

Guanosine Has No Beneficial Effect on Reactive Gliosis, Neuroinflammation and Myelin Loss in the Experimental Rat Model of Hydrocephalus

Guanosinin, Deneyisel Sıçan Hidrosefali Modelinde, Reaktif Gliosis, Nöroinflamasyon ve Miyelin Kaybı Üzerinde Yararlı Etkisi Bulunmamaktadır

Ruslan Yunusov¹ , Elham Bahador Zırh² , Figen Kaymaz² , Burçak Bilginer³ 

¹Ege Hastanesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği, Bakü, Azerbaycan

²Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara, Türkiye

³Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Ana Bilim Dalı, Ankara, Türkiye

Cite this article as: Yunusov R, Zırh EB, Kaymaz F, Bilginer B. Guanosine Has No Beneficial Effect on Reactive Gliosis, Neuroinflammation and Myelin Loss in the Experimental Rat Model of Hydrocephalus. Arch Basic Clin Res 2020; 2(2): 51-8.

ORCID iDs of the authors: R. Y. 0000-0002-6995-6727; E. B. Z. 0000-0002-6921-2365; F. K. 0000-0001-8896-2471; B. B. 0000-0001-9667-3709.

ABSTRACT

Objective: This study aimed to examine the effect of guanosine on reactive gliosis, neuroinflammation, and myelin loss in a kaolin-induced model of hydrocephalus.

Material and Method: Total 22 female rats were divided into the following 3 groups: 7 rats in Group 1 and Group 2 and 8 rats in Group 3. In Group 1 (sham), 30 µL of normal saline was injected into the cisterna magna. In Group 2 (hydrocephaly) and Group 3 (treatment) 30 µL of 25% kaolin suspension was injected into the cisterna magna. On the 14th day after the procedure, magnetic resonance imaging (MRI) was performed for identifying the hydrocephalus in Group 2 and Group 3. After the MRI, Group 2 and Group 3 received intraperitoneal vehicle and vehicle + guanosine injections for 7 days, respectively. On the 8th day, the animals were sacrificed under anesthesia. Histopathological, immunohistochemical, and immunofluorescent studies were performed, and statistical evaluation was performed with the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U tests.

Results: All the parameters examined in the hydrocephalic and treatment group were significantly different from those in the control group ($p < 0.005$). However, there was no significant difference between the hydrocephalic and treatment groups in any parameter (luxol fast blue: $p = 0.867$; IHC: $p = 0.55$; IF: $p = 0.61$).

Conclusion: In our study, guanosine did not have a significant effect on myelin loss and microglial activation in the hydrocephalus model. However, for an effect to occur, a longer treatment period and administration of guanosine may be necessary during the development of hydrocephalus. More studies on this subject with guanosine or other protective agents are required.

Keywords: Demyelination, gliosis, guanosine, hydrocephalus.

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı, kaolin kaynaklı hidrosefali modelinde guanozinin reaktif gliosis, nöroinflamasyon ve miyelin kaybı üzerindeki etkisini incelemektir.

Gereç ve Yöntem: 300-350 gr, 22 dişi sıçan 3 gruba ayrıldı. Grup 1'de 7 ve Grup 3'te 8 sıçan vardı. Grup 1'de (sham), 30 µL normal salin, cisterna magna'ya enjekte edildi. Grup 2 (hidrosefali) ve Grup 3 (tedavi) 'de, 30µL %25 kaolin süspansiyonu, cisterna magna içine enjekte edildi. İşlemden sonraki 14. günde, Grup 2 ve 3'te hidrosefali tanımlamak için manyetik rezonans görüntüleme (MRI) yapıldı. MRG Grup 2 ve Grup 3'e 7 gün boyunca sırasıyla guanozin çözünürü ve çözünürü+guanozin intraperitoneal enjekte edildi. 8. günde hayvanlar anestezi altında sakrifiye edildi. Histopatolojik, immünohistokimyasal (IHC) ve immünofloresan (IF) çalışmaları gerçekleştirildi ve istatistiksel değerlendirme Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testleri ile yapıldı.

Bulgular: Hidrosefali ve tedavi grubunda incelenen tüm parametreler kontrol grubundan anlamlı olarak farklıydı ($p < 0.005$). Bununla birlikte, hidrosefali ve tedavi grupları arasında herhangi bir parametrede anlamlı bir fark gözlenmedi (luxol fast blue: $p = 0,867$; IHC: $p = 0,55$; IF: $p = 0,61$).

Sonuç: Çalışmamızda guanozinin hidrosefali modelinde miyelin kaybı ve mikroglial aktivasyon üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte etkinin ortaya çıkması için guanozinin hidrosefali gelişimi sırasında uygulanmaya başlanması, daha uzun süreli tedavi uygulanmasını gerektirebilir. Bu konuda guanozin veya başka protektif ajanlarla yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Demyelinasyon, gliosis, guanozin, hidrosefali.

