, ortaya çıkan ikincil hasarlanma ve iskemi olmaktadır. Buna göre; hidrosefali tedavisinde, cerrahinin yanısıra nöronal kaybı engellemek üzere kullanılacak nöroprotektanın hastalık sürecinin erken döneminde kullanılmaya başlanması uygun görülmektedir.

Bu çalışmada da nöron koruyucu etkisi araştırılan memantin, hidrosefali induksiyonunu takiben erken dönemde uygulanmıştır.

2.1.6. MEMANTİN

Nöronal travma sonrası sekonder nöronal hasarı önlemek amacı ile bir çok NMDA reseptör antagonisti terapötik olarak dikkate alınmıştır (53). Ancak bunlardan bir çoğunun terapötik dozlarında hoş karşılanmayan yan etkilerin söz konusu olduğu bilinmektedir (54). Klinikte nöroprotektif amaçla uygulanabilir bir NMDA antagonisti arayışı halen sürmektedir.

Non-kompetitif NMDA açık kanal blokeri olan memantin (3,5-dimetil-I-adamantanamine) hayvan modellerinde oluşturulan beyin ve spinal kord iskemisinde yan etki olmaksızın nöroprotektif etki gösterdiği ileri sürülen ve yakın tarihlerdeki çalışmalarda adından sıklıkla bahsettiren bir drogtur. Memantin voltaj bağımlı, reseptöre orta derecede afiniteye sahip olan bir NMDA reseptör antagonistidir (55, 56). Patolojik olarak yükselmiş tonik glutamat düzeylerinin nöronal disfonksiyona yol açabilen etkilerini bloke etme özelliğine sahip olduğu bilinmektedir (55). NMDA reseptörünü bloke etme mekanizması; bloğun kullanımına bağlı olması nedeniyle kompetitif değildir. Yani bağlanma odağına yalnızca reseptörün aktive olması halinde erişilebilmektedir.

Memantin; bir antiviral olarak yaklaşık 20 yıldır kullanılan amantadinin derivativesidir ve influenza geçiren bir Parkinson hastasında rastlantısal olarak semptomları iyileştirdiği görülerek nöronlar üzerindeki etkisi araştırılmıştır (57). Memantin normalde pozitif yük taşıyan (NH^{+3}) bir köprü başı amin ile birlikte üç halka yapısına sahiptir. Amantadinden farklı olarak, kanaldaki bağlanma süresini uzatan iki metil yan gruba sahiptir ve bu onu amantadinden daha iyi bir NMDA reseptör blokeri yapar. İyon kanallarına kısa süreli bağlanır ve aşırı NMDA reseptör aktivasyonunu bloklarken reseptörün normal fonksiyonunun blokajı oldukça sınırlıdır. Bu nedenle uyuşukluk ve halüsinasyonlara yol açmaz. Bu özellikleri nedeniyle, klinik olarak iyi tolere edilebilir bir ilaçtır (58, 59).

Memantin, NMDA reseptör ilişkili kanallardaki Mg sitesinin yanına bağlanır. Mg gibi, kendi voltaj bağımlı depolarizasyonundan ve hızlı kinetiğinden dolayı NMDA reseptöründen kolayca ayrılır. Bununla beraber kronik eksitotoksik hasar sırasındaki uzun depolarizasyon sürecinde reseptörden Mg kadar kolay ayrılmaz (60). Uygun sürede reseptörde kalabilirliği sözgelimi; fizyolojik koşullarda kolay ayrılabilirliği ve etkilemezliği, patolojik koşullarda uygun süreli reseptör etkileşimi memantin için doğru kinetik imzaya sahip olduğunun göstergesidir (61).

Sıçan beyinde memantin yaklaşık yarılanma ömrü 12 saattir. Sıçanlarda 20 mg/kg memantin enjeksiyonu ile 30-60 dk sonra pik beyin konsantrasyonu olan 0,8-1,2 mikromol değerine ulaşır. Bu insanlarda Parkinson hastalığı için kullanılan ilaç dozu ile aynıdır (62, 63). Bu değer , in vitro deneylerde gösterilen NMDA reseptör afinitesi için gereken 1 mikromol düzeyindeki doz ile örtüşmektedir (62).

Memantin nöroprotektif mekanizmasının temelinde NMDA kanallarını bloke ederek nöron içerisine fazladan kalsiyum girişini engellemesi yolu ile olduğu düşünülmektedir (5).

2001 senesinde yayınlanan bir çalışmada kontrollü kortikal impakt yaralanma modelinde, memantin travmadan bir hafta sonra ortaya çıkan hipokampal nöronal hücre ölümünü anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir (5).

Memantin, demans, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve spastisitede klinik olarak denenilen, iyi tolere edilebilir NMDA iyon kanal blokeridir (62, 64, 65). Lipofilik özelliğinden dolayı periferik uygulamalarda kan-beyin bariyerini kolayca

geçer. İnsanlarda, memantinin terapötik dozda tedavisinden sonra nöropsikiyatrik değişiklikler dahil olmak üzere belirgin bir yan etkisi rapor edilmemiştir (66). Memantinin nöroprotektif etkisi son çalışmalarda, hayvan modellerinde geçici ön beyin iskemisi (67), hipoksi-iskemi (68), spinal kord iskemisi (69), neonatal fototrombotik iskemisi (70), retinal iskemisi (71) ve in vitro glutamat nedenli nöronal ölümden (72) gösterilmiştir. Hayvan modelli çalışmalarda geçici ve kalıcı fokal beyin iskemisinde 20 mg/kg memantin ile belirgin nörokoruyucu etki gösterilmiştir (5).



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 – immünohistokimyasal analiz ve ölçümler, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Nörolojik Bilimler Enstitüsü Patoloji Departmanı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışma Helsinki Bildirgesinde deneysel araştırmalarda belirtilmiş olan esaslara uygun olarak yürütülmüştür.

3.1. DENEKLER

Çalışmada Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma Merkezi (DETAB) Deney Hayvanları Üretimi Bölümü'nden temin edilmiş olan toplam 30 adet 3 haftalık Sprague-Dawley türü sıçan kullanıldı. Deneklerin ortalama ağırlığı 50 ± 10 gram olarak hesaplandı. Denekler, standart kafeslerde 4'lü gruplar halinde, ad libidum standart yem ve su verilerek, ısısı (21 ± 2 °C) ve nem oranı kontrollü odalarda barındırıldı. Odanın aydınlatması floresan ışık ile sağlandı ve her 12 saatte bir (06:00 – 18:00) açıp kapama döngüsü gerçekleştirildi.

Denekler, hidrosefali indüksiyonu uygulanan (11 adet denek), hidrosefali indüksiyonu sonrası sistemik memantin verilen (11 adet denek) ve kontrol grubu (K) denekleri (8 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 2 adet, memantin uygulanan hidrosefali grubundan 1 adet denek) deney protokolünden çıkartıldı. Deneysel çalışmanın sonunda bulguların değerlendirildiği toplam 27 adet denek şu şekilde gruplandı:

1. Kontrol Grubu (Hidrosefali indüksiyonu yapılmamış olan grup) : K (8 adet denek)

2. Hidrocefali Grubu (Hidrocefali oluşturulmuş, ancak memantin yerine serum fizyolojik verilmiş grup) : H (9 adet denek)

3. Memantin Grubu (Hidrocefali oluşturulmuş ve memantin verilmiş grup) : M (10 adet denek)

3.2. DENEYSEL İNFANTİL HİDROSEFALİ MODELİ

Denekler 20 mg/kg ketamin (Ketalar® ,Parke-Davis) + 5 mg/kg xylazin (Rompun® ,Bayer) intramüsküler ile oluşturulan genel anestezi altında oksipito-servikal bölge tıraşını takiben cerrahi alan %10 polyvinylpyrrolidone iod (Batticon Solüsyon® ,Adeka) ile iyice temizlenip silindikten sonra, literatürde daha önce tarif edilmiş olan standart yöntem ile (69, 73, 74, 75) atlantookspital membran identifiye edilip 27 G enjektör ile sisterna magnaya 0.05 ml. steril Kaolin (Kaolin Hydrated Aluminum Silicate K-7375 , Sigma Chemical Co.) süspansiyonu (250 mg/ml -%0.09 NaCl) verilmek sureti ile hidrocefali indüksiyonu oluşturulmuştur. Enjeksiyon ile birlikte dorsal serebellar subaraknoidal konveksitenin 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 edilmiştir. Kontrol grubunda atlantookspital membran identifiye edildikten sonra herhangi bir işlem yapılmamıştır (sham operasyonu). Hidrocefali indüksiyonu ve sham operasyonlarını takiben denekler 2 haftalık süre boyunca takip edilmişlerdir. 2 haftalık sürenin sonucunda deneklere kraniyal manyetik rezonans görüntüleme yapılarak ventriküler sistemdeki genişleme kontrol edilmiştir. MR inceleme için Philips Intera 1.5 Tesla MR cihazında C3 koil sirküler yüzeyi kullanılarak görüntüler elde edilmiştir. Üçüncü ventrikül düzeyinden geçen koronal kesitler karşılaştırılarak ventriküler dilatasyon verifiye edilmiştir.

Denekler, manyetik rezonans görüntüleme incelemesi sonrasında giyotin yöntemi ile sakrifiye edilerek serebrumları çıkartılmıştır. Çıkartılan serebrumlar bütün halinde ayrı olarak kodlanmış %10 buffered formalin solüsyonu içeren

steril kaplar içerisinde, yapılacak histolojik ve immünohistokimyasal çalışmalar için Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Nörolojik Bilimler Enstitüsü Patoloji Departmanı'na ulaştırılmıştır. Histopatolojik analiz için, örnekler tek kör çalışma prensibi çerçevesinde kodlar saklı tutularak Patoloji Departmanı'na teslim edilmiştir.

3.3. MEMANTİN UYGULAMASI

Memantin Grubuna (M) , hidrosefali indüksiyonu sonrası 2 hafta boyunca günde tek doz 20 mg/kg/gün memantin distile su ile çözelti halinde (Ebixa® saf etken madde; Lundbeck İlaç Tic.Ltd. Şti.) intraperitoneal yoldan enjeksiyon ile verildi.

Hidrosefali Grubuna (H), ise hidrosefali indüksiyonu sonrası 2 hafta boyunca günde tek sefer distile su (plasebo) intraperitoneal yoldan enjeksiyon ile verildi.

3.4. HİPOKAMPAL NÖRONAL VİABİLİTE TAYİNİ

320 mikrometre aralıklar ile 10 mikrometre kalınlığında koronal kesitler alınmış olan Hematoksilen-Eosin (HE) ile boyanmış beyin preparatlarında hipokampus CA1, CA2 ve CA3 bölgelerindeki nöronlar sayılmıştır. Literatürdeki benzer bir çalışma örnek alınarak her denek için dorsal hipokampus boyunca birbirini izleyen 4 kesitte 400 büyütmede nükleusu ve sitoplazması korunmuş olan nöronların (viabil) sayımı yapılarak bunların ortalaması alınmıştır (5). Sayımlar, Olympus U-MDOB3 tipi ışık mikroskobu ile gerçekleştirilmiştir.

3.5. İMMÜN BOYAMA TEKNİĞİ İLE HİPOKAMPAL NÖRONAL NİTRİK OKSİT SENTAZ TAYİNİ

Kaplı lam üzerine yapılmış olan kesitler bir gece bekletildikten sonra boyandı. İşlemden sırası ile; kesitler 60°C lik etüvde bir saat deparafinize edildi. Xylene içine alınan kesitler iki kez beşer dakika bekletildi. Absolü alkol içine alınarak onar kere batırılıp çıkarıldı. Distile su ile yıkandı. %10'luk Citrat Buffer solüsyonu hazırlandı. Lamalar mikrodalga fırına dayanıklı plastik şale içine dizildi. Üzerine %10 luk Citrate Buffer solüsyonu konuldu. Yine mikrodalgaya dayanıklı bir kap içine su konuldu ve bu kap içine “antigen retrieval” yapılacak şale yerleştirildi. Mikrodalga 5 dakika maksimum güçte (yaklaşık 800 watt) 'ta çalıştırıldı. Süre bitiminde fırının gücü %50 azaltılarak (yaklaşık 400 watt) 15 dakika daha çalıştırıldı. Süre bitiminde şale mikrodalga fırından dışarı çıkartıldı ve dışarda 20 dakika bekletildi. Distile su ile yıkandı. %3'lük H₂O₂ (Hidrojen Peroksit) ile yirmi dakika peroksidaz blokajı yapıldı. Ardından distile su ile kesitler tekrar yıkandı. Protein blokajı beş dakika uygulandı. Kesitlerin üzerindeki blokaj akıtılarak yıkanmadan, kesit üzerlerine ilgili primer antikordan üç damla damlatılarak 60 dakika bekletildi. Biotinylated Goat Anti-Polyvalent solüsyonu yine kesitlerin üzerine 3 damla damlatılmak üzere 20 dakika bekletildi. Streptavidin Peroksidaz solüsyonu da yine kesitlerin üzerine 3 damla damlatılarak 20 dakika bekletildi. Kromojende 5 dakika daha bekletildi. Musluk suyu ile kesitler iyice yıkandı. Kesitlere Hematoksilin ile yaklaşık 20 saniye “counter stain” yapıldı. Musluk suyu ile kesitler tekrar yıkandı. Lityum karbonat içinde 10 dip yapılan kesitler tekrar musluk suyu ile yıkandı. Direkt olarak alkole girmeden sulu kapama malzemesi ile kesitler kapatıldı.

