

T.C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GLOBAL SEREBRAL İSKEMİ/REPERFÜZYON SONRASINDA
AKUAPORİN 1 VE AKUAPORİN 4'ÜN ZAMAN İÇİNDEKİ
DAĞILIMI, İSKEMİK ÖDEMLE İLİŞKİSİ**

Dr. Gökhan AKDEMİR

İleri Nörolojik Bilimler Programı

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2010

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLOBAL SEREBRAL İSKEMİ/REPERFÜZYON SONRASINDA
AKUAPORİN 1 VE AKUAPORİN 4'ÜN ZAMAN İÇİNDEKİ
DAĞILIMI, İSKEMİK ÖDEMLE İLİŞKİSİ

Dr. Gökhan AKDEMİR

İleri Nörolojik Bilimler Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Nejat AKALAN

ANKARA

2010

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼'ne:

Bu alışma j¼rimiz tarafından İleri N¼rolojik Bilimler Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

J¼ri Başkanı: Prof. Dr. Nejat Akalan
Danışman Hacettepe niversitesi

ye: Prof. Dr. Tomris Erbaş
Hacettepe niversitesi

ye: Prof. Dr. Hakan Caner
Başkent niversitesi

ye: Doç. Dr. Yasemin G¼rsoy zdemir
Hacettepe niversitesi

ye: Doç. Dr. Atila Akbay
Hacettepe Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisans¼st¼ Eğitim ğretim ve Sınav Y¼netmenlięi'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki j¼ri yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hakan S. Orer

Enstit¼ M¼d¼r¼

TEŞEKKÜR

Yazar, bu çalışmanın gerçekleőmesine katkılarından dolayı aőađıda adı geçen kiőilere içtenlikle teşekkür eder.

Sayın Prof. Dr. Nejat Akalan, tez danışmanı olarak çalışmaya yol gosterici ve eğitici olarak katkılarda bulunmuştur.

Sayın Prof. Dr. Figen Kaymaz, immünohistokimyasal incelemelerde katkı sađlamıőtır.

Sayın Doç. Dr. Yasemin Gürsoy-Özdemir, Western blotlama sonuçlarının alınmasında ve tezin oluőturulmasında yapıcı eleőtirilerde bulunmuştur.

Sayın Doç. Dr. Tacettin İnandı, istatistik analizlerinde katkıda bulunmuştur.

ÖZET

Akdemir G. Global serebral iskem/reperfüzyon sonrasında akuaporin 1 ve akuaporin 4'ün zaman içindeki dağılımı, iskemik ödemle ilişkisi. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İleri Nörolojik Bilimleri Doktora Tezi, Ankara, 2010. Beyin ödemi, santral sinir sistemini etkileyen kafa travması, iskemi, tümörler, enfeksiyon ve metabolik hastalıklarında morbidite ve mortalite üzerine etkileri olan, beyin dokusunda ilerleyici su artışı ile karakterize önemli bir patofizyolojik bir durumdur. Klatzo tarafından sitotoksik ve vazojenik ödem olarak ikiye ayrılmıştır. Sitotoksik ödem, hücre membranındaki enerji yetmezliği sonucu hücreler arası sıvının hücre içine girmesiyle oluşur. Vazojenik ödem, kan beyin engelindeki (KBE) fonksiyon bozukluğu ile kapillerdeki sıvının hücreler arası aralığa sızmasıyla gelişir. Serebral iskem/reperfüzyonda ödemin bu iki tipi birlikte görülür. Akuaporin kanallarının (AQP) hücrelere ve hücreden dışarıya su taşınmasında etkili oldukları düşünülmektedir. Beyinde özellikle AQP1'in serebral ventrikül koroid pleksus epitelinde ifade edildiği ve beyin omurilik sıvısı (BOS) üretimine katkıda bulunduğu bilinmektedir. AQP4 kan beyin engelinde astrositik son ayaklarda bulunarak su taşınmasına katkıda bulunmaktadır. Bu çalışmada amaç, global serebral iskemide AQP1 ve AQP4'ün zaman içindeki dokulardaki dağılımını görmektir. Sprague-Dawley tipi erkek sıçanlar (rat) 6 gruba ayrıldı. Bir grup kontrol (sham), beş grupta iskem ve reperfüzyon uygulandı. Dört damar oklüzyon modeli kullanılarak 30 dakika oklüzyon yapıldı. İskem/reperfüzyon gruplarında, reperfüzyon sonrası 1, 6, 12, 24 ve 48 saatlerde beyinler dekapite edilerek çıkarıldı. Beyin ödemi için yaş/kuru ağırlıkları ölçüldü. AQP1 ve AQP4 antikoru ile immünohistokimyasal işaretlemeler yapılarak ölçüldü. AQP'lerin protein miktarını saptamak için western blotlama yapıldı. Sonuçlarda, AQP4'ün parankimde ve ventrikülün subependimal bölgede yoğun olduğu saptandı. İmmünohistokimyasal ve western blotlamada iskem/reperfüzyon sonrası zaman içindeki ifade edilmelerinde AQP4'de belirgin ve anlamlı bir farkın olmadığı görüldü. AQP4'ün iskemik ödemin bütün aşamalarında etkin olduğunu düşündürdü. AQP4 sitotoksik ödemde ödemi artırıcı, vazojenik ödemde ödemi azaltıcı etkisi görüldü. AQP1, immünohistokimyasal çalışmalarda daha çok ventrikül koroid pleksusunda yer aldığı, iskem/reperfüzyonun 12. ve 24. saatlerinde anlamlı bir şekilde azaldığı ($p<0.05$) görüldü. AQP1'in kafa içi basınç artımında, BOS yapımını azalttığı düşünüldü. AQP1 ve AQP4 iskemik beyin ödemin bütün aşamalarında etkin olduğu görüldü. Bu çalışma sonucunda, AQP-bağımlı ve AQP-bağımsız olmak üzere yeni bir beyin ödemi sınıflaması önerisinde bulunuldu.

Anahtar Kelimeler: Akuaporin1, akuaporin 4, beyin, iskem, ödem, sıçan

Destekleyen Kurum: Türk Nöroşirurji Derneği

ABSTRACT

Akdemir G, The changes over time in expression of aquaporin 1 and aquaporin 4 following global cerebral ischemia and the relationship to ischemic edema. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Neuroscience, Ankara, 2010. Brain edema plays a critical role in the pathophysiology, morbidity and mortality of a wide variety of nervous system disorders such as head trauma that affects the central nervous system, ischemia, tumors, infection and progressive increase of water in the brain. There are two types of edema as classified by Klatzo: cytotoxic and vasogenic. In cytotoxic edemas, intercellular fluid enters cells because of depletion of the energy of the cellular membranes. In vasogenic edemas, there is a breakdown of the blood-brain barrier leading to water from the capillaries flowing into intercellular area. In cerebral ischemia and reperfusion, both types of edemas are seen together. Aquaporin (AQP) channels affect the transportation of water into and out of the cells. Aquaporin 1 in particular affects the production of cerebrospinal fluid at the brain ventricular choroid plexus. Aquaporin 4, found in the astrocytic end feet, affects the blood-brain barrier and water transportation. The aim of this study of global cerebral ischemia was to study the changes in levels of aquaporin 1 and 4 over time. The subject Sprague-Dawley type male rats were divided into six groups. One group was the control group, and ischemia/reperfusion was performed on the other five groups using the four-vessels occlusion model. Reperfusion was done 30 minutes after the occlusion. Following the reperfusion, a group each was tested at increments of 1, 6, 12, 24 and 48 hours. The rats' brains were removed by decapitation. The wet and dry weights of the brains were measured. AQP 1 and 4 were measured using immunohistochemistry. The western blotting technique was used to detect AQP protein levels. The result was that following ischemia/reperfusion, immunohistochemical and western blotting tests revealed that the change in levels of AQP4 was statistically insignificant. AQP4 was expressed in astrocyte foot processes surrounding capillaries, astrocyte processes comprising the glial limiting membrane, in ependymal cells, and in subependymal astrocytes. The fact that the expression didn't change appears to indicate that it played a role in both cytotoxic and vasogenic edemas. AQP4 facilitates edema formation in diseases causing cytotoxic edema, in contrast facilitates edema elimination in disease causing vasogenic edema such as brain ischemia. The immunohistochemical study revealed that AQP1 was expressed in epithelial cells of choroid plexus, but the expression significantly decreased ($p < 0.05$) at the 12- and 24-hour marks. This indicates that increasing intracranial pressure causes AQP1 to produce less CSF. AQP1 and AQP4 have a lasting effect with both types of edema following ischemic edema, up until and including the resolution of the edema. As a result a new classification for brain edema is proposed AQP-dependent and AQP-independent of brain edema.

Key Words: Aquaporin 1, aquaporin 4, brain, edema, ischemia, rat

Supported by Turkish Neurosurgical Society

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. BEYİNDE SU DENGESİ	3
2.1.1. Temel Kavramlar	3
2.1.2. Kan Beyin Engeli	6
2.1.3. Astrositler ve Su Dengesi	8
2.1.4. Kan BOS Engeli	10
2.1.5. Astrositlerde Suyun Hormonal Kontrolü	17
2.2. AKUAPORİNLER	22
2.2.1. Akuaporinlerin Yapısı ve Fonksiyonel Özellikleri	22
2.2.2. Akuaporinlerin Sınıflaması	24

2.2.3.	AQP1	26
2.2.4.	AQP4	26
2.3.	İSKEMİ	35
2.3.1	İskemi Modelleri	36
2.3.2.	İskemi/Reperfüzyon	37
2.4.	BEYİN ÖDEMİ	41
2.4.1.	Sitotoksik (Hücreyel) Ödem	42
2.4.2.	Vazojenik Ödem	46
2.4.3.	İskemik Ödem	48
3.	GEREÇ VE YÖNTEMLER	50
3.1.	Protokol	50
3.2.	Deney Hayvanları	50
3.3.	Anestezi	51
3.4.	İskemi Modeli ve Cerrahi Teknik	51
3.5.	Yaş/Kuru Ağırlık	52
3.6.	İmmünohistokimyasal Boyama	52
3.7.	Western Blotlama	54
3.8.	İstatistiksel Yöntemler	55
4.	BULGULAR	56
4.1.	Beyin Ödeminin Gösterilmesi	56
4.2.	Yaş/Kuru Ağırlık Sonuçları	59
4.3.	İmmünohistokimyasal Boyama Sonuçları	61

4.4.	Western Blotlama Sonuçları	77
5.	TARTIŞMA	80
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	89
7.	KAYNAKLAR	90

SİMGELER VE KISALTMALAR

AGT: Anjiotensinojen

Ang: Anjiotensin

ANP: Atrial Natriüretik Peptid

AQP: Akuaporin

AVP: Vazopressin

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

KBE: Kan Beyin Engeli

KİB: Kafa İçi Basınç

MRG: Magnetik Rezonans Görüntüleme

NVB: Nörovasküler Birim

RAS: Renin Anjiotensin Sistemi

rCBF: Bölgesel Serebral Kan Akımı

SB: Sıkı Bağlantı

SKA: Serebral Kan Akımı

SSS: Santral Sinir Sistemi

ŞEKİLLER

		Sayfa
2.1.1	Kan beyin engeli	8
2.1.2.	Koroid pleksus epiteli	13
2.1.3.	Koroid pleksus epitelinden sıvı ve su geçişi	16
2.1.4.	Glial hücrelerde AVP-ANP sistemi	19
2.1.5.	Glial hücrelerde RAS	21
2.2.1.	AQP1'in şematik gösterimi	23
2.2.2	AQP'lerin beyinde bulunuş yerleri	27
2.2.3.	AQP4'ün bulunduğu yerler ve su geçişi	30
2.2.4.	AQP4, su ve K ⁺ dengesi	32
2.3.1.	İskemi/reperfüzyon ve ödem oluşum süreci	40
2.4.1.	Beyin ödemi oluşumu	42
2.4.2.	Sitotoksik ve vazojenik ödemin oluşumu	49
4.1.1.	Hipokampusun normal ve iskemik ödem görüntüsü	57
4.1.2.	Girus dentatusda ödem ve nekrozun gösterilmesi	58
4.2.	Yaş/kuru ağırlık sonucunun grafikte gösterilmesi	60
4.3.1.1.	AQP4'ün parankim ifadesinin grafikte gösterilmesi	62
4.3.1.2.	AQP4 immünohistokimyasal boyanma görüntüsü	63
4.3.1.3.	Parankimdeki hücre yoğunluğunun grafiği	64
4.3.2.1.	AQP4'ün koroid pleksus ölçümleri grafiği	66

4.3.2.2.	AQP4 ifadesinin koroid pleksusda gösterilmesi	67
4.3.2.3.	Ventriküldeki hücre yoğunluğu grafiği	68
4.3.3.1.	AQP1 koroid pleksusdaki ölçümlerinin grafiği	70
4.3.3.2.	AQP1 koroid pleksusdaki immün boyanması	71
4.3.3.3.	Ventrikül içinde hücre yoğunluk grafiği	72
4.3.4.1.	AQP1'in parankim ölçümlerinin grafikte gösterilmesi	74
4.3.4.2.	AQP1'in parankimde immünohistokimyasal boyanması	75
4.3.4.3.	Parankim içi hücre yoğunluk grafiği	76
4.4.1.	AQP1 ve AQP4 western blotlama jel görüntüleri	77
4.4.2.	AQP1 western blotlama sonuçlarının gösterilmesi	78
4.4.3.	AQP4 western blotlama sonuçlarının gösterilmesi	79

TABLULAR

		Sayfa
2.2.	Akuaporinlerin sınıflandırılması	25
4.2.	Yaş/kuru ağırlıkda elde edilen su yüzdesi	60
4.3.1.1.	Parankimdeki AQP4 ifadesi ölçümleri	62
4.3.1.2.	Parankimdeki hücre çekirdek yoğunluğu	64
4.3.2.1.	Koroid pleksusdaki AQP4 ifadesi ölçümleri	66
4.3.2.2.	Ventriküldeki hücre çekirdek yoğunluğu	68
4.3.3.1.	Koroid pleksusdaki AQP1'in ifadesi ölçümleri	70
4.3.3.2.	Ventriküldeki hücre çekirdek yoğunluğu	72
4.3.4.1.	Parankimdeki AQP1 ifadesi ölçümleri	74
4.3.4.2.	Parankimdeki hücre çekirdek yoğunluğu	76
4.4.1.	Western blotlamada AQP1 ifadesi yoğunluk ölçümleri	78
4.4.2.	Western blotlamada AQP4 ifadesi yoğunluk ölçümleri	79

1. GİRİŞ

Serebral ödem, beyin dokusunda ilerleyici biçimde su içeriğinin artması ile oluşur. Serebral iskemi (171), travma (234), tümör (179) ve enflamasyonun (148) bir komplikasyonu olarak geliştiği deneysel olarak gösterilmiştir (235). Beyin dokusundaki su içeriğinde ilerleyici artış, kafatasının sert olması nedeniyle, kafa içi basınç (KİB) yükselmesine, serebral kan akımında azalmaya, herniyasyona ve ölüme neden olur.