GİRİŞ

Beyin-omurilik sıvısının (BOS) salınım, emilim veya dolaşım bozukluğuyla oluşan, hidrosefali çocuk ve erişkinlerde önemli morbidite ve mortalite nedenidir. Hidrosefali gelişimi kronik (haftalar, aylar içerisinde) olabileceği gibi akut (saatler, günler içerisinde) da olabilir. Hidrosefaliye bağlı baş ağrısı, görme bozukluğu, nöbet, felç gibi klinik bulgular oluşmaktadır. Hidrosefali beyinde reaktif gliosis, nöron ve akson hasarlanması, myelin kaybı gibi patolojik durumların oluşmasına neden olur. Tüm bu patolojik durumların temelinde glial hücre proliferasyonu ve nöro-enflamasyonun olduğu bilinmektedir (1-3), bunların sonucunu gliosis beyin fonksiyonlarının bozulmasına neden olur (4, 5). Özellikle ventriküllerin genişlemesine ve BOS basıncına bağlı olarak komşu beyin dokusuna transependimal BOS geçişi olmakta, bu ise interstisyel ödemle sonuçlanmaktadır. Ayrıca erişkin tipi hidrosefali olarak kabul edilen normal basınçlı hidrosefalide derin beyaz cevherde iskemi ve liflerde etkilenme radyolojik olarak gösterilmiştir. Pürinler sinir sisteminde, hücre metabolizması, yapısı ve fonksiyonunda değişikliklere neden olan nörotransmisyon ve trofik etkiler gibi etkilere cAMP üstünden aracılık ederler. Bütün bunlardan yola çıkarak nöronal ve oligodendroglial hücre kaybını önleyerek nöroprotektif etkinliğe sahip bir ilaç olan guanozinin (6, 7) myelin kaybını azaltarak beyin fonksiyonlarını koruyacağı hipotezi ile bu çalışmayı planladık. Özellikle hidrosefalide myelin kaybını hedefleyen az sayıda çalışma bulunmaktadır. Hidrosefalideki beyaz cevher etkilenmesini dikkate alarak myelin kaybının ve gliosisin önlenmesinde etkili bir ajanın hidrosefaliye bağlı histopatolojik ve fonksiyonel kayıpların azaltılmasında yararlı olabileceği düşünülmüştür.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmaya ait deney protokolü Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından 15.12.2015 tarihindeki oturumda 2015/91-02 karar numarası ile onaylandı. Çalışma Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları laboratuvarında gerçekleştirildi.

Çalışmada 300-350 gr ağırlıkta 22 adet dişi Sprague-Dawley albino sıçanlar kullanıldı. Deney süresince standart laboratuvar koşullarında tutulan sıçanlar, standart yem (ad libitum) ile beslendi. Gruplar; sham grubu (Grup1, 7 hayvan): intrasisternal olarak SF(30 µL) verildi, hidrosefali grubu (Grup2, 7 hayvan): kaolinle (%25, 30 µL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD) intrasisternal hidrosefali önceden yayınlanan teknikte oluşturulup (8) 1 hafta boyunca intraperitoneal guanozin çözünürü (10 µL 0,1 N NaOH+990 µL %0,9 SF) verildi, tedavi grubu (Grup3, 8 hayvan): kaolinle hidrosefali oluşturulduktan sonra 1 hafta boyunca IP guanozin (8 mg/kg/gün)(Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD) verildi (6). Hidrosefali mo-

delinin doğrulanması için 14. günde beyin MRG (MAGNETOM Trio 1.5T, Siemens, Munich, Almanya) yapıldı. MRG'de hidrosefali tespit edilen hayvanlar rasgele iki gruba (hidrosefali ve tedavi grubu) ayrıldı. 15. günden itibaren tedavi grubuna intraperitoneal guanozin, yalnız hidrosefali grubuna intraperitoneal SF içinde çözünürü verilmeye başlandı. Tedavinin 8. gününde (deneyin 23. günde) denekler genel anestezi altında sol ventrikülden %4 paraformaldehit perfüzyon fiksasyonu ile sakrifiye edildi.

Beyinler hemisferlerin tam ortasından geçen transvers kesitle iki parçaya bölünüp bir parça parafine gömülmek, diğer parça ise frozen işlemi için ayrıldı. Alınan ilk parçalar %10 tamponlu nötral formalinde tespit edildi. Rutin ışık mikroskopi takibi sonrası parafine gömüldü. Elde edilen parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Hematoksilin-eozin (Abcam, Oregon, ABD) ve Luxol fast blue (Abcam, Oregon, ABD) ile boyandıktan sonra ışık mikroskobu (Leica DM 6000B, Wetzlar, Almanya) ve dijital kamera (Leica DC500, Wetzlar, Almanya) ile fotoğrafları çekilerek incelendi.

Diğer parça 1 gün daha %4 PFA içinde bekletilen dokular %30 sü kroza (PBS'te) alınıp çökene kadar (1,5-2 gün) bekletildi. Beyinler çökünce donması için -80°C'de bekletildikten sonra 20 mikrometre kalınlığında kesitler alındı.

Parafin bloklardan elde edilen 5 µm'lik kesitlere anti-MBP (myelin basic protein) antikorları (Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD) ile immünohistokimyasal boyama yapıldı.

Bu çalışmada hidrosefaliye bağlı periventriküler bölgede artmış mikrogliya infiltrasyonunu göstermek için frozen kesitlerde anti-Iba1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1) antikor (Wako, Saitama, Japonya) kullanılmıştır. Sekonder antikor olarak Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 488) (Sigma-Aldrich, St. Louis, ABD) kullanıldı.

İstatistiksel Analiz

Verilerin değerlendirilmesi için Statistical Package for the Social Sciences for Mac 22 programı (IBM Corp.; Armonk, New York, ABD) ile grup ortalamalarının karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis, bağımsız iki grup ortalamalarının karşılaştırılmasında ise Mann Whitney U testleri kullanıldı. İstatistiksel olarak fark p değerinin 0,05'den küçük olması olarak kabul edildi.