Nitrik oksit sentaz aktivitesi göstergesi için, immünohistokimyasal analiz kullanımı amaçlı RB-9261-R7 katalog numaralı (Lab Vision) Nitric Oxide Synthase – Universal (u-NOS) immün boyası kullanılmıştır.

Değerlendirmede, CA1, CA2 ve CA3 alanları için ayrı ayrı olarak 400 büyütmede immün boyanın konsantrasyonu 0 ile 4 puan arasında puanlandı. Puanlama kriteri şu şekilde kabul edildi:

- 0 puan** : Boyanma yok
- 1 puan** : Boya konsantrasyonu %25'in altında
- 2 puan** : Boya konsantrasyonu %25-%50 arasında
- 3 puan** : Boya konsantrasyonu %50-%75 arasında
- 4 puan** : Boya konsantrasyonu %75'in üzerinde

3.6. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Tüm istatistiksel analizler, “Windows XP Professional” işletim sistemi altında “SPSS for Microsoft Windows (version 11)” programı kullanılarak yapılmıştır.

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

Nitrik oksit sentaz aktivitesinin analizinde ise grupların kendi aralarındaki karşılaştırılmasında Pearson Ki-Kare testi uygulanmıştır.

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

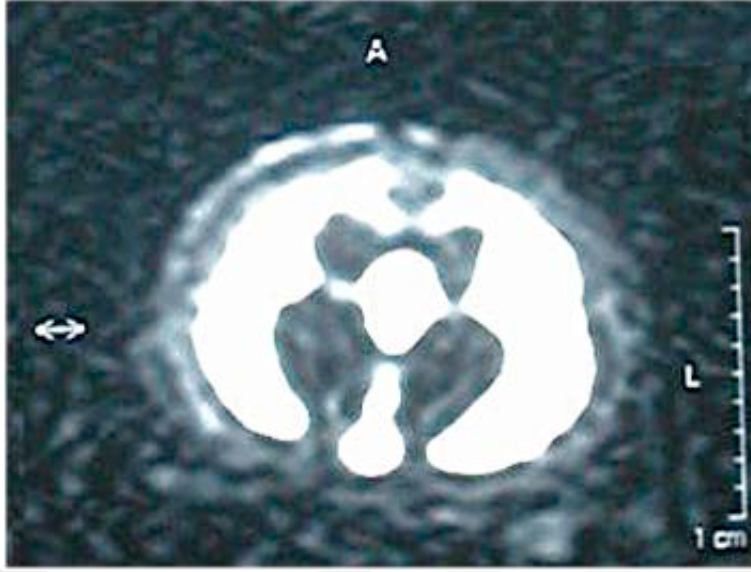
4. BULGULAR

4.1. HİDROSEFALİK SÜRECE AİT GÖZLEMLER

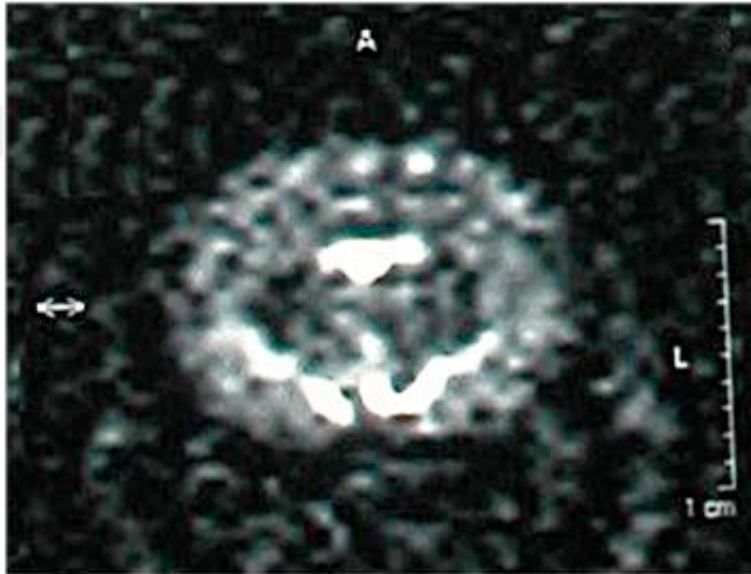
Hidrocefali indüksiyonundan yaklaşık 3-4 gün sonra deneklerde oluşan ilk değişiklikler birçok araştırmada da gözlemlendiği gibi deneklerin su ve yiyecek alımlarının azalması ve buna bağlı kilo kaybı, dış uyaranlara aşırı yada geç yanıt verme ve geniş tabanlı yürüme şeklinde idi. Daha ileri dönemlerde letarji, ekstensor rijiditesi veya spastisite şeklinde bulguların çıktığı gözlemlendi (3,76, 77).

4.2. HİDROSEFALİK SÜRECİN RADYOLOJİK KONTROLÜ

Kaolin ile hidrocefali indüksiyonu amaçlanan 22 adet deney hayvanının 21 tanesine ve 8 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. Şekil 1’de hidrocefali indüksiyonundan sonra, yapılan kraniyal MR incelemesinde ventriküler genişleme gösteren deneklere örnek radyolojik kesit sunulmuştur. Şekil 2’de ise kontrol grubuna ait normal ventriküler yapıyı gösteren MR kesiti örneği görülmektedir.



Şekil 1. T2 ağırlıklı DRIVE koronal görüntü. Belirgin ventriküler dilatasyon izlenen hidrocefali grubuna ait denek.



Şekil 2. T2 ağırlıklı DRIVE koronal görüntü. Normal ventriküler konfigürasyonun izlendiği kontrol grubuna ait denek

4.3. HİPOKAMPUS ALANLARINDA NÖRON SAYIMI

Hematoksilen-Eosin (HE) ile boyanmış beyin preparatlarında her denek için dorsal hipokampus boyunca ardışık 4 kesitte 400 büyütme altında nükleusu ve sitoplazması korunmuş olan nöronlar, hipokampusun CA1, CA2 ve CA3 bölgelerinde ayrı ayrı sayılmış ve her seferinde ardışık 4 kesite ait sayımların ortalaması alınarak kaydedilmiştir.

Gruplara ait CA1, CA2 ve CA3 bölgeleri için saptanmış olan korunmuş nöron sayısı verilerinin, minimum değer, maksimum değer, ortalama değer, standart hata, standart sapma ve varyans özellikleri hesaplanmış olup, bu veriler Tablo 3, Tablo 4 ve Tablo 5'te özetlenmiştir.

Grup	Denek Sayısı	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma	Varyans
Kontrol	8	99,00	115,00	105,7500	1,7398	4,92080	24,214
Hidrocefali	9	73,00	84,60	79,1333	1,2154	3,64623	13,295
Memantin	10	78,00	94,30	88,4300	1,4168	4,48034	20,073

Tablo 3. CA1 alanındaki korunmuş nöron sayısı verileri

Grup	Denek Sayısı	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma	Varyans
Kontrol	8	89,00	110,00	100,3750	2,1292	6,02228	36,268
Hidrocefali	9	55,00	94,00	71,8889	5,0289	15,08679	227,611
Memantin	10	75,00	93,00	84,7000	2,1242	6,71731	45,122

Tablo 4. CA2 alanındaki korunmuş nöron sayısı verileri

Grup	Denek Sayısı	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart Hata	Standart Sapma	Varyans
Kontrol	8	88,00	100,00	94,5000	1,3628	3,85450	14,857
Hidrocefali	9	54,50	87,00	69,6111	3,1543	9,46301	89,549
Memantin	10	60,00	87,00	73,1000	3,3323	10,53776	111,044

Tablo 5. CA3 alanındaki korunmuş nöron sayısı verileri

4.3.a HİPOKAMPUS CA1 ALANI KORUNMUŞ NÖRON SAYILARININ GRUPLAR ARASI KARŞILAŞTIRILMASI

Hipokampus CA1 alanına ait grupların ortalama korunmuş nöron sayıları ve standart sapma değerleri Şekil 3'te gösterilmiştir. Hipokampus CA1 alanı korunmuş 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 istatistiksel çıktı verileri aşağıda sunulmuştur.

One-Way ANOVA CA1 noron sayısı

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3066,122	2	1533,061	80,595	0,000
Within Groups	456,521	24	19,022		
Total	3522,643	26			

Post Hoc Test (Tukey)

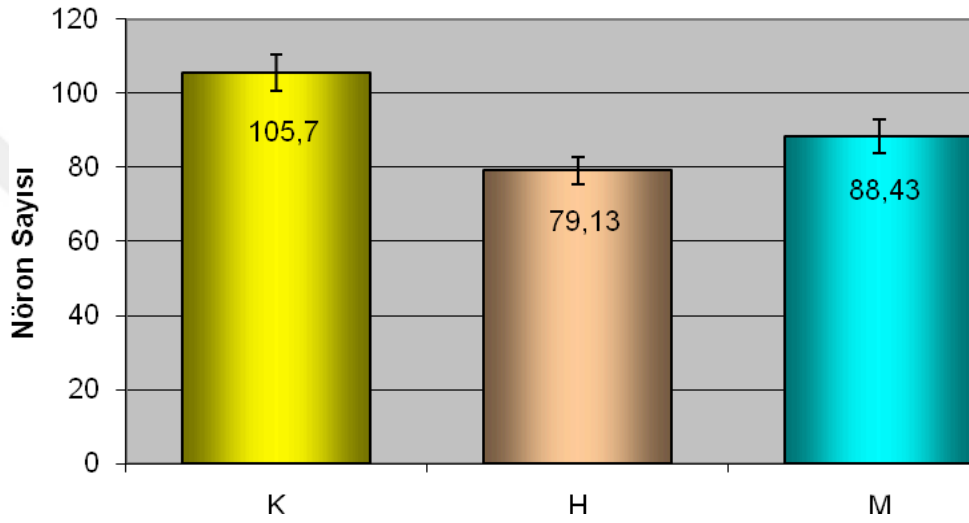
Multiple Comparisons
Dependent Variable: CA1 noron sayısı
Tukey HSD

(I) Gruplar	(J) Gruplar	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound Upper Bound
H	M	-9,2967	2,00392	0,000	-14,3010 -4,2923
	K	-26,6167	2,11925	0,000	-31,9091 -21,3243
M	H	9,2967	2,00392	0,000	4,2923 14,3010
	K	-17,3200	2,06879	0,000	-22,4864 -12,1536
K	H	26,6167	2,11925	0,000	21,3243 31,9091
	M	17,3200	2,06879	0,000	12,1536 22,4864

* The mean difference is significant at the .05 level

Gruplar arası karşılaştırmada çoklu varyans analizi (One-Way ANOVA) testi, gruplar arası farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir ($p<0,05$). Grupların kendi aralarındaki karşılaştırılmasında ise (post hoc Tukey testi), tüm gruplar arası karşılaştırmalarda farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. İkili karşılaştırmalara ait bulunan p değerleri Tablo 6’da sunulmuştur.

CA1 Bölgesi Korunmuş Nöron Sayımı



Şekil 3. CA1 alanındaki ortalama korunmuş nöron sayısı verileri (ortalama değerler \pm standart sapma) . K: kontrol grubu, H: hidrosefali grubu, M: memantin verilmiş hidrosefali grubu.

4.3.b HİPOKAMPUS CA2 ALANI KORUNMUŞ NÖRON SAYILARININ GRUPLAR ARASI KARŞILAŞTIRILMASI

Hipokampus CA2 alanına ait grupların ortalama korunmuş nöron sayıları ve standart sapma değerleri Şekil 4’te gösterilmiştir. Hipokampus CA2 alanı korunmuş 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 istatistiksel çıktı verileri aşağıda sunulmuştur.