Beyin dokusundaki su artışı, Igor Klatzo tarafından 1967 yılında, sitotoksik ve vazojenik ödem olarak tanımlanmıştır (91). Sitotoksik ödem, hücre duvarındaki enerji yetmezliği ile ortaya çıkan, hücre içeriğindeki su artışı olarak tanımlanmıştır. Kan beyin engelindeki (KBE) geçirgenliğin artması sonucu, hücreler arası su içeriğini artışı da vazojenik ödem olarak tanımlamıştır.

Beyindeki su fizyolojisinin bilinmesi, kafatası içerisindeki su değişim işlemlerinin anlaşılmasına yardım edecek ve aynı zamanda beyin ödemi, hidrocefali gibi beyin su metabolizması bozukluklarının günümüzde, çok etkin olmayan tedavi seçeneklerine katkı sağlayacaktır.

Beyin su dengesi, kapillerlerden gelen plazma içeriğinin KBE'ni geçmesi ve koroid pleksusdan üretilen beyin omurilik sıvısı (BOS) ile sağlanmaktadır. Ayrıca beyin glikoz metabolizması ve nöronal aktivitesinde ortaya çıkan glutamatın geri alımı, K^+ klerensi, monokarboksilat taşınması gibi birçok etken, beyin su dengesi üzerinde doğrudan veya dolaylı olarak rol almaktadır (40, 116, 133). Tüm organlarda olduğu gibi su, beyinde de plazma membranındaki üç farklı işleyle taşınmaktadır. Bunlar plazma lipid tabakalarında yavaş ilerleyen difüzyon, organik ve inorganik iyonlar geçişi ve özelleşmiş su kanalları-akuaporinler -*aquaporins* (AQP) tarafından sağlanmaktadır (1).

Hücre duvarında yer alan bu su kanallarından akuaporin 4 (AQP4) akuaporin 1 (AQP1) ve akuaporin 9 (AQP9)'un varlığı beyinde gösterilmiştir (17, 18, 27). AQP4'ün astrosit son ayaklarda, beyin kapillerlerinde ve subpial bazal laminada belirgin olarak ifade olmaları, bu kanalların beyin su dengesinde etkin olduğunu düşündürmektedir (8, 10, 51, 136, 140, 167, 192). AQP1 ise koroid pleksus epitelinde yoğun olarak bulunmakta ve BOS üretimine katkı yapmaktadır (66, 111, 145).

Beyinde rol aldıkları düşünülen AQP4 ve AQP1'in beyin ödemindeki etkileri bilinmekle birlikte, iskemik ödemde görülen sitotoksik ve vazojenik ödemlerin bir arada, ardışık şekilde görülmelerindeki etkinliği henüz anlaşılamamıştır.

Bu çalışmada, sıçanlarda global iskemi modeli kullanılarak, sitotoksik ve vazojenik ödemin bir arada görüldüğü iskemi oluşturularak, AQP1 ve AQP4'ün zaman içindeki etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışma sonucunda beyin ödeminin sınıflaması ve oluş işlergelerinin anlaşılması, AQP1 ve AQP4'ün beyin dokularındaki zaman içindeki dağılımı görülecektir. Geliştirilecek tedavi seçeneklerinde yer alması düşünülen AQP'lerin inhibisyonu ya da ekspresyonuna etki edecek ilaçların etkinliğine ve zamanlamasına katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. BEYİNDE SU DENGESİ

2.1.1. Temel Kavramlar

Bütün dokularda su ve solüt geçişi, kan damarlarının endotel hücreleri ile dokular arasındaki bir denge ile sağlanmaktadır. Dokulardaki sıvı geçişi İngiliz fizyolog Ernest Starling'in 1896 yılında tanımladığı eşitliğe göre (200), normal koşullarda kapillerlerden dışarı filtre olan sıvı miktarı ile diğer kapillerlerden emilen sıvı miktarı arasında bir denge ile sağlanır (165).

Bu eşitlik:

$$J_v = K_f ([P_c - P_i] - \sigma [\pi_c - \pi_i])$$

J_v : İki kompartman arasındaki net güç.

K_f : Filtrasyon katsayısı: Dokuların özelliklerini göre geçirgenlik katsayısı, kapiller katsayısı, yüzey alanına genişliğini gösterir.

P_c : Kapiller hidrostatik basınç: Sıvıyı kapiller membrandan dışarı iten basınç.

P_i : İntertisyel hidrostatik basınç: Hücreler arası bölgeden sıvıyı kapillere doğru iten basınç.

σ : Refleksiyon katsayısı: Proteinlerin geçiş katsayısı.

π_c : Kapiller onkotik basınç: Sıvıyı kapiller membrandan içeri doğru çeken basınç.

π_i : İntertisyel onkotik basınç: Hücreler arası bölgeye kapillerden, sıvıyı çeken basınç.

Hidrostatik basınç, bir sıvı içinde bulunan cisme, bu sıvının kütlesi tarafından etki eden basınca denir. Onkotik basınç (kolloidal ozmotik basınç), kan plazmasında yer alan büyük proteinlerin oluşturduğu basınca denir.

Normal dokularda bu denge, sıvıyı dışarı iten güçlerin toplamı (kapillerden dokuya) 28.3. mmHg olarak bulunmuştur. Sıvıyı içeri iten güçlerin toplamı (dokudan kapillerlere) 28.0 mmHg olarak hesaplanmıştır. Aradaki bu 0.3 mmHg'lık fark, filtrasyon katsayısı olarak kabul edilmektedir. Bu katsayı doku özelliklerine göre değişmektedir. Örneğin beyin ve kas dokusunda çok düşük, deri altı dokusu, ince barsak ve karaciğer dokusunda çok yüksektir. Çünkü bu dokulardaki kapiller yüzey alanı ve özellikleri farklıdır.

Burada önemli olan refleksiyon katsayısıdır. Bu katsayı 0-1 arasında bir değerdir. Örneğin bu katsayı periferik kapillerde tuz için $\sigma_{\text{tuz}}=0$ 'dır, bunun anlamı, periferik kapillerlerdeki tuz oranı dokuya geçen tuz miktarı ile aynıdır. Yani tuz kapillerden geçerken herhangi bir engelle karşılaşmamıştır.

Periferik kapillerde $\sigma_{\text{protein}}=0.93$ 'dür. Bunun anlamı ise, plazma proteinlerin % 93'ü kapiller yatakta kalmakta, dokuya geçerken engelle karşılaşmaktadır. Kapiller yatakta kalan bu protein, net su geri dönüşünü sağlayan ozmotik basıncı oluşturmaktadır. Periferik dokulardaki lenfatik sistem, arta kalan basınç farkında dolayı dokularda biriken sıvıyı uzaklaştırarak ödem oluşmasını engellemektedir. Ancak beyinde lenfatik akım yoktur.

Santral sinir sisteminde (SSS) vasküler endotelial hücreler, sıkı bağlantı (SB)-*tight junction (TJ)* proteinleri ile ve özelleşmiş proteinlerden oluşmaktadır (96). Sıkı bağlantılar, Na^+ ve K^+ gibi hidrofilik maddelerin geçişini önler. SB'ların var olması refleksiyon katsayısını değiştirmektedir. σ_{protein} ve σ_{tuz} , SB'da yer alan zonula okludenslerin katkısı ile protein ve tuz geçişini sınırlamaktadır.

Starling Eşitliği beyin için tekrar oluşturulursa:

$$J_v = K_f([P_c - P_i] - \sigma_{\text{protein}}[\pi_c - \pi_i] - \sigma_{\text{tuz}}[\pi_c - \pi_i])$$

SSS'de $\sigma_{tuz}=1$ eşit olması durumunda, su hareketlerinin beyin kapillerlerinde dokuya girmesi için kan basıncına gereksinim vardır. Kan basıncı da KİB'den yüksek olmalıdır ki kan akımı ve su geçişi beyine doğru sağlanabilsin. Buna karşın kapiller içindeki onkotik basınç (π_c) iyon yoğunluğunu artırarak hücre dışı iyon yoğunluğunun dilüsyonuna neden olur. Beyin kapiller arteriyollerindeki plazma basıncı (P_{plazma}) 20-35 mmHg'dır. Beyin doku basıncı ise KİB'a eşittir ve yaklaşık 5-10 mmHg'dır. Bu aradaki fark hidrostatik basınç olup sıvının kapillerden dokuya girmesini sağlayan 10-30 mm Hg basıncı oluşturur. Hücreler arası boşluktaki onkotik basınç, beyin omurilik sıvısı (BOS) onkotik basıncına eşittir (166). Burada belirleyici olan beyin dokusundaki refleksiyon katsayısıdır. Katsayıdaki değişiklikler ödemin oluşması ve çözülmesini belirlemekte ve katsayıyı etki eden önemli proteinlerden biri AQP'lerdir (191).

Bu denge, otomatik olarak hemen kurularak, su geçişi SSS'de sağlanmaktadır (162). Beyin su kontrolündeki negatif *feedback*, KBE'nin sağlam olduğunda geçerli olan bir dengedir. KBE'nin bütünlüğünün bozulması durumunda, beyine giren sıvı miktarı artarak ödem oluşturacak ve KİB'ı artırarak herniyasyona neden olacaktır.

Beyin, nöron ve glial hücreler olmak üzere iki ana hücrelerden oluşur. Glial hücrelerin nöronal modülasyonu ve dengeyi sağlamada önemli rolleri mevcuttur. Glial hücreler, mikroglia ve makroglia olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Mikroglialar fagositoz yaparlar. Makroglialar ise oligodendrositler, Schwann hücreleri ve astrositlerden oluşur. Astrositler beyindeki hücrelerin üçte birini oluştururlar.

Astrositler şekilsiz gövdeleri ve ayaksız çıkıntıları ile SSS'de sinapsları, KBE'ni çevrelerler. Astrositik ayaksız çıkıntıların beyin ve omurilik yüzeyinde yer alarak bir glial membranı (*glia limitans*) oluştururlar.

Astroditler KBE'nde görev alarak suyun geçişini, iyon dengesini nöronların aminoasit metabolizmasını, enerji ve besinlerini sağlar. Bütün bu dengelerin kurulması normal beyin aktivitesi için gereklidir.

2.1.2. Kan Beyin Engeli (KBE)

KBE, santral sinir sisteminin fonksiyonları için gerekli bir diffüzyon engelidir. KBE'nin endotel hücreleri, bedenin diğer endotel hücrelerinden, fenestrasyon içermemesi ve SB içermesi, az sayıda pinositik veziküler içermesi nedeniyle farklıdır. Endotelyal hücrelerin SB'ı, hücre etrafındaki hidrofilik moloküllerin KBE'ni geçmesini sınırlar. Buna karşın O₂ ve CO₂ gibi küçük lipofilik moloküller, difüzyonla plazma membranından geçerler (61). Glikoz, ve aminoasitler, insülin, leptin ve demir gibi beyin metabolizması için gerekli materyaller ise özelleşmiş taşıma ile beyine geçerler (150, 238). Nörovasküler birim (NVB) olarak da adlandırılan bu yapıda, birimin her bir üyesi, mikrovasküler geçirgenliğin kontrolü, iyon değişimi, besin alımı, toksik maddelerin uzaklaştırılması ve serebral hemodinamiği yönetmekle yükümlüdür. Kapiller endotel hücrelerinde bulunan sıkı bağlantılar, KBE'ndeki geçirgenliği kontrol etmektedir. SSS'deki bütün kan damarlarının kapiller endotelinin etrafını çevreleyen astrositik ayakları çıkıntılar yardımıyla astrositler, sıvı ve solüt taşınması, hücre içi metabolizmadan sorumludurlar.

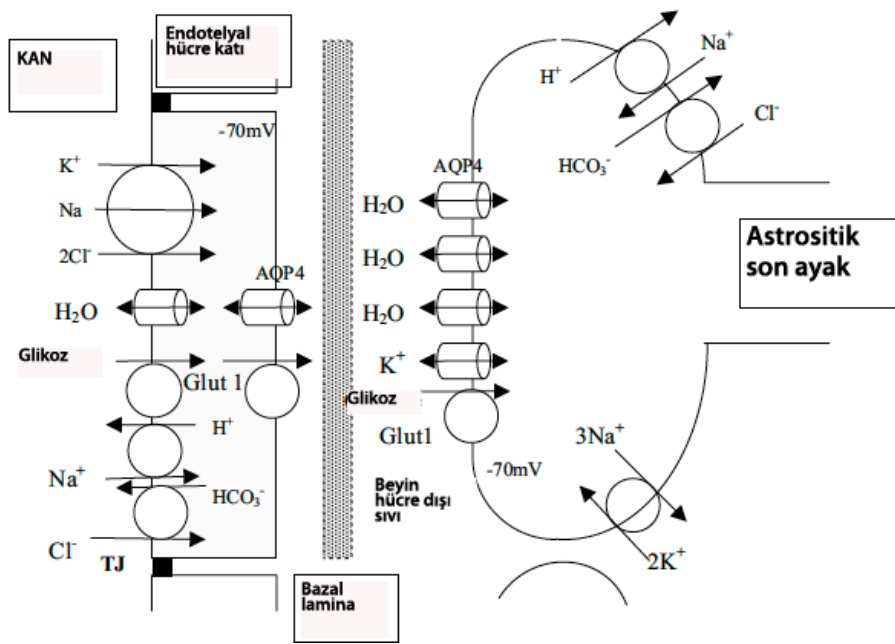
Dokularda sıvı ve solüt geçişi osmotik güçler tarafından sağlanmaktadır. ATP pompası, su kanalları ve taşıyıcılar olmak üzere bir çok işlergeler rol almaktadır. Net su taşınması, aktif taşıma, ATP gerektirmeden doğrudan, osmotik basıncın etkisiyle olmaktadır.

Kan beyin engeli:

- a. Beyin için gerekli glikoz gibi maddelerin geçişine izin verir.
- b. Beyin tuz miktarını ve pH'ı kontrol eder.
- c. Atık metabolitleri uzaklaştırır.

SSS'de glikozun 156 $\mu\text{mol}/100 \text{ g/dakika}$ hızla oksidasyonu sonucu 1500 g'lık beyinde dakikada 0.0043 cm^3 su üretilmektedir, bu yaklaşık 6.2 ml su demektir. Bu bütün BOS'un %12'sini oluşturur (32). Beyin için önemli bir miktar değildir.

Su KBE'ni geçip başlangıçta hücreler arası aralığa ulaşır. Aynı zamanda astrositik çıkıntılarda yer alan AQP4 de kapillerlerden sıvı geçişini katkıda bulunur (Şekil 2.1.1). Hücreler arası aralıktaki sıvı ventriküldeki ependimal hücrelerden geçerek BOS'a karışır (32). Endotelyal AQP'ler, su geçişini osmotik gradient ve hidrostatik basınçtan farklı olarak hızlı bir şekilde sağlamaktadır (88). AQP4 endotelyal hücrelerin her iki membranında, perivasküler astrosit membranlarına göre daha az bulunmaktadır (97). Bu durum, vasküler yüze bakan astrositlerdeki AQP4'ün ekstrasellüler aralıkla astrositlerdeki intrasellüler aralık arasında yoğun su geçişine aracılık ettiğini düşündürmektedir (88).



