

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**“SIÇAN EPENDİM HÜCRELERİNDE AQUAPORİN 4 KANALLARININ
İMMUNOHİSTOKİMYASAL DAĞILIMI VE GLİMFATİK SİSTEM ÜZERİNE
OLAN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ”**

Fatih TAŞ

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman
Prof. Dr. Ender ERDOĞAN**

Konya-2017

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇAN EPENDİM HÜCRELERİNDE AQUAPORİN 4 KANALLARININ
İMMUNHİSTOKİMYASAL DAĞILIMI VE GLİMFATİK SİSTEM ÜZERİNE
OLAN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Fatih TAŞ

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman
Prof. Dr. Ender ERDOĞAN**

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından
16202003 proje numarası ile desteklenmiştir.

Konya-2017

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Fatih TAŞ tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak oy birliği / oy çokluğu kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan
Prof. Dr. Hasan CÜCE



Danışman
Prof. Dr. Ender ERDOĞAN



Üye
Prof. Dr. Serpil KALKAN



Üye
Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV



Üye
Yrd. Doç. Dr. Ceyhan UĞURLUOĞLU



ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu .../.../... vesayılı kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Ender ERDOĞAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ender ERDOĞAN gözetiminde hazırlanmış olup, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne doktora bitirme tezi olarak sunulmuştur.

Doktora eğitimim ve tez çalışmam sırasında bilgi ve görüşleriyle yanımda olan, yönlendiren ve bu tez çalışmasının ortaya çıkmasına çok emek harcayan sayın hocam Prof. Dr. Ender ERDOĞAN'a,

Ayrıca eğitimime ve çalışmama ilgi ve katkıları ile destek olan, eğitim sürem boyunca mesai içinde ve dışında çok güzel anılar paylaştığım Histoloji ve Embriyoloji Bölümü'ndeki arkadaşlarıma,

Tezin istatistik analizinde yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Fatih KARA'ya,

Çocukluğumdan beri maddi manevi desteklerini hep arkamda hissettiğim sevgili anne, baba ve kardeşlerime,

Son olarak her alanda olduğu gibi, çalışma ve tez yazım sürecinde desteğini esirgemeyen sevgili eşim Nurefşan TAŞ'a ve moral kaynağım kızım Zeynep Erva'ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	iv
ÖZET	vii
SUMMARY	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Sinir Sistemi.....	2
1.1.1. Nöronlar	2
1.1.2. Nöroglia Hücreleri.....	3
1.1.3. Kan Beyin Bariyeri.....	15
1.1.4. Beyin Omurilik Sıvısı.....	17
1.1.5. Beyin İnterstisyel Sıvısı	19
1.2. Aquaporin Kanalları	20
1.2.1. İnsanlarda Bulunan Aquaporinler	21
1.2.2. Aquaporinlerin Yarı Ömrü	22
1.2.3. Aquaporinlerin Beyindeki Rollerini	23
1.3. Melatonin ve Genel Özellikleri.....	27
1.3.1. Pineal Bez ve Melatonin İlişkisi.....	27
1.3.2. Melatonin Yapısı, Sentezi ve Metabolizması.....	30
1.3.3. Melatonin Reseptörleri ve Etki Mekanizması	31
1.3.4. Melatoninin Fizyolojik ve Genel Etkileri.....	32
1.3.5. Melatoninin Antioksidan Etkileri.....	35
1.3.6. Melatonin ve Uyku İlişkisi	36
1.3.7. Melatoninin SSS ile Nörodejeneratif Olaylara Etkileri.....	37
1.4. Glimfatik Sistem	38

1.4.1. Glimfatik Sistemin Tanımı ve Etki Mekanizmaları	39
1.4.2. Uyku-uyanıklık Döngüsü ve Beyin Klirensine Olan Etkisi	42
2. GEREÇ ve YÖNTEM	45
2.1. Deney Gruplarının Belirlenmesi	45
2.2. Deneysel Uygulamalar	45
2.2.1. Fotoperiyod Uygulaması	45
2.2.2. Melatonin Uygulaması	45
2.2.3. Cerrahi İşlemlerin Yapılması	45
2.3. Değerlendirme Yöntemleri	46
2.3.1. Rutin Hematoksilen&Eosin (H&E) ile Boyama Yöntemi	47
2.3.2. Frozen Kesitte İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi	47
2.3.3. Histomorfolojik analiz.....	48
2.3.4. İstatistiksel Analiz	48
3. BULGULAR	49
3.1. Genel Değerlendirme Bulguları	50
3.2. Genel Histomorfolojik Değerlendirme Bulguları	50
3.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme Bulguları.....	51
3.3.1. Vimentin ile İmmünohistokimyasal Boyanma.....	51
3.3.2. Aquaporin 4 ile İmmünohistokimyasal Boyanma.....	52
3.3.3. ML1 reseptör ile İmmünohistokimyasal Boyanma.....	53
4. TARTIŞMA.....	55
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	67
6. KAYNAKLAR.....	68
7. EKLER	77
8. ÖZGEÇMİŞ	78

SİMGELER VE KISALTMALAR

AFMK	Asetil Formil Metoksi Knüramin
AH	Alzheimer Hastalığı
Ark	Arkadaşları
AQP	Aquaporin
AQP4	Aquaporin-4
A β	β amiloid
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
CD	Cluster of Differentiation
CMV	Sitomegalovirus
CTGF	Bağ Doku Büyüme Faktörü
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EC	Enterokromafin Hücre
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FSH	Folikül Stimulan Hormon
GFAP	Glial Fibriler Asidik Protein
GI	Gastrointestinal
GLUT	Glikoz Taşıyıcısı
GnRH	Gonadotropin Releasing (Salgılayıcı) Hormon
HCO ₃	Bikarbonat
H&E	Hematoksilen - Eozin Boyama
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü
HIOMT	Hidroksiindol-o-metiltransferaz
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit

HOCl	Hipokloröz asit
HSV	Herpes Simpleks Virüs
IGFBP	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein
IL	İnterlökin
KF	Kısa Fotoperiyod
L-dopa	Levodopa
LH	Luteinizan hormon
MCT1	Monokarboksilat Taşıyıcı
MIWC	Civa-Duyarsız Su Kanalı
ML1	Melatonin-1 reseptörü
ML2	Melatonin-2 reseptörü
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
NAT	N-asetiltransferaz
NKH	Nöral Kök Hücresi
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
NSPC	Nöral Kök ve Progenitör Hücreler
ONOO-	Peroksinitrit
PSS	Periferik Sinir Sistemi
PVN	Paraventricüler Nükleus
RG	Radiyal Gliya Hücresi
SCN	Suprakiazmatik Nükleus
SS	Sinir Sistemi
SSS	Santral Sinir Sistemi
SVZ	Subventriküler Zon

TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
TRH	Tiroid Releasing (Salgılayıcı) Hormon
Ub	Ubikuitin
UF	Uzun Fotoperiyod
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VZ	Ventriküler Zon



ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Sıçan Ependim Hücrelerinde Aquaporin 4 Kanallarının İmmunohistokimyasal Dağılımı ve Glimfatik Sistem Üzerine Olan Etkilerinin İncelenmesi

Fatih TAŞ

Histoloji ve Embriyoloji (Tıp) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA 2017

Beyinde lenfatik dolaşım olmadığı için, beyin parankiminde biriken ekstrasellüler proteinleri temizleyen alternatif bir mekanizmaya ihtiyaç vardır. Beyin omurilik sıvısı (BOS), beyin parankimine geçerek beyin interstisyel sıvısı ile karışır. BOS, interstisyel sıvıdan ekstrasellüler proteinleri alarak, beyin ihtiyaç fazlası olan maddelerden temizlenmesine aracılık eder. Ekstrasellüler proteinler, astrositik aquaporin 4 (AQP4) kanallarının kolaylaştırdığı bir yolla paravenöz aralığa geçiş yapar. Buraya geçen ekstrasellüler proteinler; kan dolaşımı, subaraknoid aralık veya ven duvarlarını takip ederek ortamdaki uzaklaştırılır. Bu sisteme glimfatik sistem adı verilir. Çalışmamızda ependimal AQP4 kanallarının immunohistokimyasal dağılımının farklı fotoperiyodlar ile melatonin alımında nasıl değiştiğini ve bu durumun glimfatik sistem üzerindeki etkilerini göstermeyi amaçladık.

Wistar Albino cinsi dişi ratlardan üç grup oluşturuldu (n=7). Gruplardan birincisi kısa fotoperiyoda (4 hf, 8 saat aydınlık, 16 saat karanlık), ikincisi uzun fotoperiyoda (4 hf, 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık), üçüncüsü ise uzun fotoperiyod + melatonine (4 mg/kg/gün) maruz bırakıldı. Daha sonra beyin dokularından alınan kesitler vimentin, AQP4 ve ML1 reseptör antikoru kullanılarak, immunohistokimyasal yöntemlerle boyandı.

AQP4 ve ML1 reseptör antikoru, kısa fotoperiyod ile uzun fotoperiyod + melatonine maruz bırakılan rat gruplarındaki ependim hücrelerinde anlamlı düzeyde yoğun bir immunreaksiyon gösterdiği gözlenirken ($p<0.05$), uzun fotoperiyoda maruz bırakılan rat grubunda aynı boyanma paterninin diğer iki gruba göre daha zayıf olduğu görülmüştür. Her üç grubun vimentin antikoru ile boyanması neticesinde, boyanma yoğunluğu açısından gruplar arasında herhangi bir anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Beyin interstisyel sıvısında biriken metabolik ürünlerin ortamdaki uzaklaştırılması glimfatik sistem aracılığıyla ve astrositik AQP4 kanallarının kolaylaştırdığı bir yolla gerçekleşmektedir. Ependim hücreleri de sahip olduğu AQP4 kanalları aracılığı ile astrositik AQP4 kanallarının bu işlevine yardımcı olabilir. Kısa fotoperiyod ile uzun fotoperiyod + melatonine maruz kalan ratların ependim hücrelerinde AQP4 kanallarının daha yoğun boyanması, karanlıkta salınan melatonin hormonunun, AQP4 kanal ekspresyonu üzerindeki düzenleyici etkisinden kaynaklanabilir. Dolayısıyla hem melatonin hormonu, hem de AQP4 kanalları, beyin homeostazı üzerindeki olumlu etkileri sayesinde, nörodejeneratif bozuklukların önlenmesinde etkin bir rol oynayabilir. Bu etkilerin daha iyi anlaşılabilmesi için gelecekte daha kapsamlı ve multidisipliner çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler: Aquaporin 4, Melatonin, Glimfatik Sistem

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

The Evaluation of Immunohistochemical Expression of Aquaporin 4 Channels of Ependymal Cells and It's Effects on Glymphatic System in the Rats

Fatih TAŞ

Department of Histology and Embriology

DOCTORAL THESIS / KONYA 2017

Since there is no lymphatic circulation in brain, an alternative mechanism of clearing brain parenchyma from the excess substances is needed. Cerebrospinal fluid (CSF) passes into brain parenchyma and mixes with brain interstitial fluid. CSF takes extracellular proteins from interstitial fluid and mediates the clearing of brain. These extracellular proteins, pass to the paravenous space which is facilitated by astrocytic aquaporin 4 (AQP4) channels. In there, they are removed from the media by blood circulation, subarachnoid space, or through the draining veins. This system is called glymphatic system. In this study, it was aimed to show how things have changed with different photoperiod and melatonin intake in the ependymal immunohistochemical distribution of AQP4 channels and the impact of this situation on glymphatic system.

Three groups of Wistar Albino female rats were formed (n=7). First group was exposed in short photoperiod (8/16 hours light/dark), second group was exposed in long photoperiod (16/8 hours light/dark) and third group was exposed in long photoperiod + melatonin (4 mg/kg/day) for 4 weeks. Then, brain tissue samples were stained with vimentin, AQP4 and ML1 receptor antibodies immunohistochemically.

AQP4 and ML1 receptor antibodies showed a significantly intense immunoreaction in ependymal cells of the short photoperiod and long photoperiod + melatonin groups ($p<0.05$), whereas the same staining pattern appears to be weaker in the long photoperiod group. Result in staining with vimentin antibody of the three groups, no significant differences were observed between the groups in terms of staining intensity ($p>0.05$).

Removal of metabolic products that accumulate in brain interstitial fluid is mediated through glymphatic system and facilitated by astrocytic AQP4 channels. Ependymal cells may also help in this function of astrocytic AQP4 channels via their AQP4 channels. More intensive staining of AQP4 channels in ependymal cells of rats exposed to short photoperiod and long photoperiod + melatonin groups, may be due to the regulatory effect of the melatonin hormone secreted in the darkness, on AQP4 channel expression. Thus, both the hormone melatonin, and AQP4 channels, due to the positive effects on the brain homeostasis, may play an active role in the prevention of neurodegenerative disorders. For a better understanding of these effects in the future, more comprehensive and multidisciplinary studies are needed.

Keywords: Aquaporin 4, Melatonin, Glymphatic System

1. GİRİŞ

Merkezi sinir sistemi (MSS), sinir sisteminin en büyük bölümünü teşkil eder. Beyin ve omurilikten oluşur. MSS’de bilinen herhangi bir lenfatik sistem bulunmamaktadır (Földi 1996). Halbuki nöro-fizyolojik işlevler sırasında biriken, potansiyel toksik moleküllerin, sinir dokusundan uzaklaştırılması son derece önemlidir (Verkman ve Mitra 2000). MSS’de lenfatik sistemin yerine bu işlevi gerçekleştiren alternatif bir yolun varlığı teorik olarak ve beyin görüntüleme (fonksiyonel MRI) yöntemleri ile tanımlanmış ve glimfatik sistem olarak adlandırılmıştır (Iliff ve ark 2013). Bu sistemin uyku döneminde daha aktif olarak çalıştığı ve kronik nöro-dejenaratif hastalıkların önlenmesi açısından çok önemli işlevi olduğu düşünülmektedir (Iliff ve ark 2012).

Aquaporin-4 (AQP4) beyinde en çok bulunan moleküllerden biri olup, kan beyin bariyerindeki astrosit membranlarında ve kan beyin omurilik sıvısı (BOS) bariyerinde yaygın olarak bulunur. İnterstisyel sıvıda yer alan çözünen proteinler, atık ürünler ve fazla ekstrasellüler sıvının atılımı, astrositik AQP4 kanallarının kolaylaştırdığı bir yolla gerçekleştirilir (Nagelhus ve Ottersen 2013). Beyin ventriküllerinin duvarını döşeyen ependim hücrelerinin bazolateral membranlarında AQP4 kanallarına sahip olması (Skjolding ve ark 2010), bu hücrelerin de beyindeki toksik moleküllerin atılmasında, aynı astrositler gibi görev aldığını düşündürmektedir.

Santral sinir sisteminde (SSS) görev alan ve yakın zamanda tanımlanan glimfatik sistemde, astrositik AQP4 kanallarının rolü büyüktür. Bu çalışma ise bu konuda daha önce hiç ilişkilendirilmemiş olan ependim hücrelerinin glimfatik sistem üzerindeki rolünü AQP4 kanalları üzerinden ortaya koymayı amaçlamıştır. Ayrıca uzun ve kısa fotoperiyotlara göre AQP4 kanal ekspresyonu karşılaştırılarak, konu üzerinde daha detaylı veriler elde edilebilecektir. Yine fotoperiotlarla ilişkili bir dönemsel etki söz konusu ise, bu etkide melatoninin bir rolü olup olmadığı ortaya konulmaya çalışılacaktır. Bunun için gruplar uzun fotoperiyod, kısa fotoperiyod ve uzun fotoperiyod + melatonin (4 mg/kg/gün) olmak üzere üç farklı durumda karşılaştırılarak incelenecektir.

Nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde, toksik moleküllerin zaman içinde beyin parankiminde birikmesinin rolü büyüktür. Yapılan çalışmayla günümüzün en büyük sağlık sorunlarının başında gelen nöro-dejeneratif hastalıkların önlenmesine yönelik faydalı bilgiler elde edilebilecektir.

1.1. Sinir Sistemi

Sinir sistemi, iç veya dış ortamdaki gelen uyarıları alıp analiz eden ve uygun cevaplar oluşturarak ilgili organlara ileten sistemdir. İnsanda sinir sistemi nöronlar ile sayıları nöronların 8-10 katına ulaşan gliya hücrelerinden ve kan damarlarından zengin az miktarda bağ dokusundan oluşur.

Sinir sistemi anatomik olarak santral sinir sistemi ve periferik sinir sistemi olmak üzere iki bölümde incelenir. Santral sinir sistemi, beyin ve medulla spinalisi içerir. Kranial, spinal ve periferik sinirler ile gangliyonlar periferik sinir sistemini oluşturur.

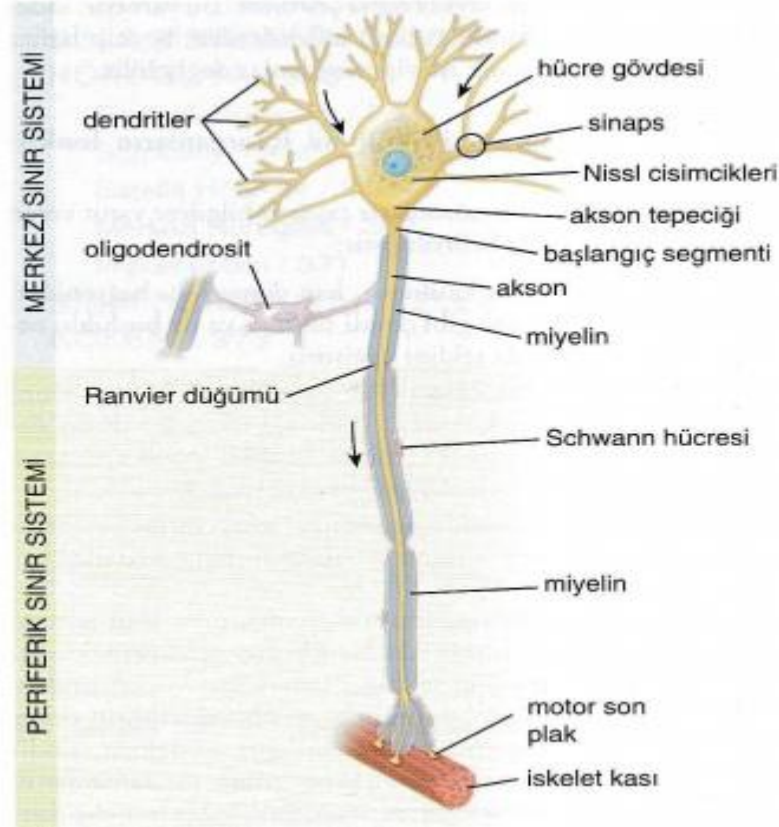
Sinir sistemi fonksiyonel olarak somatik sinir sistemi ve otonom sinir sistemi olmak üzere ikiye ayrılır. Somatik sistem uyarılara karşı istemli olarak uygun cevaplar oluşturur. Vücudun hemen hemen bütün bölümlerine motor ve duyu innervasyonu sağlar. Otonom sistem ise isteğimiz dışında çalışarak düz kas ve kalp kasının yanı sıra organların fonksiyonlarını düzenler. Otonom sinir sistemi sempatik, parasempatik ve enterik otonom sistem olmak üzere üç bölümde incelenir.

Histolojik olarak sinir sistemi nöronları ve destek hücrelerini içeren özel bir dokudur. Bu dokuyu diğer dokulardan ayıran en önemli özellik hücrelerinin uzantılı olması ve bu uzantıların aracılığıyla birbirleri ile bağlantı kurarak çok yaygın bir hücre ağı oluşturmasıdır. Sistemin fonksiyonları açısından hücreler arası etkileşimin çok önemli olduğu bilinmekle beraber, hala bu etkileşimde rol alan moleküller, faktörler ve etkenlerin çalışma şekilleri hakkında pek çok bilinmeyen vardır (Eşrefoğlu 2016).

1. 1. 1. Nöronlar

Sinir hücresi ya da nöron sinir sisteminin temel fonksiyonel birimidir. Başlıca işlevi bilgi transferini gerçekleştirmektir. Nöronlar sitoplazmik uzantıların kaynaklandığı bir hücre gövdesi (soma) içeren ileri düzeyde kutuplaşmış hücrelerdir. Uzantılar sinir fibrilleri olarak bilinir ve 1,5 m'ye kadar değişen uzunluklarda olabilirler. Uzantılardan dendritler uyarıyı hücre gövdesine doğru iletirken, hücre gövdesinden impulsları ileten tek uzantı aksondur. Soma, çekirdek ve onu çevreleyen perikaryon olarak bilinen sitoplazmadan oluşur. Medulla spinalisin ön boynuz motor nöronları merkezi sinir sisteminin en büyük nöronları olarak bilinirken, beyin korteksinin granüler hücreleri ise en küçük nöronları oluşturur (Ovalle ve Nahirney 2009).

Sinir hücresinin gövdesi, dendritleri ve aksonun proksimal kısmı MSS içinde bulunur. Akson MSS'yi terk eder ve PSS'de bir periferik sinirin parçası olarak efektörlerine ilerler. MSS'de miyelin oligodendrosit tarafından yapılır ve oligodendrositin bir parçasıdır. PSS'de ise Schwann hücresi tarafından yapılır ve Schwann hücresinin bir parçasıdır (Ross ve Pawlina 2014).

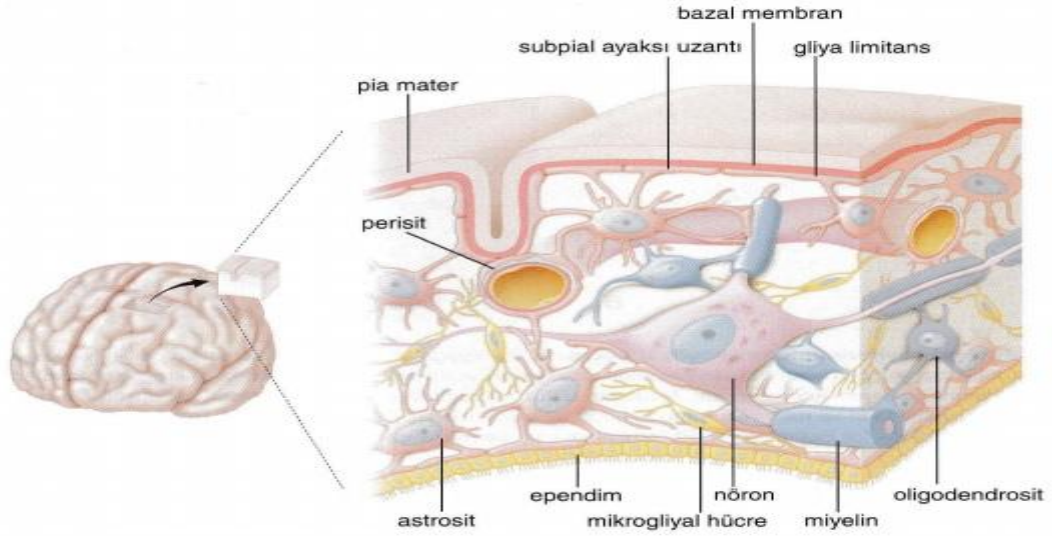


Şekil 1. 1. Bir motor nöronun yapısı (Ross ve Pawlina 2014).

1.1.2. Nöroglia Hücreleri

Santral sinir sisteminde nöronlar arasında yer alan özel dokuya nöroglia dokusu, bu dokuyu oluşturan hücelere gliya hücreleri denir. Nöronlar arasında bulunan bu uzantılı hücreler santral sinir sisteminin toplam hacminin yaklaşık yarısını oluştururlar. Rutin yöntemlerle boyanmış kesitlerde nöroglia hücrelerinin sadece nükleusları izlenebilir. Nöronlar gibi nöroglia hücrelerinin de sitoplazmik uzantıları gümüşleme yöntemleri ile incelenebilir. Gliya hücrelerinin uzantılarının detaylı olarak görülmesi ve tiplerinin tanınabilmesi için immunohistokimyasal veya elektron mikroskopik yöntemler gibi özel yöntemler gereklidir. Bu hücreler, nöronlara metabolik ve mekanik destek sağlar.

Santral sinir sisteminde astrosit, oligodendrosit, mikroglia ve endim huresi olmak üzere dört tip gliya huresi tanmlanmıştır. Astrositler uzantılarıyla hem kan damarlarına hem de MSS'nin sıvı ile dolu boşluklarına uzanarak endimal dõşemeye temas ederler. Oligodendrositler, MSS'deki sinir liflerinin miyelizasyonunu sağlarlar. Mikroglialar fagositik özellik gösterirler. Periferik sinir sisteminin nöroglia huresleri ise Schwann huresleri ve satelit huresleridir (Eşrefoğlu 2016).

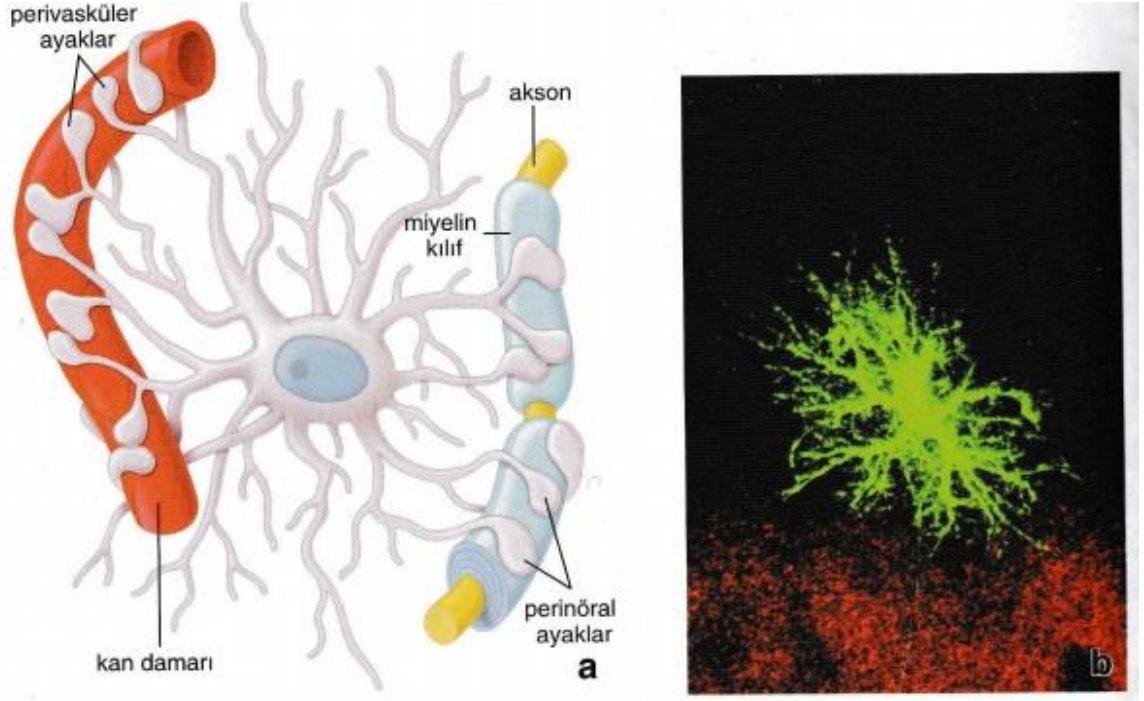


şekil 1. 2. Gliyal hureslerin dağılımı. Astrosit, oligodendrosit, mikroglia ve endim hureslerinin beyin dokusunda bulunan yapılar ile etkileşimi (Ross ve Pawlina 2014).

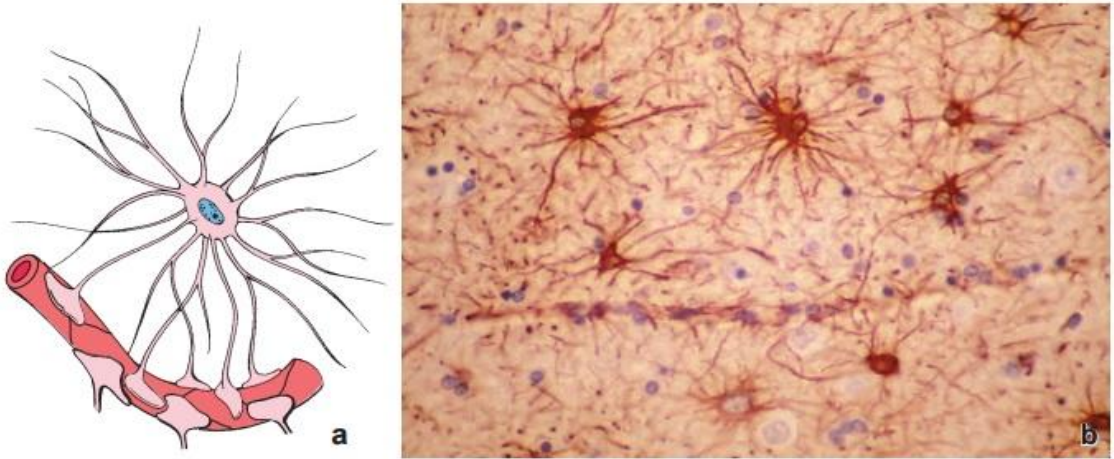
Astrositler

Gliya hure grubunun sayı, fonksiyon ve boyut olarak en fazla olan hure grubudur. Genel olarak yuvarlak çekirdekleri ve geniş, düzensiz sitoplazmaları olan, yıldız görünümlü huresler olarak tanmlanmışlardır. Astrositler çok sayıdaki uzantıları nedeniyle yıldız şeklinde izlenen hureslerdir. Sahip olduğu uzantılar aracılığıyla nöronları sararlar. Bu uzantılar aracılığıyla astrositlerin molekülleri ve iyonları kandan nöronlara taşıdıklarına inanılır. Astrositler, nöronlara yapısal destek sağlarlar, kan-beyin bariyerini oluştururlar, onarım işlemlerinde ve metabolik değişimlerde de görev alırlar.

Protoplazmik ve fibröz astrositler olmak üzere iki tip astrosit vardır. Bunlardan az sayıda, asimetric, uzun uzantılara sahip olan astrositlere fibröz astrositler denir ve bunlar genellikle ak madde içinde yer alır; çok sayıda simetric, kısa dallar veren uzantılara sahip olan protoplazmik astrositler ise gri madde içinde yer almaktadır (Yüncü 2014).



Şekil 1. 3. Beyin gri cevherindeki protoplazmik astrosit. a. Protoplazmik astrositlerin kan damarlarında ya da sinir hücresinin aksonal uzantılarında sonlanan ayaksı uzantıları. **b.** Protoplazmik astrosite ait laser tarama konfokal görüntüsü (Bushong ve ark 2003).



Şekil 1. 4. Beyin beyaz cevherindeki fibröz astrosit. a. Beyin beyaz cevherindeki bir fibröz astrositin şematik çizimi. **b.** Beyin beyaz cevherindeki astrositlerin ışınal tarzda dağılan çok miktardaki sitoplazmik uzantıları (X220) (Ross ve Pawlina 2014).