One-Way ANOVA

CA2 noron sayısı

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3438,988	2	1719,494	16,634	0,000
Within Groups	2480,864	24	103,369		
Total	5919,852	26			

Post Hoc Test (Tukey)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CA2 noron sayısı

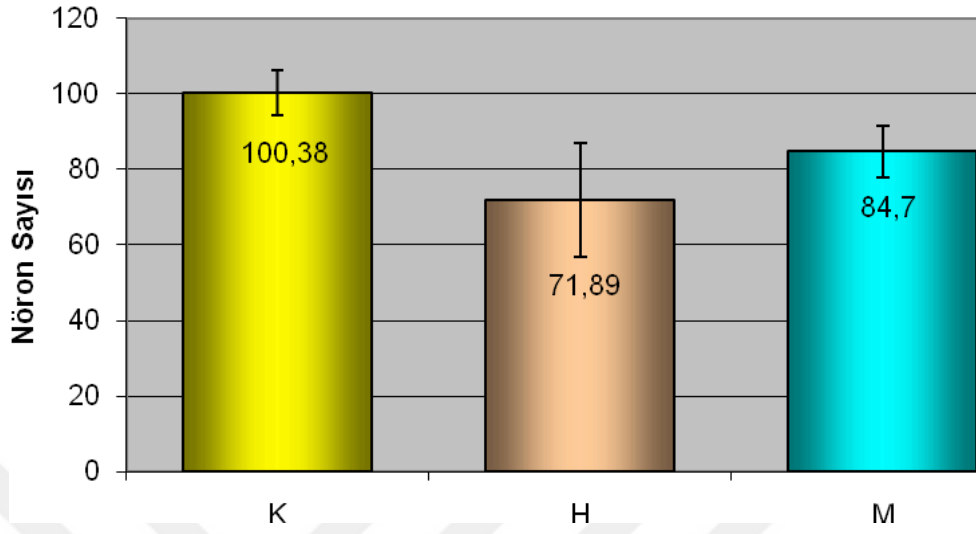
Tukey HSD

(I) Gruplar	(J) Gruplar	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
H	M	-12,8111	4,67145	0,029	-24,4771	-1,1452
	K	-28,4861	4,94031	0,000	-40,8235	-16,1487
M	H	12,8111	4,67145	0,029	1,1452	24,4771
	K	-15,6750	4,82267	0,009	-27,7186	-3,6314
K	H	28,4861	4,94031	0,000	16,1487	40,8235
	M	15,6750	4,82267	0,009	3,6314	27,7186

* The mean difference is significant at the .05 level.

CA2 alanında, gruplar arası karşılaştırmada çoklu varyans analizi (One-Way ANOVA) testi, gruplar arası farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir ($p < 0,05$). Grupların kendi aralarındaki karşılaştırılmasında ise (post hoc Tukey testi), tüm gruplar arası karşılaştırmalarda farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. İkili karşılaştırmalara ait bulunan p değerleri Tablo 6'da sunulmuştur.

CA2 Bölgesi Korunmuş Nöron Sayımı



Şekil 4. CA2 alanındaki ortalama korunmuş nöron sayısı verileri (ortalama değerler \pm standart sapma). K: kontrol grubu, H: hidrosefali grubu, M: memantin verilmiş hidrosefali grubu.

4.3.c HİPOKAMPUS CA3 ALANI KORUNMUŞ NÖRON SAYILARININ GRUPLAR ARASI KARŞILAŞTIRILMASI

Hipokampus CA3 alanına ait grupların ortalama korunmuş nöron sayıları ve standart sapma değerleri Şekil 5'te gösterilmiştir. Hipokampus CA3 alanı korunmuş 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 istatistiksel çıktı verileri aşağıda sunulmuştur.

One-Way ANOVA

CA3 noron sayısı

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3049,378	2	1524,689	20,108	,000
Within Groups	1819,789	24	75,825		
Total	4869,167	26			

Post Hoc Test (Tukey)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CA3 noron sayısı

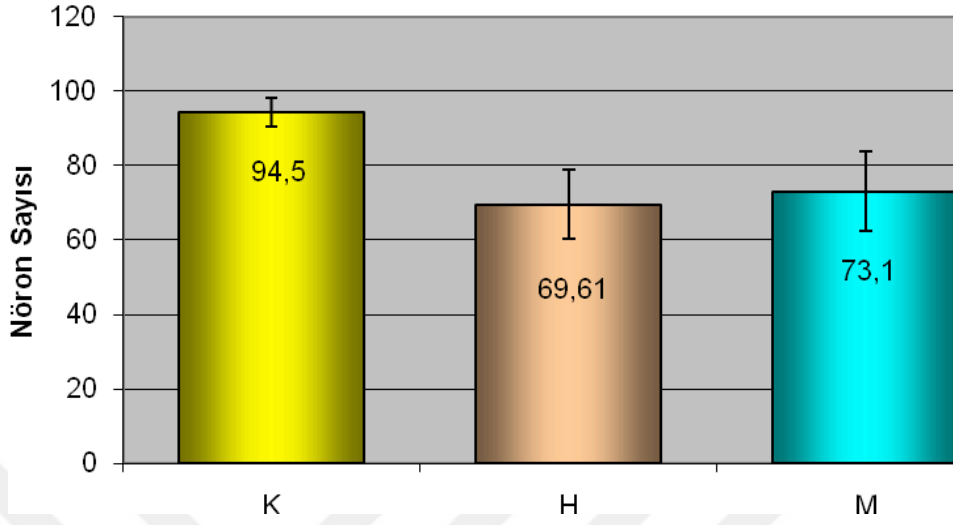
Tukey HSD

		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
(I) Gruplar	(J) Gruplar				Lower Bound	Upper Bound
H	M	-3,4889	4,00093	,663	-13,4803	6,5026
	K	-24,8889	4,23120	,000	-35,4554	-14,3224
M	H	3,4889	4,00093	,663	-6,5026	13,4803
	K	-21,4000	4,13044	,000	-31,7149	-11,0851
K	H	24,8889	4,23120	,000	14,3224	35,4554
	M	21,4000	4,13044	,000	11,0851	31,7149

* The mean difference is significant at the .05 level.

CA3 alanında, gruplar arası karşılaştırmada çoklu varyans analizi (One-Way ANOVA) testi, gruplar arası farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir ($p < 0,05$). Grupların kendi aralarındaki karşılaştırılmasında ise (post hoc Tukey testi), hidrosefali (H) ve memantin (M) grupları arasındaki karşılaştırmada farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p = 0,663$; $p > 0,05$) görülmüştür. H ve M gruplarının kontrol (K) grubu ile yapılmış olan karşılaştırmalarında ise farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). İkili karşılaştırmalara ait bulunan p değerleri Tablo 6'da sunulmuştur.

CA3 Bölgesi Korunmuş Nöron Sayımı



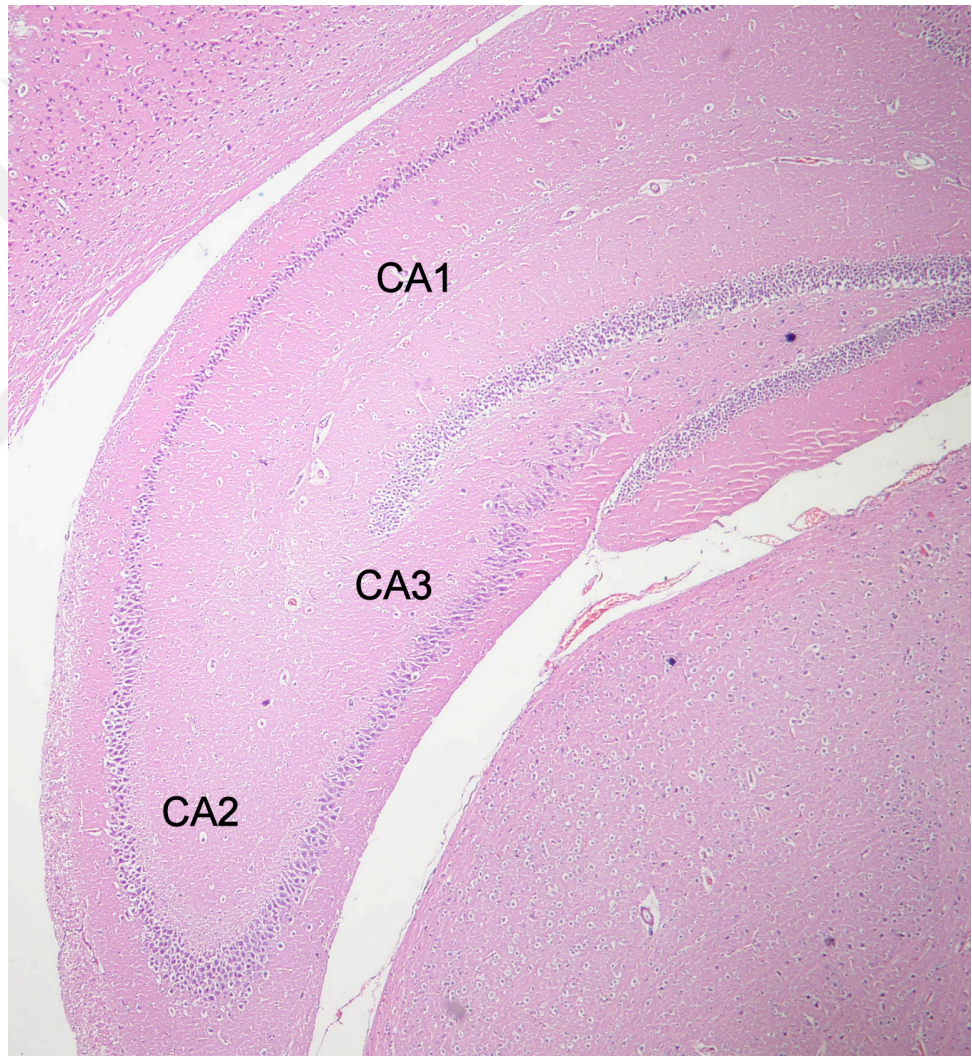
Şekil 5. CA3 alanındaki ortalama korunmuş nöron sayısı verileri (ortalama değerler \pm standart sapma). K: kontrol grubu, H: hidrosefali grubu, M: memantin verilmiş hidrosefali grubu.

Gruplar	CA1	CA2	CA3
Kontrol - Hidrosefali	p= 0,001 *	p= 0,001 *	p= 0,001 *
Hidrosefali - Memantin	p= 0,001 *	p= 0,029 *	p= 0,663
Kontrol - Memantin	p= 0,001 *	p= 0,009 *	p= 0,001 *

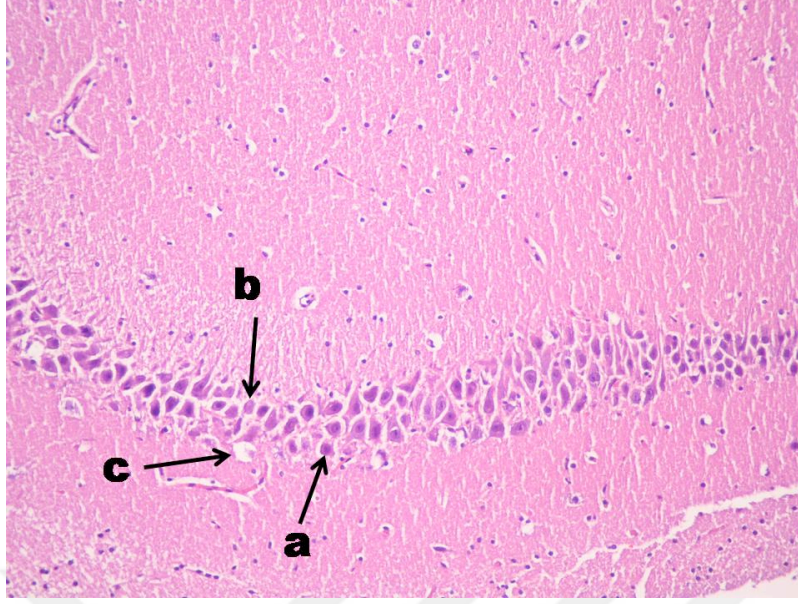
Tablo 6. CA1, CA2 ve CA3 bölgelerinde yapılan korunmuş nöron sayılarına ait istatistiksel karşılaştırmalarda post hoc Tukey testi p değerleri. İstatistiksel olarak anlamlı olan değerler (*) ile gösterilmiştir.