Şekil 2.1.1. Kan beyin engelinin şematik görünümü, AQP4, taşıyıcı (○) ve kanalları (◻) göstermektedir (10)

2.1.3. Astrositler ve Su dengesi

Astrositler hücreler arası ozmolarite değişikliklerine çok duyarlıdır ve şişme özelliklerinin yüksek olması nedeniyle ozmolariteyi düzeltme çabası içinde olurlar (151, 153). Bu süreç aktif bir süreçtir. Hücre içi K^+ ve Cl^- , organik moloküller, GABA, taurin glutamat ve glisin gibi maddeler dışarı çıkarak bu düzeltme işlemine eşlik ederler (153).

Astrositler ve Ekstrasellüler Su, K^+ ve Na^+ Kontrolü

Gliyal hücreler, nöronal fonksiyonlarda açığa çıkan ekstrasellüler K^+ kontrolü konusunda görev alan ana hücrelerdir (19, 30). Astrositler perinöral alandan perivasküler alana kadar bütün bölgede K^+ kanalları üzerinde K^+ 'ın yeniden dağılımını yapmaktadırlar (196). Kir 4.1 kanalları astrositlerle kapillerlerin buluştuğu yerde yoğun olarak bulunurlar (70). Astrositlerde K^+ iyonu

üzerinde kontrol sağlayan iki subgrup bulunmuştur. Birinci grupta astrositler K^+ iyonunu hızlı bir şekilde alımını yapmakta, ikinci grup ise K^+ kanallarının kontrolünü sağlamaktadır (239). Diğer mekanizma ise eskiden beri bilinen Na^+/K^+ -ATPaz kanalıdır. Glial hücrelerin ekstrasellüler K^+ 'u geri almaları ekstrasellüler ozmolariteyi azaltmaktadır (40). K^+ ile birlikte suyun astroitler içine alınışı K^+ kanalı ile değil, bu kanala eşlik eden AQP4'lerle olduğu ileri sürülmektedir (131). Astrositler ekstrasellüler ozmolaritenin azaldığı durumda hemen yanıt vererek şişmeye başlamaktadır (152).

Astrositlerde voltaj bağımlı Na^+ kanalların seyrek olması nedeniyle elektriksel olarak uyarılamazlar. Bu kanallar glial hücrelerin içine Na^+ 'un girmesine izin verir.

Beyinde Nöral Hücrelerarası Su Taşınması

Beyinde nöronlar, astrositler ve diğer hücreler arasındaki su değişimi doğrudan ölçülememektedir. Canlılarda nöronal hücrelerdeki su girişi veya çıkışı izole edilemediğinden, su taşınması hakkındaki bilgiler dolaylı yoldan elde edilmektedir. Magnetik rezonans görüntüleme (MRG) ile T1 ve T2 ağırlıklı kesitlerde, diffüzyon ağırlıklı çalışmalarda toplam su içeriği ölçülebilmektedir (46). Nöronlardaki su taşınması ilgili çok çalışma yoktur (2).

Glutamat ve Astrositler

L -Glutamat, beyinde ana eksitatuar aminoasittir. Ekstrasellüler aralıktan glutamatın temizlenmesi ve $1\mu M$ 'un altında tutulmasında birinci derecede sorumlu astrositlerdir. Astrositler L -Glutamat'ı toksik düzeye ulaşmasını engellemek için metabolize ederler (195). Astrositik ayaksı çıkıntılarda glutamatın temizlenmesine katkıda bulunan, glutamat taşıyıcılarından GLT1 (EAAT2) ve GLAST (EAAT-1) yoğun olarak bulunmaktadır (176). Astrositlerde glutamat, astrositik spesifik glutamin sentetaz yardımıyla glutamine çevrilerek ekstrasellüler aralığa nöronlar tarafından tekrar kullanılmak üzere verilir (112).

Glutamatın uyardığı, astrositik şişme metabotropik glutamat resöptörleri (mGluR) ile ilişkilidir. Hücre içeriğindeki Ca^{2+} 'daki değişikliklerle birlikte, glutamatın uyarılmış hücre şişmesine neden olduğu gösterilmiştir (143). Hücre içi ozmotik aktivitenin artması ile Na^+ ve glutamatın hücre içine alımı artar (185). Glial glutamat taşıyıcıları GLAST ve GLT1, glutamaterjik aktivitede ekstrasellüler bölgedeki glutamatın temizlenmesinde önemli rol oynarlar (186). Glutamat taşıyıcısı olan GLT1 iskemi sonrasında gelişen beyin ödeminde ortaya çıkmaktadır (135). GLT-1 tıpkı su kanalı gibi görev yapmakta *Xenops oocytes* ile yapılan su geçirgenlik çalışmalarında glutamatın varlığında geçirgenlik % 40 oranında artmaktadır (115). GLT-1, belkide su regulasyonunu kontrol etmektedir. Sıçanlarda su yükleme deneylerinde glial hücrelerde glutamatın glutamine dönüşmesinde artış görülmüştür (132). Astrositler glikoz taşıyıcısı olarak GLUT-1 bulundurur iken, nöronlar GLUT-3 taşıyıcısı bulundururlar (43). Bütünüyle kabul edilmemesine karşın astrosit-laktat teorisine göre, glikoz önce astrositlerce alınır, sonra laktata çevrilir, sonrada nöronlar enerji desteği için aktarılır (117).

2.1.4. Kan- BOS Engeli

BOS koroid pleksus epitelinden doğrudan ventrikül içine salgılanır. Ayrıca beyin kapillerinden hücreler arası aralığa sızan sıvı, ventrikülleri döşeyen endodimal hücrelerdeki açıklıktan ventriküle girerek, koroid pleksusdan salgılanan BOS oluşumuna katkıda bulunurlar (103). Koroid pleksus epitelinde yer alan AQP1, taşıyıcılar ve Na^+/K^+ -ATPaz pompası Şekil 2.1.3.'de gösterilmektedir.

İnsan bedenindeki damarsal ağın alanı yaklaşık $10 m^2$, koroid pleksusdaki ağ ise $200 cm^2$ 'dir. Bu yoğunluk beden diğer yapılarına göre 500 kat daha fazladır (103). Su yoğunluğunun koroid pleksusda diğer vasküler alanlara göre 500 kat fazla olduğunu düşündürmektedir.

BOS Oluşumu ve Emilimi

Koroid pleksus, ventriküllerde yer alan, salgı yapan bir epitelidir. Memeli beyinde her iki lateral ventrikül, üçüncü ve dördüncü ventriküllerde BOS yüzeyine bakan yerde yer alır. Mezodermal kaynaklı olan koroid pleksus epiteli diğer KBE'ndeki kapillerlerden farklı olarak sıkı bağlantılar içermez. Koroid pleksustaki kan damarlarındaki kandan Na^+ , Cl^- , ve HCO_3^- iyonlarını yeterli miktarda filtre ederek BOS oluşumunu sağlar (Şekil 2.2). Koroid pleksus epitelinde bazal ve apikal membranlarındaki kanallardan Na^+ , Cl^- , ve HCO_3^- iyonlarının taşınmasıyla ozmotik olarak da su geçişine katkıda bulunur (27).

AQP1, koroid pleksusun apikal membranında yer alır (10). Apikal membranın kendisi çok geçirgen değildir. Ancak bu bölgeden suyun çok hızlı geçmesi, bir su kanalının varlığını düşündürmüştür (10).

İnsanda BOS yapım hızı, 0.3-0.4 ml/dakika veya 432-576 ml/gün'dür ve kafa içi basınç ise 5-10 mmHg'dir olarak bulunmuştur (173). Toplam BOS hacmi 130 ml'dir. Beyindeki BOS dolanımı 6-7 saatte bir değişmektedir. Üretim ve boşaltımın bir dengede olması, SSS'i için gerekli bir döngüdür. BOS dolanımı ventriküllerden başlayarak 4. ventrikülde yer alan Magendie ve Luschka foramenlerinden çıkarak beyin yüzeyine ve omurilik subaraknoid alanına ulaşır. BOS boşalımı, durada yer alan araknoid granülasyonlardan olmaktadır. Bu bölgede yer alan açılış basıncı 5 mmHg olan tek yönlü valf sistemi ile venöz sinüsler içine boşalmaktadır.

Kafatası içindeki

$$V_{\text{kan}} + V_{\text{BOS}} + V_{\text{beyin}}$$

denklemini bir denge içindedir. Bu dengede yer alan hacimlerin herhangi birindeki artış diğer hacimler tarafından dengelenir (Monro Kellie).

BOS emiliminde klasik görüş, durada yer alan araknoid villi veya *pacchionian* granülasyonlarıyla aracılığı ile ana boşaltımın yapıldığı şeklindedir (60). Yeni tamamlayıcı görüş ise, yalnızca araknoid villilerin ana BOS emilimini sağlamadığını, beyin kapillerlerinde de pulsatil bir şekilde geri emiliminin olduğu şeklindedir (103). KBE'deki taşıyıcı ve kanallar yardımıyla suyun ozmotik olarak sağlandığı düşünülmektedir (88).

BOS'un fonksiyonları beyin için metabolik ürünler için bir havuz ve basınç kontrolü içinde bir şamandıra görevi görmektedir (27). BOS'un özgül ağırlığı 1.007 g/ml, beyin dokusunun özgül ağırlığı 1.040 g/ml dir.

BOS üretiminin moleküler mekanizması

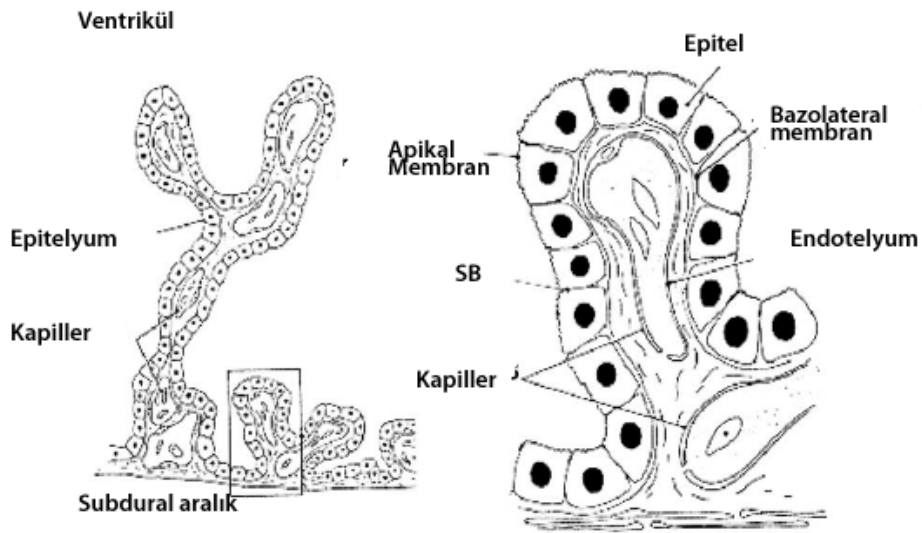
BOS, santral sinir sisteminde ana ekstrasellüler sıvı içeriğini oluşturur. BOS beyin ventriküllerini spinal kanal ve subaraknoid aralığı doldurur. BOS nöral dokudan ependima ve pia hücrelerince ayrılmıştır. BOS içeriği nöronal, santral kemoresöptörlerin aktivitesine ve pH değişikliklerine katkıda bulunur.

BOS'un en önemli görevlerinden birisi beyin ve omuriliğe mekanik destekle kafatası içinde korunmasıdır. BOS ayrıca, sinaptik aktivite nedeniyle ortaya çıkan metabolitlerin dilüsyonunu ve uzaklaştırılmasını gerçekleştirir. SSS'de çeşitli hormonları ve transmitterleri taşıyarak beyinin farklı bölgeler arasında iletişimini sağlar (83).

BOS içeriği plazmaya benzemekle birlikte protein içeriğindeki azlık nedeniyle farklılık gösterir. BOS plazma gibi süzülerek oluşan bir sıvı değil koroid pleksustan aktif olarak sekrete edilen bir sıvıdır (35). Bu özellik, plazma konsantrasyonundaki değişikliklerinden bağımsız olarak K^+ , HCO_3^- , Ca^{2+} gibi bazı iyonların regülasyonunu sağlaması açısından önemlidir (79, 128).

Koroid pleksus ventriküllerde yer alan villilerden oluşan bir yapıdır. Her bir villus tek tabaka epitel hücrelerin, kan kapilleri ve konnektif doku üzerine

kaplaması ile oluşur (Şekil 2.1.2). Koroid pleksus çok vasküler yapıda ve kanlanması yüksek olan bir dokudur, sıçanlarda 4ml /dakika olarak ölçülmüştür (205). Bu serebral korteksdeki kan akımından yaklaşık 10 kat daha fazladır. Koroid pleksus epiteli, sekresyon için gelişmiştir. Kan-BOS engelini oluşturur. Ventriküle bakan yüzdeki apikal membranda, fırçamsı yapı görülür. Kan kapillerine bakan yüzde ise bazolateral membran yer alır. Epitel her sekresyon yapan hücre gibi, bol miktarda mitokondri ve endoplazmik retikulum içerir (Şekil 2.1.2).

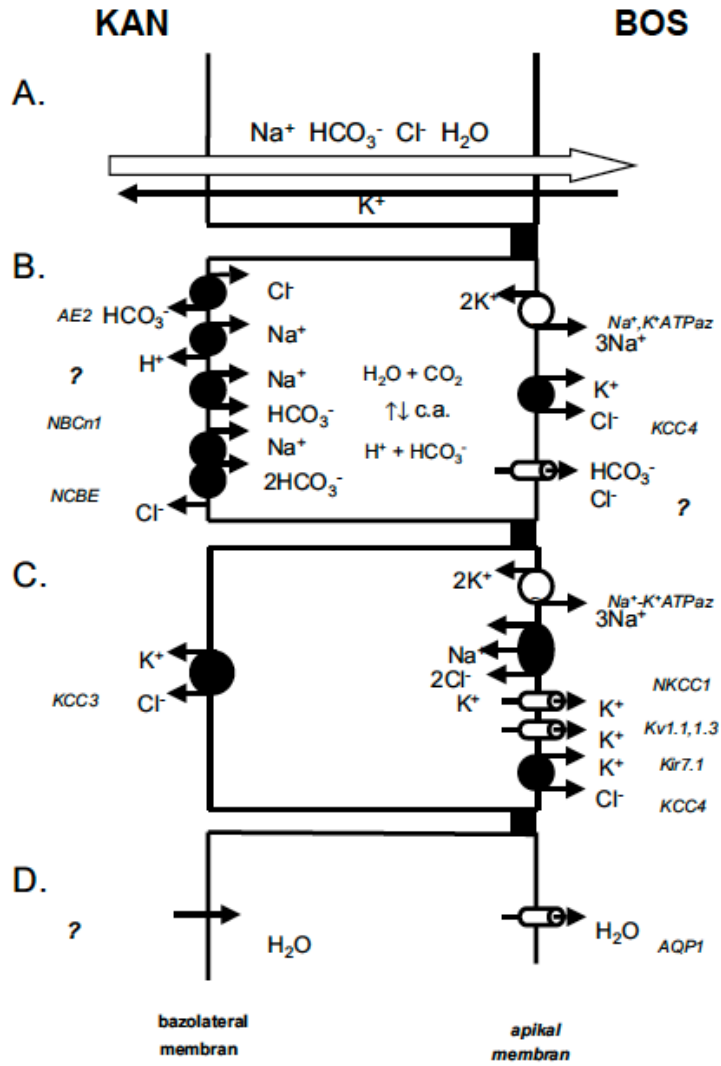


Şekil 2.1.2. Koroid pleksusun mikroskopik yapısı. Soldaki görüntü bir villi'nin şematik görüntüsüdür. Sağdaki görüntü koroid pleksusun elektron mikroskopideki şematik görüntüsüdür (27).