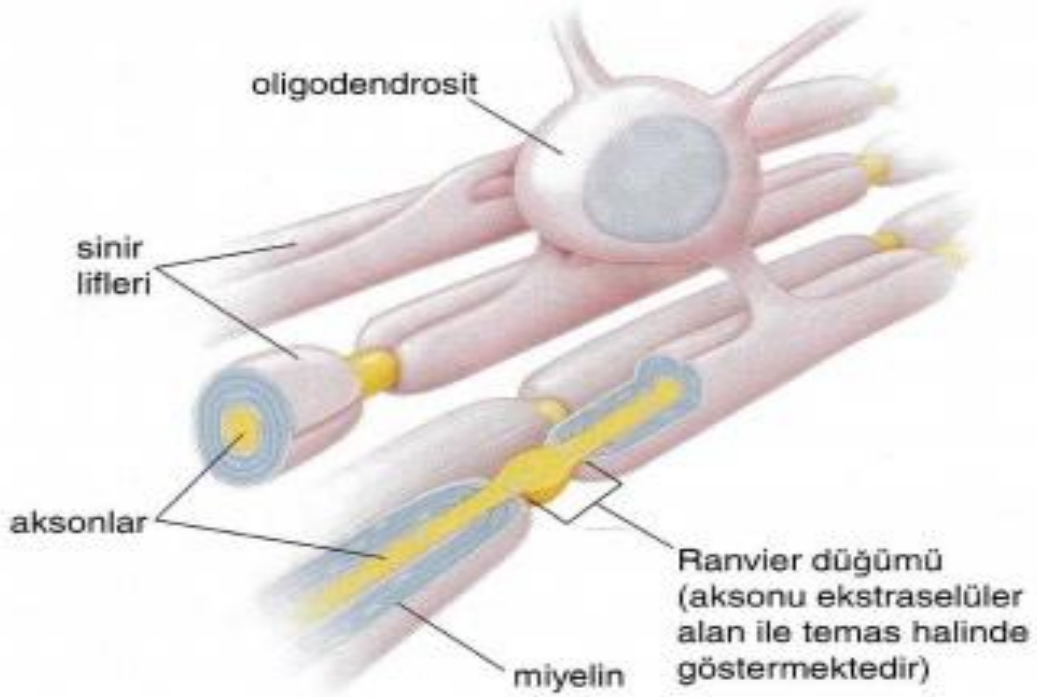
Beyin parankimi hasarlandığında astrositler; yoğun hücrel çıkıntılardan meydana gelen bir ağ oluştururlar. Hasarlı dokuda çoğalıp, skar gliya yamasını oluşturarak doku iyileşmesine yardımcı olurlar (Yüncü 2014).

Oligodendrositler

Sitoplazmik uzantıları ile nöronların aksonlarını kuşatırlar ve santral sinir sistemindeki miyelin kılıfı oluştururlar. Oligodendrositler, astrositlere göre daha küçük, az sayıda ve daha kısa uzantıları olan hücrelerdir. Bu hücreler elektriksel uyarıların iletimini arttıran miyelin kılıfı oluşturarak, aksonu çevresinden izole ederler.

Oligodendrositler merkezi sinir sisteminde, Schwann hücreleri ise periferik sinir sisteminde bulunan aksonların çevresinde miyelin kılıf oluştururlar. Schwann hücresi bir akson çevresinde miyelin oluştururken, oligodendrositler birden fazla akson etrafında kılıf oluşturacak şekilde dallar vermektedir.

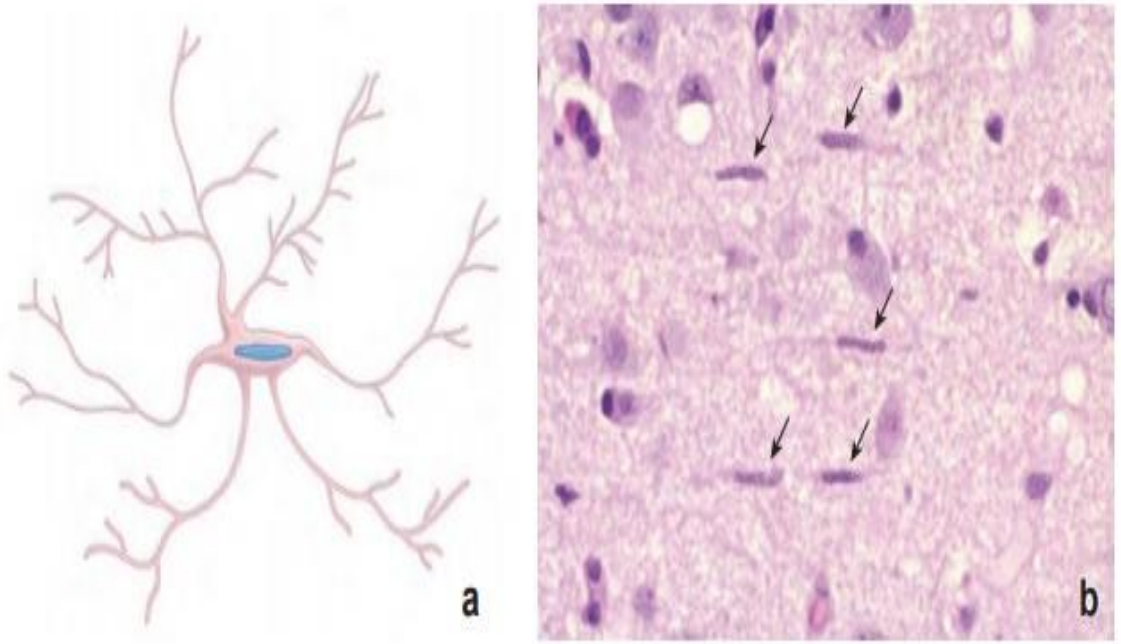
Oligodendrositlerin sitoplazmaları astrositlere göre daha yoğundur, çekirdekleri daha koyudur. Karbonik anhidraz enzimi kullanarak, MSS'de ekstrasellüler pH kontrolünü sağlar ve böylece asit-baz dengelenmesinde de kritik rol oynar (Ovalle ve Nahirney 2009).



Şekil 1. 5. Oligodendrositin üç boyutlu görünümü (Ross ve Pawlina 2014).

Mikroglialar

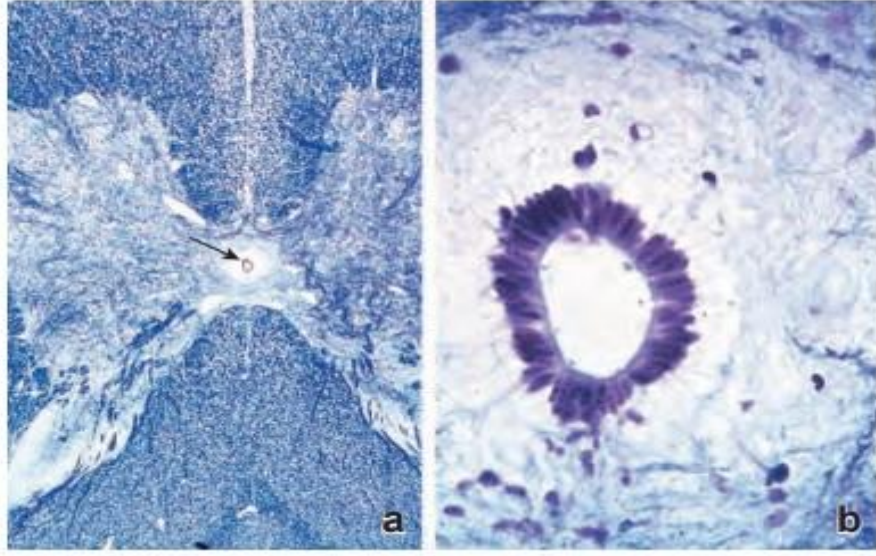
Diğer gliya hücreleri ektoderm kökenli iken bu hücreler mezoderm kökenli olup, mezogliya hücreleri adını da alırlar. Kısa uzantılara sahip, en küçük nöroglia hücreleridir. Fizyolojik ve embriyolojik olarak sinir sisteminin diğer hücreleri ile ilişkili değildir. Mikroglialar küçük, iğ biçimli olup, koyu boyanan uzun çekirdeklere sahiptir. Merkezi sinir sisteminin enflamasyonu ya da hasarı durumunda, hasarlı bölgeye giderek fagositoz yaparlar (Yüncü 2014).



Şekil 1. 6. Beyin gri cevherindeki mikroglial hücre. a. Mikroglia hücrelerinin şekil ve karakteristiği. **b.** Mikroglia hücrelerinin karakteristik uzun nükleusları (örn. diffüz mikrogliazisi olan bir birey, X420) (Ross ve Pawlina 2014).

Ependim Hücreleri

Ependim, beyin ventrikülleri ve medulla spinalis merkezi kanalını döşeyen tek katlı kübik veya prizmatik bir epiteldir. Ependimal hücrelerin lüminal yüzleri direkt olarak zayıf protein içerikli modifiye bir plazma örneği olan ve ventrikülleri dolduran, beyni darbelere karşı tamponlayan BOS ile temastadır (Ovalle ve Nahirney 2009).



Şekil 1. 7. Spinal kanalın ependimal döşemesi. a. Toluidin mavisi ile boyanmış spinal kanal merkezi bölgesi (Ok: santral kanal, X20). **b.** Santral kanalı döşeyen ependimal hücrelerin tek katlı prizmatik hücreleri (X340) (Ross ve Pawlina 2014).

Ependim Hücrelerinin Embriyonik Gelişimi

Sinir sisteminin gelişmesi nöral kök hücre farklılaşmasının temelini oluşturur, çünkü gastrülyasyondan sonra ilk gelişen doku taslaklarından birisi sinir sistemidir. Ektoderm, temelde iki farklı işlevsel yöne doğru farklılaşır; birincisi nöral yol ikincisiyse epidermis yoludur. Nöral farklılaşma sürecinde, ektodermden köken alan hücrelerin oluşturduğu nöral plakanın gelişmesi, altındaki notokorddan kaynaklanan ‘uyarıcı-düzenleyici’ sinyaller tarafından başlatılır.

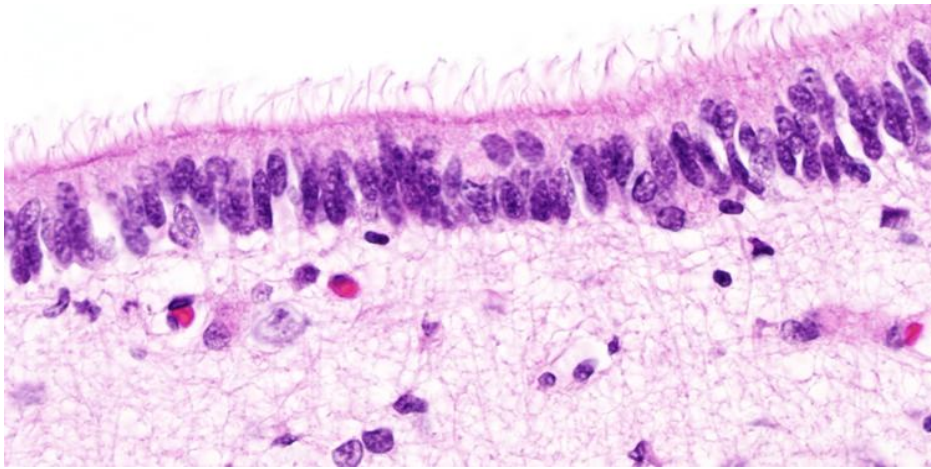
Nöral plaka oluşuktan sonra hücreler bir dizi biçimsel ve moleküler değişiklik geçirirler; bunun sonucunda önce nöral katlantılar oluşur, ardından nöral tüp şekillenir ve son olarak da nöral tüpün iki ucunun kapanması gerçekleşir.

Nöral katlantıların büyümesi tek sıralı nöroepitel hücrelerinin simetrik olarak bölünerek çoğalması sayesinde olur. Çoğalan nöroepitel hücreleri ventrikül ile pia yüzeyi arasında yalancı çok katlı prizmatik epitel biçiminde uzanırlar. Kısa süre sonra bu hücreler özgün şekilli bir başka hücre haline dönüşmeye başlar. Bu hücrelere uzantılarından dolayı radyal gliya (RG) hücresi denir. RG hücresinin bir uzantısı marjinal zon adı verilen beyin dokusuna, diğeri ise ventriküle uzanır. Hücre gövdesi ise ventriküllere komşu doku bölgesi olan ventriküler zonda (VZ) bulunur (Can 2014).

Ependimal hücreler ise bahsedilen bu RG hücrelerinden köken alan postmitotik hücrelerdir (Spassky ve ark 2005). Bu hücreler geniş apikal yüzeyleri, 9+2 mikrotübülüs yapısında uzun silyumları ve S100 β proteini barındırmalarıyla tanımlanırlar. Yapılan çalışmalar ependim hücrelerinin NKH gibi davrandığı (Johansson ve ark 1999); ancak in vitro ortamda NKH gibi nöroküre (neurosphere) oluşturma özelliğinin olmadığı belirlenmiştir (Capela ve Temple 2002).

Son çalışmalar, ependimal hücrelerin kök hücrelere diferansiyasyonunu desteklemektedir. CD133 ekspres eden ependimal hücreler, memeli ön beyindeki kök hücre popülasyonunu temsil eder (Pfenninger ve ark 2007). Kemirgenlerde spinal kordun sınırlı bazı bölgelerindeki ependimal hücreler kök hücre olarak hareket etmektedir (Del Bigio 2010). Serebral iskemi gelişen ratlarda, ependimal hücreler, radyal glia fenotipine geri dönüşür ve daha sonra nöroblastların oluşumunu sağlar (Carlen ve ark 2009). Epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptörleri, yetişkin fare ön beyinde yer alan ependimal hücrelerin diferansiyasyonu ile radyal bir morfoloji kazanmasını sağlar (Gregg ve Weiss 2003). Daha zayıf kanıtlar, sıçan üçüncü ventrikül ependimasında nörojenik bir niş olduğunu ileri sürer. Açıkçası, ependimal hücrelerin nöroenez üzerindeki işlevi henüz net olarak anlaşılamamıştır (Del Bigio 2010).

Ependimal hücrelerin ventriküler döşemesi, gebeliğin 26-28. haftalarında tamamlanır. Fetal döneme ait ependimal hücrelerin sekretuar işlevleri, erişkin döneme göre daha belirgindir (Del Bigio 2010).



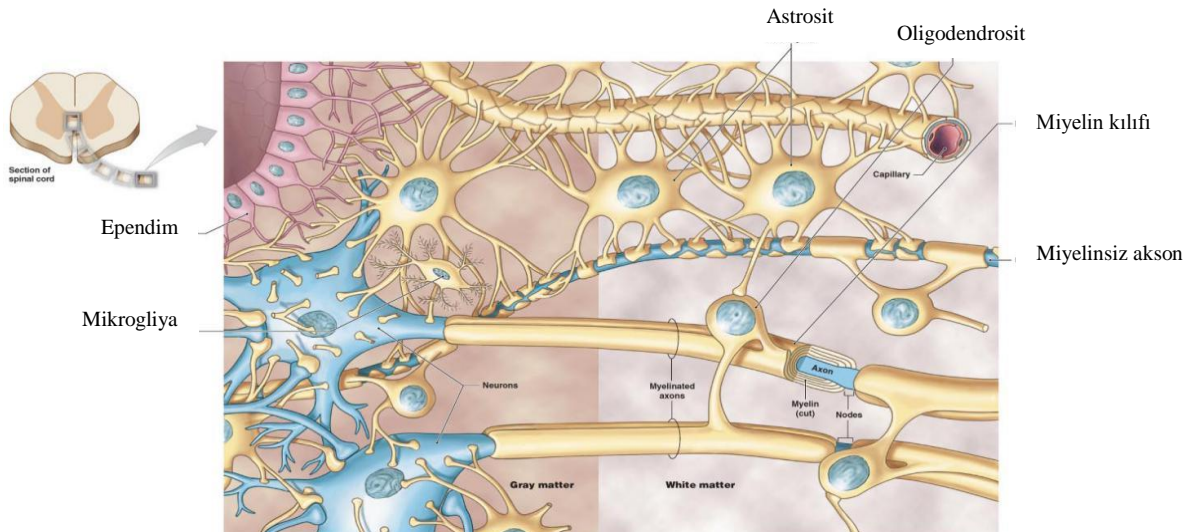
Şekil 1. 8. 32 haftalık bir fetüste üçüncü ventrikül duvarını döşeyen ependimal hücreler ve bu hücrelerden ventriküler lümenine doğru uzanan silyumlar (VandenBerg 2010).

Ependim Hücrelerinin Genel Özellikleri

Ependimal hücreler yüzey alanı artırmak için apikal mikrovilluslar taşıırken, bir çoğu ventriküler lümene uzanan hareketli silyumlar bulundurur. Silyumlar yabancı partikülleri süpürmek için düzenli bir şekilde BOS sıvısının akış yönüne salınım hareketi yaparlar. Sillerin koordine süpürme hareketlerini yapması, oluklu bağlantılar (ing. gap junction) veya sinir innervasyonu aracılığıyla sağlanır. Sillerin BOS üzerindeki rolü açık değildir, ancak moleküllerin BOS içerisindeki difüzyonunu kolaylaştırdığı kabul edilmektedir (Del Bigio 2010). Siliyer hareket beyin ve medulla spinalisde ekstraselüler alanla BOS arasında metabolitlerin taşınımına da hizmet eder (Ovalle ve Nahirney 2009).

Ependimal silyalarda atrofi veya proteinlerin mutasyonu gibi bir takım bozukluklar geliştiğinde, akuaduktus serebrinin kollabe olması veya tıkanmasına bağlı olarak hidrosefali gelişmektedir. Hatta bazı mutasyonlarda herhangi bir akuaduktus serebri anormalliği gelişmeden de hidrosefali görülebilmektedir. Dolayısıyla ependimal sillerin normal fonksiyonunu yerine getirmesi hidrosefali gibi bozukluklara karşı koruyucudur (Del Bigio 2010).

Ependimal hücreler epitelden farklı olarak eksternal lamina ile sınırlanmamışlardır. Bu hücrelerin çekirdek yapısı oldukça yuvarlak olup, çekirdekçiği belirgin değildir (Del Bigio 2010). Tipik sıvı ve iyon transportu yapan hücrelerin morfolojik ve fizyolojik karakteristiklerine sahiptir. TEM seviyesinde bazal hücre yüzeyi çok sayıda bazal girinti sergiler. Bu girintiler komşu astrositlerle interdigitasyonlar yapar (Ross ve Pawlina 2014).



Şekil 1. 9. Ependim hücreleri ile astrositler arasındaki interdigitasyonlar (2011).

Ependimanın başlıca işlevi BOS ile beyin arasında seçici bir engel oluşturarak beyni potansiyel nörotoksik maddelere karşı korumaktır (Ovalle ve Nahirney 2009). Ependimal tabakayı aşan pek çok madde, beynin ekstraselüler boşluğu ile BOS arasında hareket edebilmektedir (Berne ve ark 2008).

Ependimanın önemli özelliği hücreler arası lateral sınırlardaki apikal bağlantıların varlığıdır. Bağlantıların diğer tipleri tutundurucu (adherens), sıkı ve oluklu bağlantılardır (Ovalle ve Nahirney 2009). Ependimal hücrelerde bulunan laminin, utrofin, alfa-distrobreve ve beta-dikroglikan kompleksi, ependimal hücreleri ventrikül duvarına bağlar (Adorjan ve Kalman 2009). Subkomisural organın salgılarının, bilinmeyen bir mekanizma ile ependimal hücrelerin bütünlüğünü desteklediği düşünülmektedir (Vio ve ark 2000).

Ependima, beyin koroid pleksus olarak bilinen bölgesinde oldukça büyük değişkenlik gösterir. Burada hücreler salgılama hizmeti vererek BOS'un bileşenlerini salgırlar. Günde yaklaşık 500 ml BOS üretilir (Ovalle ve Nahirney 2009).

Ependimal hücreler, BOS içindeki birçok maddenin detoksifikasyon yoluyla temizlenmesi için gerekli olan enzimatik ve yapısal özelliklere sahiptir. Böylece beyin ile BOS arasında bir metabolik engel oluşturur. Bu işlevin gerçekleştirilmesinde hücrenin apikal yüzünde yer alan mikrovilluslar ve siller önemli görev alır. Bunların yanında oluklu bağlantıların varlığı da hücre fonksiyonlarının koordinasyonunda önemli rol oynar (Del Bigio 1995).

Ependimal hücreler, büyüme faktörleri salgılayarak, trofik fonksiyona katkıda bulunurlar. Fibroblast büyüme faktörleri (FGF) beyin gelişiminde en önemli büyüme faktörleri arasındadır. FGF2, kemirgenlerin ependimal hücrelerinde gösterilmiştir. İskemi sonrası ependimal hücrelerde görülen FGF2 artışı, bu hücrelerin trofik destek sağladığını düşündürmektedir (Hayamizu ve ark 2001). Ependimal hücrelerin fizyolojik ve patolojik koşullarda FGF1 (asidik FGF) ürettiği de bildirilmiştir (Ye ve Carp 2002).

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), insanlarda 22. ve 40. gebelik haftaları arasında, ependim hücreleri tarafından eksprese edilmektedir. Bu faktör otokrin ve parakrin fonksiyonlara sahiptir. Farelerde görülen VEGF inhibisyonu, mikrovillusların kaybına yol açar. Bu durum VEGF'nin ependimal stabilitede rol aldığını desteklemektedir (Maharaj ve ark 2008). Endotelyal büyüme ile ilişkilendirilen Ang-1, Tie-2 ve Flt-1

proteinleri, rat ependimal hücrelerinde bulunur. Bazı araştırmacılar, bu proteinlerin otokrin fonksiyona sahip olduğunu düşünmektedir (Tonchev ve ark 2007).

Ependimal hücrelerde birçok büyüme faktörü bildirilmiştir ancak kesin işlevleri tam olarak bilinmemektedir. Bunlar arasında hepatosit büyüme faktörü (HGF), bağ doku büyüme faktörü (CTGF), insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein (IGFBP), Noggin ve S100 β sayılabilir. SVZ'ye büyüme faktörü taşınmasının, ependimal hücreler tarafından kolaylaştırıldığı tam olarak ispatlanamamıştır (Del Bigio 2010).

Ependimal hücrelerin, komşu SVZ popülasyonlarını trofik faktörler aracılığıyla destekleme potansiyeline ek olarak, metabolik regülasyonda da görev aldığı düşünülmektedir. Ependimal hücrelerin GLUT 1-4 gibi glikoz taşıyıcıları aracılığıyla, BOS'dan glikoz alımını gerçekleştirmesi bu duruma örnektir. Glikoz daha sonra glikojene dönüşerek, ependimal hücreler için enerji deposu görevi görür (Verleysdonk ve ark 2005).

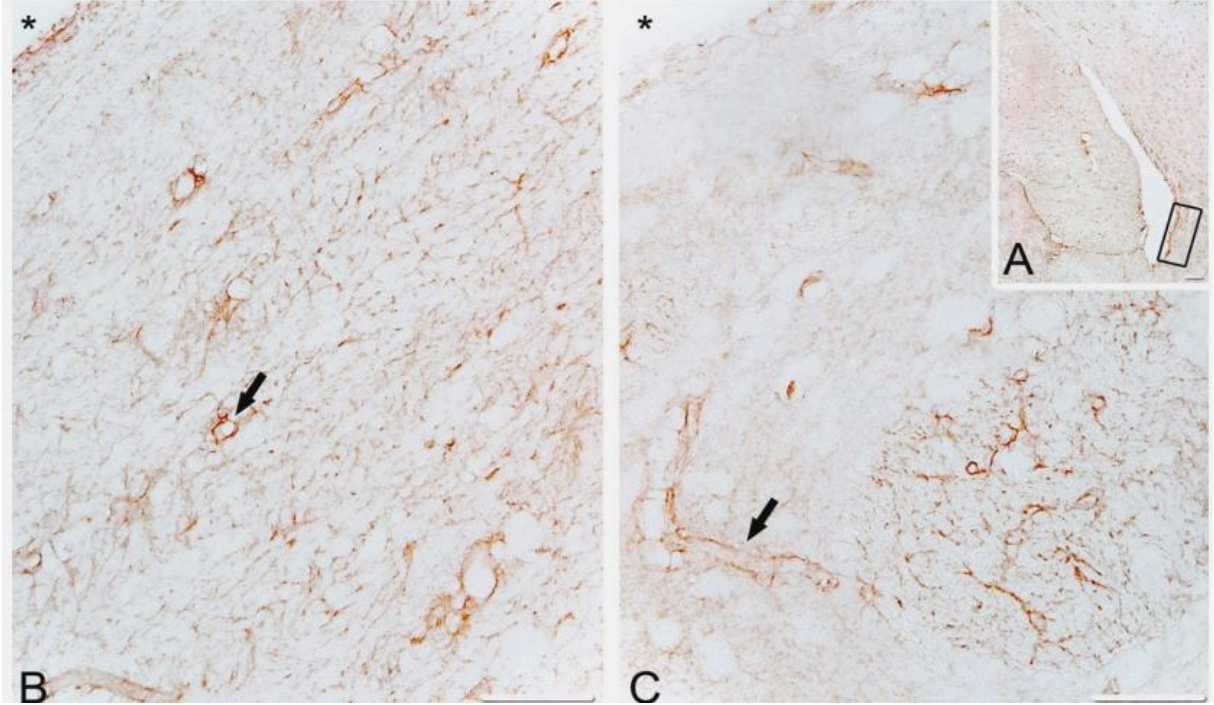
Yapılan çalışmalar ependimal hücrelerin, virüslere maruziyetini (varicella zoster, sitomegalovirus (CMV), herpes simpleks virüs (HSV), influenza A virüs...) ve onlarla enfekte olabildiğini göstermiştir. Ependimal hücreler bu duruma interferon α ve β salgılayarak cevap verirler. Bunun yanında ependimal silyaların varlığı, viral enfeksiyonların beyinde yayılmasına karşı engelleyici bir rol üstlenebilir. Dolayısıyla ependimal hücrelerin beyindeki enfeksiyonlar karşısında, savunma yapan ve enfektif ajanları karşılayan ilk hücreler olduğu düşünülmektedir (Del Bigio 2010).

Ependim Hücrelerinde Kanal Proteinleri

Ependimal membranlar birçok moleküler kanal içerirler. Oluklu bağlantıları (gap junction) oluşturan proteinler, komşu hücreler arasında intersellüler iletişim, iyon homeostazı ve hacim kontrolünün sağlanmasına yardımcı olur (Prochnow ve Dermietzel 2008). Konneksin olarak bilinen bu proteinler, hücreler arasında pore benzeri bağlantı oluştururlar. Ependimal hücreler birbirleriyle ve astrositlerle oluklu bağlantılar (gap junction) aracılığıyla bağlıdırlar (Zahs 1998).

Aquaporinler beyindeki su hareketini düzenleyen moleküler kanallardır. Aquaporin 4, ependimal hücrelerin bazolateral membranları ile astrositlerin son ayaklarında eksprese olur (Tait ve ark 2008). AQP4 ün devre dışı (knockout) bırakıldığı farelerde, akuaduktus serebrideki tıkanıklığa sekonder olarak hidrosefalinin geliştiği görülmüştür (Feng ve ark

2009). Bu durum AQP4 delesyonuna sekonder olarak, Cx43 ekspresyonundaki azalmanın yanısıra, ependimal hücreler arasında yer alan lateral bağlantıların bozulmasından kaynaklanmıştır. Bu durum AQP4 kanallarının bir su kanalı işlevi olmasının yanında, yapısal fonksiyonları da olduğunu düşündürmektedir (Li ve ark 2009).



Şekil 1. 10. A. Beyin ventriküllerini çevreleyen ependimadaki AQP4 kanal ekspresyonunun immünohistokimyasal boyaması (dörtgen içinde). B ve C. Astrositlerin uzantılarında yer alan ve perivasküler yerleşim gösteren AQP4 kanallarının (oklar), immünohistokimyasal boyaması (Skjolding ve ark 2010).

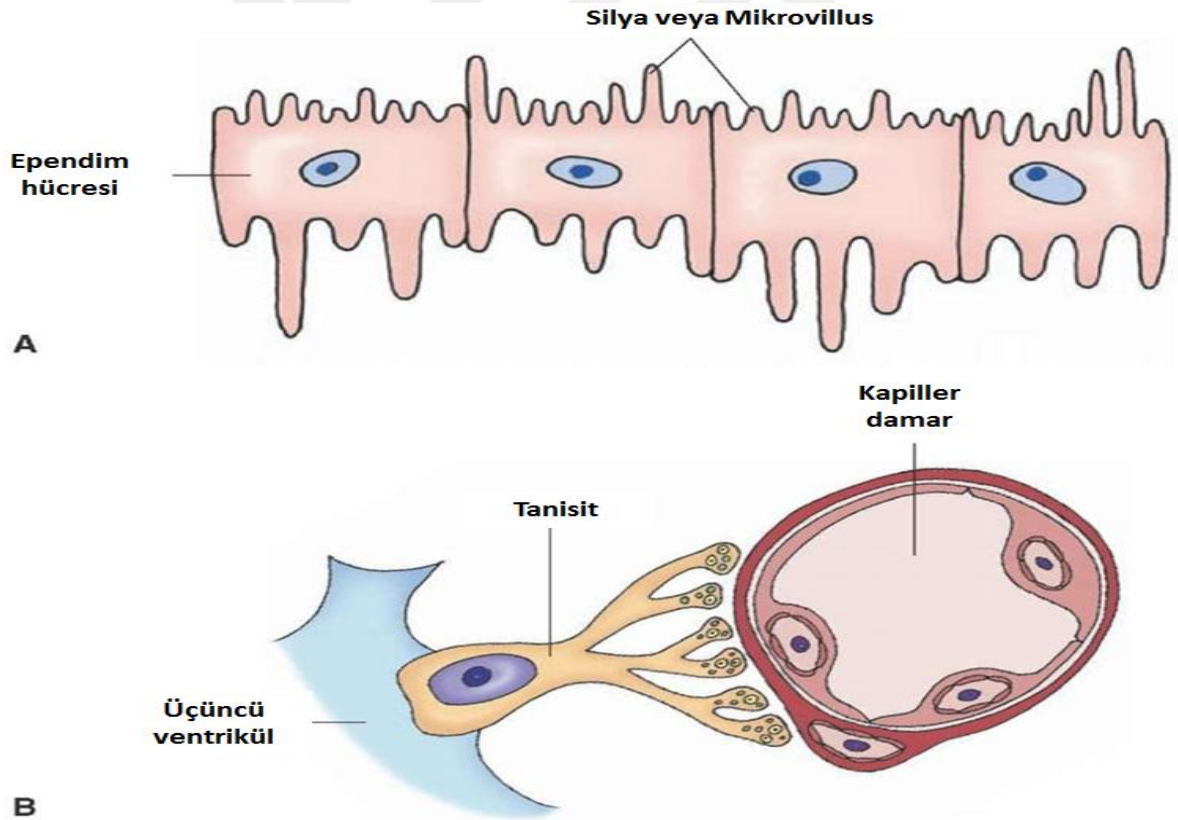
Ependim hücreleri içerisinde immünohistokimyasal yöntemlerle gösterilmiş başka AQP'ler de bulunmuştur. Örneğin AQP9 kanal ekspresyonu tanisitlerde (Lehmann ve ark 2004) ve kemirgen ependimal hücrelerde (Elkjaer ve ark 2000) gösterilmiştir. AQP3 ve AQP7 ise fare lateral ve üçüncü ventrikül ependimasında eksprese olduğu gösterilmiştir (Shin ve ark 2006). Yapılan başka bir çalışmada AQP1 ve AQP8'lerin kemirgen spinal kord ependimasında olduğu gösterilmiştir (Nesic ve ark 2008). AQP1, AQP2 ve AQP4 ise insan ependimal hücrelerinde eksprese olduğu gösterilmiştir (Mobasheri ve ark 2007).

Ependim hücreleri, glikoz taşıyıcıları (GLUT1 ve GLUT2, $Na^+/K^+/Cl^-$ kotransporter (NKCC1), monokarboksilat taşıyıcı (MCT1) eksprese ederler (Del Bigio 2010). Mrp5, Oct3 ve Oatp2b1'i içeren diğer organik iyon taşıyıcıları da ependimal hücrelerin bazal yüzeyinde bulunur (Roberts ve ark 2008).

Tanisitler

Tanisitler beyin ventriküllerinde bulunan özelleşmiş ependimal hücrelerdir. Bir ucu beyin parankimindeki nöronlar ve kapiller damarlar ile ilişkili, diğer ucu da beyin ventriküllerindeki BOS ile ilişkili olan bipolar hücrelerdir. Tanisitlerin muhtemel fonksiyonlarından birisi BOS ile beyin parankimindeki oluşumlar arasındaki iletişimi düzenlemektir (Rodriguez ve ark 2005).

Tanisitler ile ependimal hücrelerin histolojik yapısı birbirinden farklıdır. Ependimal hücreler kabaca kübik, birçok silyaya sahip ve uzantıları kısadır. Buna karşın tanisitler ise, sillerden, mikrovillulardan ya da diğer özelleşmiş apikal hücre uzantılarından yoksundur. Fakat tanisitlerde beyin parankimasına uzanan, uzun çıkıntılara sahiptir. Tanisitlerin uzantıları birkaç yüz mikron uzunluğunda olabilir. Tanisitlerin bu uzun periferel uzantıları, ependimal duvarını; beyin parenkimasına, kan damarlarına ve sinir lifleri aracılığıyla hipotalamustaki çekirdeklere bağlar (Bolborea ve Dale 2013).