4.3.d HİPOKAMPUS ALANLARINA AİT KORUNMUŞ NÖRON SAYIMINDA DEĞERLENDİRİLEN KESİTLERE ÖRNEKLER

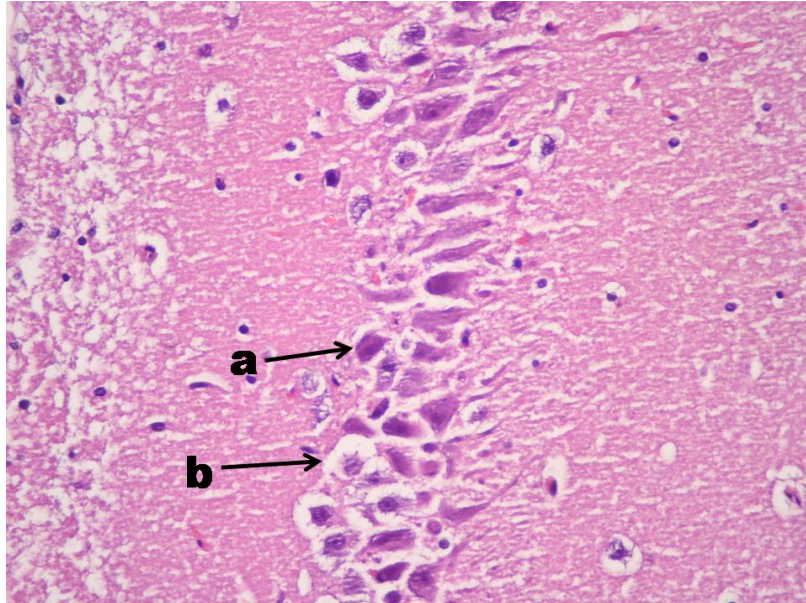
Hematoksilen-Eosin (HE) ile boyanmış beyin preparatında hipokampus CA1, CA2 ve CA3 bölgeleri Şekil 6’da gösterilmektedir. Hematoksilen-Eosin (HE) ile boyanmış 400 büyütme altında nükleusu ve sitoplazması korunmuş olan nöronlar, hipokampusun CA1, CA2 ve CA3 bölgeleri için Şekil 7, Şekil 8 ve Şekil 9’da ayrı ayrı gösterilmiştir.



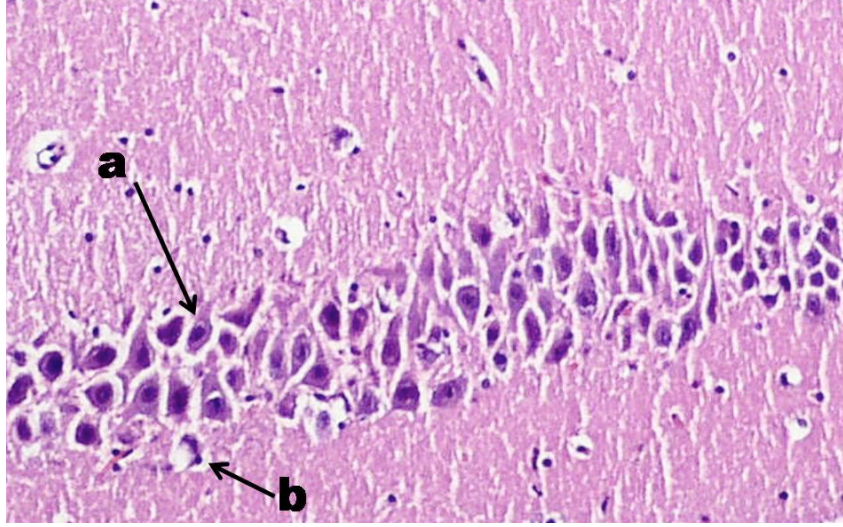
Şekil 6. Hematoksilen-Eosin (HE) ile boyanmış beyin preparatında 4X büyütmede infant sıçan hipokampusuna ait CA1, CA2 ve CA3 bölgeleri görülmektedir.



Şekil 7. Hematoksilen-Eosin (HE) ile boyanmış beyin preparatında 400X büyütmede infant sıçan hipokampusu CA1 bölgesi görülmektedir. a: sitoplazması ve nükleusu korunmuş nöron. b: nükleusu erimiş ancak sitoplazma bütünlüğü bozulmamış dejenere nöron. c: nükleus ve sitoplazması tamamen dejenere olmuş nöron.



Şekil 8. Hematoksilen-Eosin (HE) ile boyanmış beyin preparatında 400X büyütmede infant sıçan hipokampusu CA2 bölgesi görülmektedir. a: sitoplazması ve nükleusu korunmuş nöron. b: dejenere nöron.



Şekil 9. Hematoksilen-Eosin (HE) ile boyanmış beyin preparatında 400X büyütmede infant sıçan hipokampusu CA3 bölgesi görülmektedir. a: sitoplazması ve nükleusu korunmuş nöron. b: dejenere nöron.

4.4. HİPOKAMPUS ALANLARINDA NÖRONAL NİTRİK OKSİT SENTAZ AKTİVİTESİ

Gruplara ait CA1, CA2 ve CA3 bölgeleri için nitrik oksit sentaz aktivitesi Nitric Oxide Synthase – Universal (u-NOS) immün boyası kullanılarak saptanmıştır. Her denek için 400 büyütme altında CA1, CA2 ve CA3 alanları için ayrı ayrı olarak nöronların immün boyanma konsantrasyonu 0 ile 4 puan arasında puanlanmıştır. (0 puan : Boyanma yok, 1 puan : Boya konsantrasyonu %25'in altında, 2 puan : Boya konsantrasyonu %25-%50 arasında, 3 puan : Boya konsantrasyonu %50-%75 arasında, 4 puan : Boya konsantrasyonu %75'in üzerinde.)

Nitrik oksit sentaz aktivitesinin analizinde grupların kendi aralarındaki karşılaştırılmasında Pearson Ki-Kare testi uygulanmıştır.

Gruplara ait CA1, CA2 ve CA3 bölgeleri için saptanmış olan nitrik oksit sentaz immün boyanma konsantrasyonu verileri Tablo 7, Tablo 8 ve Tablo 9'da özetlenmiştir.

Gruplar	0 puan verilen denek sayısı	1 puan verilen denek sayısı	2 puan verilen denek sayısı	3 puan verilen denek sayısı	4 puan verilen denek sayısı
Kontrol	6	2	-	-	-
Hidrocefali	-	3	5	1	-
Memantin	4	5	1	-	-

Tablo 7. CA1 alanı için saptanmış olan nitrik oksit sentaz immün boyanma konsantrasyonu verileri.

Gruplar	0 puan verilen denek sayısı	1 puan verilen denek sayısı	2 puan verilen denek sayısı	3 puan verilen denek sayısı	4 puan verilen denek sayısı
Kontrol	6	2	-	-	-
Hidrocefali	-	-	4	5	-
Memantin	1	6	1	2	-

Tablo 8. CA2 alanı için saptanmış olan nitrik oksit sentaz immün boyanma konsantrasyonu verileri.

Gruplar	0 puan verilen denek sayısı	1 puan verilen denek sayısı	2 puan verilen denek sayısı	3 puan verilen denek sayısı	4 puan verilen denek sayısı
Kontrol	7	1	-	-	-
Hidrocefali	-	2	5	2	-
Memantin	-	6	4	-	-

Tablo 9. CA3 alanı için saptanmış olan nitrik oksit sentaz immün boyanma konsantrasyonu verileri.

4.4.a HİPOKAMPUS CA1 ALANI NÖRONAL NİTRİK OKSİT SENTAZ AKTİVİTESİNİN GRUPLAR ARASI KARŞILAŞTIRILMASI

Hipokampus CA1 alanı nitrik oksit sentaz immünoreaktivite analizinde grupların kendi aralarındaki karşılaştırılmasında Pearson Ki-Kare testi uygulanmıştır. Hipokampus CA1 bölgesine ait grupların SPSS programı istatistiksel çıktı verileri aşağıda sunulmuştur.

Chi-Square Tests Memantin – Hidrosefali CA1

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	8,137	3	0,043
Likelihood Ratio	10,295	3	0,016
Linear-by-Linear Association	7,527	1	0,006
N of Valid Cases	19		

Chi-Square Tests Kontrol- Hidrosefali CA1

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	12,183	3	0,007
Likelihood Ratio	16,778	3	0,001
Linear-by-Linear Association	10,586	1	0,001
N of Valid Cases	17		

Chi-Square Tests Kontrol – Memantin CA1

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	2,494	2	0,287
Likelihood Ratio	2,895	2	0,235
Linear-by-Linear Association	2,354	1	0,125
N of Valid Cases	18		

Grupların kendi aralarındaki karşılaştırılmasında kullanılmış olan Ki-Kare testi sonuçlarına göre, CA1 bölgesindeki nitrik oksit sentaz immünoreaktivitesi açısından kontrol grubu ile memantin verilmiş olan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p= 0,287$; $p>0,05$).

Hidrosefali grubunun diğer gruplar ile yapılmış olan karşılaştırmalarında farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,05$). CA1 bölgesine ait tüm ikili karşılaştırmaların p değerleri Tablo 10'da sunulmuştur.

4.4.b HIPOKAMPUS CA2 ALANI NÖRONAL NİTRİK OKSİT SENTAZ AKTİVİTESİNİN GRUPLAR ARASI KARŞILAŞTIRILMASI

Hipokampus CA2 alanı nitrik oksit sentaz immünoreaktivite analizinde grupların kendi aralarındaki karşılaştırılmasında Pearson Ki-Kare testi uygulanmıştır. Hipokampus CA2 bölgesine ait grupların SPSS programı istatistiksel çıktı verileri aşağıda sunulmuştur.

Chi-Square Tests Kontrol – Memantin CA2

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	8,454	3	0,038
Likelihood Ratio	9,992	3	0,019
Linear-by-Linear Association	6,333	1	0,012
N of Valid Cases	18		

Chi-Square Tests Hidrosefali– Memantin CA2

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	10,061	3	0,018
Likelihood Ratio	12,907	3	0,005
Linear-by-Linear Association	6,718	1	0,010
N of Valid Cases	19		

Chi-Square Tests Hidrosefali– Kontrol CA2

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	17,000	3	0,001
Likelihood Ratio	23,508	3	0,000
Linear-by-Linear Association	13,730	1	0,000
N of Valid Cases	17		

Grupların kendi aralarındaki karşılaştırılmasında kullanılmış olan Ki-Kare testi sonuçlarına göre, CA2 bölgesindeki nitrik oksit sentaz immünoreaktivitesi açısından tüm gruplar arası karşılaştırmalarda farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). CA2 bölgesine ait tüm ikili karşılaştırmaların p değerleri Tablo 10'da sunulmuştur.

4.4.c HİPOKAMPUS CA3 ALANI NÖRONAL NİTRİK OKSİT SENTAZ AKTİVİTESİNİN GRUPLAR ARASI KARŞILAŞTIRILMASI

Hipokampus CA3 alanı nitrik oksit sentaz immünoreaktivite analizinde grupların kendi aralarındaki karşılaştırılmasında Pearson Ki-Kare testi uygulanmıştır. Hipokampus CA3 bölgesine ait grupların SPSS programı istatistiksel çıktı verileri aşağıda sunulmuştur.

Chi-Square Tests Hidrosefali– Kontrol CA3

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	14,324	3	0,002
Likelihood Ratio	19,689	3	0,000
Linear-by-Linear Association	12,054	1	0,001
N of Valid Cases	17		

Chi-Square Tests Hidrosefali– Memantin CA3

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	4,070	2	0,131
Likelihood Ratio	4,924	2	0,085
Linear-by-Linear Association	3,787	1	0,052
N of Valid Cases	19		

Chi-Square Tests Kontrol – Memantin CA3

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	14,529	2	0,001
Likelihood Ratio	18,989	2	0,000
Linear-by-Linear Association	11,698	1	0,001
N of Valid Cases	18		

Grupların kendi aralarındaki karşılaştırılmasında kullanılmış olan Ki-Kare testi sonuçlarına göre, CA3 bölgesindeki nitrik oksit sentaz immünoreaktivitesi açısından hidrosefali grubu ile memantin verilmiş olan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p= 0,131$; $p>0,05$).