Koroid pleksus epitelinden iyon geçişi Şekil 2.1.3'de gösterilmiştir.

- A) Tekynl Na^+ , Cl^- ve HCO_3^- iyonların kandan BOS yönünde geçişini göstermektedir.
- B) Na^+/K^+ -ATPaz pompası çalışma sistemini göstermektedir. Na^+ geçişini sağlamkata ve enerjiye gereksinim duymaktadır. Daha çok apikal membranda yer alan bir süreçtir. Koroid pleksus epitelinin bazolateral membranında Na^+ , Cl^- ve HCO_3^- iyonlarının düzenlemesi yapılır. Hücrede yer alan karbonik anhidraz enzimi, hücrede biriken H_2O ve CO_2 'den HCO_3^- ve H^+ moloklleri arasında dönüşüm yapar. Karbonik anhidraz enzimi en az yedi yesi saptanan bir grup enzim topluluğudur ve H_2O ve CO_2 'den HCO_3^- ve H^+ oluşumunu katalize eder. Bu süreç karbonik anhidraz enzim inhibitörü olan asetolazamid ile inhibe edilir ve yaklaşık BOS üretimini % 50 oranında azaltmaktadır (218). Hidrosefalik ocuklarda BOS basıncını azalttığı saptanmıştır (31).
- C) Gösterilen apikal membranında yer alan Na^+/K^+ -ATPaz pompası Na^+ 'un BOS içine doğu taşınmasından sorumludur. Koroid pleksus Na^+ , Cl^- ve HCO_3^- sekrete ederler (228). Sekresyon HCO_3^- bağımlıdır ve aynı zamanda K^+ net emilimini kontrol eder (228). Koroid pleksustaki Na^+/K^+ -ATPaz pompası, BOS sekresyonu ile yakından ilişkilidir. Bu pompanın oubain ile inhibisyonu ile BOS yapımında azalma ve Na^+ girişi olur (228). Na^+/K^+ -ATPaz pompası çoğunlukla epitelin apikal membranında yer alması ve BOS sekresyonu dışında K^+ geri alımını sağlaması nedeniyle önemli bir bölgedir (172).
- D) AQP1 koroid pleksus epitelinin apikal membranında saptanmıştır (141, 229). AQP1'den yoksun farelerde BOS retiminde önemli derecede azalma saptanmıştır (145).

K^+ kanalları BOS sekresyonu için önemli rolleri vardır. Birincisi negatif membran potansiyeli yaratılmasına yardımcı olurlar, dolayısıyla apikal membranda anyon çıkışına neden olurlar. İkincisi, hücre içinde birikmiş olan K^+ , Na^+/K^+ -ATPaz pompası boyunca dışarı çıkar. Son olarak da K^+ kanalları BOS'dan kana, K^+ 'un transellüler yolla taşınmasını sağlar. Böylelikle BOS'daki K^+ daha az seviyede görülür (236).



Şekil 2.1.3. Koroid pleksusda iyon transportu. A) Koroid pleksus epitelinde ana iyon geçişleri. B) Karbonik anhidraz enzimi (c.a.) ile HCO_3^- ve Cl^- sekresyonu. C) K^+ emilimi. D) Koroid pleksus epitelinden AQP1 yardımıyla su geçişi görülmektedir (yukarıdaki metin içine bakınız) (27).

2.1.5. Astrositlerde Suyun Hormonal Kontrolü ve İyonik Denge

SSS'de salınan vazopressin (AVP), atrial natrüretik peptid (ANP), anjiotensinojen (AGT) ve anjiotensin II (Ang) gibi nöropeptidler su ve iyonların regülasyonunda görev almaktadırlar.

Vazopressin (AVP)

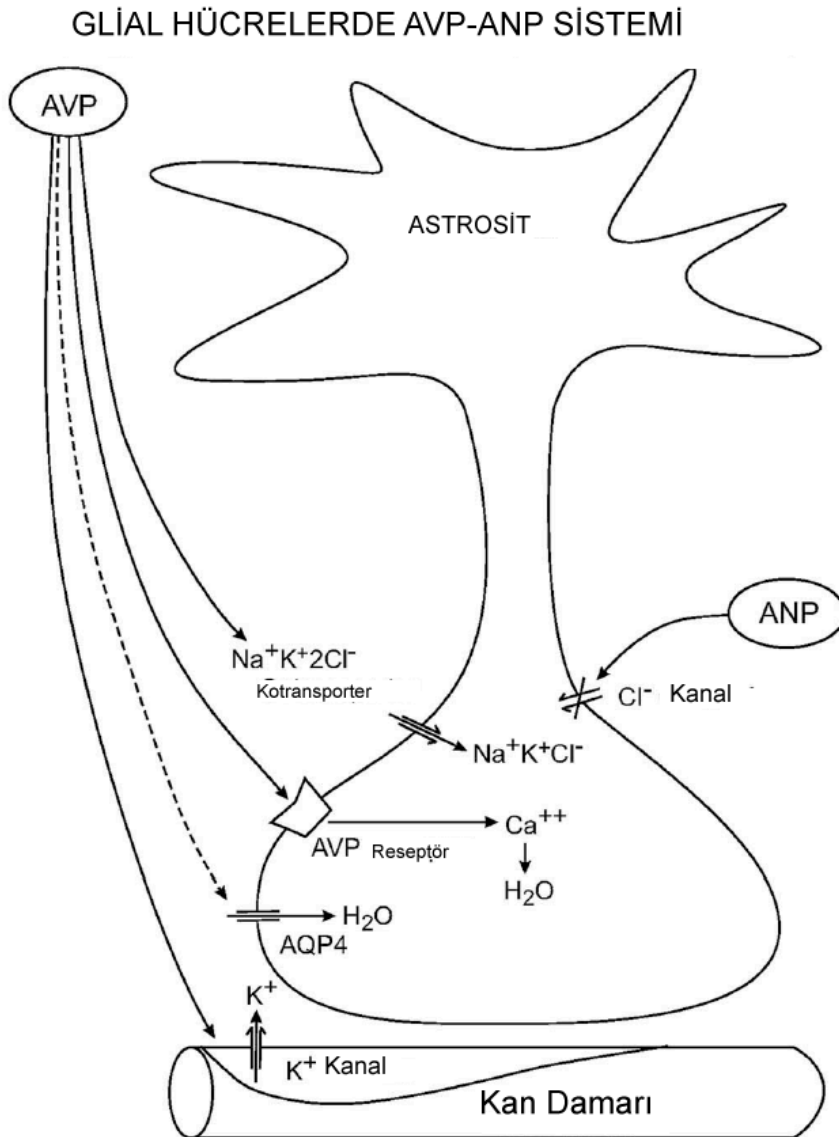
AVP beyin parankiminde hücreyel düzeyde su ve osmolorite dengesini sağlamaktadır (Şekil 2.1.5). Piameter altındaki astrositler yardımıyla su geçirgenliğini kontrol etmektedir (69). AVP ayrıca sirkümventriküler organlarda, glia limitans ve nöral hipofizden salgılanarak sistemik dolaşıma katılır, su regülasyonuna katkıda bulunur (69). Beyinde AVP içeren ağ sistemi hipotalamusdaki nöronlardan oluşmaktadır (36). Hücre dışı AVP miktarı nanomolar düzeydedir. AVP resöptörlerinden V1, bütün beyin korteksi boyunca yayılmışlardır (26). Özellikle astrositlerde ifade olmaktadır (76). AVP ile V1 resöptörleri kullanarak astrositlerdeki su içeriğinde artış gözlenmiştir (69, 182). AVP astrositlerde su miktarında artışına neden olurken, ANP'de su miktarında azalmaya neden olmaktadır (5, 104). AVP kapiller membrandaki kandan aynı zamanda K^+ taşınmasına da katkıda bulunur (69). Beyine lokal olarak AVP verildiğinde, astrositlerde K^+ iyonunda artış gözlenmiştir (102). AVP astrositlerdeki su miktarında artışa, K^+ indüklediği şişme ve Na^+ , K^+ ve Cl^- birlikte taşıyıcılarla su alınması sonucu astrositlerde şişme görülür (38, 69).

AVP ve V1 resöptörleri, aynı zamanda beyin su ve iyon miktarının düzenlenmesinde AQP-kontrollü su girişinde etkili olmaktadır (74, 142). Bu yeni bulgular sonucunda:

- a. AVP ve AVP resöptör agonistleri sıçan neokortekslerinde nöronal aktivite boyunca su girişini artırmıştır (142).
- b. Sıçanlarda immünofloresan boyamalarda AVP ve AQP'nin kan damarları ve pial yüzeyde yoğunluklarında paralellik gözlenmiştir (142).

ANP

ANP, anjiotensin II'ye zıt olarak etki göstermektedir. Bu peptid, insan bedeninde natriürezis, diürezis ve vazorelaksasyon yaparak su ve sodyum regulasyonunda önemli rol oynamaktadır (Şekil 2.1.5) (226). ANP aynı zamanda su içmeyi de engellemektedir. C-tip natriüretik peptid ANP ailesininin bir üyesidir. Beyinde lokal olarak parakrin hormon gibi davranarak ifade olmaktadır (21). ANP kandan beyine cGMP -PKG yoluyla tek yönlü sodyum taşınmasından sorumlu tutulmaktadır (44). Sıçanlarda yapılan global iskemik modeli kullanılarak geliştirilen iskemik ödem de intarventrüküler ANP verilerek KİB'de azalma gösterilmiştir (5). Kortikal kontüzyon sonrası verilen ANP'de beyin sodyum miktarında azalma saptanmıştır (55).



Şekil 2.1.4. Glial hücrelerde AVP-ANP sistemi. AVP astrositlerde su miktarında artışına neden olurken, ANP'de su miktarında azalmaya neden olmaktadır (192).

Renin-Anjiotensin Sistemi (RAS)

Anjiotensinojen (AGT) molokülü bir dekapeptid olup glikoprotein yapısında, 55000-58 000 ağırlığındadır ve renin tarafından anjiotensin (Ang) l'e dönüştürülür. Ang I'de *converting* enzim ile Ang II'ye dönüştürülür. Ang II, Ang -1 (At-1) resöptörlerine etki ederek beden sıvı dengesi ve kan basıncının kontrolünde etkin rol almaktadır.

Beyin kendi içinde bir RA sistemine sahiptir (6, 34) ve anjiotensinojenin önemli kaynağı astrositlerdir (Şekil 2.1.6)(201). AGT'nin nasıl sentez edildiği ile ilgili net bilgi olmamakla birlikte tiroid transkripsiyon faktör 1 (TTF-1) ile birlikte bulunduğu subfornikal organlarda ifadesi gösterilmiştir (194). Adrenalektomi yapılmış hastalarında kullanılan glukokortikoid ve mineralokortikoidlerle yapılan tedaviler sırasında, anterior hipotalamus, paraventriküler çekirdekler, supraoptik çekirdekler, suprakiazmatik çekirdekler, periventriküler çekirdeklerde, AGT mRNA ifadesinde artış gözlenmiştir (177).

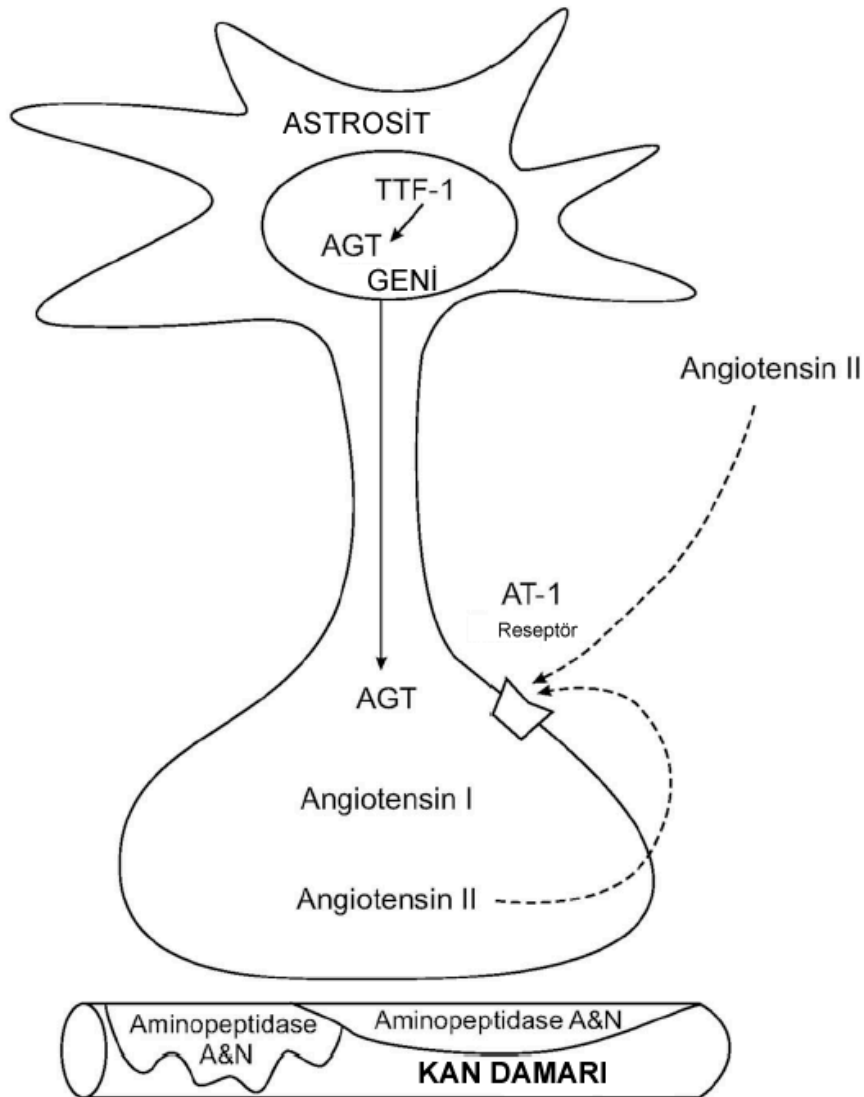
Perivasküler astrositlerde At1-resöptörlerinin bulunması, Ang'nin astrositler içinde hormonal aktivite gösterdiklerini düşündürmüştür (6). Chen ve ark'nın (29) yaptığı çalışmada Ang, At1a ve At1b resöptörleri, osmotik regülasyonda önemli görevi bulunan hipofiz bezinde gösterilmiştir.

Ang I ve Ang II astroglial hücrelerin son ayaklarının yakınındaki damarlarda bulunması ve bununla ilişkili olarak aminopeptidaz A ve N bulunmasının Ang metabolizmasında önemli olduğunu düşündürmektedir. (6, 7). Bu aminopeptidazların lümen dışındaki perisitlerin ve periendotelial hücrelerde ifade oldukları gösterilmiştir ve perivasküler Ang sisteminin serebral kan akımında farklı bir rol üstlendikleri ileri sürülmüştür (7).