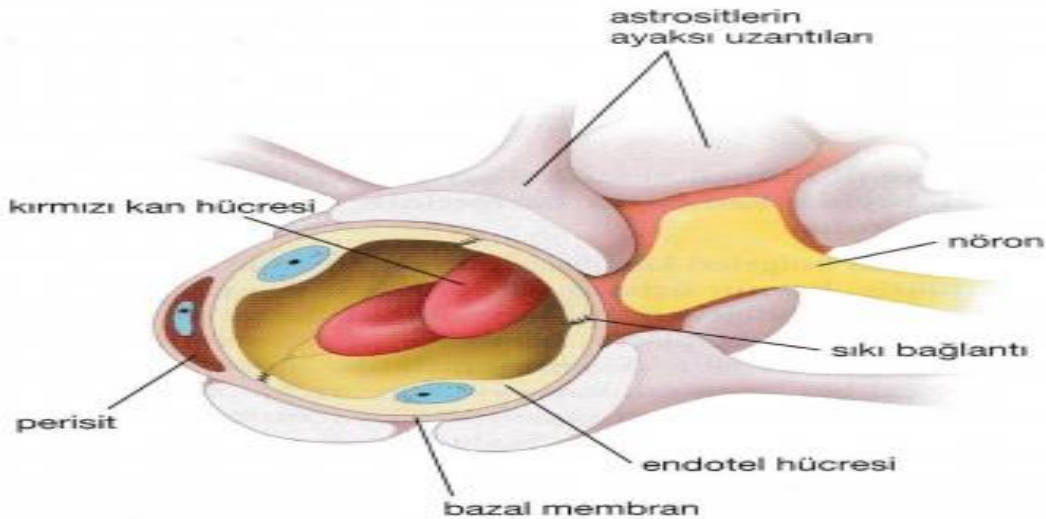


Şekil 1. 11. Ependim ile tanisit hücreleri arasındaki morfolojik farkı gösteren şematik çizim (2010).

1.1.3. Kan Beyin Bariyeri

Yüzyıldan daha uzun süre önce kan dolaşımına verilen vital boyaların bütün organlara geçerek onları boyadığı, ancak beyine geçmediği gözleminde yola çıkılarak kan-beyin bariyerinin ilk tanımı yapılmıştır. Kan-beyin bariyeri, MSS'yi kan damarlarında dolaşan elektrolitlerin, hormonların ve doku metabolitlerinin dalgalanan seviyelerinden korumaktadır. Daha yakın zamanda mikroskopide ve moleküler biyolojik tekniklerdeki ilerlemeler bu özel bariyerin kesin lokalizasyonunu ve endotel hücrelerinin beyin dokusu için gerekli olan maddelerin taşınmasındaki rolünü ortaya koymuştur.

Kan-beyin bariyeri embriyoda erken dönemde gliyal astrositlerle kapiller endotel hücreleri arasındaki karşılıklı etkileşim ile gelişir. Bariyer büyük oranda kesintisiz (sürekli) tip kapillerlerdeki endotel hücreleri arasında bulunan girift sıkı bağlantılar tarafından oluşturulmaktadır. Elektron opak işaretleyici maddeler kullanılarak yapılan TEM çalışmaları endotel hücreleri arasında kompleks sıkı bağlantılar bulunduğunu göstermiştir. Bu bağlantılar morfolojik olarak diğer endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılardan çok, epitelyal sıkı bağlantılara benzemektedirler. Ayrıca, TEM çalışmaları astrositlerin ve onların son ayaklarının endotelyal bazal lamina ile yakın bir ilişkide bulunduğunu göstermektedir. Sıkı bağlantılar endotel hücreleri arasında açıklık kalmasını engelleyerek çözünmüş maddelerin ve sıvının nöral dokuya basit difüzyonunu engeller (Ross ve Pawlina 2014).



Şekil 1. 12. Kan-beyin bariyerinin şematik çizimi. Endotel hücreleri ve bazal lamina ile astrosit son ayak uzantılarından oluşan kan-beyin bariyeri (Ross ve Pawlina 2014).

Bulgulara göre, kan-beyin bariyerindeki sıkı bağlantıların bütünlüğü, bunlarla ilişkili olan astrositlerin normal fonksiyon görmelerine bağlıdır. Şiddetli beyin hastalıklarında kan-beyin bariyeri etkinliğini kaybeder. Bu durumlarda beyin dokusunun TEM ile incelenmesinde sıkı bağlantıların kaybolduğu ve astrosit morfolojilerinde değişiklikler olduğu izlenir. Başka deneysel kanıtlara göre de astrositler bariyerin özelliğini ve sıkı bağlantıdaki protein içeriğini arttıran çözünebilir maddeler salgılamaktadır.

Beyindeki endotel hücrelerinin az sayıda küçük veziküller içermeleri, pinositozun şiddetle sınırlandırıldığını göstermektedir. 500 daltondan büyük molekül ağırlıklı maddeler genel olarak kan-beyin bariyerini geçemezler. Nöronal bütünlük için gerekli olan çoğu molekül kan kapillerlerine endotel hücreleri aracılığı ile girerler ve çıkarlar. O₂ ve CO₂ ile yağda eriyen belirli moleküller (örn. etanol ve steroid hormonlar) endotel hücrelerini kolaylıkla penetre edebilirler ve kan ile MSS'nin ekstraselüler sıvısı arasında serbestçe geçiş yapabilirler. Membranın yüksek K⁺ geçirgenliğine bağlı olarak nöronlar, özellikle ekstraselüler K⁺ konsantrasyonundaki değişimlere hassastırlar. Beyin ekstraselüler sıvısında K⁺ konsantrasyonunun tamponlanmasından astrositler sorumludur. Kan-beyin bariyerindeki endotel hücreleri de, K⁺'un MSS ekstraselüler sıvısına geçmesini etkin olarak sınırlandırarak astrositlere yardımcı olurlar.

Maddeler kapiller duvarından spesifik reseptör-aracılı endositoz ile aktif olarak taşınırlar. Örneğin glukoz, amino asitler, nükleozitler ve vitaminler spesifik transmembran taşıyıcı proteinler tarafından aktif transport ile taşınırlar. Kan-beyin bariyerinin bu makromoleküllere geçirgenliği, endotel hücre yüzeyindeki spesifik taşıyıcı proteinlerin ekspresyon düzeylerine bağlıdır.

Endotel hücrelerinin plazma membranında bulunan diğer bazı proteinler, ilaçlar ve yabancı proteinler gibi bazı molekülleri metabolize ederek bariyeri geçmelerine engel olup beyni korurlar. Örneğin L-dopa (levodopa) kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçerken, L-dopanin dekarboksilasyonu ile oluşan dopamin bu bariyeri geçemez ve MSS'ye giremez. Bu kısıtlama, klinikte dopamin eksikliği tedavisinde (örn. Parkinson hastalığı) dopamin yerine L-dopa uygulanmasının sebebini açıklamaktadır.

Özetle kan-beyin bariyeri, belirli iyonların ve maddelerin kan akımından MSS dokularına geçişini sınırlandırmaktadır (Ross ve Pawlina 2014).

1.1.4. Beyin Omurilik Sıvısı

Beyin ve omuriliği çevreleyen boşluğun toplam hacmi 1650 ml kadardır. Bu hacmin yaklaşık 150 ml'si BOS ile doludur, kalan hacim ise beyin ve omurilik dokusu tarafından doldurulur. Bu sıvı beyin ventrikülleri, sisternalar ve subaraknoid aralıkta bulunur. Bu alanlar birbirine bağlıdır ve BOS basıncı sabit bir düzeyde tutulur (Guyton ve Hall 2011). BOS, beyin dokusuna bir yandan yastık görevi yaparken, bir yandan da nöronların ekstraselüler ortamını düzenler (Berne ve ark 2008).

BOS'un önemli bir bölümü özelleşmiş ependimal hücreler tarafından kaplanmış koroid pleksus tarafından yapılır. Koroid pleksus, beyin ventrikülü duvarlarındaki kan damarlarının oluşturduğu ve BOS'un salgılandığı bölgedir ('pleksus' sinir lifleri, venler veya lenf damarlarının belli bir yerde ağ şeklinde toplanması ile meydana gelen oluşum) (Akay 2011).

Koroid pleksus lateral, üçüncü ve dördüncü ventrikülde lokalize olmuştur. Lateral ventrikül iki serebral hemisfer arasında bulunmaktadır. Bu yapı foramen interventrikularis (Monro'nun) aracılığıyla üçüncü ventriküle bağlanır. Üçüncü ventrikül iki taraftaki diensephalonun tam ortasında yerleşmiştir. Akvaduktus serebri (Slyvius) orta beyinden geçerek üçüncü ventrikül ile dördüncü ventrikülü birbirine bağlar. Dördüncü ventrikül altta pons ve medulla, üstte ise serebellumun ortasına yerleşmiştir. Erişkinlerde genellikle açık olmamakla beraber, dördüncü ventrikül santral kanal aracılığıyla omuriliğin kaudal kısmına bağlanır.

BOS, ventriküler sistemden dördüncü ventrikülün tavanında bulunan üç açıklık ile (Magendi'nin medial aperturu ve Luschka'nın 2 adet lateral aperturu) subaraknoid boşluğa geçer. BOS, ventriküler boşluktan çıktıktan sonra, beyin ve omuriliği çevreleyen subaraknoid boşlukta dolaşır (Berne ve ark 2008).

Koroid pleksuslar, üçüncü ve dördüncü ventriküllerin tavanı ile iki lateral ventrikülün duvarlarının bir kısmında oluşmasına karşın; BOS en çok lateral ventriküllerden sağlanır. Buradan yavaş yavaş üçüncü ve dördüncü beyin ventriküllerine dolaşan BOS, daha sonra omuriliğin merkezi kanalına geçer. Beyincik yakınındaki dördüncü ventrikülün duvarları yoluyla meninkslerin subaraknoid alanına da girer. Böylece beyin ve omurilik, içten ve dıştan tamamıyla BOS ile çevrelenir (Akay 2011).

Koroid pleksuslar, BOS'un salgılanma işinde işlevsel olup, geri emme yapmaz. BOS'un önemli bir bölümü araknoid villiler üzerindeki kapak yapısı aracılığıyla kafatasının dural venöz sinüslerine boşaltılarak uzaklaştırılır. Araknoid villuslar, BOS'un venöz sinüslere geçişine izin veren, ama kandan BOS'a geçişine izin vermeyen tek yönlü bir kapak işlevi yapar (Guyton ve Hall 2011).

Serebral ventriküllerdeki BOS'un hacmi yaklaşık 35 ml iken, subaraknoid boşluktaki hacim 100 ml'dir. Dakikada yaklaşık 0,35 ml BOS yapılır. Bu hız BOS'un her gün yaklaşık olarak dört kez değiştirilmesi anlamına gelir (Berne ve ark 2008).

Ependim hücrelerinin ventrikül duvarlarını döşemesi, BOS kompartmanlarının açıklığını korumak için önemlidir. Buna rağmen ventriküler sistemin dar kısımları tıkanıklık açısından risk altındadır. Bu kısımlara örnek olarak akuaduktus serebri ve spinal kordun kanalis santrali verilebilir. Erişkin insanlarda santral kanal tıkanmaları sık görülen bir durumdur. Bu durum genellikle olumsuzluğa yol açmaz. Aynı durum akuaduktus serebri için geçerli değildir. Akuaduktal stenoz kısmi ya da tam bir tıkanma şeklinde olabilir. Buna göre BOS akışı bozulur ve neticede hidrosefali gelişir (Milhorat ve ark 1994).

SSS'nin hücre dışı sıvısı ile BOS birbirlerini doğrudan etkiler. Bunun anlamı BOS içeriğinin, beyin ve omurilikteki nöronların hücre dışı ortamındaki değişiklikleri etkiliyor olmasıdır.

BOS'da K^+ , glikoz ve protein konsantrasyonu kan ile karşılaştırıldığında daha düşük iken, Na^+ ve Cl^- derişimi daha yüksektir. Ayrıca BOS'da pratik olarak hiç kan hücresi bulunmaz. BOS'un tonusitesi içinde fazla Na^+ ve Cl^- konsantrasyonuna karşın, protein içeriğinin düşük olması nedeniyle izotoniktir (Berne ve ark 2008).

BOS'un bileşimi bedenin her hangi bir bölgesindeki ekstraselüler sıvının bileşimine tam benzemez. Ayrıca büyük moleküllü maddelerin çoğu kandan BOS'a ya da beynin ekstraselüler sıvısına geçemez. Kan-BOS ve kan-beyin bariyeri olarak isimlendirilen engeller madde geçişini kısıtlar. Bu bariyerler CO_2 , O_2 , su, alkol ve anestezi maddeler gibi yağda eriyebilen moleküllere çok geçirgendir. Na, Cl, K gibi elektrolitlere az geçirgendir. Plazma proteinleri ve lipide çözünmeyen büyük organik moleküllere ise tamamen geçirimsizdir.

Bu engellerin geçirgenliğinin az olmasının nedeni kapiller endotel hücrelerinin birbirlerine vücudun diğer bölgelerindeki gibi çok sayıda delikten (por) oluşan bağlantılarla değil, çok sıkı (tight junction) bağlantılarla bağlanmış olmalarıdır. Bu bariyerler genellikle protein yapıdaki antikorların ya da yağda erimeyen bileşik türündeki ilaçların da beyin parankimine ve BOS'a etkili derişimlerde geçişini engeller (Guyton ve Hall 2011).

BOS dolaşımının obstrüksiyonu, BOS basıncını artırır ve kafatası içinde anormal sıvı birikmesi ile karakterize olan hidrosefaliye neden olur. Hidrosefalide ventriküller distande olurken, basıncın artmaya devam etmesi durumunda beyin dokusu da kaybolur (Berne ve ark 2008).

1.1.5. Beyin İnterstisyel Sıvısı

SSS nöronlarının büyük bir kısmının yerel ortamı kontrol edilmekte ve bu sayede nöronlar kendilerini çevreleyen hücre dışı sıvının içeriğindeki önemli değişikliklere karşı normal koşullarda korunmaktadır. Bu kontrol, SSS dolaşımının düzenlenmesi, kan-beyin bariyerinin varlığı, nörogliaların tamponlayıcı etkisi ve BOS ile SSS'nin hücre dışı sıvısı arasındaki madde değişimi ile sağlanır.

Kafatası boşluğunda beyin, kan ve BOS bulunur. İnsan beyni yaklaşık 1350 gr ağırlığındadır; yaklaşık olarak %15'i ya da 200 ml'si ekstrasellüler sıvıdır. Kafatası içindeki kan hacmi yaklaşık 100 ml'dir ve bu değer kafatası içindeki BOS hacmine eşittir. Yani kafatası boşluğundaki ekstrasellüler sıvı hacminin tamamı yaklaşık 400 ml'dir (Berne ve ark 2008).

Beyinde perivasküler boşluk, lenfatik işlevi yapar. Beyin dokusunu besleyen damarlar, beyin içine doğru girdikçe bir tabaka pia materle birlikte ilerler. Pia mater, damarla gevşek biçimde bağlantılıdır ve damarla arasında perivasküler aralık denen bir boşluk oluşur. Perivasküler aralık beyinde arter, ven, venül ve arteriyollerde bulunur ancak kapiller düzeyde görülmez. Beynin interstisyel doku bölgesine sızan proteinler perivasküler aralık yoluyla subaraknoid boşluğa geçerler. Subaraknoid bölgeye ulaşan proteinler BOS'a katılır, araknoid villuslarla beyin toplardamarları içine emilirler (Guyton ve Hall 2011).

1.2. Aquaporin Kanalları

Aquaporin (AQP) su kanal proteinleri ilk kez Agre ve arkadaşları tarafından, eritrositlerde Rh faktörü üzerinde yapılan çalışmalar sırasında tanımlanmıştır (Preston ve ark 1992). *Xenopus laevis* oositlerinde yapılan deneyler sonucunda her bir kanalın çok yüksek su geçirgenliğine sahip olduğu görülmüştür. 1997'de Human Genome Organization tarafından bu kanallara aquaporin adı verilmiştir (Bhattacharjee ve ark 2004). AQP'ler suyun seçici olarak geçirilmesinden sorumludurlar. AQP1'in keşfinden sonra en az 10 tane memeli aquaporini tanımlanmıştır. Bitkilerde, mikroskobik canlılarda, omurgasızlarda ve omurgalılarda 200'den fazla AQP tanımlanmış olmasına rağmen pek çoğunun işlevi hala tam olarak anlaşılamamıştır (Chae ve ark 2008).

Birçok canlı türünde eksprese edilen ve işlevleri henüz tam anlaşılamayan AQP'ler su dışında farklı moleküllere de seçici geçirgenlik gösterir. Her ne kadar aquaporinlerin ekspresyonu ile işlev bozuklukları çeşitli patolojik süreçlerde rol oynasa da, seçici geçirgenlik özellikleri birçok hastalık için tedavi olanağı sunabilir (Akyüz ve ark 2011). AQP genleri her hücrede ifadelenmemektedir. Örneğin nöronlarda aquaporinlerin hiçbir tipi tanımlanmamıştır. Çoğu kez ifadelenme kalıpları fizyolojik veya patolojik rollerine işaret eder. Aquaporinlerin gelişimsel ifadelenmeleri de çoğu zaman komplekstir. Örneğin sıçanlardaki renal tübüllerde bulunan AQP'ler sadece doğumdan sonra ifadelenir. Buna karşılık AQP3 ve AQP7 sadece olgunlaşmamış dendritik hücrelerde bulunurken, olgunlaşmışlarda bulunmaz. Çoğu kez hücreler birden fazla tip AQP içerir. Örneğin tükürük bezlerinde suyun interstisyumdan alındığı bazolateral membranda AQP3 varken, tükürük salgısının yapıldığı apikal zar da AQP5 vardır (Agre ve Kozono 2003).

Aquaporin ailesinden 0, 1, 2, 5, 6 ve 8 sadece su kanalı olarak işlev görürler. Her ne kadar aminoasit dizilimi olarak diğerlerine benzese de AQP6 anyon, AQP8 ise üre kanalı olarak iş görmektedir. AQP 3, 4, 7, 9 ise aquagliseroporindir (hem su, hem gliserole seçici geçirgen). Son zamanlarda tanımlanan AQP11 ve AQP12 ise superaquaporinlerdir (Chae ve ark 2008).

Difüzyonda su geçişi çift taraflı olmasına rağmen, AQP'ler ozmotik gradient veya hidrolojik gradient tarafından kontrol edilen tek taraflı geçişe izin verirler (Preston ve ark 1992).

1.2.1. İnsanlarda Bulunan Aquaporinler

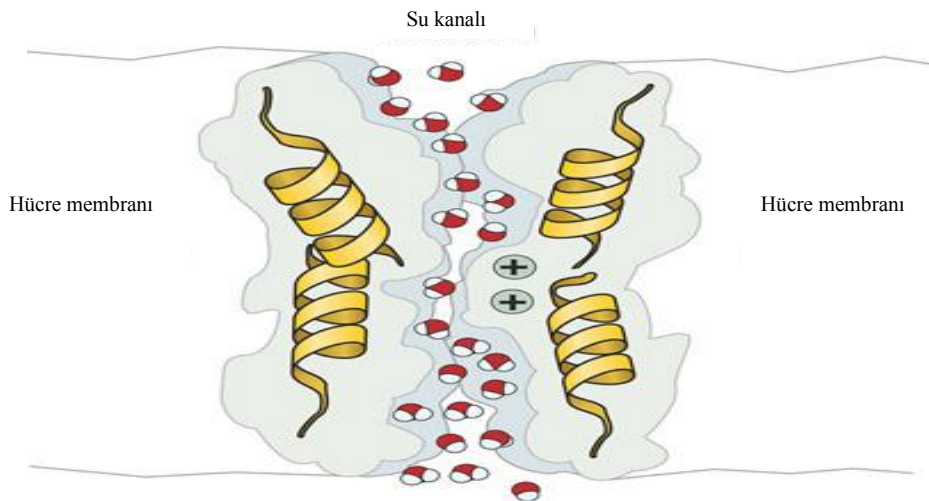
AQP0: Sadece göz lensinde bulunur. Diğer AQP'ler gibi civa tarafından inhibe olmamaktadır, bu nedenle de AQP0 olarak adlandırılmıştır (Chae ve ark 2008).

AQP1: Böbreklerde vasa rektanin inen kolunda, tubuler lümeninden interstisyuma büyük madde geçiş yollarında ve damar boşluklarında tanımlanmıştır. Ayrıca AQP1, damar ağlarında önemli salgı rolleri olan (beyin omurilik sıvısı) koroid pleksusda, gözün bölümlerinde pigment içermeyen epitellerde ve akciğerdeki bronşlar dahil birçok organın kılcal damar epitellerinde gösterilmiştir. Ancak, özellikle çoklu su protein kanallarına ihtiyaç duyan böbrek toplayıcı kanalları ve tükürük bez epitelleri AQP1 içermezler (Bhattacharjee ve ark 2004).

AQP2: Böbrek toplama kanallarında yer alır. Vazopressin ile ilişkili olup, vazopressin miktarı artınca AQP2'nin su geçirgenliği azalmaktadır.

AQP3: Su ve gliserol geçişinin yapıldığı böbrek, hava kanalları, deri ve gözde bulunan aquaporindir (Bhattacharjee ve ark 2004).

AQP4: Glial hücrelerde, bez epitelinde, akciğerlerde, retinada, çizgili kas sarkolemmasında, midede, subaraknoid astroglial hücrelerin içinde, kapiller ve venöz damarların duvarlarında ve vasopressin salgılayan nöronların etrafındaki glial lamellae'nin içinde bulunur. Beyindeki gliyal hücrelerde bulunmasına rağmen, nöronlarda bulunmamaktadır. Suyun AQP4 sayesinde kan beyin bariyerini aştığı düşünülmektedir (Agre ve Kozono 2003).



Şekil 2. 1. Birçok hücrenin membranında yer alan AQP kanal proteini (2012).

AQP5: Lakrimal ve mukozal bezlerin apikal zarında eksprese edildiği gibi, alveollerde de yaygın olarak bulunur (Bhattacharjee ve ark 2004).

AQP6: *Xenopus laevis* oositlerinde gözlemlendiği üzere primer yapısı AQP2 ve AQP5'e benzemesine rağmen, fonksiyonel farklılıklar içeren AQP6'lar minimum düzeyde su geçirgenliği gösterir (Agre ve Kozono 2003).

AQP7: Proksimal tubulde bulunmuştur. Bu bölgede yağ metabolizmasına etki ettiği düşünülmektedir.

AQP8: Sindirim sistemi boyunca çeşitli yerlerde, testislerde ve kalpte bulunur (Agre ve Kozono 2003).

AQP9: Karaciğer, testis, beyin ve beyaz kan hücrelerinde bulunan, gliserol ve suya geçirgen kanallardır.

AQP10: İnce bağırsakta bulunan AQP10, tüm küçük, suda çözünen maddelere ve suya geçirgendir.

AQP11: Böbrekte ve karaciğerde eksprese edildiği bilinmektedir ama tam olarak görevleri anlaşılamamıştır.

AQP12: Pankreasta eksprese edilen AQP12'nin hangi yapı ve maddelere geçirgen olduğu bilinmemektedir (Agre ve ark 2002).

1.2.2. Aquaporinlerin Yarı Ömrü

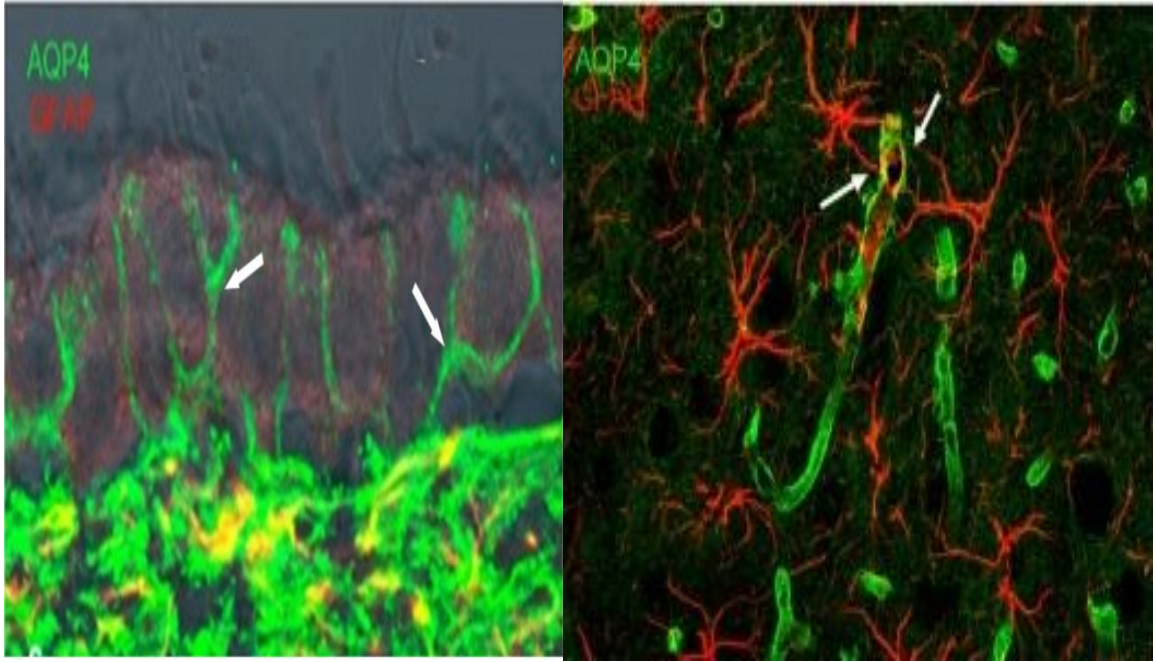
Aquaporinlerin yarı ömrü ubiquitinler (Ub) aracılığı ile düzenlenir. Ub bağlı yolların, hücre farklılaşması, DNA tamiri, transmembran ve veziküler taşıma, stres cevabı ve apoptozis gibi çeşitli biyolojik sistemlerde majör rol aldığı gösterilmiştir. Hedef proteinler önce ubiquitinlenir ve daha sonra proteozom tarafından yıkılır. Aquaporinlerin de ubiquitinlendiği ve proteozomlar tarafından parçalandığı gösterilmiştir. Stres durumu altında bulunan hücrelerde protein sentezi azalırken, ubiquitin sentezi artmaya eğilimlidir (Jessica Chen ve ark 2008).

1.2.3. Aquaporinlerin Beyindeki Rollerini

Beyinde su dengesinin regülasyonu önemlidir. Membran su kanalı olan aquaporinlerin keşfiyle, beyindeki su homeostazisinin fizyoloji ve patolojisinin daha iyi anlaşılması sağlanmıştır. AQP'ler, astrosit migrasyonunu hızlandırır, nöronal aktiviteyi değiştirir ve apoptoziste rol oynar. Aquaporin türlerinden AQP1, AQP4 ve AQP9 normal beyin ve beyin patolojilerinin kemirgen modellerinde gösterilmiştir (Öztürk ve Delibaş 2011).

AQP1, koroid pleksus epitelinin apikal membranında eksprese edilir. Serebral ventriküllere BOS sekresyonu buradan gerçekleşir.

AQP4, beyin parankimi ile BOS kompartmanları arasındaki su transportunda önemli rol alan serebral ventrikül endipimal hücrelerin bazolateral membranında eksprese edilmektedir. Bunun dışında serebral kan damarları ile direkt temas eden astrosit son ayaklarında da eksprese edilir (Zador ve ark 2007).



Şekil 2. 2. Ependimal hücrelerin bazolateral membranlarında AQP4 kanal ekspresyonu (solda, oklar, yeşil renk). Kapiller damarlara uzanan ve astrosit son ayak uzantılarında eksprese olan AQP4 kanalları (sağda, oklar, yeşil renk). Kırmızı ile boyanan yapılar GFAP (glial fibriler asidik protein) (Gleiser ve ark 2016).

AQP9'un beyin enerji homeostazisinde önemli rolü olduğu (Badaut ve ark 2007) ve astrositlerde eksprese edildiği gösterilmiştir (Badaut ve Regli 2004).

Aquaporinlerin Beyin Ödemindeki Rolü

Normal olarak su transportu, beyin dokusu ve BOS arasındaki dengenin sürdürülmesi ile düzenlenir. Bu dengenin bozulması beyin su içeriğinin artmasına neden olur. Kafatasının intrakranial hacim değişikliklerini tolere etme kapasitesi sınırlıdır. Dolayısıyla beyin ödeminin gelişimi, intrakranial basıncın artışına neden olarak, beyin hasarı ve ölümle sonuçlanabilir (Zador ve ark 2007).

Beyin ödemi, kan beyin bariyeri bozukluğu sonucunda olduğu zaman vazojenik, kan beyin bariyerinde rüptür olmaksızın patolojik durumlardan kaynaklandığında ise sitotoksik ödem olarak iki grupta sınıflandırılır (Klatzo 1994). AQP4 aktivatörleri ödemin vazojenik komponentinin temizlenmesinde rol oynarken, AQP4 inhibitörleri sitotoksik ödemde beyni koruyucu etkiye sahiptir (Donkin ve Vink 2010). Özetle aquaporinler, serebral ödemin oluşmasında veya rezolüsyonunda önemli bir role sahiptir (Manley ve ark 2000, Papadopoulos ve Verkman 2008).

Nörodejeneratif Hastalıklar ve Aquaporin

Nörodejeneratif hastalıkların oluşum süreçlerinde su kanal proteinlerinin olası rollerini gösteren çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Ölüm sonrası yapılan mikroskopik incelemeler Alzheimer hastalığında (AH), β amiloid ($A\beta$) içeren senil plaklar ile fosforile tau içeren nörofibriler yumakların beyinde biriktiğini ortaya koymuştur (Demarin ve ark 2011). Yapılan klinik çalışmalarda Alzheimer hastalığında beyin iyon ve su homeostazisinin önemli ölçüde bozulduğu tespit edilmiştir (House ve ark 2006). Başka bir çalışmada ise Alzheimer hastalığında, beyinde AQP4 kanallarının gen ekspresyonunun önemli derecede azaldığı bulunmuştur (Foglio ve Rodella 2010).

Parkinson Hastalığı, dopaminerjik nöronların progresif kaybı ile karakterizedir. Yapılan bir çalışmada dopaminin kültürde striatal astrositlerin proliferasyonunu düzenlediği ve proliferasyonda dopaminerjik etkininde AQP4 aracılığı ile sürdürüldüğü gösterilmiştir (Kuppers ve ark 2008).

Nöromiyelitis optika, optik sinir ve spinal kordu tutan inflamatuvar demiyelinizasyonla karakterize, görme kaybı ve paralizye neden olan bir sendromdur.

Yapılan çalışmalar bu hastalarda, AQP4 oto antikorlarının varlığını ve ayrıca lezyon bölgelerinde immunohistokimyasal olarak AQP4'ün yokluğunu göstermiştir (Foglio ve Rodella 2010).

Aquaporin 4'ün Beyindeki Fizyolojik Roller

İlk olarak civa-duyarsız su kanalı (MIWC) olarak adlandırılan ve daha sonra ismi AQP4 olarak değiştirilen bu aquaporin, beyinde ependimositler ile astrositlere immünlokalizedir (Hasegawa ve ark 1994, Frigeri ve ark 1995). AQP4 birçok fizyopatolojik sürecin parçası olmasına rağmen, AQP4'ün beyin fizyolojisindeki rolünün tarifi hala zordur. Son yapılan çalışmalarla AQP4'ün ekstrasellüler sıvı hacminin düzenlenmesi, potasyum (K) tamponlanması, serebro-spinal sıvı döngüsü, interstisyel sıvı emilimi, atıkların uzaklaştırılması, nöroinflamasyon, ozmotik duyarlılık, hücre göçü ve Ca^{+2} haberleşmesi gibi birçok farklı alanda görev aldığını ortaya koymuştur (Nagelhus ve Ottersen 2013).