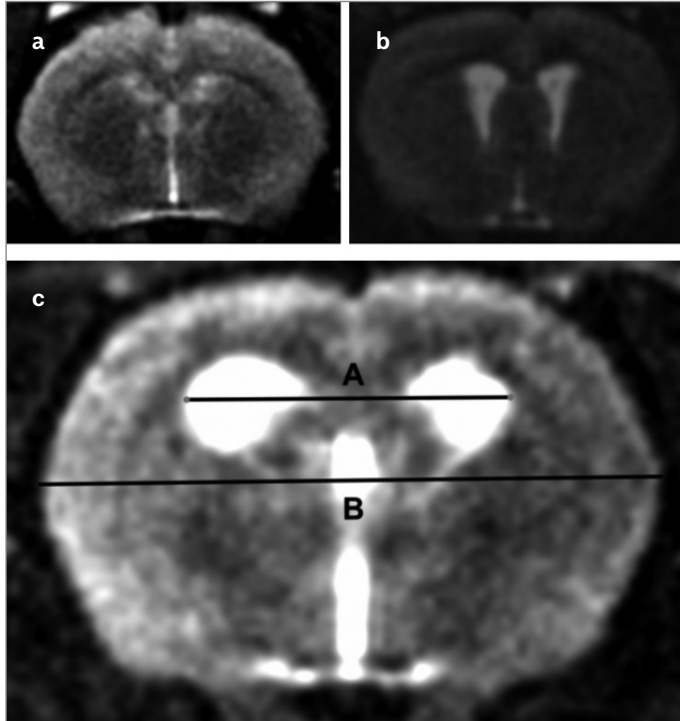
BULGULAR

Sıçanlar günlük değerlendirilerek kilo takibi yapıldı. Hidrosefali oluşturulan deneklerde kilo kaybı izlendi. Fakat

hidrosefali ve tedavi grubundaki denekler arasında ve ayrıca tedavi grubunda tedavi öncesi ve sonrası arasında kilo kaybı açısından anlamlı fark saptanmadı.

Tablo 1. Gruplara göre ortalama ağırlık ve Evans indeksleri

	Ağırlık (gr)	Evans indeksi
Sham grubu (n=7)	321±10	0,297±0,006
Hidrosefali grubu (n=7)	301±25	0,477±0,016
Tedavi grubu (n=8)	316±18	0,488±0,012



Resim 1. a-c. Koronal T2 ağırlıklı MRG kesitleri: a) sham grubu, b) hidrosefali grubu, c) Evans indeksi hesaplanması (Evans indeksi=A/B; A-frontal hornların genişliği, B-beynin en büyük çapı)

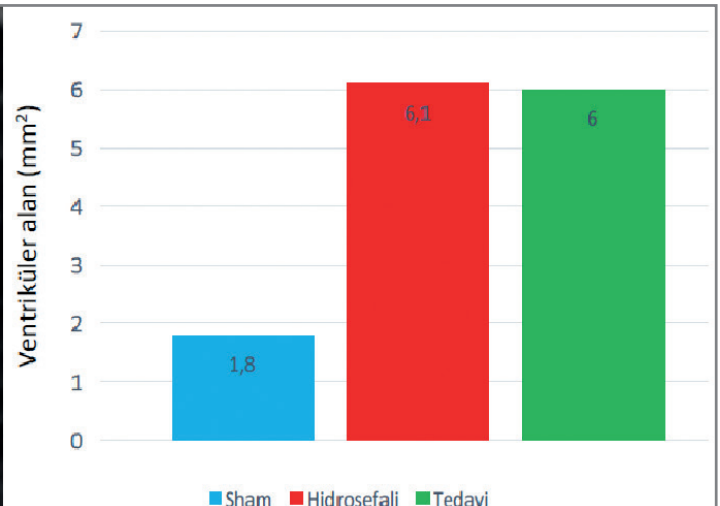


Resim 2. Ventrikül alan (VA) hesaplanması (VA=LV1+LV2+3.V) (LV1-sağ lateral ventrikül, LV2-sol lateral ventrikül, 3.V- 3.ventrikül) ve gruplara göre ventriküler alan ölçümü ortalama sonuçları (mm² ile)

Beyin MRG'de sisterna magnasına kaolin verilen deneklerde ventrikülomegali tespit edildi. MRG'de her iki lateral ventrikül eşit derecede genişlemişti, ayrıca 3. ventrikül, serebral aquaduct ve 4. ventrikülde de genişleme tespit edildi. Bütün bunlar obstrüksiyonun kortikal subaraknoid mesafede oluştuğunun göstergesiydi. Hidrosefali derecesi Evans indeksine göre hesaplandı. Evans indeksinin 0,3'ten büyük olması hidrosefali olarak kabul edildi (9) (Resim 1). Hidrosefali grubunda ortalama Evans indeksi 0,477±0,016, tedavi grubunda ortalama Evans indeksi 0,488±0,012, sham grubunda ise 0,297±0,006 olarak hesaplandı (Tablo 1). Ventrikül alan ölçümünde foramen monro düzeyinden geçen koronal kesitlerde her iki lateral ventrikül ve 3. ventrikülün kesit alanı hesaplanıp, bu değerler toplanarak her denek için tek değer elde edilmiştir (Resim 2). Gruplar ikili olarak karşılaştırıldığında hidrosefali ve tedavi gruplarında sham grubuna göre Evans indeksinin anlamlı derecede arttığı (sırasıyla p=0,002, p=0,017), buna karşın tedavi grubunda ise hidrosefali grubuna kıyasla belirgin bir fark olmadığı izlendi (p=0,55). Ventrikül alan ölçümünde gruplar karşılaştırıldığında hidrosefali ve tedavi gruplarında sham grubuna göre anlamlı artış olduğu (sırasıyla p=0,005, p=0,007), buna karşın tedavi grubunda, hidrosefali grubuna kıyasla belirgin bir fark olmadığı izlendi (p=0,80).

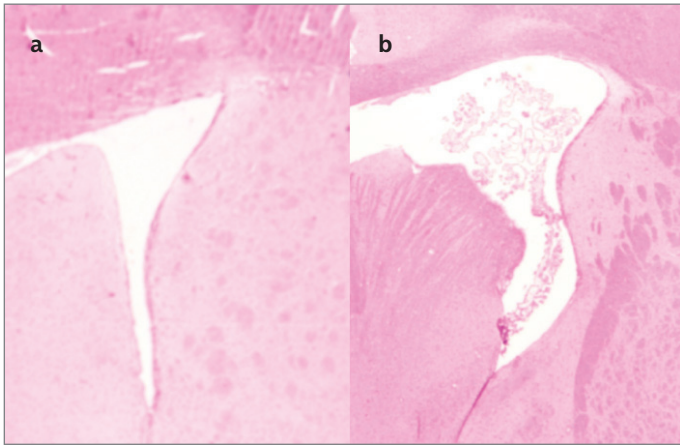
Yapılan hematoksilen-eozin boyamasında, hidrosefali ve tedavi grubu ventrikül boyutlarının sham grubuna oranla daha geniş olduğu tespit edildi (Resim 3). Fakat hidrosefali ve tedavi grupları arasında anlamlı fark saptanmadı.