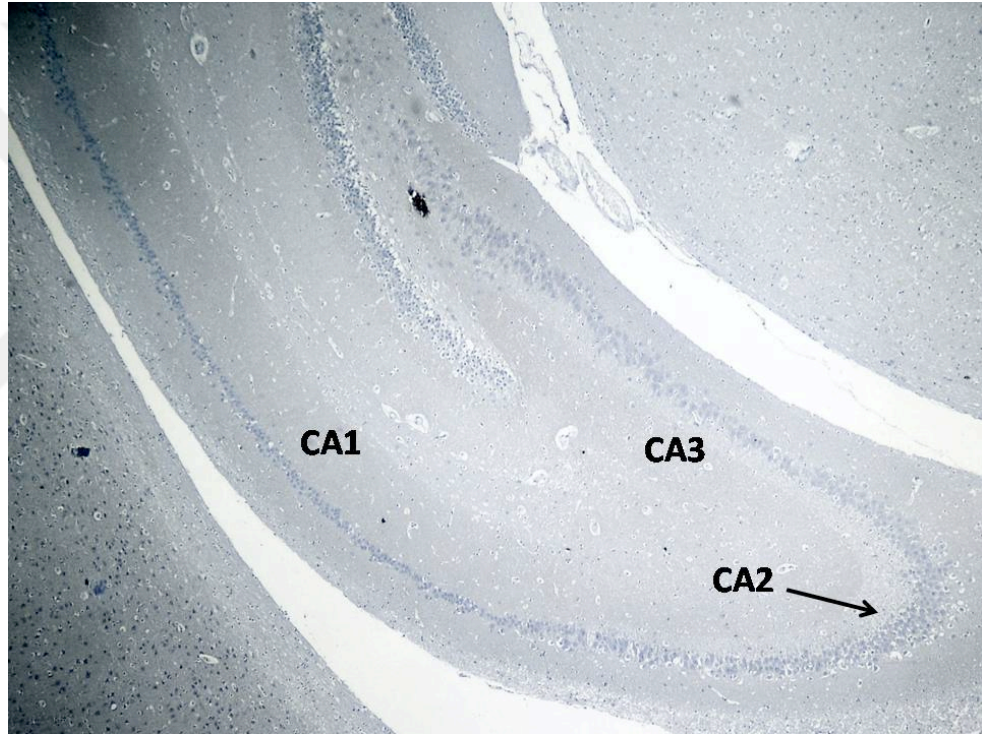
Kontrol grubunun diğer gruplar ile yapılmış olan karşılaştırmalarında farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,05$). CA3 bölgesine ait tüm ikili karşılaştırmaların p değerleri Tablo 10’da sunulmuştur.

Gruplar	CA1	CA2	CA3
Kontrol - Hidrosefali	$p= 0,007 *$	$p= 0,001 *$	$p= 0,002 *$
Hidrosefali - Memantin	$p= 0,043 *$	$p= 0,018 *$	$p= 0,131$
Kontrol - Memantin	$p= 0,287$	$p= 0,038 *$	$p= 0,001 *$

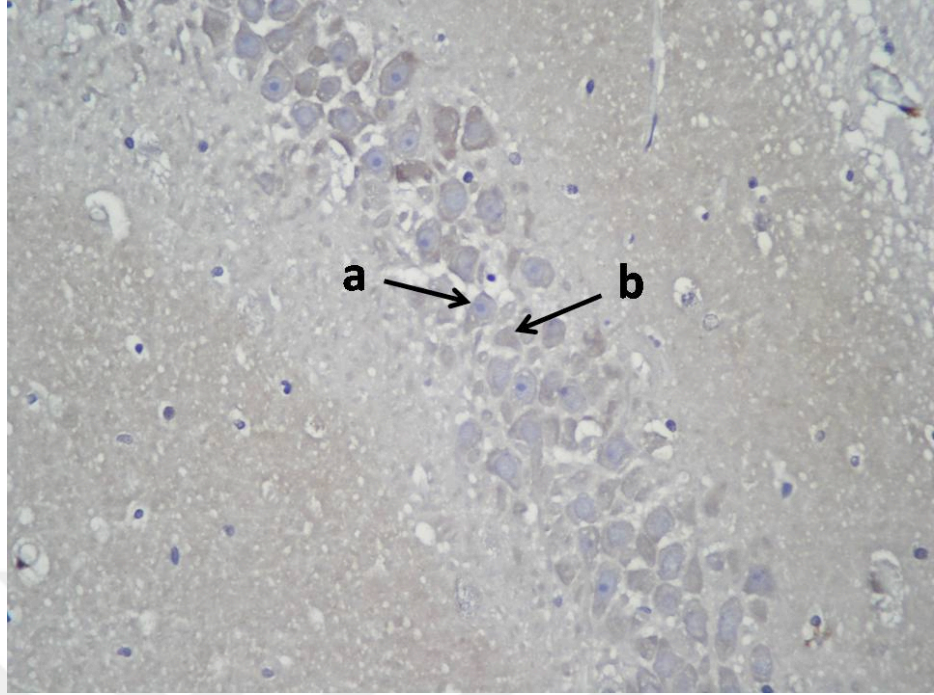
Tablo 10. CA1, CA2 ve CA3 bölgelerine ait tüm Ki-Kare testi ile yapılmış gruplara ait ikili karşılaştırmaların p değerleri sunulmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı olan değerler (*) ile gösterilmiştir.

4.4.d HİPOKAMPUS ALANLARINA AİT NİTRİK OKSİT SENTAZ İMMÜNOREAKTİVİTESİ KESİTLERİNE ÖRNEKLER

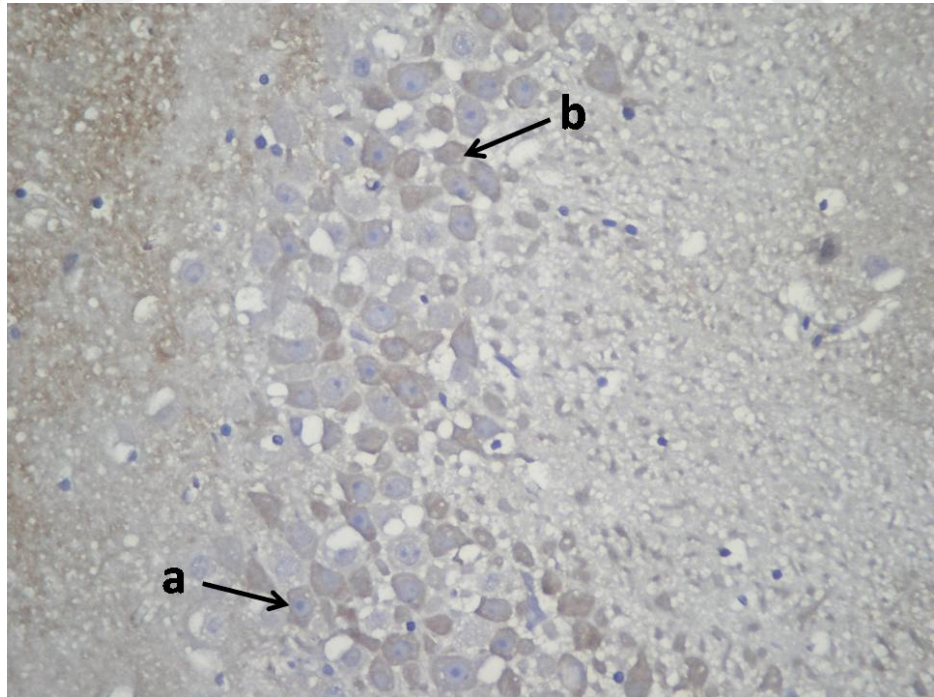
Nitric Oxide Synthase – Universal (u-NOS) immün boyası ile boyanmış beyin preparatında hipokampus CA1, CA2 ve CA3 bölgeleri Şekil 10'da gösterilmektedir. u-NOS immün boyası kullanılarak hazırlanmış olan ve her denek için 400 büyütme altında CA1, CA2 ve CA3 alanları için değerlendirilen kesitlere örnekler Şekil 11, Şekil 12 ve Şekil 13'de ayrı ayrı gösterilmiştir.



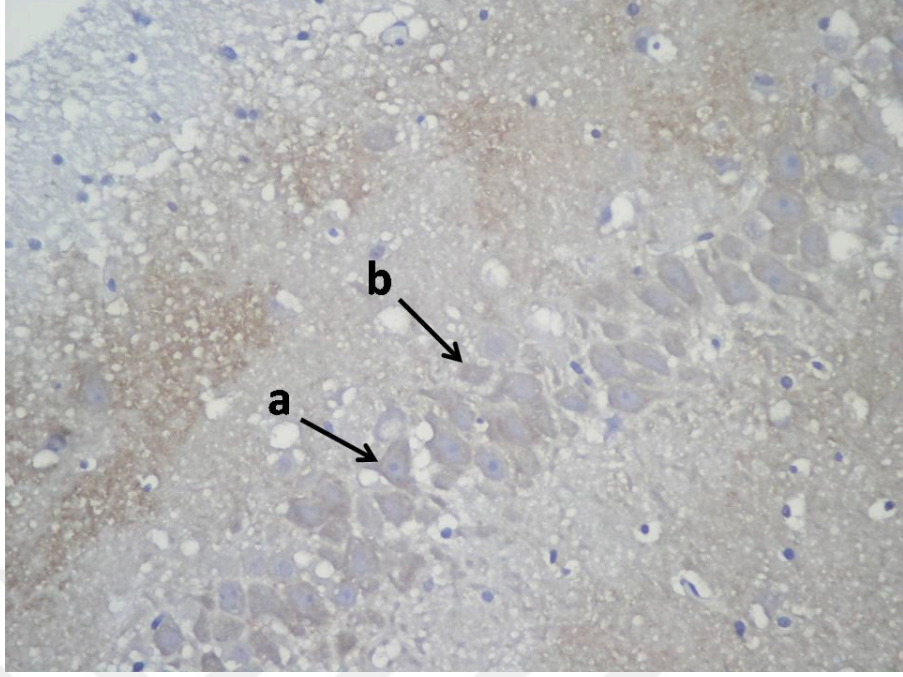
Şekil 10. Nitric Oxide Synthase – Universal (u-NOS) immün boyası ile boyanmış beyin preparatında hipokampus CA1, CA2 ve CA3 bölgeleri görülmektedir.



Şekil 11. Nitric Oxide Synthase – Universal immün boyası kullanılarak hazırlanmış olan ve 400 büyütme altında değerlendirilen CA1 alanına ait kesit. a: immünreaktivite gösteren nöron. b: immün boyanma göstermeyen nöron.



Şekil 12. Nitric Oxide Synthase – Universal immün boyası kullanılarak hazırlanmış olan ve 400 büyütme altında değerlendirilen CA2 alanına ait kesit. a: immünreaktivite gösteren nöron. b: immün boyanma göstermeyen nöron.



Şekil 13. Nitric Oxide Synthase – Universal immün boyası kullanılarak hazırlanmış olan ve 400 büyütme altında değerlendirilen CA3 alanına ait kesit. a: immünreaktivite gösteren nöron. b: immün boyanma göstermeyen nöron.

5. TARTIŞMA

Son yıllarda gelişen teknoloji ve kaydedilen bilimsel gelişmelerin hidrosefalının patofizyolojisine kattığı yenilikler söz konusu olsa da, günümüzde hidrosefali patofizyolojisi halen en çok araştırılan konuların başında gelmektedir.

Beyin dokusunda hidrosefali nedenli oluşan hasarın tip ve derecesi ventrikül genişlemesinin oluşma hızına, büyüklüğüne ve hidrosefalının hangi yaş döneminde geliştiğine bağlı olarak değişmekte ise de genellikle kabul gören kanı, BOS akımının engellenmesi ile kafa içi basıncın hızla artması bile beyin kompliyansının ve serebral kan akımının azalmasına neden olduğu yönündedir. Hidrosefalik süreçte, ventrikül genişlemesinin devam etmesi ile epanhim yırtılmakta ve mikrovasküler yapılarda iskemik ve mekanik etkiler sonucunda aksonal ve ikincil miyelin hasarları oluşmaktadır. Özellikle periventriküler ekstrasellüler alanın kompresyonu, lenfatik kanalları bulunmayan nöral parenkimden ventriküle olan akım yolunun kesilmesine ve bu alanda genişlemeye neden olmaktadır (18). Deneysel çalışmalar ve insan beyinlerinde yapılan patolojik incelemelerden, oluşan hasarın kronik iskemik sonucunda gelişen miyelin hasarına bağlı olduğu dikkatleri çekmektedir. Ayrıca nöronların dendritlerinde sayıca azalma olduğu da tespit edilmiştir (19). Hidrosefali oluşturulan deneklerde ak maddede lokal glukoz utilizasyonunun normale göre arttığı ancak bunun anaerobik yolla olduğu gösterilmiştir. Ayrıca serebral laktat konsantrasyonunun arttığı, ak maddede glukoz, ATP ve fosfokreatinin azaldığı ve periventriküler ak maddede ortalama serebral kan akımının anlamlı ölçüde düştüğü bulunmuştur (3,20). Bu nedenle bu metabolik değişikliklerin periventriküler ak maddede hipoksik-iskemik bir sürecin sonucunda olduğu ve zamanla lokal bir ak madde enfarktına neden olacağı kabul edilmektedir (20, 24, 25). Neonatal hidrosefali geliştirilmiş olan deneklerin magnetik rezonans spektroskopisi ile saptanan enerji indekslerinin kontrol grubundan anlamlı şekilde farklı bulunduğu bir çalışmada, fosfokreatinin / inorganik fosfat oranı azalmış, inorganik fosfat / ATP oranı ise artmış olarak saptanmıştır. Bu çalışmada ventriküler sisteme şant takılan deneklerde bu oranların normale döndüğü gösterilmiştir (26).