AQP4, suya seçici geçirgen olan aquaporin alt grubuna aittir (King ve ark 2004). AQP4'ün yapısında yer alan porlar, yüksek etkinlikte ve seçicilikte su geçişine imkan sağlarken; sudan daha büyük molekülleri dışarıda tutar (Walz ve ark 2009). AQP4, suya ek olarak gliserol (aquagliseroporin) ve diğer bazı maddelerin (iyon, gaz ya da sinyal molekülleri) de geçişine izin verir (Tani ve ark 2009). İyon, gaz ya da sinyal moleküllerinin porlar boyunca taşınması, lokal kan akımını ve kan-beyin arasındaki substrat değişimini direkt veya dolaylı olarak etkiler (Nagelhus ve Ottersen 2013).

Beyin fonksiyonları, kaçınılmaz bir şekilde ekstrasellüler hacmin etkin kontrolüne bağlıdır. AQP4 kanallarının beyin parankiminde yoğun olarak bulunması, bu bölgedeki ekstrasellüler sıvının emilimi ve beyin interstisyumundan makromoleküllerin uzaklaştırılması gibi iki önemli fonksiyonun gerçekleştirilmesi açısından son derece önemlidir (Haj-Yasein ve ark 2011). Özellikle Alzheimer ve epilepsi gibi nörolojik hastalıklarda, astrosit son ayak membranlarında AQP4 ekspresyonu azalmıştır. Bu da bazı nörolojik hastalıkların fizyopatolojisinde bu kanalların işlevi olduğunu düşündürmektedir (Yang ve ark 2011, Lee ve ark 2012).

Beyindeki AQP4 fonksiyonlarını anlama konusunda yapılan sınırlı çalışmalar, parankimal BOS emilim yolunun, AQP4'e oldukça yüksek bir şekilde bağlı olduğunu göstermektedir (Tourdias ve ark 2009).

Yapılan çalışmalardan birinde, beyinde paravasküler yol boyunca anlamlı oranda serebrospinal sıvı geri dönüşümü olduğu bulunmuştur. Subaraknoid alana enjekte edilmiş işaretleyiciler, penetran arterlerin çevreleri boyunca beyin dokusuna girmektedir. İşaretleyicilerin beyin parankimine hızlıca dağılmaları ve sonunda kapiller ve venlerin etrafında hızlıca birikmeleri, paravenöz drenaj yolunun olabileceğini düşündürmektedir. AQP4^{-/-} farelerde beyinde işaretleyicilerin akımı azalmıştır ve enjekte edilmiş intraparaknimal işaretleyicilerin (örn. işaretli β amiloid) uzaklaştırılması gecikmiştir. Böylece perivasküler yol boyunca seyreden AQP4 aracılı su akımının, sadece beyin interstisyel sıvısının uzaklaştırılmasında değil, interstisyel atıklar ile çözünebilir proteinlerin de uzaklaştırılmasında rol oynadığı bulunmuştur. Dolayısıyla AQP4 disfonksiyonunun, nörodejeneratif hastalıklarda protein birikmesine yol açacağı düşünülmektedir (Iiff ve ark 2012).

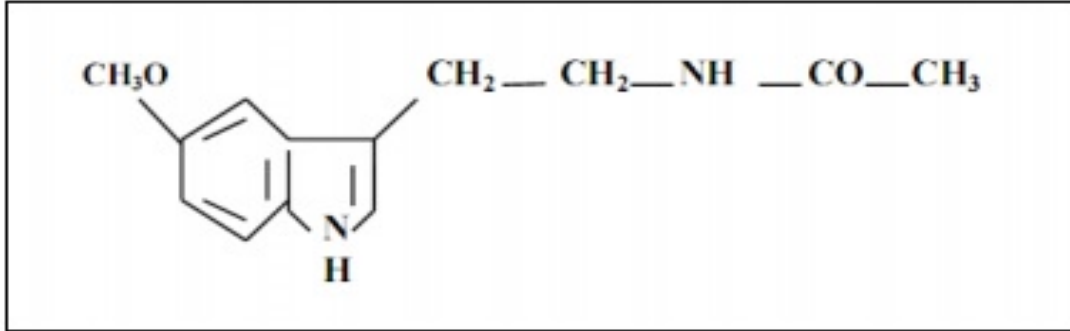
Kan dolaşımına verilen vital boyaların bütün organlara geçerek onları boyadığı, ancak beyne geçmediği gözlemlenirken yola çıkılarak kan-beyin bariyerinin ilk tarifi yapılmıştır. Kan-beyin bariyeri astrositlerle, kapiller endotel hücreleri arasındaki karşılıklı etkileşimle gelişir. Kan-beyin bariyerindeki sıkı bağlantıların bütünlüğü, bunlarla ilişkili olan astrositlerin normal fonksiyonunu görmesine bağlıdır (Ross ve Pawlina 2014). AQP4'ün kan beyin bariyerindeki astrosit son ayaklarında çok yoğun bulunması, AQP4 havuzunun kan ve beyin arasındaki su akışını kontrol ettiği hipotezini desteklemiştir (Nagelhus ve Ottersen 2013).

Özetle AQP4 beyinde en çok bulunan ve merkezi porlara sahip, hücrel transmembran protein kanallarıdır. Beyinde bulunduğu yerler ependimal hücrelerin bazolateral membranları (Gunnarson ve ark 2004) ile astrosit son ayak membranlarıdır (Venero ve ark 2001). AQP4'ün bulunduğu yerler dikkate alındığında (kan beyin bariyeri ile BOS ve beyin parankimini ayıran ventrikül duvarı), kompartmanlar arasındaki ozmotik gradient farkına bağlı olarak, su ve diğer bazı moleküllerin transportuna aracılık ettiği düşünülmektedir (McAllister ve Miller 2006).

1.3. Melatonin ve Genel Özellikleri

Canlı organizmalarda biyolojik, fizyolojik, hormonal, davranışsal ve psikolojik yönü olan pek çok olay, belirli bir ritme sahiptir. İnsanda uyku uyanıklık, vücut sıcaklığı, hormon düzeyleri ve bir takım bilişsel işlevler de günlük (sirkadiyen) ritim ile değişim göstermektedir. Sirkadiyen ritimde ilerleme, gecikme veya bozulmalar çeşitli hastalıklar ve duygu durum bozuklukları ile yakın ilişkilidir. Bu ilişkide melatonin hormonu önemli bir yer tutar (Özdemir ve ark 2014).

Melatonin (5-metoksi-N-asetiltriptamin) hormonu, pineal bez ve retina başta olmak üzere çeşitli periferik organ ve dokularda sentezlenir. Melatonin sekresyonunun endojen ritmi suprakiazmatik nukleus tarafından düzenlenir ve karanlık aydınlık siklusu ile sürdürülür. Melatonin diğer hormonların regülasyonunu ve organizmanın sirkadiyen ritmini düzenler. Amfofilik yapısı ve küçük molekülü olması nedeniyle organizmada yaygın dağılım gösterir, hücrel kompartmanlara kolayca girer. Güçlü antioksidan özelliği olan bu doğal bileşik in vitro ve in vivo güçlü bir sitostatik ajandır (Şener 2010).



Şekil 3. 1. Melatoninin kimyasal yapısı (Macchi ve Bruce 2004).

Melatoninin düzenleyici etkisi oküler hastalıklarda, diyabette, romatoid artrit, fibromyaljide, kronik yorgunluk sendromunda, enfeksiyon hastalıklarında, nörolojik hastalıklarda, uyku bozukluklarında, yaşlanmada ve depresyonda gösterilmiştir (Şener 2010).

1.3.1. Pineal Bez ve Melatonin İlişkisi

Pineal bez, günlük vücut ritmini düzenleyen endokrin ya da nöroendokrin bir bezdir. Diensefalon tavanının posteriyör parçasının nöroektoderminden gelişir ve kısa bir sapla beyne bağlı olarak kalır. İnsanlarda beyin orta hattında üçüncü ventrikülün posteriyör duvarında yer alır. Pineal bez, yassı, çam kozalağı şeklinde bir yapıdır ve bu

nedenle bu şekilde adlandırılmıştır. 5-8 mm yüksekliğinde, 3-5 mm çapında ve 100-200 mg ağırlığındadır. İki tip hücre içerir: pinealositler ve interstisyel (gliyal) hücreler.

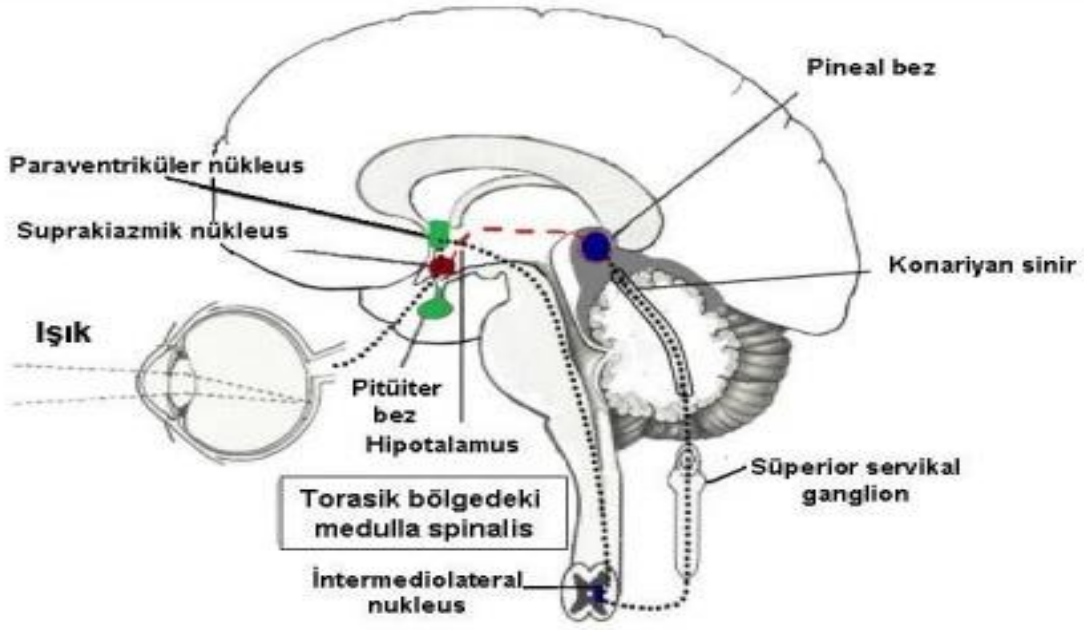
Pinealositler, pineal bezin şef hücreleri olup melatonin hormonunu sentezler. Bu hücreler, bezin yüzeyini kaplayan pia materden bezin içine uzanan bağ dokusu yapısındaki septumlar tarafından oluşturulan lobüller içinde küme ve kordonlar halinde düzenlenmişlerdir. Bu hücrelerin büyük nükleusları, bir ya da daha fazla belirgin nükleolusları bulunmaktadır ve sitoplazmalarında lipid damlacıkları içermektedirler. Uzantılarının genişlemiş sonlanmaları kan kapillerleri ile ilişkilidirler. Bu özellik, nöroendokrin aktiviteyi güçlü bir şekilde ispatlamaktadır.

İnterstisyel (gliyal) hücreler, bezdeki hücrelerin yaklaşık %5'ini oluşturmaktadır. Astrositlerin boyanma ve ultrastrüktürel özelliklerine yakın özelliklere sahiptirler ve pitüisitleri andırırlar.

İki hücre tipine ek olarak insan pineal bezi, corpora arenasea ya da beyin kumu adı verilen kalsifiye yapılar ile karakterizedir. Bu yapılar, pineal sekresyonların ekzositozu sırasında sitoplazmaya salınan taşıyıcı proteinlerin üzerine kalsiyum fosfat ve karbonatların çökmesi ile ortaya çıkmaktadır (Ross ve Pawlina 2014).

Radyolojik çalışmalarda, pineal bez hacminin yaşamın ikinci yılında doğuma göre iki kat arttığı (Sumida ve ark 1996), 7 yaşına kadar büyümeye devam ettiği, kalsifikasyonun çocukluk döneminde başladığı ve yirmili yaşlardan sonra değişmediği bildirilmiştir (Altun ve ark 2001).

Pineal bez, ışık şiddeti ile endokrin aktivite süresini ilişkilendirir. Pineal bez fotosensitif bir organdır; önemli bir zaman tutucu ve gündüz/gece döngüsünün (sirkadiyan ritim) düzenleyicisidir. Işık ve karanlık döngüleri ile ilgili bilgiyi, suprakiazmatik nükleusu, pineal beze giden sempatik nöral traktuslara bağlayan retinohipotalamik traktus, aracılığıyla retinadan alır. Gündüz esnasında ışık impulsları pineal bezin ana hormonu olan melatoninin üretimini inhibe eder. Bu nedenle plazma melatonin seviyesi değişiklikleri ile ölçülen pineal aktivite karanlıkta artar ve ışıktaki azalır. İnsanlarda melatonin sekresyonundaki bu sirkadiyan değişiklikler günlük vücut ritminin düzenlenmesinde önemli rol oynar (Ross ve Pawlina 2014).



Şekil 3. 2. Melatonin sentez yolağı (Özdemir ve ark 2014).

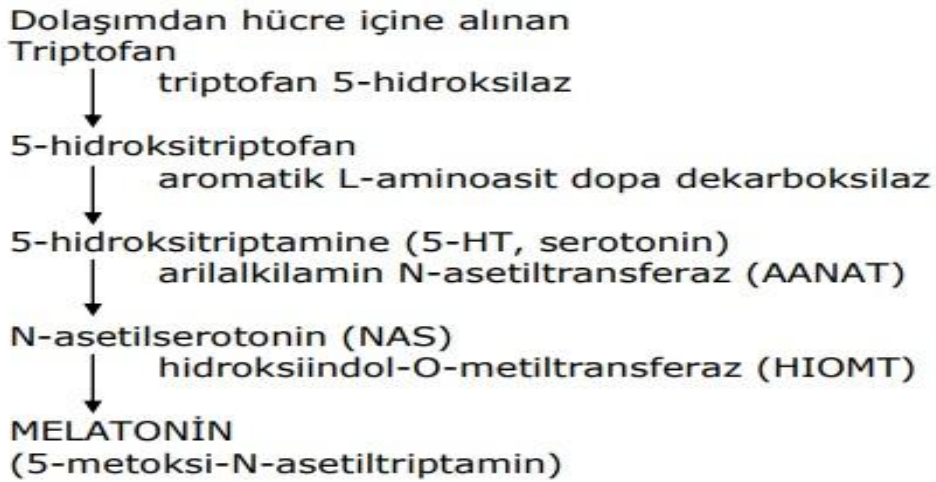
Melatonin karanlıkta salıverilir ve memelilerde gonadların steroidogenez aktivitesini inhibe ederek üreme fonksiyonunu düzenler. Gonadal steroidlerin üretimi, melatoninin hipotalamusta GnRH üreten nörosekretuar nöronlar üzerindeki inhibitör aktivitesi tarafından azaltılır. GnRH'ın inhibisyonu, pitüiter bezin anterior lobundan FSH ve LH salıverilmesinde azalmaya neden olur. Birçok hayvanın pineal bez ekstraktları melatonine ek olarak serotonin, norepinefrin, dopamin ve histamin gibi çok sayıda nörotransmitter ve somatostatin ile TRH gibi hipotalamik düzenleyici hormonlar içermektedir. Pineal bezi tahrip eden tümörler klinik olarak prekoks (erken başlayan) puberteye neden olur.

Hayvan çalışmaları, gün ışığı süresinin uzunluğu ile ilgili bilginin retinadaki fotoreseptörlerden pineal beze ulaştığını göstermektedir. Böylece pineal bez mevsimsel cinsel aktiviteyi etkiler. İnsanlar üzerindeki güncel çalışmalar pineal bezin, jet lag yaşayan yolcuların deneyimi gibi, gün uzunluğundaki ani değişimlere uyum sağlamada rolü olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak, pineal bez ılıman iklimli ve yarı arktik bölgelerde mevsimsel affektif bozukluk olarak bilinen ve kışın gün uzunluğunun azalmasına karşı verilen duygusal yanıtları değiştirmede rol oynayabilir (Ross ve Pawlina 2014).

1.3.2. Melatonin Yapısı, Sentezi ve Metabolizması

Sirkadiyen ritim denildiğinde akla ilk gelen hormonlardan biri olan melatoninin, pineal bezden ilk olarak keşfi 1958 yılında gerçekleştirilmiştir. Melatoninin bu dönemde tanımı “melanophorecontracting hormon” olarak yapılmış ve gerek kurbağa derisindeki melanoforların beyaz görünüşüne neden olduğu için ve gerekse serotoninden türediği için bu isim verilmiştir (Hardeland ve ark 2006).

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) sentezinde birinci basamak triptofanın pinealositler içine alınması ve orada pineal bir enzim olan N-asetiltransferaz (NAT) tarafından N-asetil serotonine dönüştürülmesidir. N-asetil serotoninin melatonine dönüşümü diğer bir pineal enzim olan hidroksiindol-o-metiltransferaz (HIOMT) aracılığı ile olur. Sentezin düzenlenmesi primer olarak geceye, diğer bir deyişle karanlığa bağlıdır. Sentezlenen melatonin pineal bezin endokrin hücreleri olan pinealositlerden hızla salgılanmaktadır. Salgılanma hızı 29 mg/gün'dür (Reiter ve ark 1997).



Şekil 3. 3. Melatonin sentez basamakları (Özdemir ve ark 2014).

Sentezden sorumlu N-asetiltransferaz'ın aktivitesi dolayısıyla melatonin sentezi spesifik c-AMP-bağımlı transkripsiyon faktörleri ve fotoperiyodik şartlar tarafından düzenlenir. Işık altında, retinadan başlayan nöronal impulslar, hipotalamusta suprakiazmatik nukleus (SCN) ve diğer hipotalamik yapılara aktarılır. Uyarı SCN ve periventriküler nukleus (PVN) aracılığı ile superior servikal gangliyona geçer. İnsanda karanlığın başlaması ile postganglionik sempatik liflerden salıverilen noradrenalin esas olarak $\beta 1$ reseptörlere bağlanarak, depolardaki serotonin ve NAT'ın intrasellüler salıverilmesine neden olur. Nöronlarda ve pineal bezdeki biyokimyasal sinyallerin bu

döngüsü insanda melatonin anabolizmasını hızlandırır ve aynı zamanda melatoninin gün içi ritme bağlı olarak sentez ve salıverilmesini oluşturur (Reiter 1991).

Gece 20.00-23.00 arası yükselen melatonin düzeyi 01.00-05.00 arası doruk değerlere ulaşır ve gündüz düşer. Sağlıklı kişilerde plazma melatonin düzeyi gündüz 0-20 pg/ml, gece 20-200 pg/ml (ortalama 60-70 pg/ml) dir. Bir günde yaklaşık 30 mg (%80 i gece) melatonin üretilir (Şener 2010).

İlk çalışmalar sadece parlak ışığın (gün ışığı) melatonin düzeyini baskıladığını bildirirken, son bulgular yapay ışığın (karanlık periyottaki aydınlatma sistemi) da benzer etkiyi gösterdiğini ortaya koymuştur. Gece oluşturulan yapay aydınlık melatonin sentez ve salgılanmasını akut olarak baskılamak, akşam karanlığın başlamasıyla birlikte uygulanan ışık gece 02.00-04.00 arası görülen plazma melatonin konsantrasyon pikinde kaymaya, buna karşılık sabah henüz hava ağarmadan ışık uygulama ise bu konsantrasyon pikinin erken belirmesine neden olur (Claustrat ve ark 1998).

Suda kısmen ve lipidlerde yüksek oranda çözünen melatonin dolaşıma salıverildiğinde dokulara ve hücrelere kolaylıkla girebilmektedir. Melatonin esas olarak karaciğerde hidroksilasyonla metabolize edilir ve idrarla atılır (Şener 2010). Bunun yanında melatonin böbreklerde de metabolize olur (Özdemir ve ark 2014).

1.3.3. Melatonin Reseptörleri ve Etki Mekanizması

Melatonin suya göre lipid çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle hücrelere rahatça girebilmektedir. Bu nedenle etkileri sadece membrana yönelik değildir. Sulu ortamda kısmen çözünmesi de intrasellüler etkilerinin oluşmasına katkıda bulunur. Son çalışmalar melatoninin nukleusta yüksek konsantrasyonda bulunduğunu ve melatonin için spesifik bağlanma noktalarının olduğunu göstermiştir. Bu bulgulara göre melatoninin etkilerinin tiroid ve steroid hormonlara benzer şekilde, nukleustaki moleküler olaylarla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (Penev ve Zee 1997).

Melatoninin, ML1 (Melatonin-1 reseptörü) ve ML2 (Melatonin-2 reseptörü) olarak bilinen farklı farmakolojik ailelere ait membran bağımlı iki tip reseptörü tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda ML1 reseptörlerinin yüksek afiniteli ($K_d \sim 75 \text{pM}$) reseptörler olduğu, buna karşılık ML2 reseptörlerinin aynı melatonin agonistlerine düşük afinite gösterdiği belirlenmiştir (Jahovic ve ark 2003).

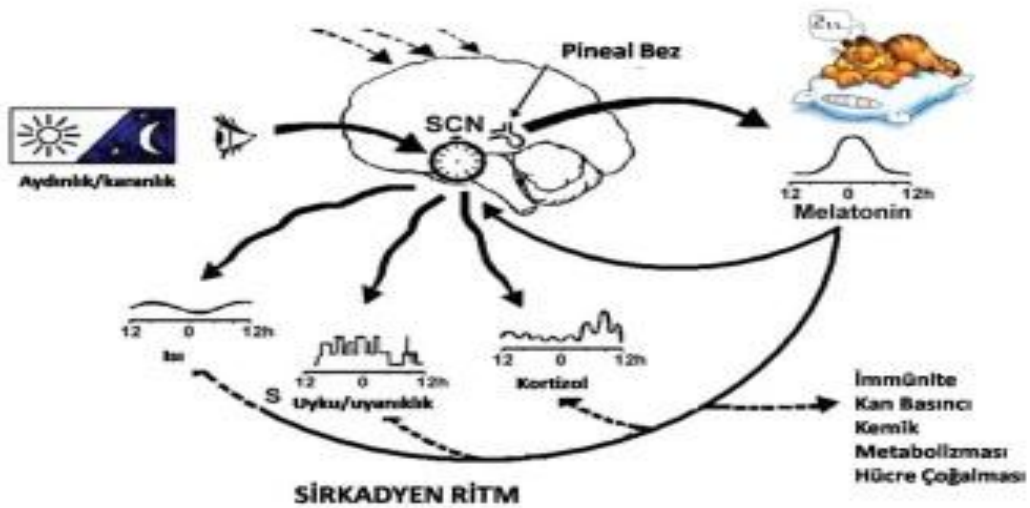
ML1 reseptörlerinin 3 alt tipi vardır: Mel1a, Mel1b ve Mel1c (Dubocovich ve ark 1997). ML1 reseptörleri serebellum, hipokampus dahil olmak üzere nöronal yerleşim göstermektedir. Ayrıca SCN, hipotalamus, talamus, preoptik alan, retinanın pleksiform tabakası ve serebral korteksin pek çok bölgesinde ML1 reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir (Reppert ve ark 1996). ML1 reseptörleri renal fonksiyon, uyku, sirkadiyen ritm, üreme ve serebral arter kontraktilesinden sorumludur (Song ve ark 1997).

ML2 reseptörlerinin memeli hücrelerinde spesifik dağılımı ve fizyolojik önemi henüz tam olarak açıklanamamıştır (Beyer ve ark 1998).

1.3.4. Melatoninin Fizyolojik ve Genel Etkileri

Melatonin fotoperiyod ile ilgili bilgiyi vücudun fizyolojisine aktararak sirkadiyen ritmin ve organizmanın fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynar. Melatonin sekresyonunun aydınlık/karanlık siklusu ile ilişkisi bu hormonu endojen bir senkronizör olarak düşündürmektedir (Arendt ve Skene 2005, Schulz ve Steimer 2009).

İnsanda birçok biyokimyasal, fizyolojik ve davranışsal değişkenlerde olduğu gibi plazmadaki melatonin düzeyleri de 24 saatlik periyod içinde düzenli iniş çıkışlar gösterir. Bu sirkadiyen ritm hipotalamusda SCN'deki santral pacemaker'lar tarafından kontrol edilir ve ritmin başlıca ayarlayıcısı dış ortamdaki aydınlık/karanlık siklusudur. Gece ışığa maruz kalındığında pineal fonksiyonlar akut olarak baskılanır (Liebmann ve ark 1997).



Şekil 3. 4. Melatoninin biyoritim düzenleyici rolü (Şener 2010).

Melatoninin immünojik rolüne ait ilk çalışmalar 1987 yılında yapılmıştır. Farelerin devamlı ışığa maruz kalması veya gece β -adrenerjik reseptör blokörlerinin uygulanması gibi melatonin oluşumunun inhibe edildiği şartlarda immün fonksiyonların baskılandığı görülmüştür. Sonraki çalışmalardan alınan sonuçlar melatoninin humoral ve hücreyel immün yanıtı artırdığını desteklemiştir. Melatoninin bu etkisi normal şartlarda belirgin değildir. Yaşlanma, viral hastalıklar, kortikosteroid kullanımı veya akut stres gibi immün sistemin baskılandığı durumlarda etki belirgin hale gelmektedir (Reiter ve ark 2000).

Melatoninin immunosupresyona karşı olan etkileri ya da immün fonksiyonları artırıcı etkileri T-helper lenfositlerdeki spesifik reseptörlere bağlanması ile ilişkilidir. Melatoninin bu reseptörlere bağlanması, gamma-interferon, IL-2 veya opioid peptidlerin salgılanmasını artırmaktadır. Melatonin-indüklü opioidler melatoninin hematopoetik etkisine aracılık etmektedirler. Tümörlü farelerde melatonin uygulaması, kan hücrelerini kemoterapötik ilaçların toksik etkilerinden korumuştur (Maestroni 1995).

Organ ve hücre transplantasyon başarısı büyük ölçüde greft reddini önlemeyi amaçlayan immunosupresif tedaviye bağlıdır. Ancak immunosüpresan tedavinin enfeksiyon ve malign etkileri vardır. Melatoninin ise viral ve bakteriyel enfeksiyonlarda çeşitli organlardaki fonksiyon bozukluklarına karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir. Greft reddinde serbest radikaller de önemli rol oynarlar. Melatoninin immün yanıt üzerindeki inhibitör etkisinin molekülün antioksidan etkisi ile ilişkili olması, melatonin uygulamasının organ transplantasyonunda yararlı olabileceğini düşündürür. Ayrıca toksisitesinin olmaması da bu ajanın transplantasyonda güvenle kullanılacak bir ajan olduğunu destekler (Reiter ve Maestroni 1999).

GI kanalda melatonin uniform bir dağılım göstermez, farklı bölümler farklı konsantrasyonlarda melatonin içerir. GI kanal melatoninini tamamen serotonin konsantrasyonu ile ilişkilidir ki, bu da GI kanalın pinealden bağımsız olarak melatonin ürettiğini desteklemiştir. Nitekim, pinealektomide GI kanal melatonin düzeyleri etkilenmemiştir (Konturek ve ark 2007).

GI kanalda çok yüksek konsantrasyonlarda bulunan melatonin özellikle enterokromafin hücrelerde (EC) (enteroendokrin hücreler, amine prekürsör uptake ve

dekarboksilasyon sistemi) lokalizedir. Melatonin sentez enzimi HIOMT ile prekürsörü serotonin, intestinal mukozanın EC hücrelerinde bulunmaktadır. Nitekim bu bulgular eşliğinde melatoninin sadece pineal orijinli olmadığı açıkça belirlenmiştir (Bubenik 2001).

Duodenumda melatoninin bikarbonat (HCO_3) sekresyonunu arttırıcı etkileri de mukozanın korunması açısından önemlidir. Çünkü duodenum mukozal hücrelerinden salınan HCO_3 , mideden duodenal lumene sagılanan HCl (hidrojen klorür) için koruyucu bir işleve sahiptir. Melatonin, duodenumda epitel hücreler üzerindeki reseptörler aracılığıyla HCO_3 sekresyonunu arttırmaktadır (Konturek ve ark 2004).

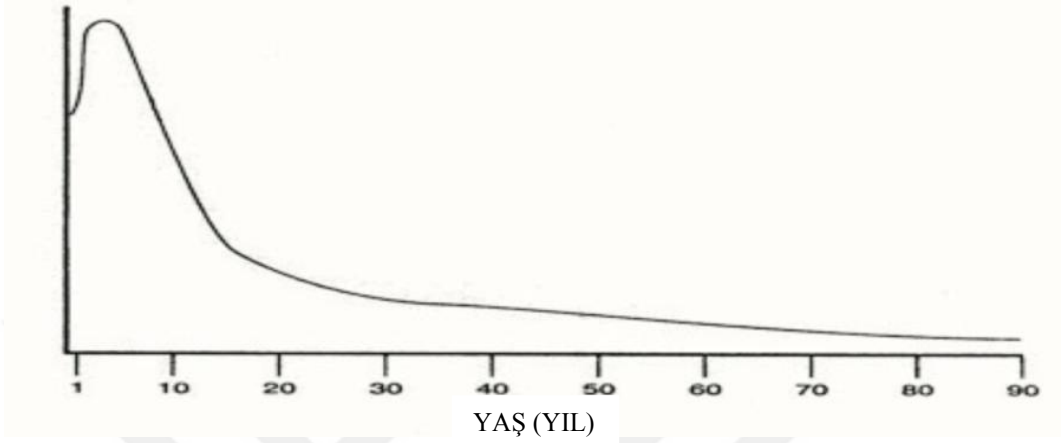
Son yıllarda elde edilen bulgular melatoninin kalp-damar sistemine etkilerinin reseptör ve non-reseptör aracılı olduğunu göstermiştir. Melatonin serebral arterlerde vazokonstriksiyona ve periferdeki damar yataklarında ise vazodilatasyona neden olmaktadır. Myokard infarktüs riski ve ani ölüm riski olan koroner kalp hastalarında melatonin düzeyleri düşük bulunmuştur. Koroner kalp hastalarında MI ve ani ölümlerin insidansında artış, bu hastalarda melatonin düzeylerinde görülen düşüş ile ilişkilendirilmiştir (Dubocovich ve Markowska 2005).

Melatoninin kardiyovasküler sistemde reseptör aracılı etkilerine ilave olarak non-reseptör etkileri de vardır. Yüksek kan basıncının neden olduğu özellikle kalp damar sistemindeki oksidan hasarda serbest radikallerin etkileri bilinmektedir (Campese 2010). Melatonin ayrıca antioksidan enzim aktivitelerini artırarak kalp damar sisteminde koruyucu bulunmuştur (Sener ve ark 2004). LDL kolesterol düzeyleri yüksek olan hipertansif hastalarda melatonin düzeyi düşüktür ve bu hastalarda melatonin uygulamasının kan basıncını düşürdüğü gösterilmiştir (Paulis ve Simko 2007).

Yaşlanma sürecinde organlarda ortaya çıkan anatomik ve işlevsel dejenerasyonun sebepleri arasında antioksidan kapasitenin azalması ile serbest radikallerin oluşturduğu hasardan da bahsedilmekte ve nedeninin yaşla birlikte azalan melatonin hormonu olduğu bildirilmektedir. Önemli bir hidroksil radikal toplayıcısı olan melatoninin yaşlanmayla birlikte kaybı, beyin dokusunun oksidatif saldırıya açık hale gelmesine neden olmaktadır ki, melatonin tedavisinin bu durumu engelleyebileceği bildirilmiştir. Yaşlanma ile pinealosit membranı üzerinde bulunan β -adrenerjik reseptör sayısındaki azalma, muhtemelen pineal bezdeki melatonin sentezinin azalmasına neden olmaktadır. Bilindiği

gibi β -adrenerjik reseptörler geceleri, pineal bez içine sempatik nöronlardan norepinefrin salgılanmasına aracılık ederek melatonin sentezinin artmasına neden olan bir dizi olayı başlatmaktadır (Mollaoğlu ve Özgüner 2005).

Melatonin seviyesi



Şekil 3. 5. Yaşlanmayla birlikte melatonin sentezinin azalması (Mollaoğlu ve Özgüner 2005).