Luxol fast blue boyamalarında korpus kallozum kalınlığı ölçüldü. Hidrosefali ve tedavi gruplarında sham grubuna göre korpus kallozum kalınlıklarının anlamlı derecede in-

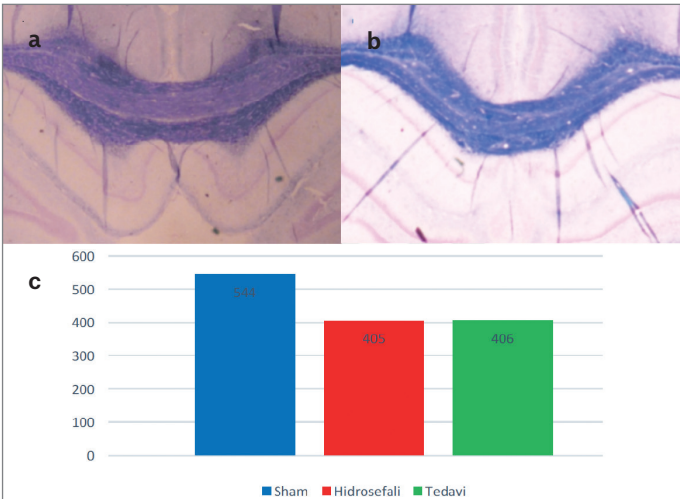


celdiği (sırasıyla $p=0,005$, $p=0,007$) (Resim 4), buna karşın tedavi grubunda ise hidrosefali grubuna kıyasla belirgin bir fark olmadığı izlendi ($p=0,867$).

Hidrosefaliye bağlı oluşan reaktif gliosis ve nöroenflamasyon sonucunda periventriküler beyaz cevherde myelin kaybı oluşur. Oluşan bu myelin kaybını tespit etmek için membran proteini olan myelin basic proteinini (MBP) işaretleyen anti-MBP antikoru kullanıldı. Boyanmanın derecesi alan ölçümü yapılarak hesaplanmıştır. Alan ölçümü 20x büyütmede 4 farklı alanda anti-MBP ile boyanan alanların tüm alana bölünmesi ile (MBP skoru) hesaplanmıştır. Gruplar ikili olarak karşılaştırıldığında hidrosefali ve tedavi gruplarında sham grubuna göre MBP skorlarının anlamlı derecede düştüğü (sırasıyla $p=0,003$, $p=0,012$), buna karşın tedavi grubu ile hidrosefali grubu arasında belirgin bir fark olmadığı tespit edildi ($p=0,55$) (Resim 5).



Resim 3. a, b. a) Sham ve b) hidrosefali grubu frontal horn görüntüleri (Hematoksilen-eozin, x25)

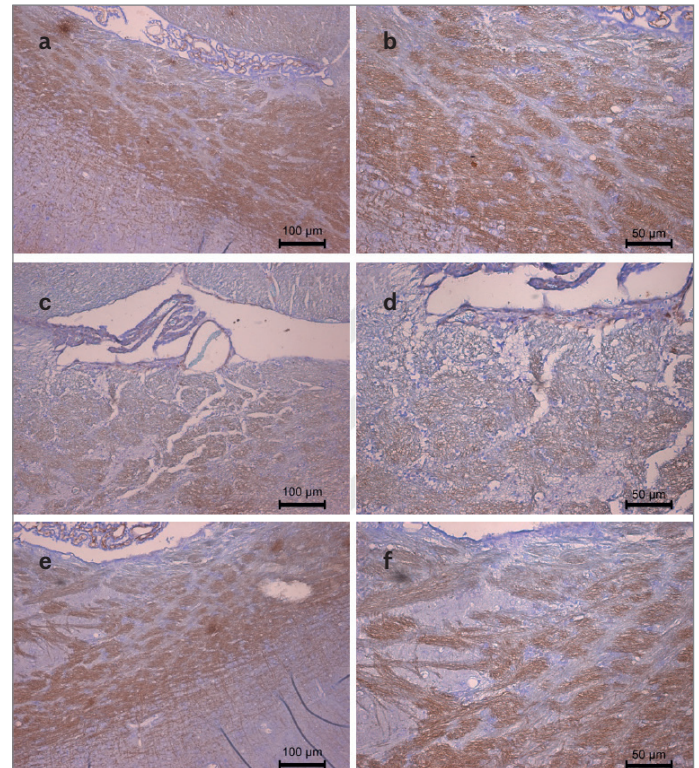


Resim 4. a-c. a) Sham ve b) hidrosefali grubu deneklerinde korpus kallozum kesitleri (Luxol fast blue x25) ve c) gruplar arası korpus kallozum kalınlık karşılaştırma grafiği (µm)

İba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1) mikrogliya/makrofajlara özgü kalsiyum bağımlı proteindir. Dağınık olarak normal beyinde de bulunan mikroglialar hidrosefalide artış göstermektedir. Anti-İba1 ile yapılan boyamada hidrosefaliye bağlı periventriküler bölgede yaygın mikrogliyal hücreler tespit edildi. Fakat normal mikrogliyal hücrelerden farklı olarak sitoplazmaları daha düzensiz ve sitoplazmik çıkıntıları daha fazla idi. Bu bulgular aktifleşmiş mikroglialar için tipiktir. Mikrogliyal hücre değerlendirilmesi x40 büyütmede 4 farklı alanda mikrogliyal hücre sayısının ortalaması alınarak hesaplandı. Gruplar karşılaştırıldığında hidrosefali ve tedavi gruplarında sham grubuna göre mikrogliyal hücre sayısının anlamlı derecede arttığı (sırasıyla $p=0,003$, $p=0,011$), buna karşın tedavi grubunda ise hidrosefali grubuna kıyasla belirgin bir fark olmadığı izlendi ($p=0,61$) (Resim 6 ve 7).