RAS'ın beyindeki aktivitesi çok anlaşılacakla birlikte Ang II'nin kan basıncı regülasyonunda, sodyum dengesinde ve kan hacminde etkin olması sempatik kontrol ile sağlanmakta, AVP salınmasına, su ve tuz alımının artışına

neden olmaktadır (48). Renin ve Ang II'ni beyinde oluşturulan aşırı ifadesinde su ve tuz alımının arttığı hipertansiyona ve sıvı metabolizmasında değişiklikler olduğu gösterilmiştir (125).

ASTROSİTLERDE RAS SİSTEMİ



Şekil 2.1.5. Glial hücrelerde RA sistemi.

2.2. AKUAPORİNLER

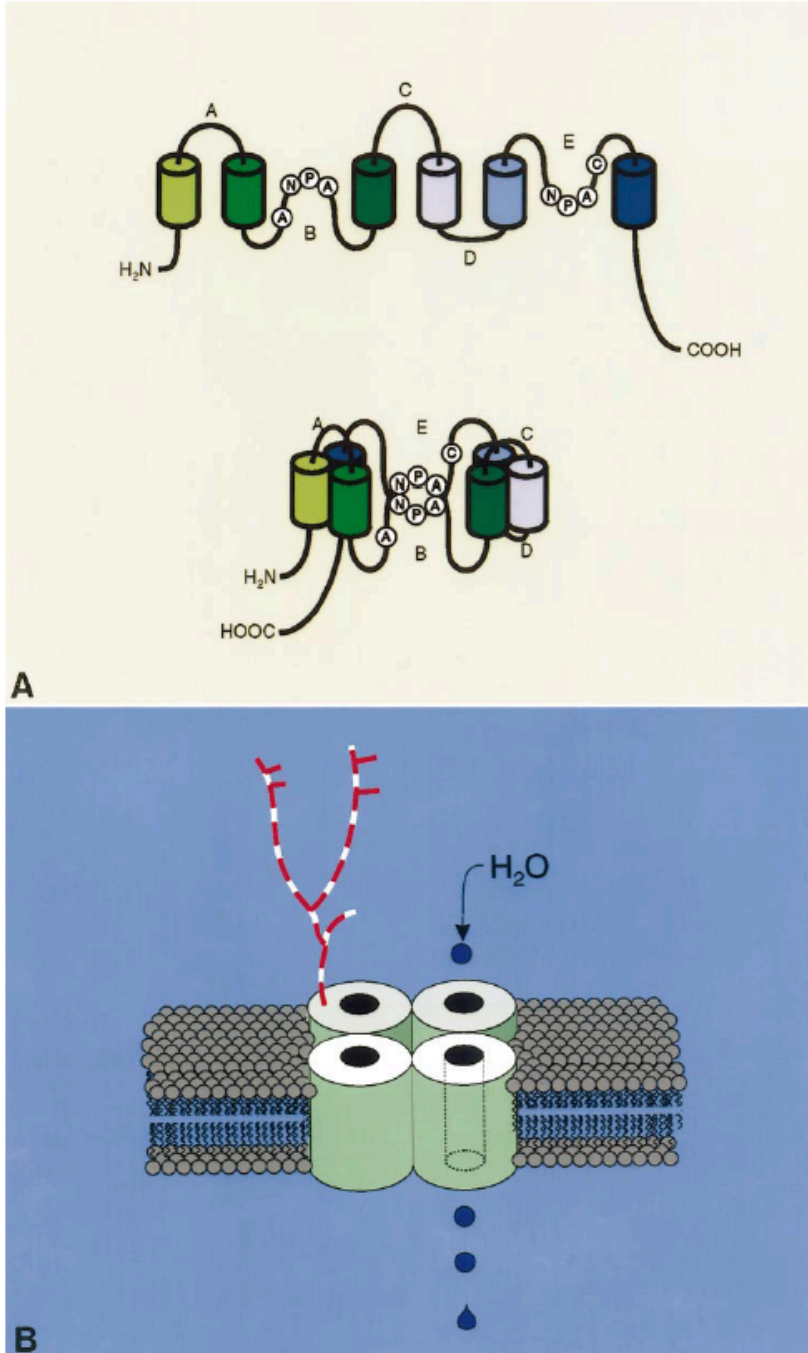
2.2.1. Akuaporinlerin Yapısı ve Fonksiyonel Özellikleri

Akuaporinler hücre membranının her yerinde bulunan, su geçişine, çok az da eriyiklerin iki yönlü geçişine izin veren ~30 kDa ağırlığında homolog su kanalı proteinleridir (1, 118, 216). Bu proteinler, bütün canlılarda bulunur. Tek hücreli canlılarda, örneğin ilkel canlılardan bakterilerde çok az da olsa akuaporin genleri vardır; su ve gliserolün taşınmasından sorumludurlar.

Küçük çiçekli bir bitki olan ve moleküler biyoloji deneylerinde de model olarak kullanılan *Arabidopsis thaliana* (tere otu)'da 38 AQP geni bulunmasına karşın insanda 13 adet saptanmıştır. Bu farklılık hücrenin fonksiyonlarına göre gelişmektedir.

Birbiri ardına tekrarlayan, üç membran zinciri α -sarmal şeklinde sitoplazmik karboksil (HOOC) ve amino (H_2N) sonlanmalarından oluşur. İki bağlantı halka ile bağlanır, her bir halka *Asn-Pro-Ala* motifi içerir. Bu motif yapısının suyun geçirgenliğini denetlediği düşünülmektedir (127). Bu proteinlerin ana görevleri bitki ve tüm memelilerde su ve eriyiklerin geçişinden sorumlu olmalarıdır (Şekil 2.2.1).

AQP1'in yapısı yapılan x-ray çalışmalarında bir model olarak 2.2 Å boyutlarında saptanmıştır. X-ray kristallografide ise 1.9 Å olarak ölçülmüştür.



Şekil 2.2.1. AQP1'in şematik diyagramı. A) Üçlü membranın iki kere tekrarlanmış hali, altta B ve E looplarının birleşip tek bir kum saati şeklinde *pore* halini alması. B) Hücre mebranında kanal oluşumu ve suyun geçişini göstermektedir (138).

2.2.2. Akuaporinlerin Sınıflaması

Bütün akuaporinler su transportundan sorumludur. Farklılıkları, değişik dokularda ek olarak farklı görevler üstlenmelerinden kaynaklanır (Tablo 2.2).

Beyinde su kanallarından ilk bahseden Jung (85) ve Hasegawa (66) olmuştur. Bu çalışmalarda beyin dokusunda AQP4 için mRNA ifadesini çalışmışlardır. AQP4, beyinde yaygın olarak bulunur, beyin su metabolizmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir (17). AQP1, koroid pleksus epitelinde yer alır ve BOS salınmasını artırdığı düşünülmektedir (141). AQP9 ise daha çok ozmoregülasyonda görev alan hücrelerde görülür (18).

Tablo 2.2. Akuaporinlerin sınıflandırılması (28).

Akuaporin	Kromozom	Su Geçirgenliği	Gliserol Geçirgenliği	Buldukları Dokular
AQP0	12q13	Düşük	---	Lens
AQP1	7p14	Yüksek	---	Eritrosit, akciğer, böbrek, beyin , göz ve vasküler endotel
AQP2	12q13	Yüksek	---	Böbrek
AQP3	9p13	Yüksek	Evet	Cilt, böbrek, akciğer, göz, GIS,
AQP4	18q22	Yüksek	---	Böbrek, beyin , akciğer, GIS, kaslar
AQP5	12q13	Yüksek	---	Tükrük, gözyaşı, tat bezleri, akciğer ve göz
AQP6	12q13	Düşük	---	Böbrek
AQP7	9p13	Yüksek	Evet	Yağ dokusu, böbrek, testis
AQP8	16p12	Yüksek	---	Böbrek, karaciğer, pankreas, GIS, testis
AQP9	15q22	Düşük	Evet	Karaciğer, lökosit, beyin ve testis
AQP10	1q21	Düşük	Evet	GIS
AQP11	11q13	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Beyin , karaciğer ve böbrek
AQP12	2q37	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor

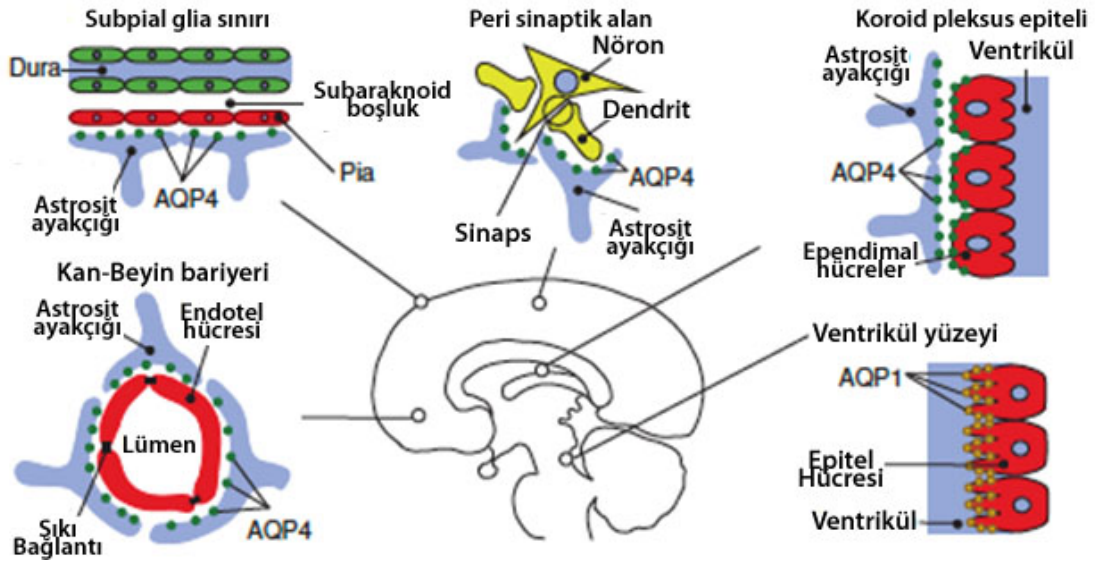
2.2.3. AQP1

Beyinde AQP1, ventriküldeki BOS'a bakan yüzde koroid pleksusun apikal membranında ifade olur (122, 141, 229) (Şekil 2.2.2). AQP1-yoksun farelerde intrakranial basınç %50 oranında azalmıştır. Aynı zamanda beyin omurilik sıvısı (BOS) da azalmış olarak bulunmuştur. Beyin yaralanması geçirmiş AQP1-yoksun fareler normal farelere göre düşük intrakranial basınca sahip olduklarından dolayı hayatta kalım oranı daha yüksek bulunmuştur (145). AQP1'in hem göz hem de koroid pleksusda AQP1'in, sıvı toplanmasında önemli rolü vardır ancak boşaltılmasında bir rolü yoktur.

Verkman ve diğ., (217) AQP1'in hücre migrasyonunda da rol aldığını ileri sürmüşlerdir. Tümör hücrelerinin AQP1 yoksun farelerde daha yavaş büyüdüğünü daha az damar içerdiğini, AQP3 yoksun farelerle yapılan çalışmalarda göstermişlerdir. Endotelial hücre kültürlerinde hem anjiogenezisin hem de damar yapıların olmadığını göstermişlerdir. AQP1'in hücre migrasyonunda rol aldığı düşünülmektedir (180).

2.2.4. AQP4

Beyinde AQP4, kan-beyin engelini oluşturan astrositik son ayaklarında ve ventrikülü döşeyen ependimal hücrelerde, piamaterde glia limitans hücrelerinin plazma membranında ifade olur (10, 140)(Şekil 2.2.2 ve 2.2.3). İmmünohistokimyasal çalışmalar AQP4' ün birincil olarak astrositler yer aldığı şeklindedir, AQP4 nöronlarda ölçülebilir düzeyde bulunmamıştır (134, 139). KBE oluşturan kapiller etrafındaki astrositik son ayaklarda yoğun olarak bulunur (51, 140). Endotel ve ependimal hücrelerinde astrositlerdekine göre daha az olmak üzere saptanmıştır (97, 134). AQP4 ayrıca beyindeki ozmoregülatör bölgedeki hipotalamik magneosellüler hücrelerde de görülür (85). Nöronlar ve meninkslerde ifade olmazlar (51). Aynı zamanda retinada yer alan astrositlerin özelleşmiş tipi Müller hücrelerinde de yoğun olarak bulunmuştur (134). AQP4 beyin ve omurilikte yoğun olarak ifade olmaktadır (50, 66, 85, 140). Omurilikte ise gri maddede nöronların gövdesi ve sinaps yaptığı yerde direk temasta olan astrositlerde yoğun olarak bulunur (51, 144).



Şekil 2.2.2. Akuaporinlerin kan beyin engelindeki ve koroid pleksus ve ventrikül epandima yüzeyindeki yerleşimleri gösterilmektedir. AQP4, subaraknoid bölgeye bakan subpial glia limitans hücrelerinde, perisinaptik bölgede, KBE'nde, epandimal hücrelerin bazolateralinde ve AQP1 koroid pleksusun epitelinin apikal bölgesinde bulunur (235).