1.3.5. Melatoninin Antioksidan Etkileri

Melatonin hidroksil ve peroksil radikallerinin güçlü süpürücüsüdür. Peroksil radikalini süpürücü etkisinin E vitamininden daha düşük olması dolayısıyla lipoperoksil radikaline karşı daha az nötrale edici etkisinin bulunduğu bildirilmiştir (Reiter ve ark 2000).

Melatonin ayrıca inflamasyon reaksiyonları sırasında makrofajların aktivasyonu ile oluşan ve toksik bir oksijen türevi olan hipokloröz asit (HOCl)'e karşı da süpürücü etki göstermektedir. Ancak melatoninin hidrojen peroksit (H_2O_2) ve O_2^- radikalleri üzerine direkt süpürücü etkisi zayıftır. Melatoninin H_2O_2 ile reaksiyonu sonucu N1-asetil-N2-formil-5-metoksi knüramin (AFMK) olduğu, AFMK'nın ise katalazla N1-asetil-5-metoksi knüramine dönüştürüldüğü ve antioksidan etkiye sahip bu metabolitlerin melatoninin süpürücü etkisini artırdığı bildirilmiştir (Reiter ve ark 2007).

Antioksidan savunma sistemi ile ilişkili diğer bir enzim sitokrom P450 enzimidir. Bu enzim ksenobiyotik metabolizması aracılığı ile serbest radikal oluşumunu artırır. Melatoninin sitokrom P450 aktivitesini azaltarak serbest radikal oluşumunu ve dolayısı ile oksidatif hasarı azalttığı gösterilmiştir (Reiter ve ark 2009).

Melatonin fizyolojik konsantrasyonlarda serebellumda nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesini baskılayarak nöral ve kardiyovasküler fonksiyonların fizyolojik düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bu işlev melatoninin serbest radikal oluşumunu önleyici etkisiyle sağlanmaktadır. Nitrik oksit (NO) tek başına bir serbest radikaldir ve O₂-varlığında peroksinitrit (ONOO-) oluşumunu artırır. Melatonin ile NOS aktivitesinin baskılanması, NO oluşumunu azaltarak bu yolak üzerinden oksidatif hasarı azaltmaktadır (Reiter ve ark 2009).

Melatoninin serbest radikaller üzerindeki süpürücü etkisi onun aynı zamanda güçlü bir antiinflamatuvar ajan olduğunu da açıklamaktadır. İnflamasyonun uyarılmasıyla doku hasarına giden yolak üzerinde çeşitli kademelerde melatonin ile blokaj bu ajana antiinflamatuvar ve doku koruyucu etki sağlamaktadır. Çeşitli inflamasyon modellerinde (yanık hasarı, sepsis, iskemi/reperfüzyon gibi) nötrofil aktivasyonunun dokularda neden olduğu oksidan hasarları, melatonin anlamlı olarak geri çevirmiştir (Kacmaz ve ark 2005).

1.3.6. Melatonin ve Uyku İlişkisi

Uyku, insanlar için vazgeçilmezdir. Uykunun düzenlenmesinde anahtar mekanizma, aydınlık-karanlık döngüsü olup, ışığa maruziyet, retinadan beyindeki hipotalamik alana kadar uzanan bir sinir yolunun uyarılmasına yol açar. Hipotalamik alanda bulunan suprakiazmatik çekirdek, beynin diğer alanlarına giden hormonları, vücut ısısını, uyku veya uyanıklık hissini kontrol eden sinyalleri başlatarak tüm vücudu etkileyen aktivitelerin düzenlenmesinden sorumlu “biyolojik saat” gibi çalışır (Macchi ve Bruce 2004). Karanlık saatler gelinceye kadar uyku ile ilişkili melatonin benzeri hormonların salınımı pineal bezin inaktif olması dolayısıyla baskılanır. Güneş ışınları kaybolunca suprakiazmatik çekirdek tarafından oluşturulan melatonin salınımını baskılayıcı sinyaller ortadan kalktığından pineal bez uyarılır ve melatonin üretimi başlar. Melatonin düzeyleri arttıkça daha az uyarı algılanmaya başlanır ve uyku hissi artar (Arendt 2000).

Amerikada yaklaşık 45 milyon kişi gece uykusuzluğu (uyku mahrumiyeti) çekmektedir. “Uyku mahrumiyeti” gerek neden olduğu hastalıklar, gerekse yaşam şartlarını etkileme yönüyle maddi ve manevi anlamda olumsuzluklara sebep olmaktadır. Yapılan pek çok çalışmada bu durumun en önemli nedenlerinden birinin de endojen melatonin sekresyonunun baskılanması olduğu belirtilmiştir.

Özetle melatoninin uykuyu indüklediği, uykuya dalış süresini kısalttığı ve uyku kalitesini arttırdığı söylenebilir (Ferguson ve ark 2010).

1.3.7. Melatoninin SSS ile Nörodejeneratif Olaylara Etkileri

Yaşlanma ile birlikte sinir sistemindeki gerileme fizyolojik yaşlanma ve nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olup en iyi gösterge hafıza ve kognitif fonksiyonlarda kayıplardır. Serbest radikallerin yaşlanma ile ilişkisi günümüzün en güncel konularındandır. Beyin dokusunun oksidatif hasara oldukça duyarlı olması, yaşlanma ile birlikte oksidatif hasar birikimi ve inflamasyon gelişimi, melatonin tedavisinin yaşa bağlı SSS fonksiyonlarındaki değişime karşı koruyucu olabileceğini düşündürmüştür. Yaşlı hayvanlarda yapılan bir çalışmada melatoninin nörojenezi artırdığı belirlenmiştir (Tresguerres ve ark 2008).

Nörodejeneratif hastalıklar beyinde yaygın bir hasar oluşmadan teşhis edilememektedir. Örneğin Parkinson hastalarında teşhis konulduğunda substantia nigradaki dopaminerjik nöronların %75'i kaybedilmiştir. Melatonin sekresyonu yaşa bağlı olarak azalma gösterdiğinden, yaşlanma ile birlikte nöronal apoptozda artış muhtemel gözükmemektedir. Tüm bunlar göz önüne alındığında orta yaşlardan itibaren melatonin kullanımının, nöronal kayıp hızını azaltmada olumlu etkisi olacağı düşünülmektedir.

Diğer taraftan melatoninin lipofilik yapısı sayesinde kan-beyin bariyerini kolayca geçebilmesi ve ayrıca farmakolojik dozlarının hayvanlarda tüm yaşam süresince ya da insanlarda uzun periyodlarla uygulanmasının herhangi bir toksisiteye ya da pro-oksidan etkiye neden olmadığını gösterilmiş olması bu hormonun güvenle kullanılabilirliğini desteklemektedir (Wang 2009).

Yapılan bir çalışmada melatoninin, subaraknoid kanamaya bağlı beyindeki oksidatif hasarı önlediği, nörolojik skorlarda iyileşme yaptığı ve kan-beyin bariyerini koruduğu gösterilmiştir (Ersahin ve ark 2009).

Melatonin reseptörlerinin serebral arterlerde varlığının gösterilmesi, melatonin uygulamasının insanda ve deneysel hipertansif sıçanlarda kan basıncını düşürmesi, melatoninin arter düz kaslarını gevşetmesi, hepsi birlikte melatoninin serebral kan akımını değiştirebileceğini ve böylelikle migren gibi baş ağrısıyla seyreden hastalıklarda faydalı olabileceğini düşündürmektedir (Bubenik ve ark 1998).

1.4. Glimfatik Sistem

Lenfatik damar sistemi, ekstrasellüler sıvıyı kan akımına geri getirir. İnsan vücudunda kan damarlarına ek olarak endotelyumun döşediği, doku aralıklarından gelen sıvıyı toplayarak kan dolaşımına ileten ince duvarlı kanallardan oluşan bir sistem vardır. Bu sıvıya lenf sıvısı denir ve kanın aksine dolaşımı tek yönlü olarak kalbe doğrudur. Merkezi sinir sistemi ve kemik iliği gibi ayrıcalık taşıyanlar dışında lenfatik sistem hemen tüm organlarda bulunur (Junqueira ve Carneiro 2009).

Lenfatik damarlar, kan damarlarına paralel olarak, ikinci bir dolaşımı temsil ederler ve interstisyel sıvının protein bileşenleri ile postkapiller venüllere absorbe olmayan diğer çözünen maddelerin temizlenmesine aracılık ederler (Aukland ve Reed 1993). Çoğu vaskülarize dokuda, lenfatik sistem hem hidrostatik hem de homeostatik dengenin sağlanması açısından önemlidir. Buna karşın, beyinde histolojik olarak tanımlanabilen lenfatik damar bulunmaz. Dolayısıyla diğer periferik dokularda olduğu gibi, interstisyel maddelerin temizlenmesini sağlayan lenfatik bir yola sahip değildir (Abbott 2004). Bu durum oldukça şaşırtıcıdır, çünkü yüksek bir metabolik hıza sahip olan beyinde, ekstrasellüler çevredeki değişimlere aşırı duyarlı olan nöronlar ve gliaların varlığı, interstisyel sıvı ile çözünen maddelerin hızlı bir şekilde temizlenmesini gerektirmektedir (Ilf ve ark 2012).

Beyinde bilinen herhangi bir lenfatik dolaşım olmadığı için, burada bulunan ekstrasellüler proteinleri temizleyen alternatif bir mekanizmaya ihtiyaç vardır. Beyinde yer alan ekstrasellüler çözünen maddelere yataklık eden beyin omurilik sıvısına, çözünen maddelerin beyin parankimindeki interstisyel aralıktan nasıl geçtiği açık değildir.

Subaraknoid BOS'un önemli bir bölümünün beyin parankimine geçtiği kanıtlanmıştır. Flöresan maddeler kullanılarak yapılan two-foton görüntüleme tekniği ile BOS'un, beyin parankimine penetran arterleri çevreleyen perivasküler aralıklar boyunca girdiği ve daha sonra paravenöz aralığa geçtiği görülmüştür. Beyin interstisyel sıvısındaki çözünen maddelerin, paravenöz aralıktaki BOS'a geçmek suretiyle temizlendiği gösterilmiştir.

Astrositlerde bulunan bir su kanalı olan AQP4'ten yoksun olan hayvanlarda, BOS akışının yavaşladığı ve interstisyel çözünen maddelerin beyin parankiminden

temizlenmesinde %70'lik bir düşüş yaşandığı görülmüştür. Bu durum beyindeki ekstraselüler maddelerin temizlenmesinde, astrositik AQP4 su kanallarının önemli bir işlevi olduğunu ortaya koymuştur. Alzheimer hastalığında patojen olduğu bilinen β amiloid proteininin, bu yolla temizlendiği bilinmektedir.

Yapılan bir çalışmada AQP4 geninin delesyona uğradığı ratlarda, flöresan maddeyle işaretlenen β amiloid'in, beyin parankiminden temizlenmesinde baskılanma olduğunun görülmesi, bu bilgiyi desteklemiştir. Beyin için toksik veya ihtiyaç fazlası olan diğer ekstraselüler proteinlerin birikimi de, beyin parankimindeki paravenöz yol aracılığıyla önlenmektedir (Iliff ve ark 2012).

1.4.1. Glimfatik Sistemin Tanımı ve Etki Mekanizmaları

β -amiloid (Cirrito ve ark 2005), a-sinüklein (Larson ve ark 2012) ve tau (Yamada ve ark 2011) gibi nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olan proteinler, beyin hücrelerini çevreleyen interstisyel aralıkta bulunurlar. Periferik dokuda lenf damarları, fazlalık olan interstisyel proteinleri, genel dolaşım yoluyla, karaciğere parçalamak amacıyla getirir (Aukland ve Reed 1993). Nöronların hem yüksek bir metabolik hıza sahip olması, hem de toksik atık ürünlere karşı duyarlı olmasına rağmen, beyinde bu durumu tolere edebilecek lenfatik sistem bulunmamaktadır. Bunun yerine, beyin parankiminde dolaşarak, β amiloid gibi zaman içinde biriken birtakım interstisyel proteinleri, interstisyel sıvıdan alan beyin omurilik sıvısı (BOS) bulunur. BOS ve interstisyel sıvı arasındaki madde alış veriş serebral damarlar etrafında gerçekleşir. Bu iki kompartman arasındaki madde alış veriş, hem astrositik AQP4 su kanallarının varlığına bağlı olarak, hem de periferik lenfatik sistem yoluyla gerçekleşen interstisyel metabolik ürünlerin atılma işlevine benzerlik (homolog) gösterdiği için glimfatik sistem olarak adlandırılmıştır (Iliff ve ark 2012).

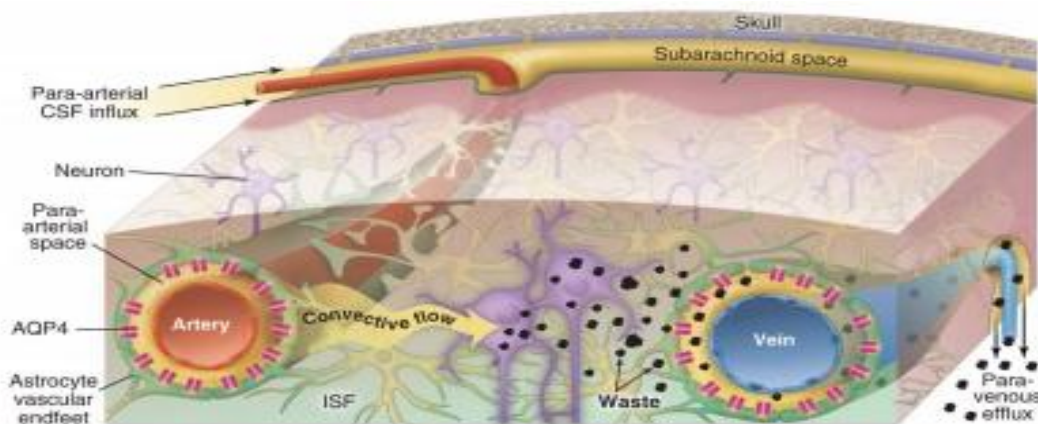
MSS'deki beyin omurilik sıvısının, beyinde yer alan çözülmüş maddelerin temizlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Koroid pleksusta oluşan BOS, serebral ventriküller ile subaraknoid aralık boyunca akar ve en son araknoid villuslar aracılığıyla, dural venöz sinüslerine boşaltılarak, kan dolaşımına geri emilir (Koh ve ark 2005). İnterstisyel çözünen maddelerin, beyin interstisyel sıvısından, BOS'a doğru gerçekleşen konvektif madde akışı ile temizlendiği düşünülmektedir (Sykova ve Nicholson 2008).

Yapılan in vivo two-foton görüntüleme teknikleriyle, subaraknoid BOS'un, beyin parankimine olan akışı gösterilmiştir. BOS'un, subaraknoid kompartmandan beyin parankimine geçişini göstermek için, sisterna magna'ya flöresan ve radyoaktif olarak işaretlenmiş madde verilmiştir. Enjeksiyondan 30 dakika sonra, enjekte edilen maddelerin beyin parankimindeki perivasküler aralıklar boyunca yayıldığı görülmüştür.

BOS'un, ventriküler kompartmandan beyin parankimine geçişini göstermek için, anestezi altındaki farelerin lateral ventrikülüne flöresan madde verilmiştir. 30 dakikalık infüzyon sonrası flöresan görüntüleme tekniği ile flöresan maddelerin ventrikülü çevreleyen ependimadan, beyin parankimine olan hareketi gözlenmiştir (Ilf ve ark 2012).

Dolayısıyla bu konuda yapılan çalışmalar, hem ventriküler, hem de subaraknoid BOS'un, farklı zaman ve miktarlarda da olsa, beyin parankimine geçip, perivasküler aralıklar boyunca yayıldığını ortaya koymaktadır. Perivasküler astrositik son ayaklar ise sahip olduğu AQP4 kanalları aracılığıyla, paravenöz BOS ile beyin interstisyumu arasında seçici bir geçirgenlik sağlamaktadır. Bu şekilde su ve düşük ağırlıklı moleküller iki kompartman arasında geçiş yapabilirken; yüksek ağırlıklı moleküller geçiş yapamazlar (Mathiisen ve ark 2010).

Subaraknoid aralıktaki BOS'un, beyin parankimine periarteriyel aralık boyunca girmektedir. Daha sonra interstisyel sıvıyla karışan BOS'un, konvektif akışı sırasında, interstisyel sıvıda biriken metabolik atık ürünleri alarak, paravenöz aralığa geçmektedir. Atık ürünlerin, paravenöz aralığa geçişini astrositik AQP4 kanallarının kolaylaştırdığı bir yolla gerçekleşmektedir (Şekil 4.1.) (Nedergaard 2013).



Şekil 4. 1. Subaraknoid aralıktaki BOS'un, beyin parankimindeki ilerleyişi (Nedergaard 2013).

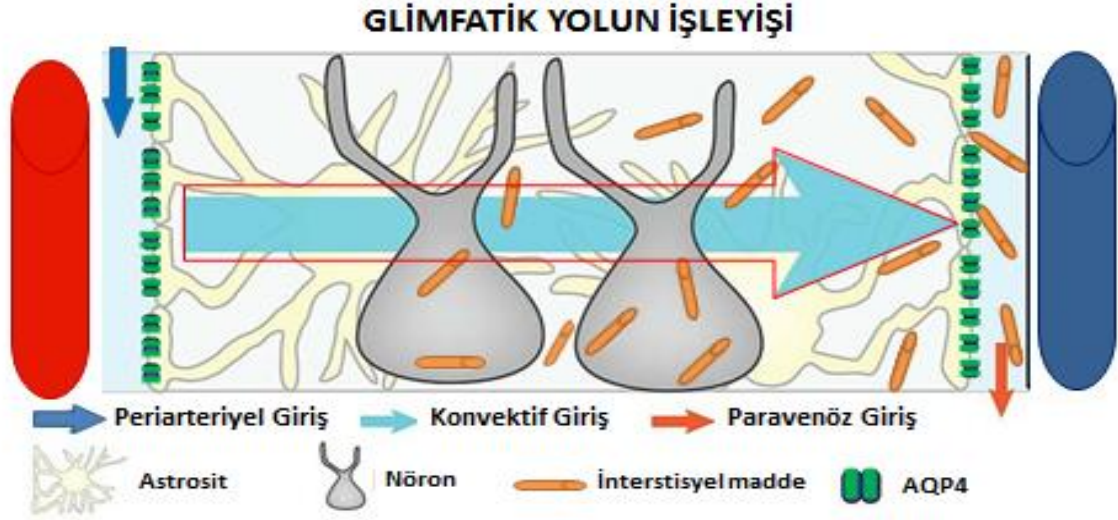
Subaraknoid BOS'un, beyin parankimine olan akışı in vivo görüntüleme teknikleriyle gösterilmiştir, ancak bu yöntemle beynin derinliklerindeki BOS akışını takip etmek mümkün değildir. Bu sorunu aşmak için ex vivo görüntüleme teknikleri kullanılmıştır. Bu teknikte işaretlenmiş madde olarak, BOS'a verilen Alexa Fluor ile bağlanmış ovalbumin aracılığıyla, beyin parankimindeki perivasküler aralıklarda BOS akışı ve klirens izlenmiştir. İşaretlenmiş maddenin intrasisternal enjeksiyonu sonrası, bu madde periarteriyel aralıklarda erken evrelerde (10 dakikadan kısa) gözlenirken, paravenöz aralıklarda daha ileri evrelerde (1 saatten fazla) gözlenmiştir. BOS'da yer alan işaretlenmiş madde, beyin parankimini iki temel yol aracılığıyla terk eder. Bunlar: internal serebral venler ile caudal rhinal venler. Yapılan bütün bu çalışmalar, beyin parankimindeki BOS ile interstisyel sıvı arasındaki madde alışverişi ve temizlenmenin, aynı paravenöz drenaj yolları boyunca gerçekleştiğini desteklemektedir (Iliff ve ark 2012).

Astroglial AQP4 su kanallarının lokalizasyonu perivasküler son ayaklarda yoğundur. Astrositik AQP4 su kanallarının, perivasküler aralıklardaki BOS ile beyin interstisyumu arasında düşük dirençli yollar oluşturarak, sıvı hareketliliğini sağladığı düşünülmektedir. Bu sayede beyin parankiminde biriken interstisyel çözünen maddelerde ortamdaki uzaklaştırılmaktadır (Abbott 2004).

Yapılan bir çalışmada radyoaktif olarak işaretlenmiş mannitolün beyin interstisyumundan klirensi, AQP4 geni delesyona uğramış farelerde, uğramamış olanlara göre %70 daha düşük bulunmuştur. Hatta işaretli dekstran (mannitolden 55 kat daha büyük hacme sahip) ile yapılan benzer çalışmada da aynı sonuçların alınması, interstisyel sıvının klirensinde, astrositik AQP4 su kanallarının, difüzyona göre daha önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Sykova ve Nicholson 2008).

Özetle BOS, beyin parankimine önce periarteriyel aralıklar boyunca girer ve daha sonra beyin parankimindeki interstisyel sıvıyla karıştıktan sonra, paravenöz aralığa gelir. İnterstisyel sıvıyla karışan BOS, interstisyel sıvıdan ekstrasellüler proteinleri alarak, beynin ihtiyaç fazlası olan maddelerden temizlenmesine aracılık eder. BOS aracılığıyla temizlenen bu ekstrasellüler proteinler, astrositik AQP4 kanallarının kolaylaştırdığı bir yolla paravenöz aralığa geçiş yapar. Paravenöz aralığa geçen BOS'daki ekstrasellüler

proteinler; kan dolaşımı, subaraknoid aralık veya drene olan ven duvarlarını takip ederek servikal lenfatiklere ulaşmak suretiyle ortamdaki uzaklaştırılır (Şekil 4.2.).



Şekil 4. 2. Glimfatik sistemin işleyişi (Illif ve ark 2012’den modifiye edilerek çizilmiştir).

1.4.2. Uyku-uyanıklık Döngüsü ve Beyin Klirensine Olan Etkisi

Tüm hayvan türleri arasında uykunun varlığı, uykunun hayati bir işlevi olduğunu düşündürür. Uyku, metabolik homeostazın sağlanmasında kritik bir göreve sahiptir. Uzun yıllardır çalışılmasına rağmen, biyolojide en büyük gizemlerden biri, uyku beyinde onarıcı etki gösterirken; uykusuzluğun beyin fonksiyonlarını bozucu etki göstermesidir (Hobson 2005, Saper ve ark 2010). Uyku yoksunluğu öğrenmeyi azaltır, bilişsel testlerde performansı düşürür, reaksiyon süresini uzatır ve nöbetlerin yaygın bir nedenidir (Stickgold 2006). Kesintisiz uyku yoksunluğu, günler ila haftalar arasında, kemirgenlerde ve sineklerde ölüme yol açmaktadır (Shaw ve ark 2002). İnsanlarda, fatal (ölümcül) ailesel veya sporadik uykusuzluk giderek kötüleşen bir durum olup, aylar ya da yıllar içinde demans ve ölümle sonuçlanmaktadır (Montagna ve ark 2003).

Canlı farelerde tetrametilamonyum difüzyonunun gerçek zamanlı değerlendirmeleri ile two-foton görüntüleme tekniği kullanılarak yapılan çalışmalarda, doğal uyku veya anestezinin, interstisyel aralıkta %60 artış ile bağlantılı olduğu ve bu durumun interstisyel sıvı ile beyin omurilik sıvısı arasındaki madde alışverişinde artışa neden olduğu görülmüştür. Örneğin uyku sırasında, interstisyel sıvıda yer alan β amiloid’in klirens oranı

artmıştır. Dolayısıyla uyku, uyanık zamanlarda santral sinir sisteminde biriken potansiyel olarak nörotoksik atık ürünlerin uzaklaştırılmasını artırmaktadır (Xie ve ark 2013).

β amiloid'in interstisyel konsantrasyonu, uyanık olan kemirgenler ve insanlarda, uyuyanlara göre daha yüksektir. Dolayısıyla uyanıklığın, yüksek β amiloid seviyesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Kang ve ark 2009).

β amiloid klirensinin uyku esnasında artışı ve uyku-uyanıklık döngüsünün glimfatik klirens üzerinde olan düzenleyici etkisi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, beyin içerisindeki BOS akışının, uyku, uyanıklık ve anestezi gibi farklı parametrelerde nasıl olduğu karşılaştırılmıştır. Bunun için in vivo two fotonlu görüntüleme tekniği kullanılmıştır. Floresan madde kullanılarak yapılan çalışmanın neticesinde, hem doğal yolla uyuyan farelerde, hem de anestezi altındaki farelerde, glimfatik BOS akışının, uyanık farelere göre çok daha fazla olduğu görülmüştür (Iliff ve ark 2012).

BOS akışı, arteriyel nabız dalgaları (pulsasyon) aracılığıyla, periarteriyel aralıklar boyunca gerçekleşir. Arteriyel pulsasyondaki diüurnal dalgalanmaların, uyanıklık sırasındaki konvansiyonel BOS akışının bastırılmasından sorumlu olması muhtemel değildir. Çünkü arteriyel kan basıncı fiziksel aktivite esnasında daha yüksektir. Alternatif bir olasılık uyanık beyinde görülen, interstisyel alan hacmindeki azalma bilgisiyle ilişkilendirilebilir. Çünkü interstisyel alan hacmindeki daralma, konvektif sıvı hareketine olan direnci artırır. Böylece bu alandaki BOS akışı da yavaşlamış olur. Bu olasılık uyuyan bireylerdeki BOS akışının, uyanık bireylere göre neden daha hızlı olduğunu açıklar (Xie ve ark 2013).

Yapılan bir çalışmada beyin parankimindeki β amiloid'in %65 kadarının glimfatik sistem aracılığıyla temizlendiğini göstermiştir. Bu temizlenmenin uyku sırasında, uyanıklık durumuna göre iki kat daha fazla olduğu gözlenmiştir. Anestezi altındaki farelerde de, aynı uyku halindeki farelerde olduğu gibi glimfatik akım daha etkin bulunmuştur. Bu durum interstisyel aralık hacmindeki değişikliğin, sirkadiyen ritme bağlı olmadığını gösterir. Bunun yerine uyku-uyanıklık halinin bizzat kendisi interstisyel aralık hacminin derecesini belirler. Uyku ve uyanıklık zamanlarında görülen adrenerjik sinyalizasyon farkı, hücre hacmiyle birlikte interstisyel aralık hacmindeki değişimin nedenini açıklar. Dolayısıyla adrenerjik sinyalizasyon sadece kortikal nöral aktivitede görev almaz, aynı zamanda

interstisyel aralık hacminin ayarlanmasında da rol oynar. Uyanık farelere verilen adrenerjik antagonistler sonrası, glimfatik sistemdeki etkinliğin, uyuyan farelerdekine benzer çıkması bu bilgiyi destekler. İnterstisyel aralık hacmindeki bu değişkenliğe bağlı olarak da, maddelerin glimfatik yolla temizlenme miktarı değişir (Xie ve ark 2013).

Nöronların bulunduğu çevreye olan yüksek hassasiyetinden dolayı, atık moleküllerin beyin interstisyel aralığından hızlı ve etkin bir şekilde uzaklaştırılması önemlidir. Örneğin β amiloid gibi atık ürünlerin beyin parankiminden yeterince temizlenememesi irreversibl nöronal hasara yol açar. Beyinde gerçekleşen biyolojik aktivitelerin neticesinde, metabolik yıkım ürünlerinin oluşumu kaçınılmazdır. Bu toksik yıkım ürünlerinin atılmasında, uyku önemlidir. Çünkü yapılan çalışmalar, uyku sırasında kortikal interstisyel aralık miktarının %60 kadar arttığını göstermiştir. Bu artışa bağlı olarak da, interstisyel aralıktan temizlenen toksik madde miktarı artar (Xie ve ark 2013). Dolayısıyla bütün bu bilgilere dayanarak, uyanık dönemlerde daha fazla biriken metabolik atık ürünlerin, uyku sırasında daha etkin bir şekilde temizlendiği söylenebilir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Deney Gruplarının Belirlenmesi

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilen, Wistar Albino cinsi erişkin dişi sıçanlar üzerinde aynı merkezde gerçekleştirilmiştir. Toplam 21 adet sıçan kullanılan araştırmada gruplar üçe ayrılmıştır.

Grup 1, Kısa Fotoperiyod (KF) Grubu: 4 hafta süreyle, 8 saat aydınlık, 16 saat karanlık ortamda tutuldu (n:7).

Grup 2, Uzun Fotoperiyod (UF) Grubu: 4 hafta süreyle, 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ortamda tutuldu (n:7).

Grup 3, Uzun Fotoperiyod (UF) + Melatonin (Mel) Grubu: 4 hafta süreyle, 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ortamda tutuldu ve 4 mg/kg/gün deri altı melatonin uygulandı (n:7).

2.2. Deneysel Uygulamalar

2.2.1. Fotoperiyod Uygulaması

Kısa fotoperiyoda maruz kalan sıçanlar 8 saat aydınlık, 16 saat karanlık ortamda tutuldu. Uzun fotoperiyoda maruz kalan sıçanlar ise 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık ortamda tutuldu. Fotoperiyod uygulaması 4 hafta süreyle aynı saat aralıklarında gerçekleştirildi.

2.2.2. Melatonin Uygulaması

Ticari olarak temin edilen melatoninin (Sigma M-5250) 40 mg'ı 3 ml saf etanolde çözüldükten sonra bu süspansiyon (stok solüsyonu) karanlıkta ve ağzı kapalı olarak kullanma zamanına kadar buzlukta bekletildi. Stok solüsyonundan 0.1 ml alınıp, üzerine 0.9 ml serum fizyolojik konularak (4 mg/kg/gün) sabah saat 10.00'da ratlara deri altı olarak enjekte edildi. Melatonin uygulaması 4 hafta süreyle her gün aynı saatlerde gerçekleştirildi.

2.2.3. Cerrahi İşlemlerin Yapılması

Hayvanlar yeterli genişlikteki kafeslerde, farklı fotoperiyod döngüsü içinde, 22± 1°C sıcaklık ve %50-60 nem olan standart laboratuvar koşullarında, standart sıçan diyeti ve

sınırsız su ulaşımı sağlanarak barındırıldı. 4. hafta sonunda her deney grubuna ait sıçanların genel anestezi (ketamine+ksilazin; sırasıyla, 50 mg/kg ve 5 mg/kg, i.p.) altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Beyin dokusu çıkarılıp, beyin ventriküllerini içine alacak şekilde dilimlendi. Alınan doku parçaları rutin H&E boyama ve immunohistokimyasal incelemeler için bekletilmeden %4'lük paraformaldehit içerisinde alındı.



Şekil 2. 1. Çalışmada kullanılan cerrahi donanım.

2.3. Değerlendirme Yöntemleri

Sıçanlardan alınan beyin dokularına ait örnekler tespit (fiksasyon) için, cerrahi işlemi takiben PBS tamponunda taze hazırlanmış %4'lük paraformaldehit içerisinde (+4⁰C) alındı. En az 24 saatlik tespit işlemi sonrası dokular %30'luk sükröz solüsyonuna alındı. Dokuların yeterli sükröz doygunluğuna ulaştığı (dibe çökerek) kontrol edildikten sonra kriyostat cihazı yardımıyla 5 µm kalınlığındaki kesitler pozitif şarjlı lamlar üzerine alındı. Her bir preparattan birer örnek genel histolojik değerlendirme için rutin Hematoksilen&Eosin (H&E) ile boyandı. Diğer preparatlar ise immunohistokimyasal yöntemlerle boyandı.

Tüm ince preparatlar Olympus BX ışık mikroskobu ile incelendi. İncelenen örnekler Olympus DP 72 ile dijital olarak görüntülendi. Her örnek için mümkün olduğunca

aynı alanlarda inceleme ve fotoğraflama işlemi uygulandı. HE ile boyanmış örnekler genel histopatolojik değerlendirmeye tabi tutuldu.

İmmünohistokimyasal olarak işaretlenmiş preparatalara ait görüntü yazılımı ile değerlendirilen resimlerde immün işaretlenme yoğunluğu semikantitatif olarak (0, +3 arası) skorlanıp, hesaplamaları yapıldı.

Rutin H&E boyama ile immünohistokimyasal prosedürler özetle şu şekilde yapıldı.