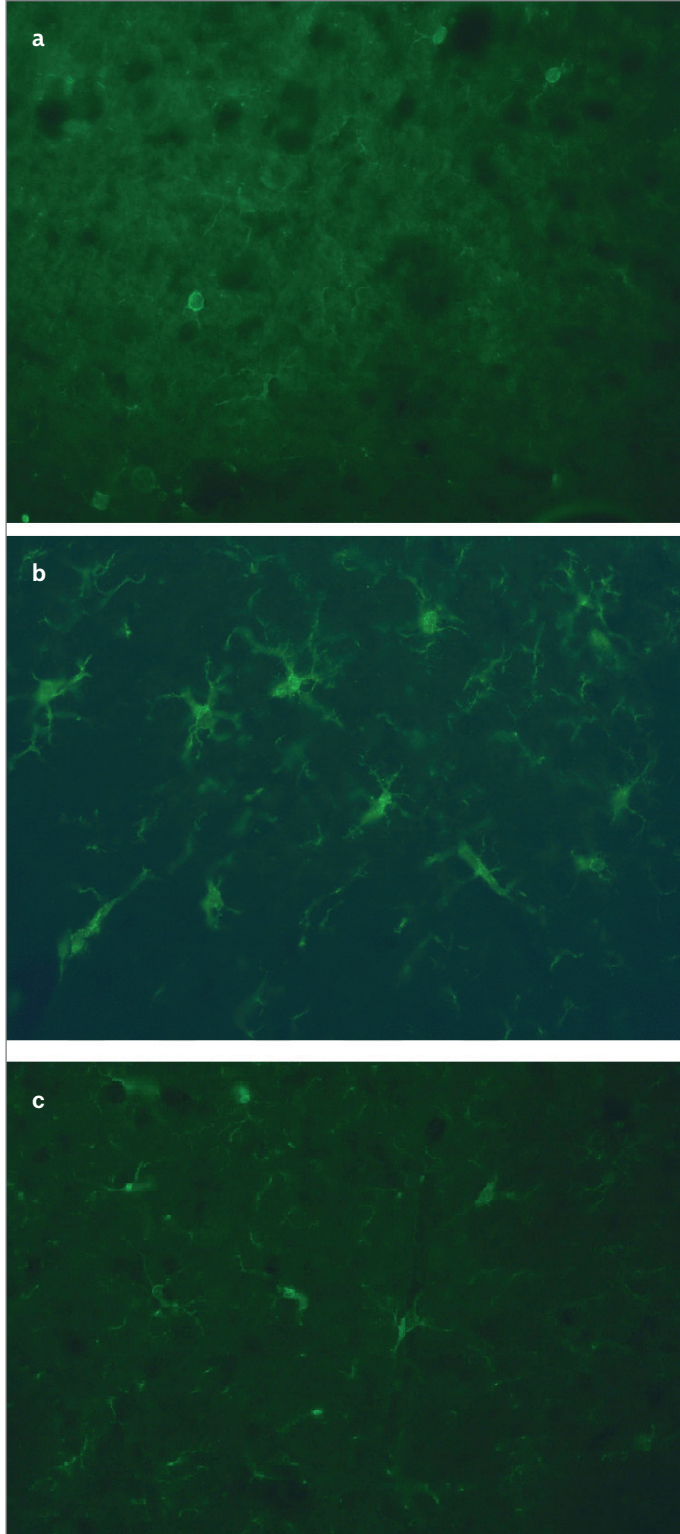
SONUÇ

Hidrosefali BOS akım yollarının tıkanması veya emiliminin azalması sonucu, BOS bulunan alanların genişlemesi ile karakterize ciddi bir nörolojik durumdur. Hidrosefali sonucu genişleyen ventriküller, etraf dokuları sıkıştırarak beynin hem morfolojik özelliklerinde, hem de kanlanmasında, biyokimyasında ve metabolizmasında değişiklikler oluşturur (10-13). Hidrosefaliye bağlı oluşan ventrikulomegali ve artmış kafa içi basıncı kortikal, subkortikal ve periventriküler alanlarda hasarlanmalara neden olur (14). Yapılan son çalışmalar hidrosefali sonucu kolinerjik,



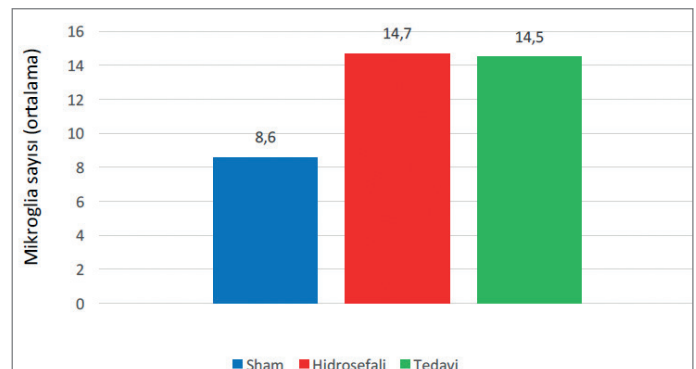
Resim 5. a-f. Periventriküler zonun anti-MBP (anti-myelin basic protein) antikoru ile işaretlenmesi. a,b: Sham c,d: Hidrosefali grubu e,f: Tedavi grubu (a, c, e x100) (b, d, f x200)

dopaminerjik ve noradrenerjik sistemde progresif fonksiyonel hasarlanmanın olduğunu göstermiştir (15-17). Bu hasarlanmalar sonucu hidrosefalisi olan hastalarda fonksiyonel ve kognitif bozukluklar oluşmaktadır. Kog-