Sinir sistemi çeşitli mekanik hasarlara maruz kaldığında (kafa travması veya spinal kord yaralanması gibi), iskemi durumlarında hasarlı hücrelerden aşırı miktarda glutamat salgılanır. Glutamat çok güçlü bir eksitatördür. Bununla beraber, glutamatın çok fazla miktarda veya normalden fazla süre ortamda bulunması hücrenin ölümüne neden olmaktadır. Eksitotoksisite, günümüzde santral sinir sisteminde travmatik ve iskemik hasarlanmanın patogenezinin önemli bir komponenti olarak gösterilmektedir. Bununla beraber, çok sayıda kronik nörolojik hastalıkta eksitotoksisitenin rol aldığına dair giderek artan kanıtlar vardır ve “antieksitotoksik tedavi” bu durumların bazılarında kabul görmeye başlamıştır (33).

Hidrosefali gelişiminde akut dönemde ortaya çıkan; ependimal hasar, ak madde ödemi, kapiller kompresyon, ak madde hipoksi ve iskemisi, aksonal şişme ve nöronal piknozis ile karakterize olan primer yaralanmanın da aynen iskemi ve travmatik süreçler gibi, eksitator aminoasit toksisitesinin oluşturduğu kısır döngüyü çevirmeye başlattığı düşünülmektedir (3). Hidrosefalik süreçte olduğu bilinen periventriküler ak maddedeki ekstrasellüler atık madde birikiminin, mikrovasküler kompresyonun yarattığı iskeminin (lokal serebral kan akımı azalmasının), anaerobik glukoliz ve laktik asidoz oluşumunun ve nörotransmitter değişimlerinin hücresel düzeydeki anormal biyokimyasal süreçleri tetiklemekte ve hidrosefalinin gelişme süresi ve şiddeti ile ilgili olmakla beraber periventriküler yapılar ve ependimde oluşan serbest oksijen radikali-lipid peroksidasyonu ve eksitator aminoasit reaksiyonları ikincil bir hasar sürecini de beraberlerinde getirmektedir (3). Hidrosefalik sürecin erken döneminde nöronal immünohistokimyasal reaksiyon olarak gözlemlenmiş olan kortikal ve hipokampal nitrik oksit sentaz boyanmasındaki artışın toksik nöronal yanıtı ifade ettiği ileri sürülmektedir. Nitrik oksit sentaz aktivasyonundaki bu artışın ekstrasellüler glutamat düzeylerindeki artışa bağlı olduğu düşünülmektedir (39). Nitekim hidrosefali indüksiyonundan hemen sonra ekstrasellüler glutamat taşıyıcılarında anlamlı bir artış olduğu gösterilmiştir (40).

Hidrosefalik süreç ilerledikçe, ortaya çıkan değişikliklerin daha çok iskemiye duyarlı alanlarda olduğu çok sayıdaki çalışmada gösterilmiştir. Özellikle hipokampusun hipoksi ve iskemiye duyarlı nöronları bu hasarlanma için önemli hedefler teşkil etmektedir. Özellikle hipokampal CA1 alt ünitesindeki piramidal katmanın hidrosefalik sürece bağlı iskemik ve eksitotoksik hasardan etkilendiğine

dair veriler yayınlanmıştır (41). Hidrosefalik sürecin belirginleşmesi ile birlikte hipokampusta özellikle CA1 alt ünitesinde geçici global iskemi sonrası görülen “gecikmiş nöronal ölüm” fenomenini anımsatır tarzda nöronal kayıpların söz konusu olduğu bildirilmiştir (41, 43). Ancak yine de günümüzde çok az sayıda çalışma, immatür beyinde hidrosefalik sürecin hipokampus üzerindeki olumsuz etkilerine değinmektedir (44, 48). Deneysel hidrosefali modellerinde serebral kan akımı ile aynı zaman diliminde hipokampustaki nöronal hücre değişimleri araştırılmış ve hidrosefalinin erken dönemindeki serebral kan akımındaki azalma ile korele olarak hipokampal nöronlarda nöronal nitrik oksit sentaz aktivitesinde anlamlı artış olduğu rapor edilmiştir.

Günümüzde hidrosefalik sürecin beyin dokusunda yaratmış olduğu hasarlanmanın önüne geçilmesi konusunda cerrahi sağaltım dışında herhangi ek bir farmakolojik tedavi henüz kabul görmemiştir. Hidrosefalik süreçte nöronal kaybın sebebi primer mekanik hasarlanmanın yanı sıra, ortaya çıkan ikincil hasarlanma ve iskemi olduğu da göz önüne alındığında. hidrosefali tedavisinde, cerrahinin yanı sıra nöronal kaybı engellemek üzere kullanılabilir nöroprotektanın hastalık sürecinin erken döneminde kullanılmaya başlanması akla yatkın gözükmektedir.

Bu çalışmada, özellikle eksitotoksik hasarlanma mekanizmasını glutamat NMDA reseptör blokajı yaparak engelleyebilen “memantin” in, hidrosefalik süreçte bu tip hasarlanmaya duyarlı olduğu gösterilmiş hipokampus hücreleri üzerindeki olası koruyucu etkisi araştırılmıştır.

Çalışmada deneysel olarak obstrüktif hidrosefali oluşturulmuş immatür sıçan beyinlerinde, hidrosefali indüksiyonundan 2 hafta sonra yapılan değerlendirmelerde hidrosefalik beyinlerin hipokampus CA1, CA2 ve CA3 bölgelerinde, hidrosefalik olmayan kontrol deneklere göre sağlıklı nöron sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu görülmüştür. Hidrosefali oluşturulmuş ve herhangi bir tedavi verilmemiş olan deneklerin hipokampus CA1 bölgesindeki ortalama korunmuş hücre sayısı (400 büyütmadaki alan için) $79,13 \pm 3,65$ iken bu değer, kontrol grubunda $105,75 \pm 4,92$ olarak hesaplanmıştır. Bu değerler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Hidrosefali indüksiyonu sonrası ertesi gün sistemik olarak 20mg/kg/gün memantin uygulanmış olan deneklerde ise bu sayı, $88,43 \pm 4,48$ olarak bulunmuştur. Bu sayı, kontrol grubu denekleri ile

kıyaslandığında yine anlamlı oranda azalma ifade etmekle birlikte, tedavi verilmemiş hidrosefalik deneklerin ortalama sayısı ile kıyaslandığında ise CA1 bölgesinde memantin verilmesi ile nöronal hücrelerin anlamlı derecede korunduğu dikkat çekmektedir ($p=0,001$).

Hidrosefalik sürecin erken döneminde nöronal immünohistokimyasal reaksiyon olarak gözlemlenmiş olan hipokampal nitrik oksit sentaz boyanmasındaki artışın toksik nöronal yanıtı ifade ettiği ileri sürülmektedir (39). Nitrik oksit sentaz aktivasyonundaki bu artışın ekstrasellüler glutamat düzeylerindeki artışa bağlı olduğu ileri sürülmüştür (39). Hidrosefali indüsyonundan iki hafta sonra, hipokampal nöronlarda nöronal nitrik oksit sentaz aktivitesinde anlamlı artış saptayan ve bu artışın hidrosefalinin erken dönemindeki serebral kan akımındaki azalma ile korele olduğunu gösteren bir çalışma da mevcuttur (44). Bu çalışmada, CA1 bölgesinde yapılmış olan nitrik oksit sentaz immünoaktivite değerlendirmesinde, hidrosefali oluşturulmuş olan deneklerde, kontrol grubu deneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı nitrik oksit sentaz aktivitesi artışı görülmüştür ($p=0,007$). Memantin uygulanmış hidrosefalik deneklerin göstermiş olduğu immünoaktivite düzeylerinin ise kontrol grubu deneklerine yakın düzeylerde olduğu ($p=0,287$) dikkat çekmiştir. Memantin verilen deneklerin nitrik oksit sentaz immünoaktivite değerleri, memantin verilmemiş deneklere göre daha düşük bulunmuştur. Değerler istatistiksel olarak kıyaslandığında aralarında anlamlı düzeyde fark olduğu görülmüştür ($p=0,043$).

Hidrosefalik süreçte CA1 hipokampus bölgesinden yapılmış olan bu değerlendirmeler ile, hidrosefalik sürecin erken devresinde verilmeye başlanan sistemik memantin, CA1 bölgesinde nöronal toksisiteyi gösteren nöronal nitrik oksit sentaz aktivitesini ve hücre kaybını anlamlı derecede engellediği görülmektedir. Bu sonuç, hidrosefalik süreç içerisinde hipokampusun bu bölgesinde glutamat NMDA reseptörüne bağlı eksitotoksik hasarlanma mekanizmasının varlığını doğrular yöndedir.

Hidrosefali oluşturulmuş olan deneklerin hipokampus CA2 bölgesindeki ortalama korunmuş hücre sayısı $71,89 \pm 15,09$ olarak bulunmuş, bu değer, kontrol grubunda ise $100,38 \pm 6,02$ olarak hesaplanmıştır. Bu değerler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,01$). Bu sonuç, hidrosefalik süreçte

hipokampus CA2 bölgesinde de nöronal kaybın anlamlı düzeyde olduğuna işaret etmektedir. Hidrosefali indüksiyonu sonrası sistemik olarak memantin uygulanmış olan deneklerde ise bu sayı, $84,70 \pm 6,71$ olarak bulunmuştur. Bu sayı, kontrol grubu denekleri ile kıyaslandığında yine anlamlı oranda ($p=0,009$) azalma ifade etmekle birlikte, tedavi verilmemiş hidrosefalik deneklerin ortalama sayısı ile kıyaslandığında ise CA2 bölgesinde memantin verilmesi ile nöronal hücrelerin anlamlı derecede korunduğu dikkat çekmektedir ($p=0,029$).

CA2 bölgesinde yapılmış olan nitrik oksit sentaz immünoreaktivite değerlendirmesinde, hidrosefali oluşturulmuş olan deneklerde, kontrol grubu deneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı nitrik oksit sentaz aktivitesi artışı görülmüştür ($p=0,001$). Memantin uygulanmış hidrosefalik deneklerin göstermiş olduğu immünoreaktivite düzeyleri kontrol grubu deneklerine göre anlamlı düzeyde artmış olmasına rağmen ($p=0,038$), memantin verilen deneklerin nitrik oksit sentaz immünoreaktivite değerlerinin, memantin verilmemiş deneklere göre daha düşük bulunmuş olması dikkat çekicidir. Bu değerler istatistiksel olarak kıyaslandığında aralarında anlamlı düzeyde fark olduğu görülmüştür ($p=0,018$). Hidrosefalik süreçte hipokampus CA2 bölgesindeki bu değerlendirmeler ile, hidrosefalik süreçte verilen sistemik memantin, CA2 bölgesinde de nöronal nitrik oksit sentaz aktivitesini ve nöron kaybını anlamlı derecede engelleyebildiği söylenebilir. Bu sonuçlar, hidrosefalik süreçte hipokampus CA2 bölgesinde de glutamaterjik NMDA reseptörüne bağlı eksitotoksik hasarlanma mekanizmasının var olduğunu göstermektedir.