2.3.1. Rutin Hematoksilen&Eosin (H&E) ile Boyama Yöntemi

Boyama yöntemi sırasıyla şu şekildedir:

I- Deney gruplarından alınan kriyostat kesitleri -20 derecedeki metanolde 10 dakika bekletildi (kesitler lama sabitlendi).

II- 1 dakika suda yıkandıktan sonra, Harris hematoksilen’de 2 dakika boyandı (hücre nükleusu) ve 2x1 dakika suda yıkandılar.

III- %1 Amonyak-su karışımına batırılıp (nükleusun mavi rengi parlaklaştırıldı), tekrar 1 dakika suda yıkandı.

IV- Lamalar 3 dakika eozinde bekletilip (sitoplazmaları boyandı) artan dereceli alkol serilerinden geçirildi (%50, %70, %80, %96, %100).

V- Her bir kesit, 2x1 dakika ksilole alınarak, hücreler şeffaflandırıldı.

VI- Kesitler entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

VII- Kuruması beklenerek mikroskopta incelendi.

2.3.2. Frozen Kesitte İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi

Çalışmada kriyostat cihazı (Shandon Scientific Cryotome SME) ile 5 mikron kalınlığında aldığımız kesitlere tüm gruplar için vimentin (SantaCruz sc-5565), ML1 reseptör (SantaCruz sc-30017) ve aquaporin 4 (SantaCruz sc-9888) antikoları kullanılarak, aşağıda verilen işlem basamakları ile, immunohistokimyasal yöntemlerle boyandı.

I- Deney gruplarından alınan kriyostat kesitleri -20 derecedeki Metanolde 10 dakika bekletildi (kesitler lama sabitlendi).

II- 1 dakika suda yıkandıktan sonra antijen maskesini kaldırmak için 1/10 Dilue Citrat Buffer (AP-9003-999 Thermo Scientific) mikrodalga ile uygulandı.

III- Distile su ile yıkama aşamasından sonra 10 dakika %3'lük hidrojen peroksit (TA-125-HP ThermoScientific) ile etkin bırakılan dokularda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi.

IV- PBS ile yıkanan kesitlerde 20 dakika protein bloke (TA-125-PBQ ThermoScientific) edildi.

V- 60 dakika nemli ortamda primer antikolar ile inkübe edildi.

VI- Amplifier Quanto (TL-125-QPB ThermoScientific) ile 20 dakika bekletildi (sinyal artırılarak sekonder antikora bağlanma kuvvetlendirildi).

VII- HRP Polymer Quanto (TL-125-QPH ThermoScientific) ile 30 dakika bekletildi (antijen-antikor bağlanması, kromojene bağlandı).

VII- Her aşamada PBS ile dikkatle yıkama yapıldı ve pozitif hücreleri belirleyebilmek için DAB ile boyama yapıldı.

VII- Zemin boyaması için 1 dakika süreyle hematoksilin uygulandı.

VIII- Boyanan kesitler artan alkol serilerinden geçirilerek suyu alındıktan sonra, 5 dakika şeffaflaştırmak için ksilolde bekletildi ve entellan ile kapatılarak mikroskopta incelendi.

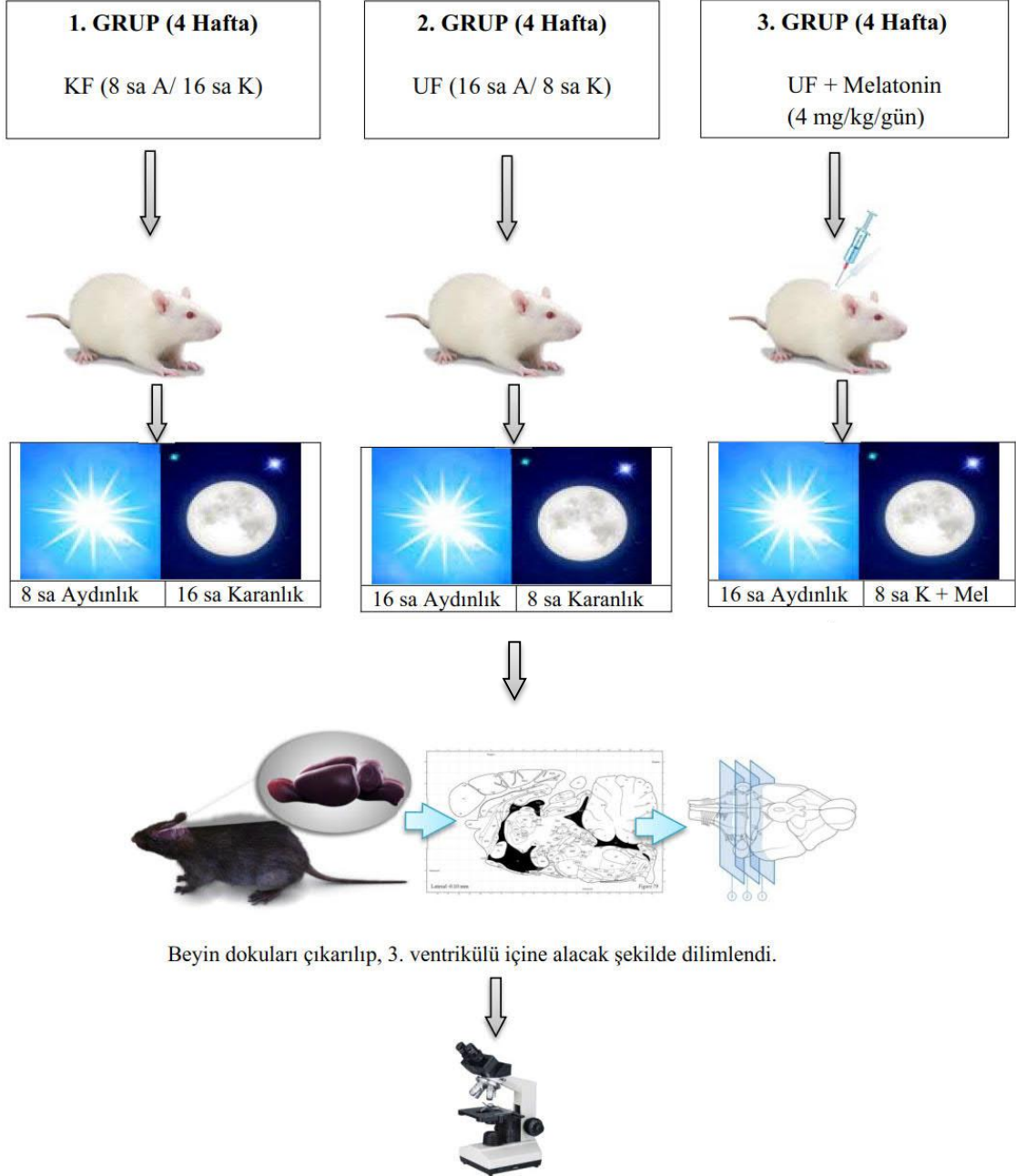
2.3.3. Histomorfolojik analiz

İmmünohistokimyasal yöntemlerle boyanan preparatalara ait görüntülerin bilgisayar ortamında fotoğraf çekimleri yapıldı. 40X'lık objektif büyütmesi ile elde edilen dijital resimlerin monitör üzerindeki immun işaretlenme yoğunluğu semikantitatif olarak skorlanıp (0, +3 arası), hesaplandı. Çıkan sonuçların istatistiksel analizleri yapıldı.

2.3.4. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için; oluşturulan gruplar arasındaki immunohistokimyasal boyanma dereceleri Ki-kare Testi kullanılarak yapılmıştır. $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEMİN ŞEMATİK ÖZETİ



Beyin dokusundan alınan kesitler, immunohistokimyasal olarak boyanıp mikroskopta incelendi ve immun işaretlenme yoğunluğu semikantitatif olarak (0, +3 arası) skorlanıp, hesaplamaları yapıldı.

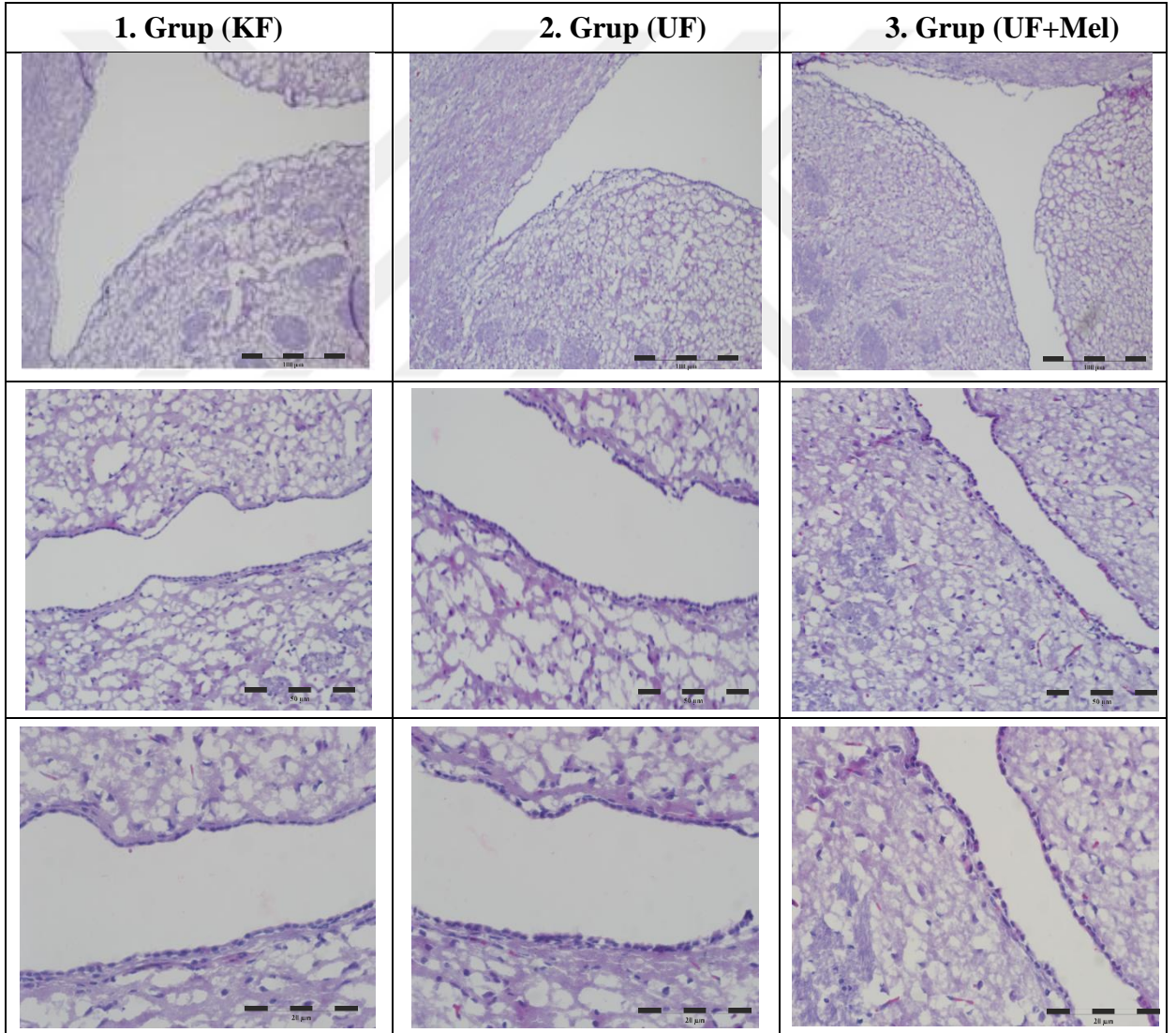
3. BULGULAR

3.1. Genel Değerlendirme Bulguları

Dört haftalık takip süresi sonunda herhangi bir sıçan ölümü görülmedi ve çalışma 3 grupta 21 hayvan üzerinden tamamlandı. Yapılan çalışmada sadece deri altı melatonin verilen grupta, melatonin verilen deri bölgesinde skar dokusu oluştuğu gözlemlendi. Diğer gruptaki hayvanlarda ise herhangi bir morfolojik anormallik gözlenmedi.

3. 2. Genel Histomorfolojik Değerlendirme Bulguları

H&E boyama ile yapılan genel değerlendirmede; beyin ventrikülleri ve onları döşeyen ependim hücreleri, genel olarak tüm ratlarda korunmuş olarak izlendi (Şekil 4. 1.).



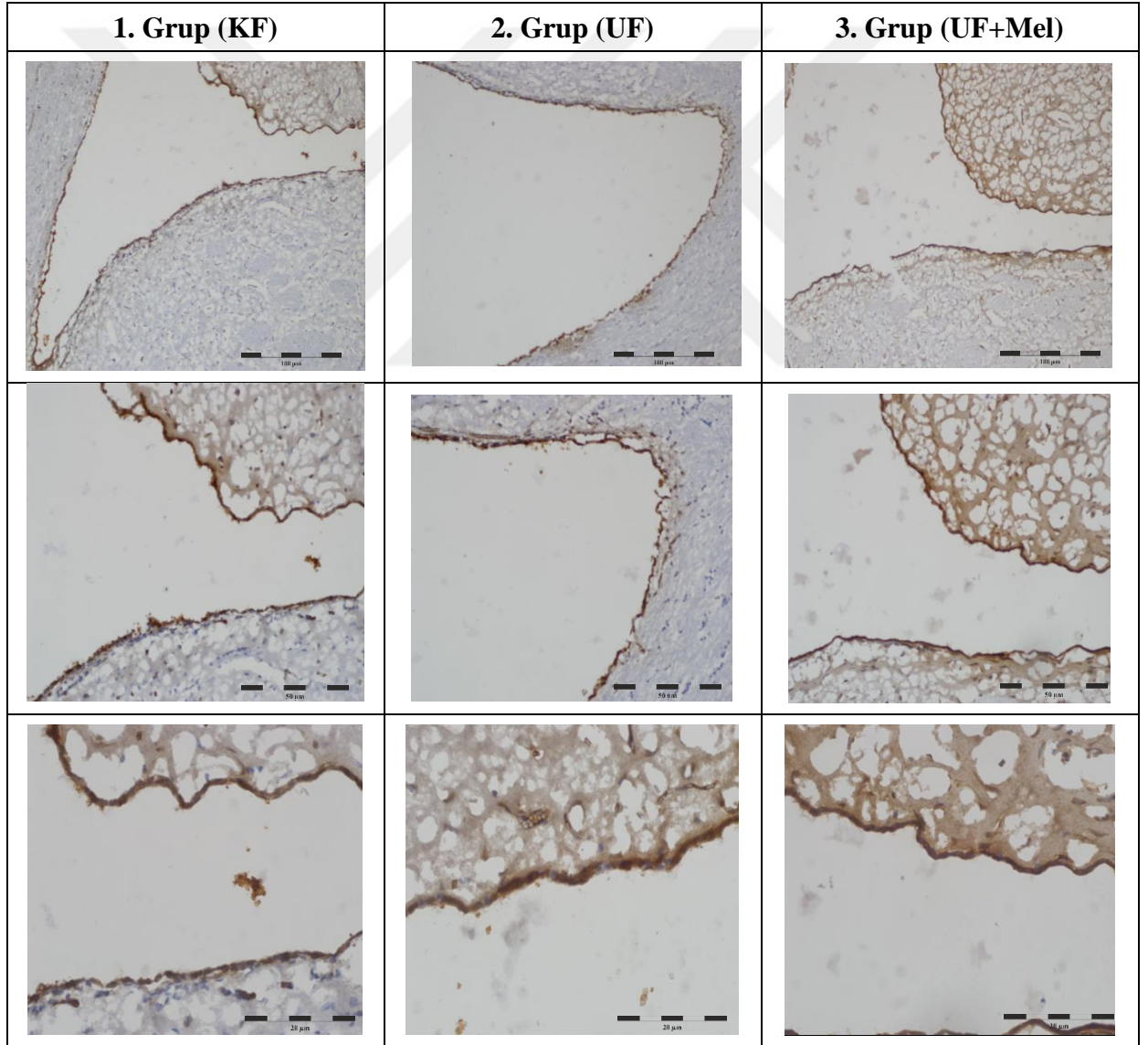
Şekil 4. 1. Rutin H&E boyama yöntemiyle farklı gruptardaki ratların farklı büyütmelerdeki görüntüleri (X10, X20, X40).

3.3. İmmunohistokimyasal Değerlendirme Bulguları

Beyin dokuları Vimentin, AQP4 ve ML1 reseptör antikoları ile immunohistokimyasal yöntemlerle boyandı.

3.3.1. Vimentin ile İmmunohistokimyasal Boyanma

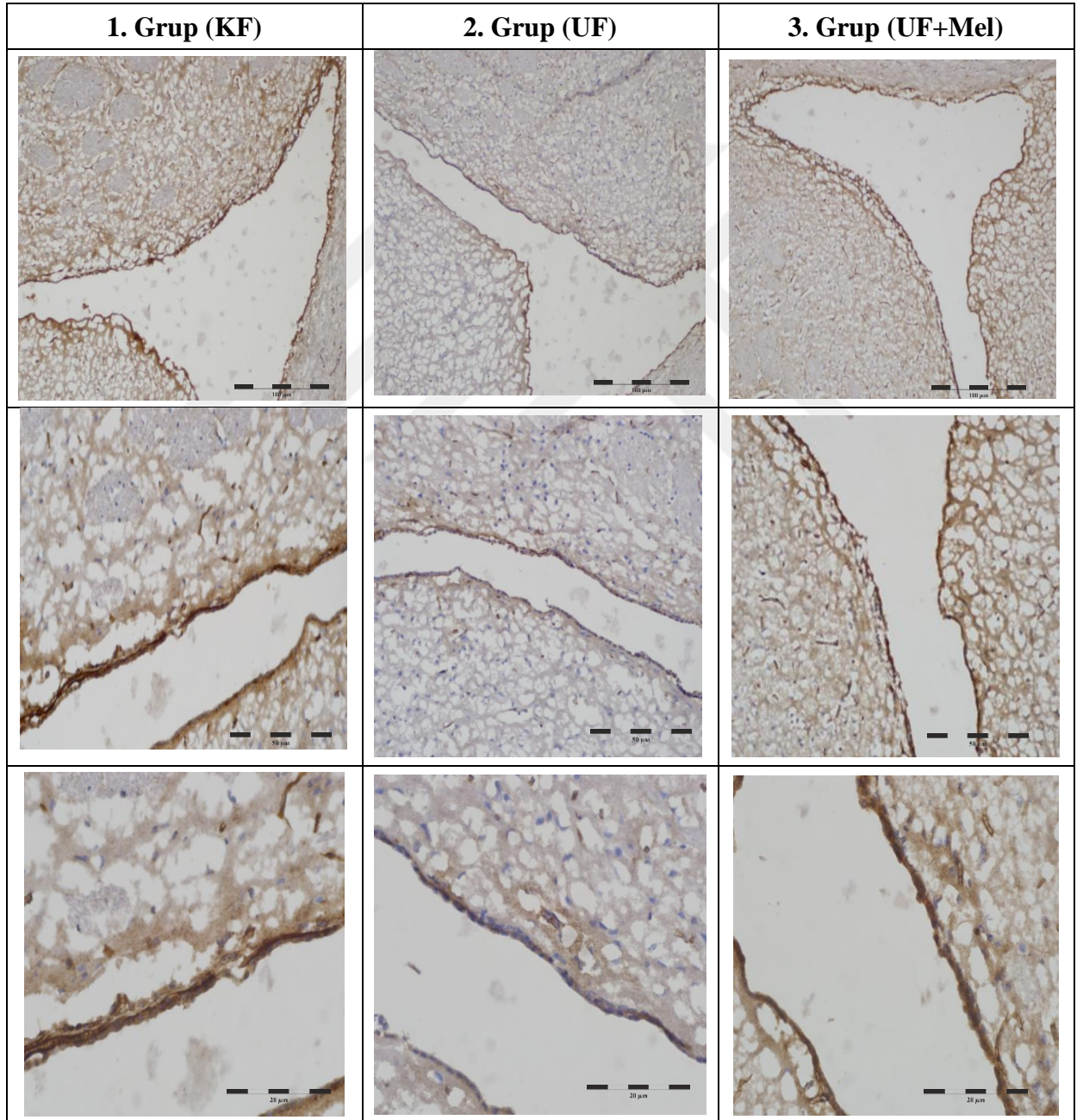
Vimentin antikolarının bütün gruplardaki ratlarda immunohistokimyasal yöntemlerle boyamaları yapıldı. Netice de 3. ventrikülde yer alan endim hücrelerin sitoplazmalarında vimentin antikolarının yoğun olarak boyandığı görüldü (Şekil 4.2.). Gruplar karşılaştırıldığında, vimentin antikoları ile boyanma açısından gruplar arasında anlamlı düzeyde herhangi bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4.1.).



Şekil 4. 2. İmmunohistokimyasal yöntemlerle vimentin antikoları ile boyanan farklı gruplardaki ratların farklı büyütmelelerdeki görüntüleri (X10, X20, X40).

3.3.2. Aquaporin 4 ile İmmünohistokimyasal Boyanma

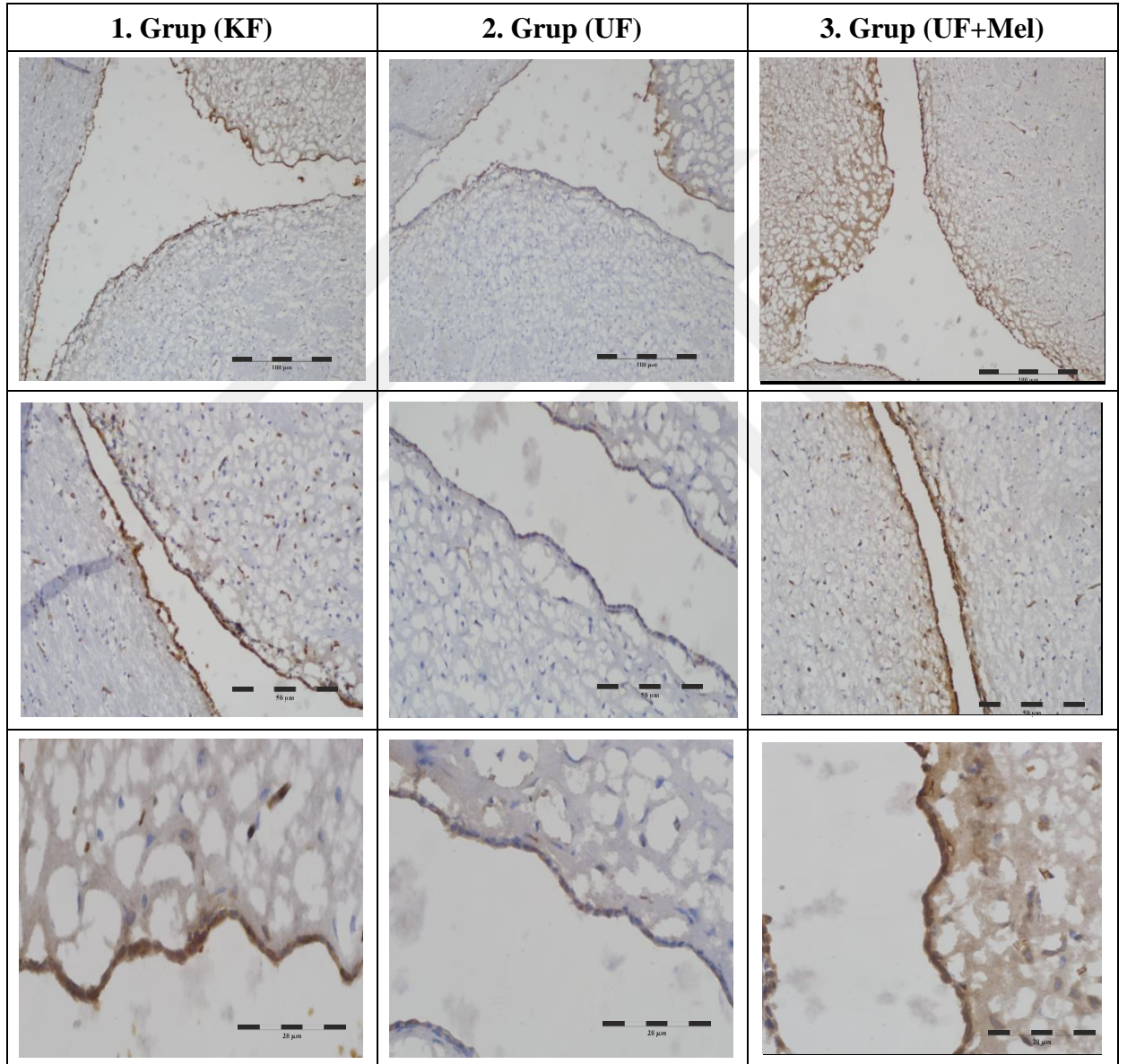
AQP4 antikorlarının bütün gruplardaki ratlarda immunohistokimyasal yöntemlerle boyamaları yapıldı. Netice de 3. ventrikülde yer alan endimal hücrelerin bazolateral membranlarında AQP4 antikorlarının farklı derecelerde boyandığı görüldü (Şekil 4.3). Gruplar karşılaştırıldığında, 1. ve 3. gruptaki AQP4 antikorlarının immunohistokimyasal boyanma derecesinin, 2. gruba göre anlamlı düzeyde daha yoğun olduğu görüldü ($p<0,05$) (Tablo 4.2).



Şekil 4. 3. İmmünohistokimyasal yöntemlerle AQP4 antikorları ile boyanan farklı gruplardaki ratların farklı büyütme derecelerindeki görüntüleri (X10, X20, X40).

3.3.3. ML1 reseptör ile İmmünohistokimyasal Boyanma

ML1 (Melatonin-1) reseptör antikorlarının bütün gruplardaki ratlarda immunohistokimyasal yöntemlerle boyamaları yapıldı. Netice de 3. ventrikülü döşeyen ependimal hücrelerde ML1 reseptör antikorlarının farklı derecelerde boyandığı görüldü (Şekil 4.4.). Gruplar karşılaştırıldığında, 1. ve 3. gruptaki ML1 reseptör antikorlarının immunohistokimyasal boyanma derecesinin, 2. gruba göre anlamlı düzeyde daha yoğun olduğu görüldü ($p<0,05$) (Tablo 4.3.).



Şekil 4. 4. İmmünohistokimyasal yöntemlerle ML1 reseptör antikorunu ile boyanan farklı gruplardaki ratların farklı büyütmelerdeki görüntüleri (X10, X20, X40).

VİMENTİN	1. Grup (KF)	2. Grup (UF)	3. Grup (UF+Mel)
1. Rat	2	2	2
2. Rat	3	2	1
3. Rat	3	2	3
4. Rat	3	3	2
5. Rat	2	3	3
6. Rat	2	1	2
7. Rat	2	2	3

Tablo 4.1. Vimentin antikorlarıyla boyanan herbir gruptaki ratın histomorfolojik analizine bağlı skora değerleri (0-3).

AQUAPORİN 4	1. Grup (KF)	2. Grup (UF)	3. Grup (UF+Mel)
1. Rat	2	2	2
2. Rat	3	1	2
3. Rat	3	2	2
4. Rat	2	2	3
5. Rat	3	1	3
6. Rat	2	1	2
7. Rat	3	2	3

Tablo 4.2. Aquaporin 4 antikorlarıyla boyanan herbir gruptaki ratın histomorfolojik analizine bağlı skora değerleri (0-3).

ML1 Reseptör	1. Grup (KF)	2. Grup (UF)	3. Grup (UF+Mel)
1. Rat	3	1	2
2. Rat	2	1	3
3. Rat	2	2	3
4. Rat	3	2	3
5. Rat	2	1	2
6. Rat	2	1	2
7. Rat	3	2	3

Tablo 4.3. ML1 reseptör antikorlarıyla boyanan herbir gruptaki ratın histomorfolojik analizine bağlı skora değerleri (0-3).

4. TARTIŞMA

Sinir sisteminin homeostatik dengesinin nasıl sağlandığı uzun yıllardan beri bilim adamlarının üzerinde durduğu bir konudur. Çünkü SS'nde görülen beyin ödemi, epilepsi ve nörodejeneratif bozukluklar gibi beyinle ilgili birçok hastalığın çıkış noktası hep bu homeostatik dengenin bozulmasından kaynaklanmıştır. Dolayısıyla hastalıkları ortaya çıktıktan sonra değil, daha belirtileri ortaya çıkmadan önce önüne geçebilmek için bu dengenin çok iyi anlaşılması gerekmektedir.

Yeni görüntüleme tekniklerinin ve deneysel yaklaşımların keşfedilmesiyle özellikle son yıllarda bu konuda ciddi ilerlemeler yaşanmıştır. Fakat bu noktada başarının yolu sinir sisteminin bir bütün olarak ele alınıp, değerlendirilmesinden geçmektedir. Bunun içinde sinir sistemini oluşturan hücreler (nöronlar, nöroglialar) ve onların işlevini kontrol eden moleküler yapı çok iyi incelenip, birlikte değerlendirilmelidir.

Çalışmamızda sinir sisteminde önemli bir yeri olan endim hücreleri ile bu hücrelerin bazolateral membranlarında yer alan AQP4 kanallarının immünohistokimyasal dağılımını, farklı deney gruplarında nasıl değiştiğini göstermeye çalıştık.

Endimal hücrelerin apikal yüzeyinde silya ve mikrovilluslar bulunurken, bazal yüzeyinde AQP4 kanalları bulunur. Mikrovilluslar BOS emiliminde görevli iken, siller BOS'u harekete geçiren yapılardır (Ross ve Pawlina 2014). AQP4 kanallarının ise endimal hücreler üzerindeki işlevleri henüz tam anlamıyla bilinmemektedir.

Daha önceki yıllarda yapılan çalışmalar endimal hücrelerin, BOS ile beyin parankimi arasında küçük moleküllerin taşınmasında görev aldığını ortaya koymaktadır (Sarnat 1992). Endim hücreleri, BOS ile beyin ekstraselüler sıvısı arasında bir bariyer oluşturmaz ve BOS'taki bütün değişimler kolaylıkla nöronların fonksiyonlarını etkileyebilir (Öztaş 1992). Ancak bunun nasıl olduğu konusunda kapsamlı bilgiler mevcut değildir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla hem suyun, hem de küçük bazı moleküllerin geçişine aracılık eden AQP4 kanallarının endimal hücrelerde gösterilmesi bu noktanın aydınlatılmasında oldukça dikkat çekicidir.

Yaptığımız çalışmada endimal hücrelerin bazal ve lateral membranlarında yoğun AQP4 ekspresyonu olduğunu tespit ettik. Dolayısıyla endimal hücreler, apikal yüzeyindeki mikrovilluslar aracılığıyla bir kısım BOS içeriğini absorbe edebilir. Bu sayede

ependimal hücrelerin apikalinden emilen BOS içeriği, bu hücrelerin bazalinde yer alan AQP4 kanalları aracılığıyla beyin parankimine geçebilir. Böylece beyin parankiminde homeostazı sağlamak için gerekli olan bir kısım maddeler, ependimal AQP4 kanalları aracılığıyla, BOS'dan alınmış olur.

BOS ile beyin parankimi arasında gerçekleşen madde alış verişi sadece tek yönlü değil, iki yönlü düşünülmesi gereken bir konudur. Çünkü yüksek aktiviteye sahip beyinde zaman içinde biriken atık (veya toksik) moleküllerin beyin parankiminden hızlı bir şekilde uzaklaştırılması önemlidir. Dolayısıyla ependimal AQP4 kanalları, beyinde biriken bu atık moleküllerin, BOS'a geçişine aracılık edebilir. BOS'a geçen bu atık moleküller daha sonra araknoid villuslar aracılığıyla genel dolaşıma verilerek, ortamdan uzaklaştırılabilir.

Daha önceki yapılan çalışmalar ependimal hücrelerin mikrovilluslar aracılığıyla BOS'dan aldığı bir takım maddeleri, yapısal ve enzimatik karakteristiği sayesinde detoksifiye ettiğini ortaya koymuştur (Del Bigio 1995). Benzer bir mantıkla bu hücreler, bazaldeki AQP4 kanalları aracılığı ile beyin parankiminde biriken bazı toksik molekülleri alabilir ve bu molekülleri kendi içinde yıkıp detoksifiye edebilir. Böylece toksik moleküllerin beyin içerisinde birikimi engellenmiş olur.