Resim 6. a-c. Periventriküler zonda mikrogial hücrelerin anti-Iba1 (anti-ionized calcium-binding adapter molecule) antikoruna ile işaretlenmesi: a) sham grubu, b) hidrosefali grubu, c) tedavi grubu (İmmüno Floresan boyama, x40)

nitif bozukluğun klinik bulguları psiko-motor yavaşlama, dikkat ve konsantrasyon eksikliği, kişilik değişikliği, kısa dönem hafıza bozukluğu, lakaytlık olarak sıralanabilir (1, 18). Hidrosefalinin patofizyolojisinde beyaz cevher etkilenmesi, özellikle de myelin kaybı, nöroenflamasyon ve reaktif gliozisin önemli olduğu düşünülmektedir. Reaktif gliozis ve nöroenflamasyon oluşmasında merkezi sinir sisteminin enflamatuar hücreleri olan mikrogial hücreler önemli bir role sahiptir. Mikrogial hücrelerin ürettiği sitotoksik maddeler (interlökinler, tümör nekroz faktör- α , reaktif nitrojen ürünleri vs.) nöroenflamasyona bağlı doku hasarını arttırmaktadır (19, 20). Bu nedenle çalışmamızda myelin kaybı ve nöroenflamasyonu önleyici etkisi daha önceden gösterilmiş bir madde olan guanozinin hidrosefalideki etkilerini inceledik (21-23). Guanozinin remyelinizasyonu artırması; endojen oligodendrogliosit progenitor hücrelerin proliferasyonunu artırarak bu hücrelerin myelin oluşturan matür oligodendrogliositlere dönüşmesini hızlandırmasına bağlıdır (7). Rathbone ve ark.'ın yaptığı çalışmada guanozinin çok sayıda nörotrofik etkiye sahip olduğu ve kapiller endotel hücreleri, fibroblastlar ve glial hücrelerin proliferasyonunu hızlandırdığı tespit edilmiştir (24-27). Guanozinin deneysel inme ve spinal kord hasarında intrensek kök hücre ve progenitor hücrelerin proliferasyonunu ve diferansiasyonunu hızlandırdığı gösterilmiştir (21, 28). Di Iorio ve ark.'ın (29, 30) yaptığı çalışmada guanozinin farklı mekanizmalarla nöronal hücre apoptozunu önlediğini göstermişlerdir. Biz de ilk defa hidrosefalide guanozinin myelin kaybı ve nöroenflamasyon üzerine etkilerini inceledik. İntrasisternal kaolin enjeksiyonu sıçanlarda hidrosefali modeli oluşturulmasında efektif metot olduğu için uzun zamandır kullanılmaktadır. Fakat sonuçlar değişken ve bazen öngörülemez olmaktadır. Bu çalışmada intrasisternal kaolin enjeksiyonu yapılan deneklerin %90'ında hidrosefali oluşturuldu. Tüm deneklere aynı miktarda kaolin (30 μ L) enjeksiyonu yapılmasına rağmen farklı derecede ventriküler dilatasyon saptandı. Hidrosefali modeli geliştikçe, kısmen telafi edici alternatif beyin omurilik sıvısı yollarının açılması nedeniyle ventriküler genişleme-



Resim 7. Periventriküler zondaki ortalama mikrogial hücre sayım sonuçları

nin stabilizasyonu ve intrakraniyal basıncın normalleşmesi meydana gelebilmektedir, bu durum da denekler arası ventriküler dilatasyon farkını açıklayabilir (8). Çalışmaya sadece hidrosefali bulguları gözlenen denekler dahil edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan sisternal kaolin enjeksiyonu modeli kimyasal menenjitte neden olarak BOS'un subaraknoid mesafeden emilimini bozmaktadır. Bunun sonucunda deneklerde obstrüktif hidrosefali oluşur (31). Hidrosefali oluşturulan deneklerin hepsinde zaman içinde kilo kaybı, gözden ve burundan sekresyon, dengesizlik, motor aktivitede azalma gibi bulgular gelişti. Bu semptomların periventriküler bölgedeki aksonların hasarlanması sonucu olduğu düşünülmektedir (32, 33). Fakat hidrosefali oluşturulduktan sonra deneklerde oluşan fonksiyon kayıpları ve davranış değişiklikleri uygun koşullar sağlamadığı için monitorize edilemedi. Bu da çalışmamızın kısıtlamalarından biridir. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda uygun koşullar sağlanarak fonksiyonel kayıp ve davranış değişikliklerinin monitorize edilmesini öneririz. İntrasisternal kaolin verildikten 14 gün sonra deneklere çekilen beyin MRG'de Evans indeksi ve ventrikül alan ölçümü yapılarak hidrosefalinin olduğu teyit edildi. Ayrıca sakrifikasyon sonrası yapılan histopatolojik değerlendirilmelerde de hidrosefali bulguları (genişlemiş ventriküller, korpus kallozumda incelleme vs.) görüldü. İntrakardiyak perfüzyonla beyinler fikse edilip çıkarıldıktan sonra histopatolojik, immünohistokimyasal ve immünofloresan boyamalar yapıldı. Yapılan bu boyamalar sonucunda sham grubu ile hidrosefali oluşturulan gruplar (hidrosefali grubu ve tedavi grubu) arasında histopatolojik olarak anlamlı istatistiksel fark saptandı. Fakat hidrosefali grubu ile tedavi grubu arasında bulgulara anlamlı fark saptanmadı. Sonuç olarak guanozinin hidrosefalide miyelin kaybı ve nöroenflamasyon üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı izlendi. Jiang ve ark.'ın yaptıkları çalışmada spinal kord hasarı oluşturulan ratlarda erken ve geç dönemde guanozinin etkileri incelenmiştir. Guanozinin spinal kord hasarı oluşturulan ratlarda hem erken dönemde hem de geç dönemde fonksiyonel iyileşmeyi hızlandırdığı tespit edilmiş, ayrıca yapılan histopatolojik çalışmalarda remiyelinasyonda artış gösterilmiştir (7, 21, 34). Ayrıca guanozinin nöronal apoptozu önlediği, nöroenflamasyonu ve mikrogial proliferasyonu azalttığı tespit edilmiştir (6). Xu ve ark.'ın (35) yaptıkları çalışmada kaolinle oluşturulan deneysel hidrosefali modelinde minosiklinin etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada hidrosefali oluşturulan ratlara 15. günden itibaren 7 gün boyunca intraperitoneal minosiklin uygulanmış. Minosiklinin hidrosefaliyi önlemediği fakat hidrosefaliye bağlı semptom ve bulguları azalttığı gösterilmiştir. Histopatolojik olarak da hidrosefali grubuna nazaran tedavi grubunda nöroenflamasyonda ve mikrogial hücrelerde azalma olduğu tespit edilmiştir (35). Literatürde bu konuda yapılmış az sayıda çalışma mevcuttur. Çalışmamız-