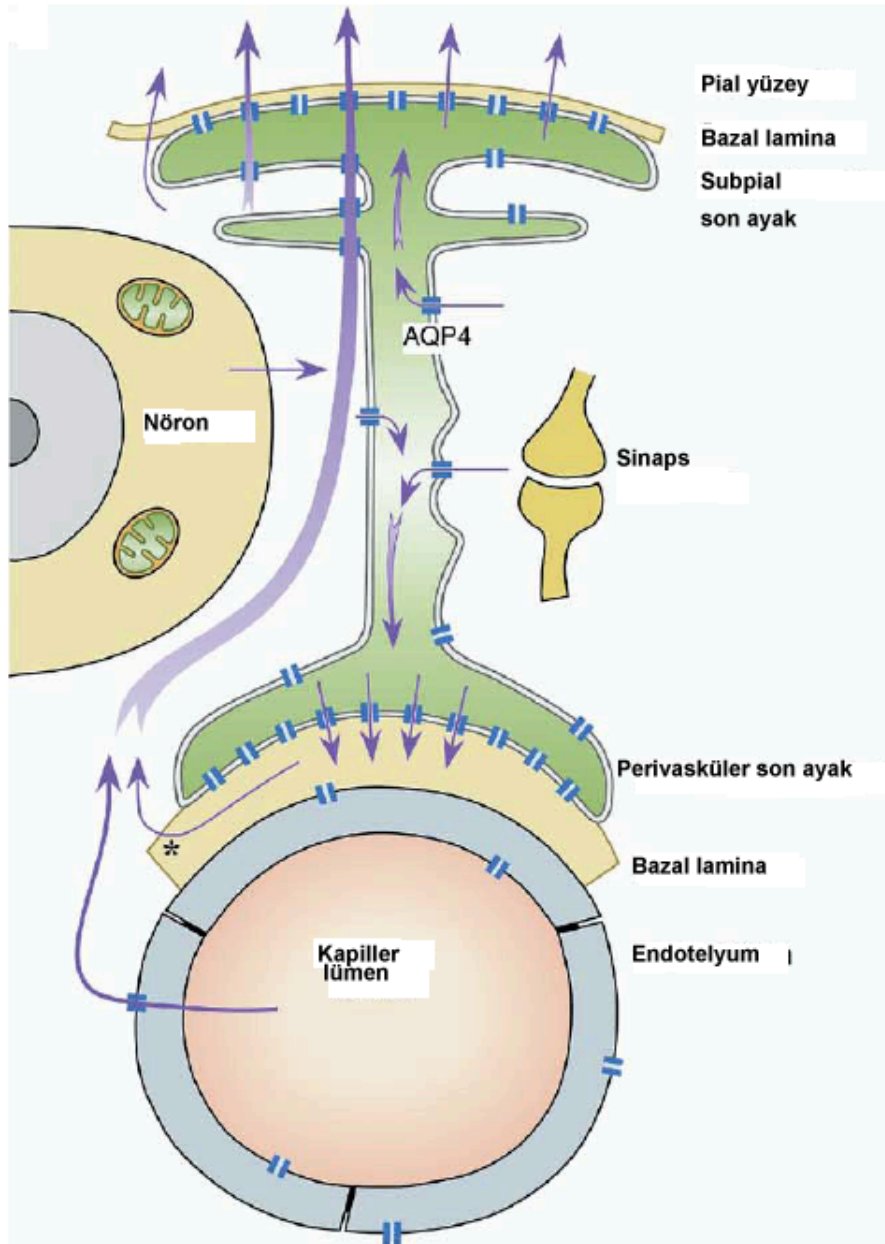
Serebral kapillerlerin abluminal yüzeyine bakan astrositlerin ayakları çıkıntılarında AQP4'ün yoğun olarak bulunması, sistemik dolaşımdan su geçişini kontrol ettiklerini düşündürmektedir (9, 56, 140). Su ve K⁺, nöronal aktivite boyunca gerek BOS, gerekse kan ile alışveriş içindedir. Astrositlerdeki AQP4 havuzu, ozmotik basınç etkisi ile iki yönlü çalışmaktadır (11). Patolojik durumlarda bu iki yönlü çalışma beyin de su tutulmasına neden olarak negatif etkide bulunmaktadır (11). Sıçanlarda travmatik deneysel akut hiponatremi çalışmalarında perivasküler astrositik ayakları çıkıntılarda şişme görülmüştür (86). Bununla ilişkili olarak AQP4-yoksun farelerde yapılan çalışmada da astrositlerdeki bu şişmenin ve dolayısıyla beyin ödeminin daha az olduğu görülmüştür (119). Astrositik ayakları çıkıntılar aynı zamanda ekstrasellüler K⁺ın temizlenmesine katkıda bulunurlar. Bu özellikleri epilepside daha belirgindir (11).

AQP4' diğer AQP'ler gibi 6 transmembran içerir. AQP4, diğer memeli AQP'lerden farklı olarak su geçirgenliği civa ile inhibe edilememektedir (188). Bu nedenle AQP4 başlangıçta, civaya duyarsız su kanalı (*mercurial-insensitive water channel- MIWC*) olarak adlandırılmıştır (66).

AQP4, SSS'deki su metabolizması üzerine etkinliğini araştıran çalışmaların bir kısmı, AQP4-yoksun farelerde yapılmıştır (114). AQP4-yoksun farelerde genel olarak davranış, motor, duyu ve koordinasyon bozukluğu saptanmamıştır (231). AQP4-vahşi tip ile AQP4-yoksun tipler karşılaştırıldığında, morfolojik, yapısal değişiklikler, ışık mikroskopisinde, serebral vasküler anatomide ve MRG'de belirgin bir fark görülmemiştir (119). İntrakranial basınç, komplians, kalp atımı, beden ısı, ortalama arter basıncı, kan gazları gibi fizyolojik verilerde de bir değişiklik olmamıştır (119, 146). AQP4-yoksun sıçanlarda idrar yoğunluğunda da bir farklılık görülmemiş ve bu durum AQP4'ün serum ozmolitesi üzerine etkin olmadığını düşündürmüştür (85, 114). AQP4-yoksun farelerde yapılan değişik çalışmalarda (*distrophin* yoksun *mdx* ve alfa *syntrophin* yoksun) toplam AQP4 miktarının normal olmasına karşın KBE ve glia limitans bölgesindeki astrositik son ayaklarda önemli oranda AQP4

yoğunluğunda azalma saptanmıştır (9, 213). Aynı zamanda bu farelerde astrositik son ayaklarda şişme ve KBE geçirgenliğinde artma saptanmıştır (52, 137).

İmmün çalışmalar ışığında ileri sürülen tez, plazma membranından su geçişinde önemli rolü olan astrositlerde AQP4 yer alarak su regülasyonunda önemli rol oynamaktadır. Özellikle su taşınması ve K^+ 'nin temizlenmesi arasında bir paralellik vardır. AQP4, su akışını, bikarbonat taşınmasını ve aktivite bağımlı volüm değişikliklerini düzenler.



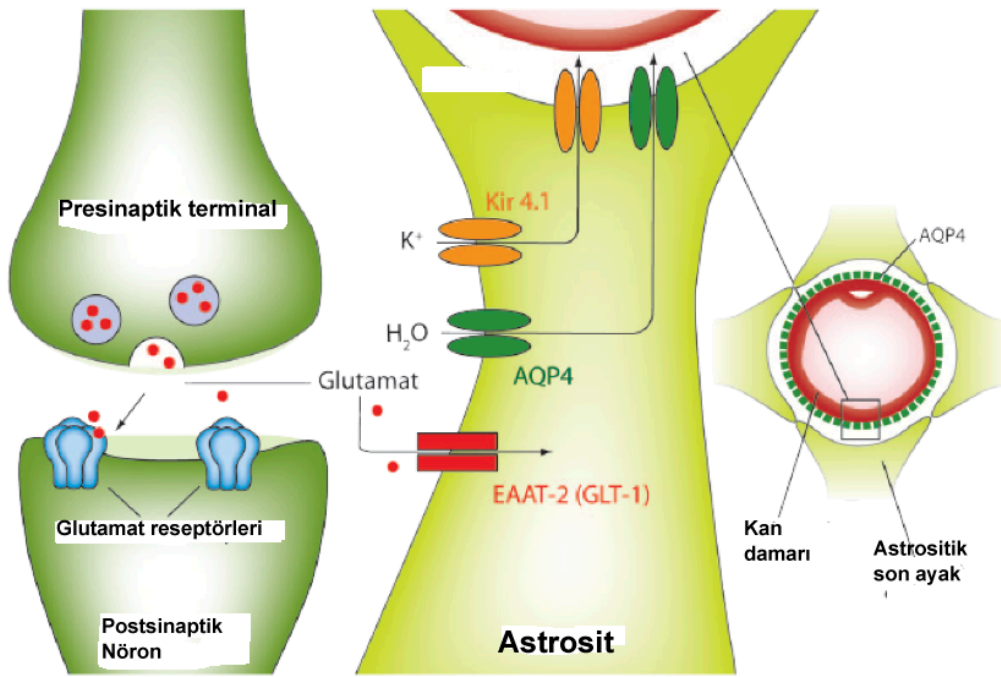
Şekil 2.2.3. AQP4'ün subpial ve perivasküler glial son ayaklarda yerleşimini su dengesinin şematik gösterilmesi (mavi yarıklar AQP4 kanallarını göstermektedir) (8).

AQP4'ün nöron sinyali aktarımı iyon dengesi üzerindeki rolü

Astrofitler, nöral aktivite boyunca ortaya çıkan K^+ 'un temizlenmesi, ve yeniden dağıtılması, nörotransmitter döngüsünün (GABA ve glutamatın sentezi ve sinaptik bölgeden uzaklaştırılmaları), nöronlara enerji desteğinin ve sinaptogenezinin gerçekleşmesi gibi birçok fizyolojik işlevleri sağlarlar (164). Nöral aktivite sırasında ortaya çıkan K^+ ve H_2O 'nun temizliği ve yeniden kullanılabilir hale gelmesini sağlayarak nöral aktivitenin sürekliliğine katkıda bulunmaktadır. Kir4.1 K^+ kanalları ile birlikte AQP4 ifadesinin yan yana bulunması bu düşünceleri doğrular niteliktedir (Şekil 2.2.4) (75, 98, 132). Kulakta Corti organında yapılan çalışmada, Corti organının mekanoelektrik uyarılması sırasında büyük miktarda K^+ iyonu geçişi olmakta ve AQP4'ün K^+ eliminasyonuna sağlaması nedeniyle, ozmotik dengeyi hızla sağlayarak işitmeye katkısı olduğu gösterilmiştir (84, 106, 124). Benzer çalışma, retinadaki Müller hücrelerinde de yapılmış AQP4-yoksun farelerde retinogramlarında *b*-dalgalarında azalma saptanmıştır (105).

Nöronların sinaptik aktivitesi sırasında ekstrasellüler aralıktaki suyun astrositik hücrelerin içine alınması nedeniyle, hücreler arası aralık küçülür (203). Deneysel çalışma ile akut dönemde elde edilen kortikal kesitlerle nöral fonksiyonun olduğu bölgeler de ekstrasellüler aralıktaki hacim azalması fonksiyon olmayan yerler göre daha belirgin olduğu gösterilmiştir (73, 74). Özellikle yüksek frekansla afferent liflerin uyarılması ile neokorteksin IV. tabakasında lokal ekstrasellüler aralıkta volümde küçülme I. tabakasında ise artma görülmektedir (73). Bu bilgi beyin su içeriğini yeniden dağılımına neden olduğu, bu hızlı su değişiminin ancak AQP4 ile olduğu düşünülmektedir. Bütün bu aktivite glial hücrelerin son ayak çıkıntıları dışındaki membranın aktivitesini göstermektedir.

AQP4'ün Su ve K⁺ dengesindeki rolü



Şekil 2.2.4. AQP4'ün su, K⁺ ve sinaptik glutamatın dengesini sağlaması (10).

Akuaporinler ve ekstrasellüler sıvı üretimi

BOS üretiminin % 40-70'i koroid pleksus epitelinde elde edilirken, % 30-60 ise beyin metabolizması sonucu ortaya çıkan endojen sıvı ve kan damarlarından geçerek oluşan hücreler arası sıvıdan elde edilir (32). Hücreler arası sıvının % 48'i kan damarlarından elde edilen sıvıdan oluşmaktadır (173). BOS'un toplam üretim hızı 0.30 ml/dakikadır (103). Bu üretim hızına damarsal sıvıdan gelen katkının 0.15 ml/dakika olduğu düşünülmektedir. Şekil 2.1.4 'de gösterilen AQP, taşıyıcı ve kanalların osmotik gradient üzerine etkili olarak su geçişine katkıda bulunmaktadır. Bu durumda koroid pleksus apikal membranında yer alan AQP1'in dışında astrositlerin son ayaklarında yer alan AQP4 de etkin olduğu konusunda görüşler vardır. AQP'ler perivasküler alandaki astrositlerde yoğun olarak bulunması SSS'nin içsel su taşınmasından sorumlu olduğunu düşündürmektedir.

AQP'lerin Regülasyonu

AQP1 regülasyonu

AQP1 beyinde koroid pleksusun apikal membranında bulunur. *Xenopus* oosit'inde vazopresin ile AQP1 ifadesi arterken, atrial natriüretik peptid ile azalmaktadır (154). Asetolazamid, bir karbonik asit inhibitörü olarak oositte AQP1'in su geçirgenliği üzerine etkinliğini inhibe etmiştir (113). Tetraetilamonyum ise voltaj bağımlı potasyum kanal inhibitörü olarak AQP1'in geçirgenliğini inhibe etmiştir (233). Kısa dönem hormonal regülasyon ile ilgili henüz bir kanıt elde edilememiştir (64). AQP1 mRNA'sı fetal yaşamda koroid pleksusda ve erişkin dönemde yüksek miktarda gösterilmiştir (25). Beyin dışındaki AQP1'in bulunduğu dokularda (akciğer, böbrek), glikokortikoid AQP1 ifadesini artırdığı saptanmıştır (108, 126).

AQP4 regülasyonu

Vazopressin beyindeki AQP4'ün aktivitesini uyarmaktadır (182). AQP4 civaya karşı duyarsız iken diğer ağır metallere karşı duyarlıdır. Zehirlenmelerde AQP4'ün etkinliği artar, KBE'nde geçirgenlik artmakta ve beyin ödemi oluşumuna katkıda bulunmaktadır (63). AQP4 postnatal dönemin ikinci haftasında gösterilmiş ve gençlik çağına kadar giderek arttığı bildirilmiştir (225). Primer astrosit kültürlerinde kortikosteroidlerin AQP4 üzerine bir etkinliği gösterilememiştir (62). İnsanda deksametazonun beyin ödemi üzerine etkinliğini araştırmak için yapılan bir çalışmada, beyin tümörü etrafındaki ödematöz doku ile normal dokudaki AQP4 ifadesinde bir farklılık gösterilememiştir (179). Mannitol verilerek oluşturulan hiperozmotik durumlarda sıçanbeyin korteksinde AQP4 ve AQP9'un ifadesinde artış gösterilmiştir (14). Astrosit kültürlerinde AQP4 ve AQP9 ifadelerinde hipoksik durumda azalma, reperfüzyonda ise infarkt bölgesindeki ifadelerinde artış görülmüştür (16, 54, 208, 230). İnfarktlı insan beyinde AQP4 ifadesinde artış gözlenmiştir (12). Fulminant karaciğer yetmezliğinde, akut hepatik ensefalopatilerde gelişen beyin ödeminde AQP4'ün ifadesinde artış gösterilmiştir (163).

AQP'ler ve beyin ödemi

Sitotoksik ödem hiponatremi ve serebral iskemide görülmektedir (87). İntraperitoneal su enjeksiyonu, bakteriyal menenjit ve serebral arter oklüzyonu ile oluşturulan sitotoksik ödem sonrası AQP4-yoksun farelerin normal farelere göre mortalitesinin daha az ve nörolojik muayenelerinin de daha iyi olduğu görülmüştür (119, 148). AQP4-yoksun fareler sitotoksik ödemlerden korunmuşlardır (53). AQP4-yoksun farelerin beyin tümörü ve beyin abselerinde ortaya çıkan vazojenik ödeme karşı daha duyarlı oldukları görülmüştür (119, 148). Karşılaştırmalı çalışmada AQP-yoksun farelerde kafa içi basınç ve nörolojik bozulma daha sık görülmüştür. Bu nedenle AQP4'ün, vazojenik ödemin elimine edilmesinde önemli olduğu düşünülmektedir (149).

2.3. İSKEMİ

Serebral iskemi, beyin dokusu için gerekli olan kan akımının karşılanamaması sonucu ortaya çıkar (190).

Hipoksi, parsiyel oksijen basıncının azalması; anoksi, komplet oksijen yokluğudur. Hipoksi ve iskemi karıştırılan, bazen birbiri yerine kullanılan terimlerdir. Hipokside, tek başına iskemi veya asidoz olmaz ve beyin yaralanması olmaz.

İskemik kor, yetersiz kan akımından dolayı enerji desteğinin sağlanamadığı fokal iskeminin bir bölgesidir (65).