Hidrosefali oluşturulmuş olan deneklerin hipokampus CA3 bölgesi ortalama korunmuş nöron sayısı $69,61 \pm 9,46$ olarak hesaplanmıştır. Bu değer, kontrol grubu CA3 bölgesinde $94,50 \pm 3,85$ olarak bulunmuştur. Bu değerler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,01$). Bu fark, hidrosefalik süreçte hipokampus CA3 bölgesinde de nöronal kaybın anlamlı düzeylerde olduğunu göstermektedir. Hidrosefali indüksiyonu sonrası memantin uygulanmış olan deneklerde ise CA3 bölgesinde ortalama korunmuş nöron sayısı $73,10 \pm 10,54$ olarak bulunmuştur. Bu sayı, kontrol grubu denekleri ile kıyaslandığında anlamlı oranda ($p=0,001$) azalma ifade etmektedir. Bu değer, tedavi verilmemiş hidrosefalik deneklerin ortalama sayısı ile kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı

bir fark saptanmamıştır ($p= 0,663$). Bu sonuç, memantin verilmesine rağmen hidrosefalik süreçte hipokampus CA3 bölgesinde nöronal hücrelerin sayısında anlamlı derecede azalmanın devam etmiş olduğuna dikkat çekmektedir.

Benzer sonuçlar, CA3 bölgesinde yapılmış olan nitrik oksit sentaz immünoreaktivite değerlendirmesinde de görülmektedir. Hidrosefali oluşturulmuş olan deneklerde, kontrol grubu deneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı nitrik oksit sentaz aktivitesi artışı görülmüştür ($p=0,002$). Memantin uygulanmış hidrosefalik deneklerin göstermiş olduğu immünoreaktivite düzeyleri de kontrol grubu deneklerine göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p=0,001$). Memantin verilen deneklerin nitrik oksit sentaz immünoreaktivite değerlerinin, memantin verilmemiş deneklerle kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark olmadığı görülmüştür ($p=0,131$). Hidrosefalik süreçte hipokampal CA3 bölgesindeki bu değerlendirmeler sonucunda, hidrosefalik proste uygulanan sistemik memantin, CA3 bölgesindeki nöronal nitrik oksit sentaz aktivitesini ve nöron kaybını anlamlı derecede etkilemediği görülmektedir.

Bu çalışmanın sonuçları göstermektedir ki, hidrosefalik sürecin başlangıcında uygulanan “antioksidotoksik aktiviteye sahip” memantin, büyük olasılıkla iyi bilinen “NMDA reseptör blokajı mekanizması” yolu ile hidrosefalinin ilerlemesiyle ortaya çıkan hipokampus gibi iskemiye duyarlı alanlardaki gecikmiş hücre ölüm ve hasarlanma üzerinde koruyucu etki gösterebilmektedir. Ancak bu çalışmada, deneklerde eş zamanlı olarak serebral kan akımı ölçümleri yapılmadığı için, memantin bu etkisinin, serebral kan akımı üzerindeki olası bir etki ile gerçekleştirip gerçekleştirmediği konusunda yorum yapmak olanaklı değildir. Bu etkinin daha ayrıntılı şekilde ortaya konabilmesi için, yapılacak daha ayrıntılı çalışmalara gereksinim vardır. Ancak, elde olunan bu veriler ışığında, deneysel infantil hidrosefali modelinde hipokampus CA1, CA2 ve CA3 bölgelerinde iki haftalık süre sonucunda anlamlı nöronal kayıp olduğu ve bu kayıplara nöronal toksisiteyi gösteren nöronal nitrik oksit sentaz aktivitesi artışının eşlik ettiğini söylemek mümkündür. Hidrosefalik sürecin başlaması ile birlikte erken dönemde sistemik olarak 20 mg/kg/gün dozunda verilen memantin, özellikle hipokampus CA1 ve CA2 alanlarındaki nöronal toksisiteyi ve nöron yıkımına karşı anlamlı bir koruyucu etkisi olduğu söylenebilir. Memantin bu etkiyi, hipokampal nöronlardaki

nöronal nitrik oksit sentaz aktivitesindeki artışı engelleyerek gösteriyor olması söz konusu olabilir. Çünkü; daha önceden yapılmış olan çalışmalarda nitrik oksit sentaz aktivasyonundaki artışın ekstrasellüler glutamat düzeylerindeki artışa bağlı olduğu gösterilmiştir (39). Bu da memantin hipokampal nöronlar üzerindeki koruyucu etkisinin sahip olduğu glutamat-NMDA reseptör antagonizması mekanizması ile gerçekleştirme olasılığını kuvvetle düşündürmektedir.

Sonuç olarak, hidrosefalik süreç ilerledikçe, ortaya çıkan değişikliklerin daha çok iskemiye duyarlı alanlarda olduğu ve özellikle hipokampusun hipoksi ve iskemiye duyarlı nöronlarının bu hasarlanma için önemli hedefler teşkil ettiği bilinmektedir. Özellikle immatür beyinde hidrosefalik sürecin tetiklediği nöronal kayıpların engellenmesine yönelik ek tedavi modalitelerine gereksinim vardır. Bu tedavi modaliteleri de ancak, hidrosefalik sürecin oluşturduğu hasarlanma mekanizmalarının daha iyi anlaşılması sonucu geliştirilebilecektir. Mevcut çalışma, bu amaçla yapılmış olup, özellikle hidrosefalik süreçte hipokampal bölgelerin eksitotoksik hasarlanma mekanizması üzerine dikkat çekmektedir. Bu mekanizmaların ve olası tedavi modalitelerinin daha ayrıntılı gösterilebileceği gelecek çalışmalara ihtiyaç vardır. Günümüzde ayrıntılı şekilde araştırılan hidrosefali patogenezindeki ikincil hasarlanma mekanizması ve bu mekanizmanın farmakolojik açıdan engellenebilirliği, gelecekte belki de yeni tedavi umutları açabilecektir.

6. SONUÇ

Çalışmada deneysel olarak obstrüktif hidrosefali oluşturulmuş immatür sıçan beyinlerinde, hidrosefali indüksiyonundan 2 hafta sonra yapılan değerlendirmelerde hidrosefalik beyinlerin hipokampus CA1, CA2 ve CA3 bölgelerinde, hidrosefalik olmayan kontrol deneklere göre sağlıklı nöron sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu görülmüştür. Bu azalmaya, her üç bölgede de anlamlı nitrik oksit sentaz aktivitesi artışı eşlik etmiştir.

Hidrosefalik sürecin erken devresinde 20 mg/kg/ gün dozunda verilmeye başlanan sistemik memantin, 2 haftalık süre sonunda CA1 ve CA2 bölgelerinde nöronal toksisiteyi gösteren nöronal nitrik oksit sentaz aktivitesini ve hücre kaybını anlamlı derecede engellediği görülmüştür. Ancak memantin uygulamasının, hipokampus CA3 bölgesindeki nöronal nitrik oksit sentaz aktivitesini ve nöron kaybını anlamlı derecede etkilemediği saptanmıştır.

Çalışmanın bulguları, deneysel hidrosefali sürecinde hipokampusta, özellikle CA1 ve CA2 bölgelerinde glutamat NMDA reseptörüne bağlı eksitotoksik nöronal hasarlanma mekanizmasının varlığını savunan görüşleri destekler yöndedir.

Bu çalışmada deneysel olarak etkinliği gösterilen memantin, hidrosefalik sürece bağlı nöronal hasarlanmayı engellemek amacı ile kullanılabilirliği, ileride yapılacak daha ayrıntılı deneysel ve klinik çalışmaların sonucunda ortaya konulabilecektir.

7. ÖZET

İNFAANT SIÇANDA KAOLİN İLE OLUŞTURULAN HİDROSEFALİ MODELİNDE SİSTEMİK UYGULANAN MEMANTİNİN HİPOKAMPUS CA1, CA2 VE CA3 BÖLGELERİ ÜZERİNDEKİ NÖROPROTEKTİF ETKİSİ : HİSTOPATOLOJİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME

AMAÇ: Deneysel infantil hidrosefalinin erken döneminde verilen sistemik memantin hipokampus CA1, CA2, CA3 bölgelerindeki nöron koruyucu etkinliğinin histopatolojik ve immünohistokimyasal açıdan araştırılması

YÖNTEM-GEREÇLER: Çalışmada 3 haftalık Sprague-Dawley türü sıçanlar kullanılmıştır. Deneklerde sisterna magnaya kaolin enjeksiyonu ile hidrosefali modeli oluşturulmuştur. Denekler, kontrol grubu (K, n=8), hidrosefali grubu (H, n=9), memantin uygulanan hidrosefali grubu (M, n=10) şeklinde sınıflandırılmıştır. M grubuna hidrosefali indüksiyonu sonrası 2 hafta süre ile 20 mg/kg/gün memantin intraperitoneal yoldan verilmiştir. Bu sürenin sonunda denekler, manyetik rezonans görüntüleme incelemesi sonrasında giyotin yöntemi ile sakrifiye edilerek serebrumları çıkartılmıştır. Hipokampus CA1, CA2 ve CA3 bölgelerindeki nöronlar sayılmış ve bu bölgelerdeki nöronlarda nöronal nitrik oksit sentaz enzimine yönelik immünohistokimyasal inceleme yapılmıştır.

BULGULAR: Çalışmada hidrosefali oluşturulmuş sıçan beyinlerinin, hipokampus CA1, CA2 ve CA3 bölgelerinde, hidrosefalik olmayan kontrol deneklere göre sağlıklı nöron sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu görülmüştür. Bu azalmaya, her üç bölgede de anlamlı nitrik oksit sentaz aktivitesi artışı eşlik etmiştir. Hidrosefalik sürecin erken devresinde verilmeye başlanan sistemik memantin, 2 haftalık sürenin sonunda CA1 ve CA2 bölgelerinde nöronal toksisiteyi gösteren nöronal nitrik oksit sentaz aktivitesini ve hücre kaybını anlamlı derecede engellediği görülmüştür. Ancak benzer anlamlı etkiye, hipokampus CA3 bölgesinde rastlanmamıştır.

TARTIŞMA: Hidrosefalik sürecin başlaması ile birlikte erken dönemde sistemik olarak uygulanan memantin, özellikle hipokampus CA1 ve CA2

alanlarındaki nöronal toksisiteyi ve nöron yıkımına karşı anlamlı bir koruyucu etkisi olduğu söylenebilir. Çalışmanın bulguları, deneysel hidrosefali sürecinde hipokampusta eksitotoksik nöronal hasarlanma mekanizmasının varlığına işaret eden görüşleri destekler yöndedir.

ANAHTAR KELİMELER: Eksitotoksisite, hidrosefali, hipokampus, memantin, sıçan



8. ABSTRACT

NEUROPROTECTIVE EFFECT OF SYSTEMIC MEMANTINE ADMINISTRATION ON CA1, CA2 AND CA3 REGIONS OF THE HIPPOCAMPUS IN KAOLIN INDUCED EXPERIMENTAL INFANTILE RAT HYDROCEPHALUS: HISTOPATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS

PURPOSE: To investigate the neuroprotective effect of systemic memantine administration on CA1, CA2 and CA3 hippocampal regions in kaolin induced experimental infantile rat hydrocephalus.

MATERIALS AND METHOD: Experimental hydrocephalus was induced by injecting kaolin into the cisterna magna of 3-weeks old Sprague-Dawley rat pups. Animals were grouped as follows: control group (K, n=8), hydrocephalus induced group (H, n=9), memantine-treated hydrocephalic animals (M, n=10). M group received a single daily dose of 20mg/kg memantine i.p. 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. Viable neurons were counted and neuronal nitric oxide synthase activity was assessed in the CA1, CA2 and CA3 regions of the hippocampus.

RESULTS: Statistically significant reduce in the number of viable neurons and significantly higher nitric oxide synthase immunoreactivity were observed in H group animals as compared to control group. Memantine, when given in the early phase of the hydrocephalic process for a period of two weeks, seemed to significantly reduce both the neuronal death and nitric oxide synthase immunoreactivity in CA1 and CA2 regions of the hippocampus. However, it seemed to have no significant effect on the CA3 region.

DISCUSSION: Memantine, when administered in the early phase of the hydrocephalic process, seems to have a protective effect on neuronal toxicity and

neuronal loss especially in CA1 and CA2 regions of the hippocampus. The data of this study, seems to support the reports which point out the existence of excitotoxic neuronal injury mechanisms in experimentally induced hydrocephalic process.