da daha önce remiyelinizasyonu azalttığı gösterilen guanozinin hidrosefali modelinde miyelin kaybı ve mikrogial aktivasyon üzerine etkileri incelenmiş; ancak bu konuda belirgin bir etkisi bulunamamıştır. Bununla birlikte etkinin ortaya çıkması için guanozinin hidrosefali gelişimi sırasında uygulanmaya başlanması, daha uzun süreli tedavi uygulanmasını gerektirebilir. Bu konuda guanozin veya başka protektif ajanlarla yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of Hacettepe University Animal Experimentations Ethics Board (2015/91-02).

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Acknowledgements: We would like to thank individuals who contributed to the preparation of the manuscript: Selim Zırh, Department of Histology & Embryology, Hacettepe University, Ankara, Turkey, MD.

Author Contributions: Concept - R.Y., B.B.; Design - R.Y., E. B.Z., F.K., B.B.; Supervision - F.K., B.B.; Resources - R.Y.; Materials - R.Y., E.B.Z., F.K.; Data Collection and/or Processing - R.Y., E.B.Z.; Analysis and/or Interpretation - R.Y., E.B.Z., F.K., B.B.; Literature Search - R.Y.; Writing Manuscript - E.B.Z.; Critical Review - F.K., B.B.

Conflict of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan alınmıştır (2015/91-02).

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Teşekkür: Yayının hazırlanmasında verdiği desteklerden dolayı Dr. Selim Zırh'a (Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye) teşekkür ederiz.

Yazar Katkıları: Fikir -R.Y., B.B.; Tasarım - R.Y., E.B.Z., F.K., B.B.; Denetleme - F.K., B.B.; Kaynaklar - R.Y.; Malzemeler - R.Y., E.B.Z., F.K.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - R.Y., E. B.Z.; Analiz ve/veya Yorum - R.Y., E.B.Z., F.K., B.B.; Literatür Taraması - R.Y.; Yazıyı Yazan - E.B.Z.; Eleştirel İnceleme - F.K., B.B.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