Yapılan son çalışmalar astrosit son ayaklarının, beyindeki su homeostazının sürdürülmesinde önemli rol oynadığını göstermektedir. Suyun, kan-beyin bariyerini geçtiği astrosit son ayaklarında, AQP4 kanalları bulunmaktadır. Bu kanallar, beyin ödemi gibi patolojik durumlarda, beyindeki ozmotik dengeyi yeniden sağlamada anahtar rol oynamaktadır (Papadopoulos ve Verkman 2008).

MSS'nin bazı bölgeleri kan dolaşımındaki maddelerden izole edilmemiştir. Beynin üçüncü ve dördüncü ventriküller boyunca bulunan bölgelerinde bariyer bulunmamaktadır. Bu bölgelere beraberce sirkumventriküler organlar denmektedir. Sirkumventriküler organlar arasında pineal bez, mediyan eminens, subfornikal organ, area postrema, subkommissural organ, lamina terminalisin organum vaskülozumu ve pitüiter bezin posteriyör lobu bulunmaktadır. Bariyer içermeyen bu bölgeler muhtemelen kanda dolaşan, ancak normalde kan-beyin bariyeri tarafından geçirilmeyen maddeleri örnekleyerek bu maddelerle ilgili bilgiyi MSS'ye aktarmakla görevlidirler. Sirkumventriküler organlar vücut sıvısı homeostazının düzenlenmesinde ve sinir sisteminin nörosekretuar aktivitesinin

kontrolünde önemlidirler. Bazı araştırmacılar bu organları merkezi nörohumoral sistemde ‘beyin pencereleri’ olarak tanımlamaktadırlar (Ross ve Pawlina 2014).

Sirkumventriküler organların, kan beyin bariyeri içermemesi dışında dikkati çeken başka bir özelliği de üçüncü ve dördüncü ventrikülü çevreliyor olmasıdır. Çünkü beyin ventrikülleri, BOS içeren ve duvarı ependimal hücrelerle döşeli yapılardır. Yaptığımız çalışmada ependimal hücrelerin bazolateral membranlarında yoğun AQP4 kanalları içerdiğini gördük. Dolayısıyla ependimal hücreler, ventriküllerden mikrovilluslar aracılığıyla aldığı BOS içeriğini, sahip olduğu AQP4 kanalları aracılığıyla sirkumventriküler organlara aktarabilir. Sonuç olarak sirkumventriküler organların sadece kan yoluyla gelen madde içeriği ile değil de, aynı zamanda BOS yoluyla gelen maddeler aracılığı ile de sinir sistemindeki birçok aktivitesini gerçekleştirdiği söylenebilir.

Birçok canlı türünde ifade edilen ve işlevlerinin tamamı henüz anlaşılamayan AQP’ler su dışında farklı moleküllere de seçici geçirgenlik gösterir. Bunlardan AQP4 kanallarının keşfinden bugüne kadar geçen sürede, beyinde hacim, iyon ve sıvı homeostazının anlaşılmasına dair çok önemli gelişmeler yaşanmıştır. Birçok fizyolojik işlevi olan AQP4’ün, en iyi anlaşılan görevi ise MSS’den interstisyel sıvıyı uzaklaştırmasıdır (Nagelhus ve Ottersen 2013).

Gliyal hücrelerde AQP4 geninin etkisizleştirilmesi postnatal dönemde ekstraselüler sıvının rezorbsiyonunu geciktirir ve erişkin beyninin normalden daha fazla sıvı içeriğine sahip olmasına yol açar (Haj-Yasein ve ark 2011). Bu güncel veriler AQP4^{-/-} hayvanlarda görülen kafa içi basıncındaki artışın nedenini izah eder (Papadopoulos ve ark 2004). Perivasküler gliyal yapraklardan geçen sıvı, periferel lenfatiklere benzer şekilde bir perikapiller drenaj sistemi oluşturarak interstisyel sıvıyı uzaklaştırır. AQP4^{-/-} hayvanlarda intraserebral olarak uygulanan amiloid, peptid ve mannitolün uzaklaştırılmasındaki gecikme, bu bilgiyi desteklemektedir (Iloff ve ark 2012).

Suyun kan-beyin düzleminde nasıl taşındığını anlamak açısından, AQP4 aracılığıyla gerçekleşen taşınmanın iki yönlü olduğunu bilmek önemlidir. İntraperitoneal su enjeksiyonu, suyun beyne doğru göçünü zorlayan bir ozmotik kuvvet meydana getirir. Bu kuvvetin etkisiyle suyun ilk önce prekapiller astrositlerde biriktiği görülmüştür. Bu hücreler intraperitoneal distile su enjeksiyonu sonrasında aşıkâr biçimde şişmişlerdir. Elde

edilen sonuç suyun hücre içine girişinin perikapiller son ayak yüzünde yer alan geniş AQP4 havuzu sayesinde gerçekleştiği fikrini desteklemektedir (Nase ve ark 2008). Bu durum beyindeki sıvı dengesinin sağlanmasında, perivasküler yol boyunca uzanan ve astrosit son ayaklarında yer alan AQP4 kanallarının önemini ortaya koymaktadır.

Beyindeki sıvı homeostazının sağlanmasında AQP4 ile astrosit ilişkisi göz ardı edilemez. Ancak cevaplanması gereken bir diğer husus diğer gliyal hücreler ile AQP4 kanalları arasında bir ilişki olup olmadığıdır. Yapılan çalışmalar AQP4 kanallarının astrositler dışında ependimal hücreler (Gleiser ve ark 2016) ile tanisitlerde (Konuk ve ark 2011) de bulunduğunu göstermektedir. Bu durumda BOS ve beyin parankimi arasında adeta bir köprü gibi olan ependim hücreleri ile tanisitlerde AQP4 kanallarının varlığı, bu hücrelerin beyindeki sıvı dengesinin sağlanmasında ve ihtiyaç fazlası moleküllerin uzaklaştırılmasında görev aldığını düşündürmektedir.

BOS'un esas işlevi etrafında dolaştığı organları korumak olup; MSS'de değişmez bir iyon derişimi sağlamaktır. BOS'un bu görevinin yanında, atık maddeler için kana bir geçiş yolu oluşturduğu da bilinmektedir. BOS ile temas eden ependimal hücreler, yüzeylerindeki siliyer hareket sayesinde, beyindeki ekstraselüler alanla BOS arasında metabolitlerin taşınımına da hizmet eder (Ovalle ve Nahirney 2009). Dolayısıyla ependimal hücrelerde bulunan AQP4 kanalları atık maddelerin hücre içerisine alınmasına, siliyer hareketler ise bu maddelerin BOS'a doğru taşınmasına aracılık edebilir.

Yakın zamanda astrositler ile AQP4 ilişkisini inceleyen birçok çalışma yapılmıştır. Biz de çalışmamızda ependimal hücrelerdeki AQP4 kanallarının, farklı fotoperiyodik koşullarda ve dışardan melatonin alındığında nasıl değişkenlik gösterdiğini immunohistokimyasal olarak inceledik. Bunun için grupları; KF (kısa fotoperiyod), UF (uzun fotoperiyod) ve UF + melatonin (4 mg/kg/gün) olmak üzere 3'e ayırdık.

Suda kısmen ve lipidlerde yüksek oranda çözünen melatonin dolaşıma verildiğinde, hücrelere kolayca girmektedir. Bu hormonun ML1 ve ML2 olmak üzere 2 reseptörü vardır ve bunlardan ML1 reseptörü ağırlıklı olarak nöronal yerleşim gösterir. Yaptığımız çalışmada KF'a maruz kalan grup ile UF + melatonin verilen grubun ependimal hücrelerinde daha yoğun bir ML1 reseptör ekspresyonu olduğu görülmüştür. Bunun nedeni gruplardan birinin KF'a yani karanlık ortama daha çok maruz kalması olabilir. Çünkü

melatonin esas olarak karanlıkta salgılanan bir hormondur. Diğer grupta ise UF'a (daha çok ışıklı ortam) rağmen, dışardan verilen melatonin hormonu bu durumu açıklayabilir. Sadece UF'a maruz kalan grupta ise muhtemelen ışığın melatonin salınımını daha uzun süre baskılayıcı etkisinden dolayı, ML1 reseptör ekspresyonu daha zayıf bulunmuştur.

Uyku, sirkadyen ritim ve nörolojik birçok düzenleyici işlevi olan ML1 reseptörlerinin bu iki grupta (KF, UF + melatonin) yoğun eksprese olması dikkat çekicidir. Çünkü yaptığımız çalışmada aynı durum AQP4 ekspresyonu için de geçerlidir. Çalışmamızda aynı ML1 reseptör antikollarında olduğu gibi, AQP4 ekspresyonunun da bu iki grupta (KF, UF + melatonin) daha yoğun eksprese olduğunu gözlemledik.

Dolayısıyla hem ML1 reseptör ekspresyonunun, hem de AQP4 kanal ekspresyonunun iki grupta (KF, UF + melatonin) daha yoğun eksprese olması, melatonin hormonunun AQP4 kanal ekspresyonu üzerinde olumlu etkileri olabileceğini düşündürmektedir. Eğer bu ilişki gelecekte tam olarak ortaya konabilirse, bu hipotezden bilim dünyasına çok önemli mesajlar çıkartılabilir. Çünkü AQP4 kanallarının bilinen en önemli etkilerinden biri, beyin interstisyel sıvısında biriken atık moleküllerin temizlenmesine aracılık etmesidir. Bu etki nörodejeneratif hastalıkların (örn. Alzheimer hastalığı) önüne geçilebilmesi açısından çok değerlidir. Melatonin hormonunun, AQP4 kanal ekspresyonunu artırıcı etkisi ispatlanırsa, bu durum nörodejeneratif bozuklukların önlenmesi adına umut ışığı olabilir.

Gece vardiyasında çalışan işçiler ile yoğun bakım şartlarında sürekli aydınlık ortamda tutulan hastalara bakıldığında, bu insanların karanlığın melatonin salgılayıcı etkisinden yeteri kadar faydalanamadığı söylenebilir. Dolayısıyla melatonin yetersizliğinin AQP4 kanalları üzerindeki olumsuz etkilerine bağlı olarak birtakım nörolojik hastalıklar ortaya çıkabilir.

Özellikle ileri yaşlar, nörodejeneratif hastalıklar için risk grubudur. Yapılan çalışmalar ileri yaşlarda melatonin salınımının azaldığını göstermiştir (Mollaoğlu ve Özgüner 2005). Dolayısıyla risk grubu olan ileri yaş hastalara dışardan melatonin vermek, bu hastalığın ilerleyişini durdurabilir. Bunun içinde melatonin hormonu ile AQP4 kanal ilişkisini inceleyen daha kapsamlı çalışmaların yapılması gereklidir.

Yaşlanmayla birlikte organizmada görülen en önemli sorunlardan bazıları, vücuttaki antioksidan kapasitenin azalması ve biriken serbest radikallerin oluşturduğu hasarlardır. Melatonin hormonu, SS başta olmak üzere vücudun antioksidan kapasitesini artırarak ve serbest radikalleri bulunduğu ortamdaki süpürerek bu durumu yavaşlatmaktadır (Reiter ve ark 2008).

Yaptığımız çalışmada özellikle iki grupta (KF, UF + melatonin), melatonin seviyesini daha yüksek tutmayı amaçladık. Netice de bu iki grupta ML1 reseptör ekspresyonunun daha yoğun olduğunu gözlemledik. Melatonin seviyesi daha yüksek olan gruplar, AQP4 kanallarının işlevselliğini artırıcı bir rol üstlenebilir. Bunun nedeni melatonin sayesinde serbest radikallerin ortamdaki daha iyi temizlenmesi ve böylece temizlenen serbest radikallerin AQP4 kanalları üzerindeki olası zararlı etkilerinin önlenmesi olabilir.

Melatoninin önemli bir işlevi de özellikle SS'deki hücrelerde antiapoptotik etkisidir (Şener 2010). Bu durum ileri yaşlarda belli lokalizasyonlarda (örn. lateral ventrikül) sayıca azalan ependimal hücrelerin (Del Bigio 2010) varlığını devam ettirmesi açısından anlamlı olabilir. Bu sayede ependimal AQP4 kanalları da işlevini daha uzun süre ve geniş lokalizasyonlarda sürdürebilir.

Melatoninin diğer bir önemli etkisi de kan beyin bariyerini korumasıdır. Böylece kandan, beyne geçebilecek zararlı moleküller daha sıkı şekilde kontrol edilmiş olur. Bu durum, kan beyin bariyerindeki kontrollü geçişte önemli bir yeri olan AQP4 kanallarının işini kolaylaştırır. Bütün bu bilgileri toplarsak, melatoninin direk veya dolaylı olarak AQP4'ün işleyişine katkıda bulunan önemli bir düzenleyici hormon olduğu söylenebilir.

Pineal bez, nöronal kökenli olduğundan yenilenme kabiliyeti düşüktür. Pineal hücrelerin sayısı genetik olarak önceden belirlenmiştir ve pinealositler haraplandığı zaman postnatal dönemde genellikle yenilenemezler. Bu nedenle organizma yaşça ilerledikçe pineal hücreler kaybolarak sonunda pineal yetmezlik durumu oluşur. Ayrıca yaşlanma sürecinde pineal bezde düzenli dejeneratif olmayan kalsifikasyon görülmektedir. Genç sıçanların pineal bezleri daha yaşlı hayvanlara nakledilince yaşlanma süreci bastırılmış ve yaşam süresi uzatılmıştır. Sıçanlarda melatonin agonisti olan siproheptadin alımını takiben hayatta kalma süresi artırılmıştır. Ayrıca sıçanlara melatonin sentezini uyaran epitalamin

verildiğinde de hayat süresi artırılmıştır (Mollaoğlu ve Özgüner 2005). Bütün bu bilgiler birçok nörolojik hastalığın tedavisinde, melatonin kullanımını önemli hale getirebilir.

Melatonin, farmakolojik dozlarda hayvanlarda tüm yaşam süresince, insanlarda ise uzun periyodlarla kullanımının toksik bir etki yapmadığı bilinmektedir (Wang 2009). Bu durum hormonun canlılarda güvenle kullanılabileceğini desteklemektedir.

Günümüzde serbest radikallerin kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve nörodejeneratif bozukluklar başta olmak üzere çeşitli patolojiler ile yaşlanmadaki rollerinin gösterilmesi, antioksidan kullanımını gündeme getirmiş ve bu konuda yapılan çalışmalar giderek ivme kazanmıştır. Melatonin diğer birçok antioksidan ile kıyaslandığında, gerek güçlü serbest radikal süpürücü etkisi, gerek antioksidan enzim aktivitelerini artırıcı özelliği ile güncelliğini korumaktadır. Ancak melatoninin klinikte kullanıma girmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

AQP4 seçici bir su taşıyıcısıdır ve su kotransportunda görev alan membran moleküllerinin başında gelir. AQP4'ün baskın rolü ile beyindeki diğer aquaporinlerden (AQP1, AQP9 ve AQP11) ayrılması, bu aquaporinin MSS'deki hacim kontrolünü tek başına sağladığı fikrini doğurmamalıdır. Dolayısıyla beyin hacminin homeostazında, su taşınması görevinde rol oynayan bütün molekülleri ve kompartmanları hesaba katan bir matematiksel modelin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu durumun gerçekleşmesi kolay değildir. Yeni nesil in vivo lazer tarama mikroskopunun kullanılmasıyla bir kısmı çözülebilecek olmasına karşın çokça metodolojik sorun bulunmaktadır. Günümüzde beyin ödemi (sitotoksik) gibi nörolojik hastalıklarda, gliyal hücrelerde (ependim ve astrosit) bulunan AQP4 kanallarının su transportu işlevini engelleyecek ilaçların geliştirilmesi noktasında çalışmalara ihtiyaç vardır. Matematiksel modellerin mümkün kılınması, gelecekte kullanılacak bu tür ilaçların güvenilirliği açısından bir gereklilik olacaktır.

Subaraknoid BOS, öncelikle beyin parankimindeki periarteriyel aralığa geçer. Arteriyel pulsasyon dalgalarının oluşturduğu kuvvetle, BOS beyin interstisyumuna geçer ve burada interstisyel sıvı ile karışır. BOS, beyin parankimindeki interstisyel sıvıda yer alan ekstraselüler proteinleri alarak, paravenöz aralığa geçiş yapar. Bu geçişe serebral damarları çevreleyen ve astrosit son ayaklarında eksprese olan AQP4 kanalları aracılık eder. Bu yolla interstisyel sıvıda çözünen birçok madde beyin parankiminden uzaklaştırılmış olur.

Böylece beyin parankimi temizlenir. AQP4 geni hasarlanmış farelerde ekstraselüler aralığın genişlemiş olması bu bilgiyi destekler. Çünkü beyin parankiminden temizlenemeyen ekstraselüler proteinlerin zamanla birikerek, ekstrasellüler aralık hacmini genişlettiği söylenebilir (Yao ve ark 2008).

AQP4 içermeyen farelerde yapılan çalışmalarda, beyin interstisyel sıvısındaki çözünen maddelerin temizlenememesine bağlı olarak, nörotoksik moleküllerin biriktiği ve nörodejeneratif hastalıklara yol açtığı görülmüştür. Buna örnek olarak β amiloid klirensinin paravenöz olarak gerçekleşmemesine bağlı olarak, interstisyumda birikmesi ve Alzheimer hastalığına progresyonu verilebilir (Weller ve ark 2008). Böyle durumlarda astrositlerle beraber, ependim hücrelerinde de AQP4 ekspresyonunun düzenlenmesi, β amiloid başta olmak üzere nörotoksik maddelerin birikmesinin önüne geçebilir. Bu sayede β amiloid ile birlikte diğer nörotoksik maddelerin sistemik dolaşıma katılımıyla, Alzheimer hastalığı başta olmak üzere, pek çok nörodejeneratif hastalığın gelişimi önlenebilir.

Basit difüzyon yoluyla beyin parankiminden, en yakındaki BOS kompartmanına moleküllerin geçişi yeterli değildir. Özellikle moleküllerin boyutu arttıkça, bu geçişin süresi de uzamaktadır (Groothuis ve ark 2007). Örneğin ürenin difüzyon yoluyla beyin içinde 1 cm yayılması için 5,4 saat gerekirken; albüminin 1 cm yayılması için 109 saat gereklidir (Cserr 1971). Bu verilere bakılarak, beyindeki klirens açısından difüzyonun efektif olmadığı söylenebilir. Dolayısıyla beyin fonksiyonlarının korunması ve homeostazın sağlanmasında, AQP4 kanal aracılığıyla gerçekleşen parankimal klirensin, difüzyona göre çok daha önemli olduğu söylenebilir.

Çalışmamızda ependimal hücrelerin membranlarında AQP4 ekspresyonu, özellikle KF ile UF + melatonin gruplarında, daha yoğun olarak görülmüştür. Bu durum difüzyona ihtiyaç bırakmadan beyin parankimindeki ekstraselüler proteinlerin, BOS'a olan geçişini hızlandırabilir. Böylece nörotoksik maddelerin beyindeki birikimi önlenebilir.

Yapılan çalışmalar, beyin parankimine geçen BOS'un, paravasküler alanlar arasında, beyin interstisyel sıvısı ile madde alışverişi yapan "lenfatik" bir işlevi olduğunu ortaya koymuştur. Ratlarda yapılan bir çalışma, beyin interstisyumuna enjekte edilen işaretlenmiş maddeden %70 kadarının paravenöz BOS'a geçtiğini göstermiştir. Paravenöz yollardan özellikle, internal serebral venler ile kaudal serebral venleri çevreleyen yollar,

işaretlenmiş maddenin klirensini sağlayan temel yolakları oluşturur. Dolayısıyla farklı iki kompartman arasında gerçekleşen klirens, periarteriyal aralıklardan ziyade, paravenöz aralıklarda etkin bir şekilde gerçekleşmektedir (Carare ve ark 2008).

Bu noktada cevaplanması gereken önemli bir soru şu olmalıdır: Eğer beyin parankiminde biriken ekstrasellüler proteinlerin yaklaşık %70 kadarı bu yolla temizleniyorsa, geriye kalan proteinlerin de temizlenmesi açısından ekstra yolaklar olabilir mi? Ya da beyin parankiminde gerçekleşen bu temizlenmede tek aktör bahsedildiği gibi astrositik AQP4 kanalları ile mi sınırlıdır?

Yaptığımız çalışmada BOS ile beyin parankimi arasında adeta bir köprü gibi olan endodimal hücrelerde de (özellikle KF ile UF + melatonin grupları) AQP4 kanallarına yoğun olarak rastlandı. Bu durum endodimal hücrelerin de, AQP4 kanalları aracılığıyla, özellikle ventriküllere yakın olan parankimal bölgelerden, ekstrasellüler proteinlerin klirensini artırarak beyinden temizlenmesine yardımcı olduğunu düşündürmektedir.

Beyinde zaman içinde biriken atık molekülleri temizleyen herhangi bir lenfatik damar sistemi bulunmaz. Bunun yerine astrositler ile AQP4 kanallarının görev aldığı ve glimfatik sistem adı verilen bir yolla ekstraselüler moleküller beyin parankiminden temizlenir. Yapılan çalışmalarda uyku sırasındaki glimfatik sistem etkinliğinin, uyanık olunan zaman dilimine göre çok daha iyi olduğu bulunmuştur. Uyku sırasında beyin parankimine geçen BOS ile beyin interstisyel sıvısının daha efektif karışması ve bu sayede interstisyel sıvıdaki maddelerin BOS'a daha kolay geçişi bu durumun nedenini açıklar.

Yapılan çalışmalarda melatonin hormonunun kalp damar sistemi üzerindeki etkileri ortaya çıkarılmıştır. Bu etkilerden biri de melatoninin serebral arterler üzerinde vazokonstriksiyona neden olmasıdır (Sewerynek 2002). Melatoninin serebral damarlar üzerindeki bu etkisi, dolaylı olarak perivasküler aralığın genişlemesine yol açabilir. Perivasküler aralığın genişlemesiyle, interstisyel sıvı ile karışan BOS daha yoğun bir şekilde bu aralığa alınabilir. Bu durum interstisyel sıvıda yer alan atık moleküllerin beyin parankiminden daha çok uzaklaştırılması anlamına gelir. Dolayısıyla melatonin hormonu, daha çok interstisyel molekülün paravenöz aralığa geçişini sağlayarak, glimfatik sistem işleyişine katkıda bulunabilir.

Yaptığımız çalışmada KF'a maruz kalan grup ile UF+Melatonin verilen grupta, ML1 reseptör ekspresyonu, UF'a maruz kalan gruba göre daha yüksektir. Sonuçta melatonin karanlıkta salgılanan ve uyku kalitesini arttıran en önemli hormondur. Uyku ise düzenli ve kaliteli olması nisbetinde beyinde onarıcı bir etki gösterir (Saper ve ark 2010). Uykunun, beyin üzerinde onarıcı ve glimfatik sistem etkinliğini artırıcı olmasını sağlayan mekanizmalardan biri de, AQP4 kanallarının ekspresyonunu indüklemesinden kaynaklanabilir. Benzer bir mantıkla uyku bozukluğu da AQP4 kanal ekspresyonu üzerinde inhibe edici bir stres faktörü olabilir. Örneğin uyku bozukluğu yaşayan hastalarda nörodejeneratif hastalıklar daha sık görülür. Bu hastalıklarda (örn. Alzheimer hastalığı) ise AQP4 kanal ekspresyonunda ciddi azalmalar görülmüştür (Iliff ve ark 2012). Dolayısıyla melatonin ve uyku ilişkisi bir bütün olarak, AQP4 kanal ekspresyonu üzerinden, glimfatik sistem etkinliğini veya nörodejeneratif hastalıkların prognozunu etkileyebilir. Yapığımız çalışmada KF ve UF + melatonin grubunda AQP4 kanal ekspresyonu yüksek iken; UF grubunda AQP4 kanal ekspresyonununun zayıf olması bu bilgiyi destekler.

Yapılan çalışmalar ubikuitinlerin (Ub), AQP yarı ömrünü düzenlediğini göstermiştir. Hedef proteinler ubikuitinlenerek, proteozomlarca yıkılır. AQP'lerin de ubikuitinlendiği ve proteozomlarca yıkıldığı gösterilmiştir. Stres faktörleri ise ubikuitin sentezini arttıran önemli bir etkidir (Jessica Chen ve ark 2008). Yapığımız çalışmada UF'a maruz kalan grupta, diğer gruplara göre daha zayıf AQP4 ekspresyonu olduğunu gözlemledik. Dolayısıyla dört hafta boyunca uzun süre ışığa maruz kalınması, ratlar üzerinde stres faktörü oluşturabilir. Buna bağlı olarak da artan ubikuitin sentezi, AQP4 kanal ekspresyonu üzerinde inhibe edici bir rol üstlenebilir.

Serebral ventrikülleri döşeyen ependimal hücrelerin, progenitör hücreler olduğu düşünülmektedir. Lateral ventrikülleri döşeyen ependimal hücreler üzerinde yapılan bir çalışmada, bu hücrelerin vimentin eksprese ettiği gösterilmiştir (Kirik ve Korzhevskii 2013). Bizde çalışmamızda yer alan her üç deney grubundaki ratların 3. ventriküllerinde, vimentin antikollarını immunohistokimyasal yöntemlerle boyadık. Sonuçta önceki yapılan çalışmaları destekler şekilde, burada yer alan ependimal hücrelerin yoğun bir vimentin ekspresyonu gösterdiğini gözlemledik. Ayrıca gruplar arasında vimentin ekspresyonu açısından herhangi bir anlamlı farklılık bulunmamaktadır.

Hem çalışmamızda, hem de yapılan benzer çalışmalarda, ventriküllere yakın bazı bölgelerde vimentin pozitif bir takım hücreler görülmüştür. Bu hücreler hem şekil itibariyle, hem de vimentin içermesi yönüyle ependim hücrelerine benzediği için, bu hücrelerin ektopik ependimositler olduğu düşünülmektedir (Danilov ve ark 2012).

Vimentin ve nestin, proteinlerin ara filaman (İng. intermediate filament) ailesinin bir üyesi olup, nöral kök ve progenitör hücrelerinde (NSPC), hücre iskeletinin bileşenlerini oluşturur (Korzhevskii ve ark 2007, Danilov ve ark 2012). Vimentin, astrositlerin prekürsörü olduğu düşünülen radyal gliya hücreleri ile diferansiyasyon aşamasındaki bir takım sinir hücrelerinde tespit edilmiştir (Sukhikh ve Malaitsev 2001). Geçmiş dönemde yapılan çalışmalar nörogenezin belli bölgelerde tüm yaşam boyunca devam ettiğini göstermektedir. Bu bölgelerdeki olası progenitör hücrelerin, SVZ'daki bazı hücre tipleri (Alvarez-Buylla ve ark 2008) ile ependimal hücrelerden (Carlen ve ark 2009) kaynaklandığı düşünülmektedir. NSPC hücrelerinin en önemli bileşenlerinden biri olan vimentinin, aynı zamanda ependim hücrelerinde de yoğun bir şekilde bulunması bu bilgiyi destekler. Bu bilginin yanında ependim hücreleriyle ilgili elde edilen son veriler, bu hücrelerin SVZ'de yer alan kök hücreler için, özel bir mikroortam sağladığını da düşündürmektedir (Kirik ve Korzhevskii 2013).

Yaptığımız çalışmada bazı ependimal hücrelerin bazal yüzünden beyin parankimine doğru uzanan uzantılara sahip olduğunu ve bu hücrelerin bazal membranlarının AQP4 kanallarını eksprese ettiğini gözlemledik. Daha önceki yapılan çalışmalarda bazı ependim hücrelerinin, tanisitlerle benzer şekilde, kan damarlarına doğru uzanan uzantılara sahip olduğu görülmüştür (Bolborea ve ark 2011, Kirik ve Korzhevskii 2013). Bu uzantıların bazıları aynı zamanda perivasküler gliyal membranların yapısını oluşturmaktadır (Kirik ve Korzhevskii 2013). Perivasküler astrosit son ayaklarında yer alan AQP4 kanallarının, glimfatik sistemin işleyişindeki rolü bilinmektedir. Dolayısıyla bazı ependimal hücrelerin, uzantılarıyla perivasküler membran yapısına katılması ve AQP4 kanallarına sahip olması, bu hücrelerinde astrositlerle birlikte glimfatik sistemde rol aldığını düşündürmektedir.

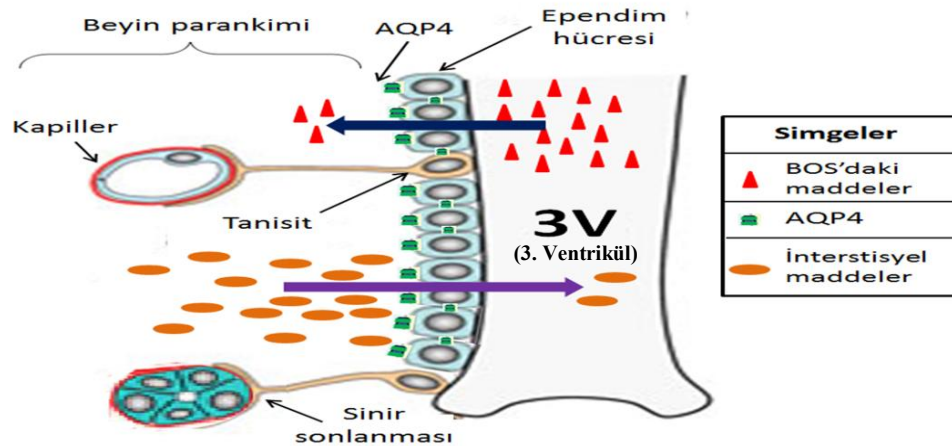
Ependimal hücreler arasında yer alan ve uzantılarıyla beyin parankiminin derinliklerine kadar uzanan tanisit hücreleri de vardır. Özelleşmiş ependimal hücreler olduğu düşünülen tanisit hücrelerinin de, AQP4 kanallarını eksprese ettiği yapılan

çalışmalarla gösterilmiştir (Konuk ve ark 2011). Yaptığımız çalışmada ependimal hücreler vimentin ile boyandı ve bazı ependimal hücrelerin bazal yüzeyinden, beyin parankimine doğru uzanan uzantılar görüldü. Bu uzantıların varlığı tanisit hücrelerini anımsatmakla birlikte kesin tanı koymak doğru değildir. Çünkü tanisitlerin kesin tesbitini yapabilmek için sadece vimentin değil, başka ara filamanlarında işin içine dahil edildiği daha kapsamlı ve karşılaştırılmalı immünohistokimyasal analizlere ihtiyaç vardır (Gilyarov ve ark 2009).

Özetle, beyin parankiminde biriken ekstrasellüler proteinlerin, sadece astrositik AQP4 kanallarının kolaylaştırdığı bir yolla değil de, aynı zamanda ependim hücreleri ile tanisitlerin de katkı sağladığı daha kompleks bir yolla beyinden temizlendiği söylenebilir.

Bütün bu verilen bilgiler ile yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz bulgular ışığında, ependimal hücrelerin sinir sistemi üzerindeki işleyişi ve glimfatik sisteme olan katkısı şöyle özetlenebilir: BOS'da yer alan bir kısım maddeler (kırmızı simge) mikrovilluslar aracılığıyla ependim hücrelerinin içerisine alındıktan sonra, AQP4 kanalı yoluyla beyin parankimine aktarılır. Bu sayede beyin dokusu ihtiyacı olan maddeleri, BOS'dan almış olur. Beyin parankiminde zaman içinde biriken ihtiyaç fazlası interstisyel maddeler (turuncu simge), AQP4 kanalları aracılığıyla BOS'a geçerek, beyinden uzaklaştırılır. Ependimal AQP4 kanalları bu özelliğiyle glimfatik sistemin işleyişine katkı sağlayabilir (Şekil 4.1.). Çalışmamızdan elde edilen bulgular, KF ile UF + melatonine maruz kalan gruplarda ependimal AQP4 etkinliğinin, UF'a maruz kalan gruba göre daha etkin olabileceğini desteklemektedir.