KEY WORDS: Excitotoxicity, hippocampus, hydrocephalus, memantine, rat



9. KAYNAKLAR

1. Caner H, Atasever A, Kılınç K, Durgun P, Peker S, Özcan OE: Lipid peroxide level increase in experimental hydrocephalus. *Acta Neurochir (Wien)* 1993;**121** :68-71.
2. 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.
3. Etuş V : Deneysel neonatal hidrosefali modelinde N-asetilsisteinin lipid peroksidasyonu üzerine etkisi T.C. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Nöroşirürji Ana Bilim Dalı Uzmanlık Tezi 1999
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. *Exp Neurol* 1999;**155**:109-17.
5. Rao VLR, Dogan A, Todd KG, Bowen KK, Dempsey RJ : Neuroprotection by memantine, a non-competitive NMDA receptor antagonist after traumatic brain injury in rats. *Brain Research* 2001;**911**: 96–100.
6. Dogan A, Eras MA, Raghavendra Rao VL, Dempsey RJ. Protective effects of memantine against ischemia-reperfusion injury in spontaneously hypertensive rats. *Acta Neurochir* 1999; **141**: 1107-1113
7. Dorland's Medical Dictionary. Twenty-sixth edition. W.B.Saunders Company Philadelphia. 1981:pp.622.
8. Gjerris F, Borgesen SE: Current concepts of measurement of cerebrospinal fluid absorbtion an biomechanics of hydrocephalus. In: Symon L.(Ed) *Advances and technical standarts in neurosurgery*. 1992:Vo1:19. Springer-Verlag/Wien. pp 146-177.
9. Jeffreys RV: Hydrocephalus. In: Miller JD (Ed.): *Northfield's surgery of the central nervous system*. Second edition. Blackwell Scientific Publications/Edinburgh. 1987:pp.543-573.

10. Milhorat TH: Hydrocephalus: Pathophysiology and clinical features. In: Wilkins RH, Rengachary SS (Ed.): *Neurosurgery* Vol:3. McGraw-Hill Book Company/New York. 1985:pp.2135-2139.
11. O'Brien MS: Hydrocephalus in children. In: Youmans JR (Ed.): *Neurological surgery*. Third edition, vol:3. W.B.Saunders Company/Philadelphia. 1992: pp.1381-1422.
12. Lyons AE : Hydrocephalus first illustrated. *Neurosurg*. 1995;**37**:511-512,
13. Davidoff LE : Treatment of hydrocephalus. *Arch. Surg* 1929;**18**:1737-1762.
14. Torack RM: Historical aspects of normal and abnormal brain fluids: II. Hydrocephalus. *Arch Neurol* 1982;**39**: 276-279.
15. Aronyk KE: The history and classification of hydrocephalus. In: Winn HR, Mayberg MR (Ed.): *Neurosurgery clinics of North America* Vol:4; Hydrocephalus. W.B.Saunders Company/Philadelphia. 1993:pp.599-609.
16. Fisher RG : Surgery of the congenital anomalies, in Walker AE (ed): *A History of Neurological Surgery*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1951, pp 334-351
17. Yaşargil MG: *Microneurosurgery* Vol:IV A. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 1994 pp.256-262.
18. Lux WE, Hochwald GM, Sahar A, Ransohof J: Periventricular water content: Effect of pressure in experimental chronic hydrocephalus. *Arch Neurol* 1970;**23**:475-479.
19. McAllister II JP, Maugans TA, Shah MV, Truex JrRC: Neuronal effects of experimentally induced hydrocephalus in newborn rats. *J Neurosurg* 1985;**63**:776-783.
20. Chumas PD, Drake JM, Del-Bigio MR, Da Silva M, Tuor UI: Anaerobic glycolysis preceding white-matter destruction in experimental neonatal hydrocephalus. *J Neurosurg* 1994; **80**:491-501.
21. DelBigio MR, Bruni JE: Changes in periventricular vasculature of rabbit brain following induction of hydrocephalus and after shunting. *J Neurosurg* 1988;**69**:115-120.
22. Higashi K, Asahisa H, Ueda N: Cerebral blood flow and metabolism in experimental hydrocephalus. *Neurol Res* 1986;**8**:169-176.

23. Rosenberg GA, Saland L, Kyner WT: Pathophysiology of periventricular tissue changes with raised CSF pressure in cats. *J Neurosurg* 1983;**59**:606-611.
24. DelBigio MR: Neuropathological changes caused by hydrocephalus. *Acta Neuropathol* 1993;**85**:573-585.
25. McAllister II JP, Cohen MI, O'Mara KA, Johnson MH: Progression of experimental infantile hydrocephalus and effects of ventriculoperitoneal shunts: An analysis correlating magnetic resonance imaging with gross morphology. *Neurosurgery* 1991;**29**:329-340.
26. DaSilva MC, Drake JM, Lemaire C, Cross A, Tuor UI: High-energy phosphate metabolism in a neonatal model of hydrocephalus before and after shunting. *J Neurosurg* 1994;**81**:544-553.
27. Bareggi SR, Porta M, Collice M, Calderini G, Ferrara M, Morselli PL: Monoamine acid metabolites in ventricular CSF of patients with brain tumours. *Acta Neurochir (Wien)* 1976; **35** :161-170.
28. DelBigio MR: Hydrocephalus-Induced changes in the composition of cerebrospinal fluid. *Neurosurgery* 1989;**25**:416-423.
29. Garelis E, Sourkes TL: Sites of origin in the central nervous system of monoamine metabolites measured in human cerebrospinal fluid. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1973; **36**:625-629.
30. Pickard JD, Walker V, Newton H, Smythe PJ, Perry S: Effect of hydrocephalus on prostaglandins and thromboxane B₂ in ventricular cerebrospinal fluid. *Neurosurgery* 1990; **27**:943-945.
31. Lipton SA, Rosenberg RA. Mechanisms of disease: excitatory amino acids as a final common pathway in neurologic disorders. *N Engl J Med* 1994; **330**: 613-622.
32. Lipton SA. Molecular mechanisms of trauma-induced neuronal degeneration. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 1993; **6**: 588-596
33. Franzco RJC. Possible role of excitotoxicity in the pathogenesis of glaucoma. *Clin and Exp Ophthalmol* 2006; **34**: 54-63
34. Franzco RJC. Possible role of excitotoxicity in the pathogenesis of glaucoma. *Clin and Exp Ophthalmol* 2006; **34**: 54-63

35. Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 1969; **164**: 719–21
36. Lipton SA. Possible role for memantine in protecting retinal ganglion cells from glaucomatous damage. *Surv Ophthalmol* 2003; **48** (Suppl 1): 38-46
37. Budd SL, Tenneti L, Lishnak T, et al. Mitochondrial and extramitochondrial apoptotic signaling pathways in cerebrocortical neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 6161-6166.
38. Dawson VL, Dawson TM, London ED, et al. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 6368-6371.
39. 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.
40. Masago A, Shimada S, Minami Y, Inoue K, Morimura H, Otori Y, Miyai A, Tohyama M, Yamada K. GLAST mRNA expression in the periventricular area of experimental hydrocephalus. *Neuroreport.* 1996; **7**: 2565–2570.
41. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 1982; **239**:57–69.
42. 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. *Exp Brain Res.* 1992;**89**:31–39.
43. 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.
44. Klinge PM, Samii A, Mühlendyck A, Koppány V, Geerd-Jürgen M, Walter GF, Silverberg GD, Brinker MD. Cerebral hypoperfusion and delayed hippocampal response after induction of adult kaolin hydrocephalus. *Stroke* 2003;**34**:193-199
45. Egawa T, Mishima K, Egashira N, Fukuzawa M, Abe K, Yae T, Iwasaki K, Fujiwara M. Impairment of spatial memory in kaolin-induced hydrocephalic

- rats is associated with changes in the hippocampal cholinergic and noradrenergic contents. *Behav Brain Res* 2002;**129**:31–39
46. Del Bigio MR, Bruni JE. Silicone oil-induced hydrocephalus in the rabbit. *Childs Nerv Syst* 1991;**7**:79–84
47. Tsubokawa T, Katayama Y, Kawamata T. Impaired hippocampal plasticity in experimental chronic hydrocephalus. *Brain Inj* 1988;**2**:19–30
48. Kriebel RM, McAllister JP. Pathology of the hippocampus in experimental feline infantile hydrocephalus. *Neurol Res* 2000;**22**:29–36
49. 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
50. 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
51. Dyker AG, Lees KR. Duration of neuroprotective treatment for ischemic stroke. *Stroke* 1998, **29**:535-542
52. Del Zoppo GJ, Wagner S, Tagaya M. Trends and future developments in the pharmacological treatment of acute ischaemic stroke. *Drugs* **54**: 9-38, 1997
53. Myseros JS, Bullock R. The rationale for glutamate antagonists in the treatment of traumatic brain injury. *Ann. N Y Acad. Sci.* **765** ; 262–271, 1995
54. Muir KW, Lees KR. Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs, *Stroke* **26** :503–513, 1995
55. Danysz W, Parsons CG, Möbius HJ, et al. 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.
56. Kornhuber J, Weller M, Schoppmeyer K. Amantadine and memantine are NMDA receptor antagonists with neuroprotective properties. *J Neural Transm* 1994; Suppl. **43**:91-104.

57. Vorwerk CK, Lipton SA, Zurakowski D et al. Chronic low-dose glutamate is toxic to retinal ganglion cells: toxicity blocked by memantine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; **37**:1618-1624
58. Parsons CG, Danysz W, Quack G. Memantine is a clinically well tolerated N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor antagonist. *Neuropharmacology* 1999; **38**: 735-767.
59. Rogawski MA, Wenk GL. The neuropharmacological basis for the use of memantine in the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drug Rev.* 2003;**9**:275-308.
60. Lipton SA. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: Memantine and beyond. *Nature Rev Drug Discov.* 2006; **5**; 160-170.
61. Volbracht C, van Beek J, Zhu C et al. Neuroprotective properties of memantine in different in vitro and in vivo models of excitotoxicity. *Eur J Neurosci* 2006;**23**; 2611-2622
62. Parsons CG, Danysz W, Quack G. Memantine is a clinically well-tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist - a review of preclinical data, *Neuropharmacology* 1999;**38** :735–767.
63. Hesselink MB, De Boer MG, Breimer DD, Danysz W. Brain penetration and in vivo recovery of NMDA receptor antagonists amantadine and memantine: a quantitative microdialysis study. *Pharm. Res.* 1999;**16** :637–642.
64. Heidrich P, Rosler M, Riederer P. Pharmacotherapy of Alzheimer dementia: therapy of cognitive symptoms - new results of clinical studies. *Fortschr. Neurol. Psychiatr.* 1997;**65** :108–121.
65. Schneider E, Fischer PA, Clemens R, Balzereit F, Funfgeld EW, Haase HF. Effects of oral memantine administration on Parkinson symptoms. Results of a placebo-controlled multicenter study. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 1984;**109** :987–990.
66. Kornhuber J, Weller M. Psychotogenicity and N-methyl-D-aspartate receptor antagonism: implications for neuroprotective pharmacotherapy. *Biol. Psychol.* 1997;**41** :135–144.

67. Block F, Schwarz M. Memantine reduces functional and morphological consequences induced by global ischemia in rats. *Neurosci. Lett.* 1996;**208**:41–44.
68. Chen HS, Wang YF, Rayudu RF, 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.
69. 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.
70. Stieg PE, Sathi S, Warach S, Le DA, Lipton SA. Neuroprotection by the NMDA receptor-associated open-channel blocker memantine in a photothrombotic model of cerebral focal ischemia in neonatal rat, *Eur. J. Pharmacol.* 1999;**375**:115–120.
71. Osborne NN. Memantine reduces alterations to the mammalian retina, in situ, induced by ischemia, *Vis. Neurosci.* 1999;**16**:45–52.
72. 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.
73. Etuş V, Belce A. Total sialic acid levels decrease in the periventricular area of infantile rats with hydrocephalus. *Childs Nerv Syst.* 2003;**19**: 825-828.
74. Etuş V, Altuğ T, Belce A, Ceylan S. Green Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin Gallate Prevents Oxidative Damage on Periventricular White Matter of Infantile Rats with Hydrocephalus. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 2003;**200**:203-209.
75. Etuş V, Tugay M, Utkan T, Müezzinoğlu B, Ceylan S. The foregut smooth muscle reactivity changes in the hydrocephalus-induced infantile rats. *Journal of Surgical Research* 2004;**118**: 197-202.
76. DelBigio MR, Bruni JE. Periventricular pathology in hydrocephalic rabbits before and after shunting. *Acta Neuropathol* 1988;**77**:186-195.

77. Gonzales-Darder J, Barbera J, Cerda-Nicholas M, Segura D, Broseta J, Barcia Salorio JL. Sequential morphological and functional changes in kaolin-induced hydrocephalus. *J Neurosurg* 1984; **61**:918-924