KAYNAKLAR

- Del Bigio MR, Wilson MJ, Enno T. Chronic hydrocephalus in rats and humans: white matter loss and behavior changes. *Ann Neurol* 2003; 53: 337-46. [\[Crossref\]](#)
- Khan OH, Enno TL, Del Bigio MR. Brain damage in neonatal rats following kaolin induction of hydrocephalus. *Exp Neurol* 2006; 200: 311-20. [\[Crossref\]](#)
- Xu H, Zhang SL, Tan GW, Zhu HW, Huang CQ, Zhang FF, et al. Reactive gliosis and neuroinflammation in rats with communicating hydrocephalus. *Neuroscience* 2012; 218:3 17-25. [\[Crossref\]](#)
- McAllister II JP, Miller JM. Minocycline inhibits glial proliferation in the H-Tx rat model of congenital hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res* 2010; 7: 7. [\[Crossref\]](#)
- Yoshida Y, Koya G, Tamayama K, Kumanishi T, Abe S. Development of GFAP-positive cells and reactive changes associated with cystic lesions in HTX rat brain. *Neurol Med Chir* 1990; 30: 445-50. [\[Crossref\]](#)
- Jiang S, Bendjelloul F, Ballerini P, D'Alimonte I, Nargi E, Jiang C, et al. Guanosine reduces apoptosis and inflammation associated with restoration of function in rats with acute spinal cord injury. *Purinergic Signal* 2007; 3: 411-21. [\[Crossref\]](#)
- Jiang S, Khan MI, Lu Y, Wang J, Buttigieg J, Werstiuk ES, et al. Guanosine promotes myelination and functional recovery in chronic spinal injury. *Neuroreport* 2003; 14: 2463-7. [\[Crossref\]](#)
- Klinge PM, Samii A, Muhlendyck A, Visnyei K, Meyer GJ, Walter GF, et al. Cerebral hypoperfusion and delayed hippocampal response after induction of adult kaolin hydrocephalus. *Stroke* 2003; 34: 193-9. [\[Crossref\]](#)
- Greenberg MS. *Handbook of Neurosurgery*. 7th ed. New York: Thieme Publishers; 2010.
- da Silva 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: 544-53. [\[Crossref\]](#)
- da Silva MC, Michowicz S, Drake JM, Chumas PD, Tuor UI. Reduced local cerebral blood flow in periventricular white matter in experimental neonatal hydrocephalus-restoration with CSF shunting. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; 15: 1057-65. [\[Crossref\]](#)
- Hwang YS, Shim I, Chang JW. Anxiety responses and neurochemical changes in a kaolin-induced rat model of hydrocephalus. *J Neurosurg Pediatr* 2011; 7: 401-7. [\[Crossref\]](#)
- McAllister II JP, Chovan P. Neonatal hydrocephalus. Mechanisms and consequences. *Neurosurg Clin N Am* 1998; 9: 73-93. [\[Crossref\]](#)
- Cinalli G, Maixner WJ, Sainte-Rose C, editors. *Pediatric hydrocephalus*. Springer-Verlag Italia: Springer Science & Business Media; 2012.
- Del Bigio MR, Vriend JP. Monoamine neurotransmitters and amino acids in the cerebrum and striatum of immature rats with kaolin-induced hydrocephalus. *Brain Res* 1998; 798: 119-26. [\[Crossref\]](#)
- Tashiro Y, Drake JM. Reversibility of functionally injured neurotransmitter systems with shunt placement in hydrocephalic rats: implications for intellectual impairment in hydrocephalus. *J. Neurosurg* 1998; 88: 709-17. [\[Crossref\]](#)
- Tashiro Y, Drake JM, Chakraborty S, Hattori T. Functional injury of cholinergic, GABAergic and dopaminergic systems in the basal ganglia of adult rat with kaolin-induced hydrocephalus. *Brain Res* 1997; 770: 45-52. [\[Crossref\]](#)
- Del Bigio MR. Neuropathological changes caused by hydrocephalus. *Acta Neuropathol* 1993; 85: 573-85. [\[Crossref\]](#)
- Mangano FT, McAllister II JP, Jones HC, Johnson MJ, Kriebel RM. The microglial response to progressive hydrocephalus in a model of inherited aqueductal stenosis. *Neurol Res* 1998; 20: 697-704. [\[Crossref\]](#)
- Miller JM, McAllister II JP. Reduction of astrogliosis and microgliosis by cerebrospinal fluid shunting in experimental hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res* 2007; 4: 5. [\[Crossref\]](#)
- Jiang S, Ballerini P, Buccella S, Giuliani P, Jiang C, Huang X, et al. Remyelination after chronic spinal cord injury is associated with proliferation of endogenous adult progenitor cells after systemic administration of guanosine. *Purinergic Signal* 2008; 4: 61-71. [\[Crossref\]](#)
- Rathbone M, Pilutti L, Caciagli F, Jiang S. Neurotrophic effects of extracellular guanosine. *Nucleos Nucleot Nucl* 2008; 27: 666-72. [\[Crossref\]](#)
- Schmidt AP, Lara DR, Souza DO. Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system. *Pharmacol Therapeut* 2007; 116: 401-16. [\[Crossref\]](#)
- Christjanson LJ, Middlemiss PJ, Rathbone MP. Stimulation of astrocyte proliferation by purine and pyrimidine nucleotides and nucleosides. *Glia* 1993; 7: 176-82. [\[Crossref\]](#)
- Kim JK, Rathbone MP, Middlemiss PJ, Hughes DW, Smith RW. Purinergic stimulation of astroblast proliferation: guanosine and its nucleotides stimulate cell division in chick astroblasts. *J Neurosci Res* 1991; 28: 442-55. [\[Crossref\]](#)
- Rathbone MP, Christjanson L, Deforge S, Deluca B, Gysbers JW, Hindley S, et al. Extracellular purine nucleosides stimulate cell division and morphogenesis: pathological and physiological implications. *Med Hypotheses* 1992; 37: 232-40. [\[Crossref\]](#)
- Rathbone MP, Middlemiss PJ, Gysbers JW, DeForge S, Costello P, Del Maestro RF. Purine nucleosides and nucleotides stimulate proliferation of a wide range of cell types. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 1992; 28a: 529-36. [\[Crossref\]](#)
- Connell BJ, Di Iorio P, Sayeed I, Ballerini P, Saleh MC, Giuliani P, et al. Guanosine protects against reperfusion injury in rat brains after ischemic stroke. *J Neurosci Res* 2013; 91: 262-72. [\[Crossref\]](#)
- Di Iorio P, Ballerini P, Traversa U, Nicoletti F, D'Alimonte I, Kleywegt S, et al. The antiapoptotic effect of guanosine is mediated by the activation of the PI 3-kinase/AKT/PKB pathway in cultured rat astrocytes. *Glia* 2004; 46: 356-68. [\[Crossref\]](#)
- Di Iorio P, Kleywegt S, Ciccarelli R, Traversa U, Andrew CM, Crocker CE, et al. Mechanisms of apoptosis induced by purine nucleosides in astrocytes. *Glia* 2002; 38: 179-90. [\[Crossref\]](#)
- Rekate HL. A contemporary definition and classification of hydrocephalus. *Semin Pediatr Neurol* 2009; 16: 9-15. [\[Crossref\]](#)

32. Del Bigio MR. Future directions for therapy of childhood hydrocephalus: a view from the laboratory. *Pediatr Neurosurg* 2001; 34: 172-81. [\[Crossref\]](#)
 33. Olopade FE, Shokunbi MT, Siren AL. The relationship between ventricular dilatation, neuropathological and neurobehavioural changes in hydrocephalic rats. *Fluids Barriers Cns* 2012; 9: 19. [\[Crossref\]](#)
 34. Jiang S, Fischione G, Giuliani P, Romano S, Caciagli F, Di Iorio P. Metabolism and distribution of guanosine given intraperitoneally: implications for spinal cord injury. *Nucleos Nucleot Nucl* 2008; 27: 673-80. [\[Crossref\]](#)
 35. Xu H, Tan G, Zhang S, Zhu H, Liu F, Huang C, et al. Minocycline reduces reactive gliosis in the rat model of hydrocephalus. *BMC Neurosci* 2012; 13: 148. [\[Crossref\]](#)
-