Penumbra, iskeminin yoğun olduğu alan ile perfüzyonun normal olduğu alan arasında kalan bölgeye denir. Kan akımı azalmış ancak ATP seviyesi yeterlidir (204). Nöronal fonksiyonlarda bozulma, EEG voltajında düzleşme, duyu ve uyarılmış potansiyellerde yetersizlik vardır. Maymunlarda yapılan çalışmada, orta serebral arter oklüzyonunda, kan akımı 18 ml/100g/dakika'ya düştüğünde, uyarılmış potansiyellerde kaybolma, 12 ml/100g/dakika'ya düştüğünde ise enfarkt saptanmıştır (204).

Kan perfüzyon basıncı düşerse, oksijen ekstraksiyon oranı normalde % 30-40'dan % 90-100'lere çıkar (158). Kan akımı azalsa bile oksijen ekstraksiyonu arttığı için normal doku oksijen konsantrasyonu devam eder.

Pozitron emisyon tomografi ile yapılan çalışmada normal dokunun pH'sı 7.0 iken, penumburada bu değer 6.7 bulunmuştur. Oksijen metabolik oranı normalde 130-160 mmol/100g/dakika iken, penumburada 60-80 mmol/100g/dakika, glikoz metabolik oranı normal beyinde 25 mmol/100g/dakika iken, penumburada 17 mmol/100g/dakika civarında bulunmuştur (65).

Serebral enfarkt deyimi, glial, nöronal ve endotelial hücrelerin damar tıkanması nedeni ile etkilenen alanlarda ölmesidir. Beyin yaralanmasında seçici yaralanabilirlik deyimi ise, hipokampal CA1 bölgesi piramidal nöronları ve

serebellumda Purkinje hücrelerinin global iskemiye karşı daha duyarlı olmalarının ifade edilmesidir (160).

İskemi, komplet veya inkomplet olarak ya da geçici veya kalıcı olarak sınıflandırılır. Serebral arterlerin bütünüyle oklüzyonu, komplet iskemiye, tıkanan damarın kollateralle dolaşım sağlanması, inkomplet iskemiye neden olur. İnkomplet (fokal) iskemide, iskemik kor alanının etrafında penumbra vardır. Kardiak arrest veya şiddetli hipotansiyonda komplet iskemi (global iskemi) gelişir.

Deneyssel hayvan modellerinde, gerbillerde iki-damar, kemirgenlerde dört damar global iskemi modelleri kullanılmaktadır (82, 161).

2.3.1. İskemi Modelleri

Komplet İskemi Modeli

Global iskemi modelinde genellikle gerbil kullanılır. Gerbillerde anterior ile posterior dolaşım arasında kollateral yoktur. İki dakikalık karotid oklüzyonunda iskemik hücre ölümü olmaz. Beş dakikalık oklüzyonda seçici, ve geçmiş hücresel ölüm hipokampal CA1'deki piramidal nöronlarda görülürken, beyin sapı ile serebellumda iskemi olmaz (89). Sıçanlarda global iskemi oluşturmak için karotid oklüzyonuna ek olarak sistemik hipotansiyon gerçekleştirilir (193). Pulsinelli'nin, dört-damar oklüzyon modelinde her iki vertebral arter kalıcı, iki karotid arter ise geçici olarak oklüde edilir (161).

Global iskemide, gerbillerde (82), sıçan (160), maymun (240) ve insanların beyinde (199) değişiklikler saptanmamıştır. İskemiden 1-4 gün sonra, CA1 piramidal nöronlarda, piknotik ve eozinofilik nöronlar görülmeye başlar (156).

Gerbillerde global iskeminin 5. dakikasından sonrada, CA1 hipokampal nöronlarında ölüm, 10-15. dakikasında striatum, inferior kollikulus septumunda, korteksin 3 ve 5. katlarındaki piramidal nöronlarında, talamusun genikülat

çekirdeğinde ve substansia nigradaki nöronlarda ölüm görülür (13). Sıçanlarda ise bu patolojilere ek olarak serebellumun Purkinje hücrelerinde de ölüm görülür.

Fokal İskemi

Üç önemli model kullanılmaktadır. İntrakranial yaklaşımla, orta serebral arter oklüzyonu (78), ya da orta serebral arterin foramen ovale genişletilerek oklüzyon yapılmasıdır (189). Üçüncü yöntem naylon filaman yöntemidir (110). İntrakranial girişim gerektirmez. Boyundan karotis arterden girilerek orta serebral arteri intrakranial segmentinde tıkararak gerçekleştirilir. Geçici veya kalıcı olabilir. Diğeri ise fotosensitif boya vererek damar görüntülenip lazer ile damar üzerine fotokoagülasyon yapılmasıdır (39).

2.3.2. İskemi/Reperfüzyon

İnme (*stroke*), beyin hücrelerinin fonksiyon bozukluğu ile ortaya çıkan klinik bir durumdur. İskemik inmenin, iskemi ve reperfüzyon olmak üzere iki aşaması vardır.

İskemi

İnmenin iskemik aşaması, bölgesel serebral kan akımının (*rCBF*) azalması, vasküler direncin artması, vasküler içerikte trombüslerin oluşması sonucu, beyin dokusuna oksijen ve besleyici ürünlerin gitmemesidir. Endoteliumda gelişen infarkt, sıkı kavşakların bütünlüğünün bozulması ve iskemik bölgede geçirgenliğin kontrolünü ortadan kaldırmaktadır. İskemik deneysel modellerde sıkı kavşakların etkilenmesi hemen görülmemektedir. Kan akımındaki azalmanın devam etmesi ile birlikte, saatler içinde ortaya çıkmakta ve geçirgenlik artışı sürmektedir (22).

Beyin kan akımındaki azalma, iskemik bölgedeki bir çok süreci başlatır. ATP'de azalma, glutamat toksitesi, iyonik dengesizlik, metabolik fonksiyon kaybı, artmış asidoz, oksidatif stres ve inflamatuvar aktivasyon gibi hücrel ve

metabolik süreçler tetiklenir. Dakikalar ve saatler içinde başlayan iskemi, kapiller çapında daralma, endotelial şişmeye neden olur. Oksijen yetersizliği sonucu gelişen anaerobik metabolizma laktik asit birikimi ile laktoasidoza neden olur. Endotelial hücreler, astrosit ve nöronlarda şişmeler görülür. Doku plazminojen aktivatörü (tPA), matriks metalloproteinaz (MMPs) katepsin ve heparinaz gibi proteaz enzimlerinin aktivasyonu ile KBE ve ekstrasellüler matriks yıkıma uğrar ve geçirgenlikte artış olur (120).

Oklüzyondan dakikalar sonra erken duyarlı genlerin (c-jun, c-fos) ve geç *heat shock* genlerin (Hsp70, Hsp72) ortaya çıkması ile endotelial yanıt yıkıma uğrar (224). Penumbra içinde apoptotik kaspaz-bağımlı, kaspaz-bağımsız yollar aktive olur. Proinflamatuvar sitokinler (*interleukin-1, tissue necrosis factor- α -TNF α*) endotelialda aktive olur. Lökosit ekstrasel olarak inflamatuvar aktivasyonu başlatır. Lökosit ve reaktif mikroglialar iskemik beyinde inflamatuvar aktiviteyi artırır ve toksik serbest oksijen radikalleri açığa çıkar (109).

Reperfüzyon

Reperfüzyon, serebral kan akımının iskemik veya hipoperfüzyone olmuş dokularda yeniden sağlanmasıdır. Dokuların yaşayabilmesi için mutlaka gerekli olan bir süreçtir. Buna karşın geçikmiş reperfüzyon ek yaralanmalara ve KBE yıkımı ile hemorajiye neden olabilir. Reperfüzyonda KBB'de sıkı kavşakların açılması ve parasellüler permeabilitenin artması üç fazda gerçekleşir. Başlangıçta, reperfüzyon geçirgenliğinde akut serebral bölgesel kan akımı artar (rCBF) arkasından bifazik permeabilite artışı izler (Şekil 2.3.1).

Orta serebral oklüzyon modelinde multifazik iskemi/reperfüzyon permeabilitesinin başında hiperemi gösterilmiş, daha sonra bifazik parasellüler permeabilite 5 ila 72 saat sonra ortaya çıkmıştır (101). Global iskemi modelinde beyin bölgelerine göre reperfüzyon sonrasında hemen permeabilite artışı sonra da bifazik yanıt ortaya çıkmıştır (159).

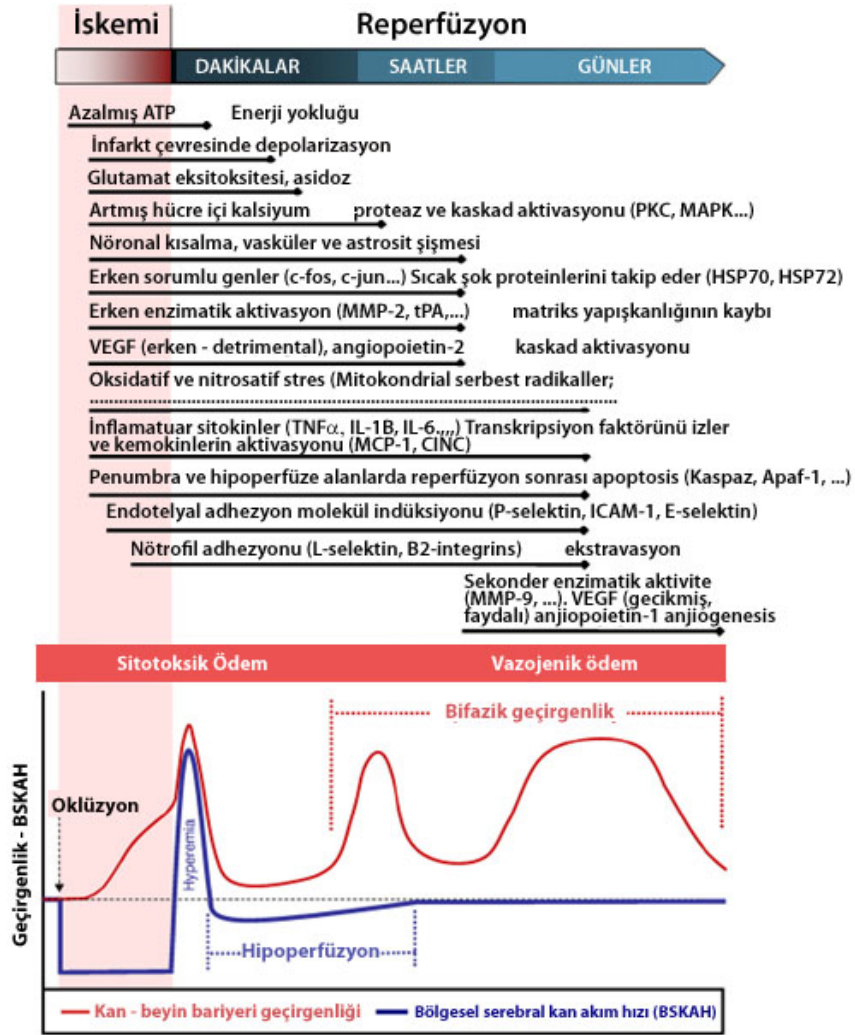
Reaktif hiperemi serebral otoregulasyonun kaybı, reperfüzyonun başlangıç aşamasında akut olarak KBE'in açılması sonucu gelişmektedir. Bu akut fazda perfüzyonun pasif olarak geliştiği, ani ve keskin kan akımı artışıyla ortaya çıktığı düşünülmektedir (198). Serebral perisitler içerdikleri kontraktıl proteinler yardımıyla serebral kan akımını (SKA) kontrol ettikleri düşünülmektedir (20, 155). Ekstrasellüler matriks endotelyumu çevreleyerek sarması, kollejen yardımı ile mekanik olarak direncini artırmaktadır.

Başlangıç hiperemiyi takiben iskemik bölgede hipoperfüzyon gelişir, sonuçta bölgeye besin desteğinin ulaşmasında azalma görülecektir. Hipoperfüzyonun nedeni serebral metabolik depresyon, endotelyal ve astrositik son ayaklarındaki şişme sonucu mikrovasküler tıkanmanın gelişmesiyle ortaya çıkmaktadır (80). Hipoperfüzyon ayrıca nötrofil adhezyonunu artırarak inflamatuvar sürece dolaylı olarak katkıda bulunur.

Bifazik permeabilitenin ilk fazı, KBE'deki artmış inflamatuvar ve oksidatif stres, ekstrasellüler matriksde enzimatik yıkılma sonucu gelişir (68, 220). Buna karşın akımın olmadığı ve iskeminin uzun sürdüğü dönemde venöz tıkanma sonucu iskemik yaralanma artar (77). İskemi süresi artıkça ödem artışı ve final faz olan bifazik fazı artırmaktadır (159).

Koroid Pleksusda İskemi:

Koroid pleksus zengin bir kan desteğine sahiptir. Arteriyal beslenmesi, karotid arterin anterior koroidal ve baziller arterin, posterior serebral arterin dalı olan, posterior koroidal arterlerinden sağlanır. Bu nedenle fokal iskemi modellerinde, koroid pleksusda iskemi sağlanamayabilir. Fokal iskemide kullanılan orta serebral arter tıkanmalarında koroid pleksus hem posterior dolaşımdaki posterior serebral arterden hem de internal karotid arterin erken bölümlerinde yeterli kan desteğini alacağı için iskemi tam olarak gerçekleşemez (59). Global iskemide ise dört damar okluzyonu sağlandığı için, lateral ventriküldeki koroid pleksusda 6 saat içinde nekroz olur fakat, 24 saat içinde nekrozun azalmaya başaldığı ve 72 saat içinde de kaybolduğu gösterilmiştir (160).



Şekil 2.3.1. Şematik olarak iskemi reperfüzyon sürecini ve bununla birlikte ortaya çıkan sitotoksik ve vazojenik ödem gösterilmektedir (181).

2.4. BEYİN ÖDEMİ

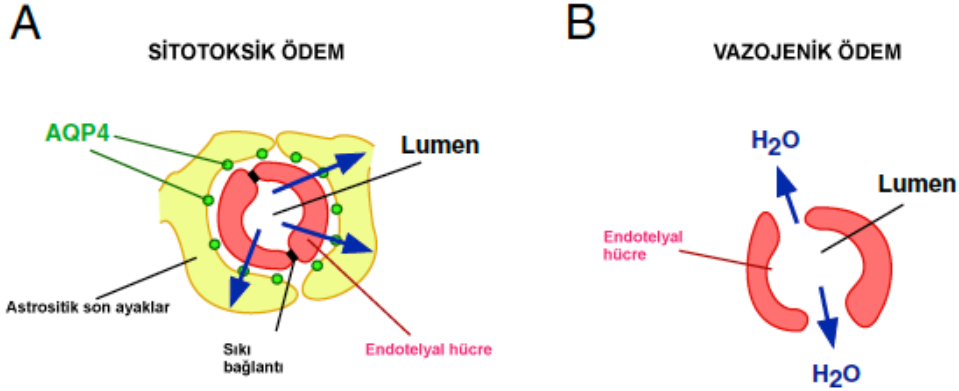
Normal insanda kafa içi hacmini oluşturan bölümler: beyin parankimi (1100-1300 ml), hücreler arası aralık (100-150 ml), BOS (75-100 ml) ve kan (75-100 ml)'dir. Bu bölümler arasındaki sıvı değişimi, ozmotik ve hidrostatik güçlerin etkisiyle hücresel ve hücre dışı bölümlerden hücre membranı, KBE, kan-BOS, beyin ventrikül epandiması, kan, koroid pleksus ve araknoid granülasyonlar yardımıyla gerçekleşir.