Ependimal AQP4 Kanallarının İşleyişi



Şekil 4. 1. Ependimal AQP4 kanallarının işleyişi.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sinir sisteminde lenfatik sistem bulunmaz. Buna karşın beyinde zaman içinde biriken atık moleküllerin yaklaşık %70 kadarı astrositik AQP4 kanallarının görev aldığı glimfatik sistem aracılığıyla temizlenir. Bizde çalışmamızda geriye kalan %30'luk kısımda, ependimal AQP4 kanalları ile melatonin hormonunun bir rolünün olup olmadığını, farklı fotoperiyod şartlarında ve melatonin alımında göstermeyi amaçladık.

Yaptığımız çalışmada AQP4 kanalı ile ML1 reseptör ekspresyonunun, KF ve UF + melatonin grubunda daha yüksek iken; UF grubunda diğer iki gruba göre daha düşük olduğunu gördük. Bu veriler bize, sinir sisteminde düzenleyici bir hormon olan melatoninin, AQP4 ekspresyonu ve işleyişi üzerinde direk veya indirek yollarla olumlu etkileri olduğunu düşündürmektedir.

Ortaya çıkan sonuçların ne gibi etkileri olduğunu tam olarak ispatlayabilmek için, sadece immunohistokimyasal değil, aynı zamanda görüntüleme teknikleri ve biyokimyasal verilerin de olduğu daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir. Yapılacak multidisipliner çalışmalar ile, AQP4 ve melatonin arasındaki pozitif ilişki açığa çıkarılırsa, bu durum nörodejeneratif bozuklukların önlenmesi adına bilim dünyasına çok büyük katkılar sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Abbott NJ, 2004. Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. *Neurochemistry international*, 45, 4, 545-52.
- Adorjan I, Kalman M, 2009. Distribution of beta-dystroglycan immunopositive globules in the subventricular zone of rat brain. *Glia*, 57, 6, 657-66.
- Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S, 2002. Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *The Journal of physiology*, 542, Pt 1, 3-16.
- Agre P, Kozono D, 2003. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. *FEBS letters*, 555, 1, 72-8.
- Akay MT, 2010. Genel Histoloji Atlası. Onbeşinci Baskı, Ankara, Palme Yayıncılık, p. 4-5.
- Akay MT, 2011. Genel Histoloji, Ankara, Palme Yayıncılık, p. 235-36.
- Akyüz S, Büyüköztürk H, Öztürk A, Turanoğlu MA, (2011). Aquaporinler: Su Kanallarından Fazlası. Başkent Üniversitesi 13. Öğrenci Sempozyumu. Ankara: 1-8.
- Altun A, Vardar A, Altun BU, 2001. Melatonin ve kardiyovasküler sistem. *Ana Kar Der*, 1, 283-8.
- Alvarez-Buylla A, Kohwi M, Nguyen TM, Merkle FT, 2008. The heterogeneity of adult neural stem cells and the emerging complexity of their niche. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 73, 357-65.
- Arendt J, 2000. Melatonin, Circadian Rhythms, and Sleep. *New England Journal of Medicine*, 343, 15, 1114-6.
- Arendt J, Skene DJ, 2005. Melatonin as a chronobiotic. *Sleep medicine reviews*, 9, 1, 25-39.
- Aukland K, Reed RK, 1993. Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume. *Physiological reviews*, 73, 1, 1-78.
- Badaut J, Brunet JF, Regli L, 2007. Aquaporins in the brain: from aqueduct to "multi-duct". *Metabolic brain disease*, 22, 3-4, 251-63.
- Badaut J, Regli L, 2004. Distribution and possible roles of aquaporin 9 in the brain. *Neuroscience*, 129, 4, 971-81.
- Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA, 2008. *Fizyoloji*, Ankara, Güneş Tıp Kitabevi, p. 96-8.
- Beyer CE, Steketee JD, Saphier D, 1998. Antioxidant properties of melatonin--an emerging mystery. *Biochemical pharmacology*, 56, 10, 1265-72.
- Bhattacharjee H, Carbrej J, Rosen BP, Mukhopadhyay R, 2004. Drug uptake and pharmacological modulation of drug sensitivity in leukemia by AQP9. *Biochemical and biophysical research communications*, 322, 3, 836-41.
- BMB Neuropathology, 2010. Erişim tarihi 04.08.2017. Erişim adresi, http://missinglink.ucsf.edu/lm/introductionneuropathology/Response%20to_Injury/EpendymalCells.htm.
- Bolborea M, Dale N, 2013. Hypothalamic tanycytes: potential roles in the control of feeding and energy balance. *Trends in neurosciences*, 36, 2, 91-100.
- Bolborea M, Laran-Chich MP, Rasri K, Hildebrandt H, Govitrapong P, Simonneaux V, Pevet P, Steinlechner S, Klosen P, 2011. Melatonin controls photoperiodic changes in tanycyte vimentin and neural cell adhesion molecule expression in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *Endocrinology*, 152, 10, 3871-83.

- Bubenik GA, 2001. Localization, physiological significance and possible clinical implication of gastrointestinal melatonin. *Biological signals and receptors*, 10, 6, 350-66.
- Bubenik GA, Blask DE, Brown GM, Maestroni GJ, Pang SF, Reiter RJ, Viswanathan M, Zisapel N, 1998. Prospects of the clinical utilization of melatonin. *Biological signals and receptors*, 7, 4, 195-219.
- Bushong EA, Martone ME, Ellisman MH, 2003. Examination of the relationship between astrocyte morphology and laminar boundaries in the molecular layer of adult dentate gyrus. *The Journal of comparative neurology*, 462, 2, 241-51.
- Campese VM, 2010. Oxidative Stress and Sympathetic Activity in Hypertension. *American Journal of Hypertension*, 23, 5, 456-8.
- Can A, 2014. Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları, Ankara, Akademisyen Tıp Kitabevi, p. 477-85.
- Capela A, Temple S, 2002. LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron*, 35, 5, 865-75.
- Carare RO, Bernardes-Silva M, Newman TA, Page AM, Nicoll JA, Perry VH, Weller RO, 2008. Solutes, but not cells, drain from the brain parenchyma along basement membranes of capillaries and arteries: significance for cerebral amyloid angiopathy and neuroimmunology. *Neuropathology and applied neurobiology*, 34, 2, 131-44.
- Carlen M, Meletis K, Goritz C, Darsalia V, Evergren E, Tanigaki K, Amendola M, Barnabe-Heider F, Yeung MS, Naldini L, Honjo T, Kokaia Z, Shupliakov O, Cassidy RM, Lindvall O, Frisen J, 2009. Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nature neuroscience*, 12, 3, 259-67.
- Chae YK, Kang SK, Kim MS, Woo J, Lee J, Chang S, Kim DW, Kim M, Park S, Kim I, Keam B, Rhee J, Koo NH, Park G, Kim SH, Jang SE, Kweon IY, Sidransky D, Moon C, 2008. Human AQP5 plays a role in the progression of chronic myelogenous leukemia (CML). *PloS one*, 3, 7, e2594.
- Cirrito JR, Yamada KA, Finn MB, Sloviter RS, Bales KR, May PC, Schoepp DD, Paul SM, Mennerick S, Holtzman DM, 2005. Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron*, 48, 6, 913-22.
- Claustrat B, Brun J, Geoffriau M, Chazot G, 1998. Melatonin: from the hormone to the drug? *Restorative neurology and neuroscience*, 12, 2-3, 151-7.
- Cserr HF, 1971. Physiology of the choroid plexus. *Physiological reviews*, 51, 2, 273-311.
- Danilov AI, Kokaia Z, Lindvall O, 2012. Ectopic ependymal cells in striatum accompany neurogenesis in a rat model of stroke. *Neuroscience*, 214, 159-70.
- Del Bigio MR, 1995. The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia*, 14, 1, 1-13.
- Del Bigio MR, 2010. Ependymal cells: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119, 1, 55-73.
- Demarin V, Zavoreo I, Kes VB, Simundić AM, 2011. Biomarkers in Alzheimer's disease. *Clin Chem Lab Med*, 49, 5, 773-8.
- Donkin JJ, Vink R, 2010. Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain injury: therapeutic developments. *Current opinion in neurology*, 23, 3, 293-9.
- Dubocovich ML, Markowska M, 2005. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*, 27, 2, 101-10.

- Dubocovich ML, Masana MI, Jacob S, Sauri DM, 1997. Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 355, 3, 365-75.
- Elkjaer M, Vajda Z, Nejsun LN, Kwon T, Jensen UB, Amiry-Moghaddam M, Frokiaer J, Nielsen S, 2000. Immunolocalization of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain. *Biochemical and biophysical research communications*, 276, 3, 1118-28.
- Ersahin M, Toklu HZ, Cetinel S, Yuksel M, Yegen BC, Sener G, 2009. Melatonin reduces experimental subarachnoid hemorrhage-induced oxidative brain damage and neurological symptoms. *Journal of pineal research*, 46, 3, 324-32.
- Eşrefoğlu M, 2016. Genel Histoloji, İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, p. 307-16.
- Feng X, Papadopoulos MC, Liu J, Li L, Zhang D, Zhang H, Verkman AS, Ma T, 2009. Sporadic obstructive hydrocephalus in Aqp4 null mice. *Journal of neuroscience research*, 87, 5, 1150-5.
- Ferguson SA, Rajaratnam SM, Dawson D, 2010. Melatonin agonists and insomnia. *Expert review of neurotherapeutics*, 10, 2, 305-18.
- Foglio E, Rodella LF, 2010. Aquaporins and Neurodegenerative Diseases. *Current Neuropharmacology*, 8, 2, 112-21.
- Földi M, 1996. The brain and the lymphatic system. *Lymphology*, 29, 1-8.
- Frigeri A, Gropper MA, Umenishi F, Kawashima M, Brown D, Verkman AS, 1995. Localization of MIWC and GLIP water channel homologs in neuromuscular, epithelial and glandular tissues. *Journal of cell science*, 108 (Pt 9), 2993-3002.
- Gilyarov A, Korzhhevskii D, Otellin V, 2009. Change of composition of intermediate filaments in rat telencephalon during early postnatal period of ontogenesis. *Journal of evolutionary biochemistry and physiology*, 45, 1, 147-55.
- Gleiser C, Wagner A, Fallier-Becker P, Wolburg H, Hirt B, Mack AF, 2016. Aquaporin-4 in Astroglial Cells in the CNS and Supporting Cells of Sensory Organs-A Comparative Perspective. *International journal of molecular sciences*, 17, 9.
- Gregg C, Weiss S, 2003. Generation of functional radial glial cells by embryonic and adult forebrain neural stem cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23, 37, 11587-601.
- Groothuis DR, Vavra MW, Schlageter KE, Kang EW, Itskovich AC, Hertzler S, Allen CV, Lipton HL, 2007. Efflux of drugs and solutes from brain: the interactive roles of diffusional transcapillary transport, bulk flow and capillary transporters. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27, 1, 43-56.
- Gunnarson E, Zelenina M, Aperia A, 2004. Regulation of brain aquaporins. *Neuroscience*, 129, 4, 947-55.
- Guyton AC, Hall JE, 2011. Tibbi Fizyoloji Cep Kitabı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, p. 476-79.
- Haj-Yasein NN, Vindedal GF, Eilert-Olsen M, Gundersen GA, Skare O, Laake P, Klungland A, Thoren AE, Burkhardt JM, Ottersen OP, Nagelhus EA, 2011. Glial-conditional deletion of aquaporin-4 (Aqp4) reduces blood-brain water uptake and confers barrier function on perivascular astrocyte endfeet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 43, 17815-20.

- Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP, 2006. Melatonin. The international journal of biochemistry & cell biology, 38, 3, 313-6.
- Hasegawa H, Ma T, Skach W, Matthey MA, Verkman AS, 1994. Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. The Journal of biological chemistry, 269, 8, 5497-500.
- Hayamizu TF, Chan PT, Johanson CE, 2001. FGF-2 immunoreactivity in adult rat ependyma and choroid plexus: responses to global forebrain ischemia and intraventricular FGF-2. Neurological research, 23, 4, 353-8.
- Histology of the Nervous System (The Neuron) Part 2, 2010. Erişim tarihi 05.08.2017. Erişim adresi, <http://what-when-how.com/neuroscience/histology-of-the-nervous-system-the-neuron-part-2/>.
- Hobson JA, 2005. Sleep is of the brain, by the brain and for the brain. Nature, 437, 7063, 1254-6.
- House MJ, St Pierre TG, Foster JK, Martins RN, Clarnette R, 2006. Quantitative MR imaging R2 relaxometry in elderly participants reporting memory loss. AJNR. American journal of neuroradiology, 27, 2, 430-9.
- Iloff JJ, Lee H, Yu M, Feng T, Logan J, Nedergaard M, Benveniste H, 2013. Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI. The Journal of Clinical Investigation, 123, 3, 1299-309.
- Iloff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, Benveniste H, Vates GE, Deane R, Goldman SA, Nagelhus EA, Nedergaard M, 2012. A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid β . Science translational medicine, 4, 147, 147ra11-ra11.
- Jahovic N, Cevik H, Sehirli AO, Yegen BC, Sener G, 2003. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. Journal of pineal research, 34, 4, 282-7.
- Jessica Chen M, Sepramaniam S, Armugam A, Shyan Choy M, Manikandan J, Melendez AJ, Jeyaseelan K, Sang Cheung N, 2008. Water and Ion Channels: Crucial in the Initiation and Progression of Apoptosis in Central Nervous System? Current Neuropharmacology, 6, 2, 102-16.
- Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J, 1999. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. Cell, 96, 1, 25-34.
- Junqueira LC, Carneiro J, 2009. Temel Histoloji text & atlas, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, p. 219-21.
- Kacmaz A, User EY, Sehirli AO, Tilki M, Ozkan S, Sener G, 2005. Protective effect of melatonin against ischemia/reperfusion-induced oxidative remote organ injury in the rat. Surgery today, 35, 9, 744-50.
- Kang JE, Lim MM, Bateman RJ, Lee JJ, Smyth LP, Cirrito JR, Fujiki N, Nishino S, Holtzman DM, 2009. Amyloid-beta dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle. Science (New York, N.Y.), 326, 5955, 1005-7.
- King LS, Kozono D, Agre P, 2004. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. Nature reviews. Molecular cell biology, 5, 9, 687-98.
- Kirik OV, Korzhevskii DE, 2013. Vimentin in Ependymal and Subventricular Proliferative Zone Cells of Rat Telencephalon. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 154, 4, 553-7.
- Klatzo I, 1994. Evolution of Brain Edema Concepts. In: Brain Edema IX: Proceedings of the Ninth International Symposium Tokyo, May 16–19, 1993. Eds: Ito U, Baethmann A, Hossmann K-A et al. Vienna: Springer Vienna, p. 3-6.

- Koh L, Zakharov A, Johnston M, 2005. Integration of the subarachnoid space and lymphatics: is it time to embrace a new concept of cerebrospinal fluid absorption? *Cerebrospinal fluid research*, 2, 6.
- Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T, Bubenik GA, 2007. Role of melatonin in upper gastrointestinal tract. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, 58 Suppl 6, 23-52.
- Konturek SJ, Konturek PC, Pawlik T, Sliwowski Z, Ochmanski W, Hahn EG, 2004. Duodenal mucosal protection by bicarbonate secretion and its mechanisms. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, 55 Suppl 2, 5-17.
- Konuk KE, Sözen B, Tanrıöver G, Demir N, (2011). Fared ventriculus tertius tanisit hücrelerinde aquaporin-4'ün ekspresyonu. 10. Ulusal Sinir Bilimleri Kongresi İstanbul: 120-20.
- Korzhevskii D, Lentsman M, Gilyarov A, 2007. Induction of nestin synthesis in a proportion of rat brain cells by ischemic lesioning. *Morfologiya*, 131, 1, 23-6.
- Kuppers E, Gleiser C, Brito V, Wachter B, Pauly T, Hirt B, Grissmer S, 2008. AQP4 expression in striatal primary cultures is regulated by dopamine--implications for proliferation of astrocytes. *The European journal of neuroscience*, 28, 11, 2173-82.
- Larson ME, Sherman MA, Greimel S, Kuskowski M, Schneider JA, Bennett DA, Lesne SE, 2012. Soluble alpha-synuclein is a novel modulator of Alzheimer's disease pathophysiology. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32, 30, 10253-66.
- Lee DJ, Amini M, Hamamura MJ, Hsu MS, Seldin MM, Nalcioglu O, Binder DK, 2012. Aquaporin-4-dependent edema clearance following status epilepticus. *Epilepsy research*, 98, 2-3, 264-8.
- Lehmann GL, Gradilone SA, Marinelli RA, 2004. Aquaporin water channels in central nervous system. *Current neurovascular research*, 1, 4, 293-303.
- Li X, Kong H, Wu W, Xiao M, Sun X, Hu G, 2009. Aquaporin-4 maintains ependymal integrity in adult mice. *Neuroscience*, 162, 1, 67-77.
- Liebmann PM, Wolfler A, Felsner P, Hofer D, Schauenstein K, 1997. Melatonin and the immune system. *International archives of allergy and immunology*, 112, 3, 203-11.
- Macchi MM, Bruce JN, 2004. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in neuroendocrinology*, 25, 3-4, 177-95.
- Maestroni GJ, 1995. T-helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. *Journal of pineal research*, 18, 2, 84-9.
- Maharaj AS, Walshe TE, Saint-Geniez M, Venkatesha S, Maldonado AE, Himes NC, Matharu KS, Karumanchi SA, D'Amore PA, 2008. VEGF and TGF-beta are required for the maintenance of the choroid plexus and ependyma. *The Journal of experimental medicine*, 205, 2, 491-501.
- Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, Chan P, Verkman AS, 2000. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nature medicine*, 6, 2, 159-63.
- Mathiisen TM, Lehre KP, Danbolt NC, Ottersen OP, 2010. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia*, 58, 9, 1094-103.
- McAllister JP, Miller JM, 2006. Aquaporin 4 and hydrocephalus. *J. Neurosurg: Pediatrics*, 105, 459-65.

- Milhorat TH, Kotzen RM, Anzil AP, 1994. Stenosis of central canal of spinal cord in man: incidence and pathological findings in 232 autopsy cases. *Journal of neurosurgery*, 80, 4, 716-22.
- Mobasheri A, Marples D, Young IS, Floyd RV, Moskaluk CA, Frigeri A, 2007. Distribution of the AQP4 water channel in normal human tissues: protein and tissue microarrays reveal expression in several new anatomical locations, including the prostate gland and seminal vesicles. *Channels (Austin, Tex.)*, 1, 1, 29-38.
- Mollaoglu H, Özgüner MF, 2005. Yaşlanma sürecinde melatoninin rolü. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 12, 3.
- Montagna P, Gambetti P, Cortelli P, Lugaresi E, 2003. Familial and sporadic fatal insomnia. *The Lancet. Neurology*, 2, 3, 167-76.
- Nagelhus EA, Ottersen OP, 2013. Physiological roles of aquaporin-4 in brain. *Physiological reviews*, 93, 4, 1543-62.
- Nase G, Helm PJ, Enger R, Ottersen OP, 2008. Water entry into astrocytes during brain edema formation. *Glia*, 56, 8, 895-902.
- Nedergaard M, 2013. Garbage Truck of the Brain. *Science (New York, N.Y.)*, 340, 6140, 1529.
- Nesic O, Lee J, Unabia GC, Johnson K, Ye Z, Vergara L, Hulsebosch CE, Perez-Polo JR, 2008. Aquaporin 1 - a novel player in spinal cord injury. *Journal of neurochemistry*, 105, 3, 628-40.
- Ovalle WK, Nahirney PC, 2009. *Netter Temel Histoloji*, Ankara, Güneş Tıp Kitabevi, p. 107-119.
- Özdemir Z, Ak O, Yüceer HC, Akgör D, Aysun D, Asparuk Ç, (2014). *Drakula Hormon: Melatonin*. Başkent Üniversitesi 16. Öğrenci Sempozyumu. Ankara: 1-14.
- Öztaş B, 1992. Merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarında kan-beyin bariyerinin ve beyin omurilik sıvısının klinik önemi. *Klinik dergi*, 3, 140-44.
- Öztürk G, Delibaş N, 2011. Aquaporinlerin Beyindeki Rollerini. *Türk Klinik Laboratuvar Dergisi*, 3, 115-19.
- Papadopoulos MC, Manley GT, Krishna S, Verkman AS, 2004. Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18, 11, 1291-3.
- Papadopoulos MC, Verkman AS, 2008. Potential utility of aquaporin modulators for therapy of brain disorders. *Progress in brain research*, 170, 589-601.
- Paulis L, Simko F, 2007. Blood pressure modulation and cardiovascular protection by melatonin: potential mechanisms behind. *Physiological research*, 56, 6, 671-84.
- Pearson Education, 2011. Erişim tarihi 05.08.2017. Erişim adresi, <http://www2.highlands.edu/academics/divisions/scipe/biology/faculty/harnden/2121/image/s/neuroglialcns.jpg>.
- Penev PD, Zee PC, 1997. Melatonin: a clinical perspective. *Annals of neurology*, 42, 4, 545-53.
- Pfenninger CV, Roschupkina T, Hertwig F, Kottwitz D, Englund E, Bengzon J, Jacobsen SE, Nuber UA, 2007. CD133 is not present on neurogenic astrocytes in the adult subventricular zone, but on embryonic neural stem cells, ependymal cells, and glioblastoma cells. *Cancer research*, 67, 12, 5727-36.
- Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P, 1992. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science (New York, N.Y.)*, 256, 5055, 385-7.

- Prochnow N, Dermietzel R, 2008. Connexons and cell adhesion: a romantic phase. *Histochemistry and cell biology*, 130, 1, 71-7.
- Reiter RJ, 1991. Neuroendocrine effects of light. *International journal of biometeorology*, 35, 3, 169-75.
- Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX, 2000. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 917, 376-86.
- Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS, 1997. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*, 29, 8, 363-72.
- Reiter RJ, Maestroni GJ, 1999. Melatonin in relation to the antioxidative defense and immune systems: possible implications for cell and organ transplantation. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 77, 1, 36-9.
- Reiter RJ, Paredes SD, Korkmaz A, Manchester LC, Tan DX, 2008. Melatonin in relation to the "strong" and "weak" versions of the free radical theory of aging. *Advances in medical sciences*, 53, 2, 119-29.
- Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, Tan DX, 2009. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 44, 4, 175-200.
- Reiter RJ, Tan DX, Erren TC, Fuentes-Broto L, Paredes SD, 2009. Light-mediated perturbations of circadian timing and cancer risk: a mechanistic analysis. *Integrative cancer therapies*, 8, 4, 354-60.
- Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E, 2000. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *Journal of biomedical science*, 7, 6, 444-58.
- Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Flores LJ, Czarnocki Z, 2007. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta biochimica Polonica*, 54, 1, 1-9.
- Reppert SM, Weaver DR, Godson C, 1996. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends in pharmacological sciences*, 17, 3, 100-2.
- Roberts LM, Black DS, Raman C, Woodford K, Zhou M, Haggerty JE, Yan AT, Cwirala SE, Grindstaff KK, 2008. Subcellular localization of transporters along the rat blood-brain barrier and blood-cerebral-spinal fluid barrier by in vivo biotinylation. *Neuroscience*, 155, 2, 423-38.
- Rodriguez EM, Blazquez JL, Pastor FE, Pelaez B, Pena P, Peruzzo B, Amat P, 2005. Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. *International review of cytology*, 247, 89-164.
- Ross MH, Pawlina W, 2014. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas*, Ankara, Palme Yayıncılık, p. 372-86.
- Saper CB, Fuller PM, Pedersen NP, Lu J, Scammell TE, 2010. Sleep state switching. *Neuron*, 68, 6, 1023-42.
- Sarnat HB, 1992. Role of human fetal ependyma. *Pediatric neurology*, 8, 3, 163-78.
- Schulz P, Steimer T, 2009. Neurobiology of circadian systems. *CNS drugs*, 23 Suppl 2, 3-13.
- Sener G, Balkan J, Cevikbas U, Keyer-Uysal M, Uysal M, 2004. Melatonin reduces cholesterol accumulation and prooxidant state induced by high cholesterol diet in the plasma, the liver and probably in the aorta of C57BL/6J mice. *Journal of pineal research*, 36, 3, 212-6.

- Sewerynek E, 2002. Melatonin and the cardiovascular system. *Neuro endocrinology letters*, 23 Suppl 1, 79-83.
- Shaw PJ, Tononi G, Greenspan RJ, Robinson DF, 2002. Stress response genes protect against lethal effects of sleep deprivation in *Drosophila*. *Nature*, 417, 6886, 287-91.
- Shin I, Kim HJ, Lee JE, Gye MC, 2006. Aquaporin7 expression during perinatal development of mouse brain. *Neuroscience letters*, 409, 2, 106-11.
- Skjolding AD, Rowland IJ, Søgaard LV, Praetorius J, Penkowa M, Juhler M, 2010. Hydrocephalus induces dynamic spatiotemporal regulation of aquaporin-4 expression in the rat brain. *Cerebrospinal fluid research*, 7, 20-.
- Song Y, Chan CW, Brown GM, Pang SF, Silverman M, 1997. Studies of the renal action of melatonin: evidence that the effects are mediated by 37 kDa receptors of the Mella subtype localized primarily to the basolateral membrane of the proximal tubule. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 11, 1, 93-100.
- Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A, 2005. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25, 1, 10-8.
- Stickgold R, 2006. Neuroscience: a memory boost while you sleep. *Nature*, 444, 7119, 559-60.
- Sukhikh G, Malaitsev V, 2001. Neural stem cell: biology and prospects of neurotransplantation. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 131, 3, 203-12.
- Sumida M, Barkovich AJ, Newton TH, 1996. Development of the pineal gland: measurement with MR. *AJNR. American journal of neuroradiology*, 17, 2, 233-6.
- Sykova E, Nicholson C, 2008. Diffusion in brain extracellular space. *Physiological reviews*, 88, 4, 1277-340.
- Şener G, 2010. Karanlığın hormonu: Melatonin. *Marmara Pharmaceutical Journal*.
- Tait MJ, Saadoun S, Bell BA, Papadopoulos MC, 2008. Water movements in the brain: role of aquaporins. *Trends in neurosciences*, 31, 1, 37-43.
- Tani K, Mitsuma T, Hiroaki Y, Kamegawa A, Nishikawa K, Tanimura Y, Fujiyoshi Y, 2009. Mechanism of aquaporin-4's fast and highly selective water conduction and proton exclusion. *Journal of molecular biology*, 389, 4, 694-706.
- Tonchev AB, Yamashima T, Guo J, Chalidakov GN, Takakura N, 2007. Expression of angiogenic and neurotrophic factors in the progenitor cell niche of adult monkey subventricular zone. *Neuroscience*, 144, 4, 1425-35.
- Tourdias T, Dragonu I, Fushimi Y, Deloire MS, Boiziau C, Brochet B, Moonen C, Petry KG, Doussot V, 2009. Aquaporin 4 correlates with apparent diffusion coefficient and hydrocephalus severity in the rat brain: a combined MRI-histological study. *NeuroImage*, 47, 2, 659-66.
- Tresguerres JA, Kireev R, Tresguerres AF, Borrás C, Vara E, Ariznavarreta C, 2008. Molecular mechanisms involved in the hormonal prevention of aging in the rat. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 108, 3-5, 318-26.
- Venero JL, Vizuete ML, Machado A, Cano J, 2001. Aquaporins in the central nervous system. *Progress in neurobiology*, 63, 3, 321-36.

- Verkman AS, Mitra AK, 2000. Structure and function of aquaporin water channels. American journal of physiology. Renal physiology, 278, 1, F13-28.
- Verleysdonk S, Kistner S, Pfeiffer-Guglielmi B, Wellard J, Lupescu A, Laske J, Lang F, Rapp M, Hamprecht B, 2005. Glycogen metabolism in rat ependymal primary cultures: regulation by serotonin. Brain research, 1060, 1-2, 89-99.
- Vio K, Rodriguez S, Navarrete EH, Perez-Figares JM, Jimenez AJ, Rodriguez EM, 2000. Hydrocephalus induced by immunological blockage of the subcommissural organ-Reissner's fiber (RF) complex by maternal transfer of anti-RF antibodies. Experimental brain research, 135, 1, 41-52.
- Walz T, Fujiyoshi Y, Engel A, 2009. The AQP structure and functional implications. Handbook of experimental pharmacology, 190, 31-56.
- Wang X, 2009. The antiapoptotic activity of melatonin in neurodegenerative diseases. CNS neuroscience & therapeutics, 15, 4, 345-57.
- We all know water is important to our Bodies. What is the “correct” water to drink?, 2012. Erişim tarihi 05.08.2017. Erişim adresi, <http://berryenvironmentalservices.com/?p=84>.
- Weller RO, Subash M, Preston SD, Mazanti I, Carare RO, 2008. Perivascular drainage of amyloid-beta peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. Brain pathology (Zurich, Switzerland), 18, 2, 253-66.
- Xie L, Kang H, Xu Q, Chen MJ, Liao Y, Thiagarajan M, O'Donnell J, Christensen DJ, Nicholson C, Iloff JJ, Takano T, Deane R, Nedergaard M, 2013. Sleep Drives Metabolite Clearance from the Adult Brain. Science (New York, N.Y.), 342, 6156, 373.
- Yamada K, Cirrito JR, Stewart FR, Jiang H, Finn MB, Holmes BB, Binder LI, Mandelkew EM, Diamond MI, Lee VM, Holtzman DM, 2011. In vivo microdialysis reveals age-dependent decrease of brain interstitial fluid tau levels in P301S human tau transgenic mice. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 31, 37, 13110-7.
- Yang J, Lunde LK, Nuntagij P, Oguchi T, Camassa LM, Nilsson LN, Lannfelt L, Xu Y, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Torp R, 2011. Loss of astrocyte polarization in the tg-ArcSwe mouse model of Alzheimer's disease. Journal of Alzheimer's disease : JAD, 27, 4, 711-22.
- Yao X, Hrabetova S, Nicholson C, Manley GT, 2008. Aquaporin-4-deficient mice have increased extracellular space without tortuosity change. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 28, 21, 5460-4.
- Ye X, Carp RI, 2002. Increase of acidic fibroblast growth factor in the brains of hamsters infected with either 263K or 139H strains of scrapie. Journal of molecular neuroscience : MN, 18, 3, 179-88.
- Yüncü M, 2014. Histobul, Adana, Çokurova Nobel Tıp Kitabevi, p. 135-37.
- Zador Z, Bloch O, Yao X, Manley GT, 2007. Aquaporins: role in cerebral edema and brain water balance. Progress in brain research, 161, 185-94.
- Zahs KR, 1998. Heterotypic coupling between glial cells of the mammalian central nervous system. Glia, 24, 1, 85-96.

7. EKLER



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
DENEYSEL TIP ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ MÜDÜRLÜĞÜ

Sayı : 41475755-2015/95
Konu : Etik Kurulu Onayı

27.10.2015

Sayın Prof. Dr. Ender ERDOĞAN

“Sıçan Tanisit Hücrelerinde Aquaporin 4 Kanallarının İmmunhistokimyasal Dağılımı ve Glimfatik Sistem Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” isimli ve 2015/95 sayılı projeniz 27.10.2015 tarihinde yapılan Etik Kurul Toplantısında kabul edilmiştir.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof.Dr. Nilset OKUDAN

ETİK KURUL BAŞKANI

8. ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında A.B.D'nin Kaliforniya eyaleti Sacramento şehrinde doğdu. İlkokula Ankara Mimar Kemal İlkokulunda başladı, Maastricht (Hollanda) Joppenhof ilkokulunda devam edip, Ankara Yücetepe İlköğretim okulunda tamamladı. Ortaokul ve liseyi Ankara Etimesgut Anadolu Lisesinde okudu. 2004 yılında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesine girdi. 2010 yılında mezun olduktan sonra Batman Sason Devlet Hastanesinin Acil Bölümünde yaklaşık 1 yıl süre ile pratisyen hekimlik yaptı. Ardından Batman Kozluk Taşlıdere Aile Sağlığı Merkezinde yaklaşık 1 yıl süre ile Aile Hekimi olarak görev yaptı. 2012 yılında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitime başladı. Doktora eğitimiyle eş zamanlı olarak, birçok firmanın İşyeri Hekimliği hizmetlerini yürütmektedir. Evli ve bir kız çocuk babasıdır.