Başlangıçta beyin hacmindeki değişiklikler, beyin omurilik sıvısı ve kan hacminde azalmaya yol açarak kompanse edilir. İleri derecede hacimsel artışlarda, bu işlergeler çalışamaz hale gelir ve kafa içi basınç artar, herniyasyon ve ölüm gelişir (129).

Beyin ödemi tanım olarak, beyin parankimi içerisinde lokal ve yaygın anormal sıvı toplanmasıdır. Bu tanımlama, beynin venöz dolaşımının engellenmesi veya hiperkapni nedeniyle vazodilatasyon olması sonucu, kafa içinde venöz göllenmenin olduğu beyin şişmesinden ayırt edilmelidir.

Beyin ödemi terimini ilk Reichardt (169) 1905'te kullanmış ve beyin şişmesinden ayırt etmek için tercih etmiştir. Patolog Igor Klatzo (91), 1967' de soğuk hasarı (*cold injury*) modelinde iki tip beyin ödemi tanımlamıştır. Hücre içi ve hücre dışı su toplanmasına göre sitotoksik ve vazojenik olmak üzere iki tip ödem sınıflaması yapmıştır (Şekil 2.4.1). Fishman (47) 1975'de bu sınıflandırmaya ek olarak hidrosefali hastalarında gördüğü ödem tipini belirtmek için "*intertitial edema*" tanımını yapmıştır. Dördüncü ödem tipi "*osmotic edema*" sodyum benzeri iyonların dengesindeki bozukluklarında görülen hücre içine su girişini sağlayan ödem tipidir.

Beyin ödemi, kafa travmalarında, beyin tümörü, inmelerde, beyin kanamalarında ve enfeksiyonlarında sık görülür. Beyin cerrahi pratiğinde, hiperosmotik ajanlar ve dekompresyon gibi yöntemler 90 yıldır kullanılmaktadır. Beyin ödemi tedavisinde etkili bir tedavi yönteminin bulunamaması henüz beyin ödemi işlergelerinin tam olarak anlaşılmadığını göstermektedir.



Şekil 2.4.1. Beyinde ödem oluşumu. A) Sitotoksik ödem astroitik çıkıntılarda AQP4 yardımcıyla ödemin gelişimi. B) Vazojenik ödem KBE'in yıkılması sonucu suyun hücrelerarası aralığa sızması, AQP4 rol oynamamaktadır (207).

2.4.1. Sitotoksik (Hücresel) Ödem

Sitotoksik ödem terimi, Klatzo tarafından ilk olarak *triethyltin* gibi toksik bir madde kullanılarak yapılan deney sonucu görüldüğü için benimsenmiştir (91). Daha sonraki çalışmalarda toksik ajan kullanılmadan, travma, epilepsi ve beyin tümörlerinde de benzer ödem geliştiği görülmüştür (157). Fokal veya global damar oklüzyonunda, kalıcı veya geçici serebral iskemilerde, belirgin olarak hücresel ödem görülür (15, 100, 107). İskemi dışında hücresel ödem, kafa travması, enfeksiyon, karaciğer ve böbrek metabolik hastalıklarında da görülür (119, 207, 215).

Mikroskobik olarak hücresel ödemde, öncelikle astroitlerin gövde ve ayakları çıkıntılarında ve bazı nöronların dendritlerinde şişme görülmektedir. Nöronal hücrelerin gövde ve aksonlarında şişme, oligodendrositlerde

görülmemektedir. İskeminin ilk 30 dakikasında astrositlerde şişme görülürken nöronlar büzüşmektedir (87, 157). Sitotoksik ödem hücreler arası sıvı miktarında % 50 oranında bir azalmaya neden olduğu erken dönem çalışmalarda gösterilmişti (214). Bu azalma, deneysel iskemik çalışmalarda, MRG'nin belirgin diffüzyon katsayılı (ADC) incelemeleri ile, hücreler arası sıvının hücre içine geçişi gösterilmiştir (72).

Hücresel Ödem İşlergesi

Önerilen bir çok su taşıma işlergeleri tanımlanmıştır (Şekil 2.4.2). Akuaporinler osmotik basınç zorlaması ile su geçişine kolaylık sağlamaktadır. Travmatik beyin yaralanmasında ekstrasellüler aralıkta biriken K^+ iyonu artar ve artan bu iyon hücre içine KCL olarak alınır. Diğer bir mekanizma hücre içindeki HCO_3^- ve H^+ iyonlarının hücre dışındaki Na^+ ve Cl^- ile yer değiştirmesi sonucu şişmeye neden olur. İskemi sonrasında astrositlerin duvarlarındaki yetmezlikten glikojen, gibi makromoleküllerin girmesi, yağ asidi, serbest oksijen radikallerinin geöçirgenliği artırması Na^+ ve Cl^- hücre içine girmesine birlikte de su molekülleri sürklemesine neden olur.

Hücresel şişme sonucu hücrede (88):

1. Membran depolarizasyon sonucu hücre içinden dışarıya çıkan K^+ iyonu, Ca^{2+} iyonlarının voltaj bağımlı kanalları ile hücre içine girmesine yol açar.
2. Mekanosensitif kanalların uyarılması ile Ca^{2+} doğrudan hücre içine girer.
3. İskemi sonucu ortaya çıkan eksitatuvar aminoasitlerin astrositler tarafından geri alımı azalır.

Deneysel modellerde hücresel ödem oluşturmak için global iskemi ve su zehirlenmesi modeli kullanılmaktadır (223). Hücresel ödemde, astrositler, nöronlar ve dentritlerde beyindeki ödemi azaltmaya yönelik şişme olur (92).

Astrositler, hücreler arası aralıkta, nöronal aktivite ya da iskemi nedeniyle ortaya çıkmış olan K^+ ve glutamatin temizlenmesi gibi sorumlulukları oldukları için nöronlara göre patolojik şişmeye daha çok eğilimlidirler. İnsanlarda bir nörona karşı yirmi astrosit bulunmaktadır ve astrositler hücresel hacimlerin beş katına kadar şişebilirler (87).

Hücresel ödem en iyi fokal iskemi modellerinde çalışılmıştır. Kan akımının iskemi eşik değeri olan 10 ml/100g/dakika'nın altına düşürülmesi ATP-bağımlı Na^+/K^+ -ATPaz pompalarında yetmezliğe neden olur. Bu yetmezlik, Na^+ 'un hücre içinde birikmesine, hücre dışındaki suyun osmotik dengenin sağlanması için hücre içine girmesine neden olur. Bu süreç saniyeler içinde gerçekleşir. Na^+ ile birlikte Cl^- , H^+ , HCO_3^- hücre içine girer. Bütün bu değişiklikler geri dönüşümlüdür. İskemi süresi 6 dakikadan uzun sürerse geri dönüşümsüz hale gelir ve iskemik kor oluşur. İnfarkt olmuş bu bölgenin etrafını çevreleyen bir penumbra bölgesi vardır. Kan akımı burda 20ml/100g/dakikadan fazladır. Bu bölgedeki astrosit ve nöronlarda da şişme hücresel ödemden dolayı vardır. Hipoksi devam ederse hücreler nekroza giderler. Hücreler içerdikleri su ve eriyikleri hücreler arası boşluğa bırakarak vazojenik ödem tipi bir tablo geliştirir.

Geçici vasküler oklüzyon sonrası sağlanan reperfüzyon, kesilmiş olan enerji desteğini yeniden sağlar ve Na^+ ve suyun hücre içinde birikmesi önlenir. İskemiden 4 saat sonra KBE'nde gelişen hasarlanma nedeniyle vazojenik ödem gelişir ve iskemiden 24-48 saat sonra bilgisayarlı tomografide görünür hale gelir. Reperfüzyondan sonraki vazojenik ödemin iki fazlı olduğu düşünülmektedir (99, 174). KBE'nin ilk açılması reperfüzyondan iskemik alanda asidoz, vazodilatasyon ve vasküler otonöregülasyonun bozulması nedeniyle, alana hızla dolan kan, reaktif hiperemi oluşumuna neden olur.

KBE'nin ikinci açılışı iskemik oklüzyonun açılmasından sonra dolan kanın enfarkt alanını genişletmesi ile ortaya çıkar (93). İnfarkt alanına plazma içeriğinin dolması ve osmolaritesinin artması nedeniyle hücre membranı yıkılır ve doku basıncı artar. Artmış doku basıncı kan akımını azaltarak perfüzyonu bozar. Penumbra bölgesi nekroza gider. Glutamat, serbest oksijen radikalleri

iskemide nöronal yaralanmada ve KBE'nin yıkılmasında önemli roller üstlenen bir süreçtir (109).

AQP4'ün sitotoksik ödem üzerindeki rolü

Sitotoksik ödem deneysel modeli olarak kullanılan akut su zehirlenmesi modeli ile yapılan AQP4-ifadeli ve AQP4-yoksun tip farelerde yapılan çalışmada, farelere intraperitoneal su infüzyonu yapılarak serum da hiponatremi oluşturulmuş, böylelikle KBE yıkılmadan sitotoksik (hücreyel) beyin ödemi gerçekleştirilmiştir (119). KBE'ni oluşturan astrositlerdeki AQP4 bağımlı su geçişi AQP-yoksun farelerde daha az olması nedeniyle beyin ödemi daha az olmuş ve farelerin nörolojik durumları AQP4-ifadeli farelere göre daha iyi bulunmuş ve daha uzun süre yaşamışlardır (119). Elektron mikroskopik incelemelerinde prekapiller astrositik son ayaklarda şişme, AQP-yoksun farelerde AQP-ifadeli farelere göre üç kat daha az bulunmuş ve AQP4'ün kapillerlerden astrositlere su geçişini sağladığı düşünülmüştür (119).

İnmede görülen iskemik ödemin, birincil olarak sitotoksik ödem daha sonra da vazojenik ödem görülmesi nedeniyle kalıcı fokal iskemi modeli ile yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda AQP4-yoksun farelerde nörolojik defisit ve hayatta kalım oranı 24 saatin sonundan yüksek oranda bulunmuştur (119). AQP4-ifadesi olan farelerde hemisferik genişleme, orta hat şifti ve hacim artışı görülmüştür (119). AQP4'ün sitotoksik ödemde, su geçişini artırdığı düşünülmüştür.

2.4.2. Vazojenik Ödem

Beyin kanaması, enfeksiyon, epileptik nöbet, travma, tümör radyasyon yaralanması ve hipertansif ensefalopati gibi hastalıklarda KBE yıkılır ve plazma içeriği hücreler arası aralığa geçerek vazojenik ödeme neden olur (129). Vazojenik ödem, etken olan hastalığın tipine göre lokal veya yaygın olabilir. Klinikte, ödemin radyolojik görüntüleri basitçe, lokal olanlarda giruslarda silinme, yaygın olanlarda ventriküllerde daralma şeklinde görülür.

Beyaz maddenin, korteksdeki gri maddenin uzantıları olan paralel lifleri içermesi, gevşek bir hücreler arası bir boşluğa sahip olması nedeniyle, ödem daha çok bu bölgede görülür. Gri maddede, hücre yoğunluğunun fazla olması, hücreler arası bağlantıların fazla olması, hücreler arası aralığın daha dar ve sıkı olması nedeniyle ödem içeriği burada birikemez.

Işık mikroskopisinde erken dönem ödemde hücrelerde vakuolleşme, parankimde solukluk görülür. Geç dönemde, miyelin kılıflarında inflamatuvar fagositöz nedeniyle parçalanma görülür.

Klatzo tarafından geliştirilen soğuk yaralanması modelinde sıvı azot ile soğutulmuş probe, dura üzerinde 45 saniye tutularak vazojenik ödem oluşturulmaktadır (95). Bu model ile yapılan araştırmalarda iki kez KBE yıkılması görülmektedir (130). Birincisi 6 saat-2.günde olur; genellikle arteriyoller ve büyük venüller etkilenmekte ve çevrelerinde plazma proteinleri dışarı çıkmaktadır. İkincisi ise anjiogenezise eşlik eden fazdır ve maksimum 4.güne denk gelmektedir. Bu fazda arteriyoller, venoller ve yeni oluşan damarlardan plazma kaçağı görülmektedir.

KBE'ndeki geçirgenliğin artması, beyin sıvı miktarının artmasına neden olur. Kan kapillerleri etrafındaki endotel hücrelerinin sıkı bağlantılar aracılığı ile bağlanması sonucu ortaya çıkan KBE beyine sıvı girişini kontrol etmede önemli görevler üstlenmektedir. Yıkılması durumunda plazma protein içeriği beyine sızar. Kan şekilli elemanları sızarsa hemoraji görülür. Plazma içeriğinden sızan

ultrafiltrat içeriği kompliansın gri maddeye göre daha fazla olmasından dolayı beyaz maddede birikir (166).

AQP4'ün vazojenik ödem üzerindeki rolü

Bütün AQP'lerde olmak üzere su geçiş iki yönlüdür (9, 123). AQP4 sadece kapillerlerden beyine su girişini sağlamaz, aynı zamanda beyinden kapillerlere su çıkışını da sağlar (146). AQP4'ün beyinde su çıkışını sağlamak için yapılan bir çalışmada, fare beynine verilen izotonik saline solusyonu ile AQP4-yoksun farelerin kafa içi basıncında ve beyin su içeriğinde artış görülmüştür (146). Beyin tümöründe görülen vazojenik ödemle ilgili yapılan deneysel çalışmada ise beyin tümörlü AQP4-yoksun farelerde intrakranial basınç, morbidite ve mortalitenin yüksek olduğu görülmüştür (147).

Beyin ödeminde ödem suyunun eliminasyonunda üç önemli engel vardır: KBE, glia limitans ve ependimadır. Her üç engelde de AQP4 ifade olmaktadır.

Vazojenik ödem çözümünde önerilen hipotezler, eğer intrakranial basınç düşük ise hücreler arası vazojenik ödem sıvısı ependimal yolla elimine edilerek ventrikül içindeki BOS'a karışmaktadır, eğer yüksek ise beyin parankimindeki KBE ile elimine edilmektedir (121, 170).

Vazojenik ödemin çözülmesi KBE'nin yıkıldığı dönemde plazma proteinlerinin su ile birlikte beyin dokusunda artışı İyot¹²⁵-işaretli albumin ile gösterilmiştir (100). Hem plazma proteinlerinin hem de suyun hücreler arası aralıktan geri çekilmesi KBE'nin kapanması ile birlikte 24 saat içinde başlamaktadır. İlerleyici ödemin görülmesi, hidrostatik basıncın etkisi ile ödem sıvısının beyaz madde ve ventriküle doğru yer değiştirmesinin bir sonucudur (170, 210). AQP4'ün bu aşamada ependima ve astrositlerdeki lokalizasyonları ile ödemin çözülmesinde rol aldıkları düşünülmektedir.

Hücre dışı aralığa sızmış bu proteinler ve sıvının, astrositler tarafından sindirildiği, endotelial hücreler tarafından geri kan dolaşımına alındığı düşünülmektedir (94, 219). Ödem sıvısı aynı zamanda, glia limitans eksternayı geçerek subaraknoid alandaki BOS'un içine geçerek araknoid granülasyonlarla superior sagittal sinüse boşalır.

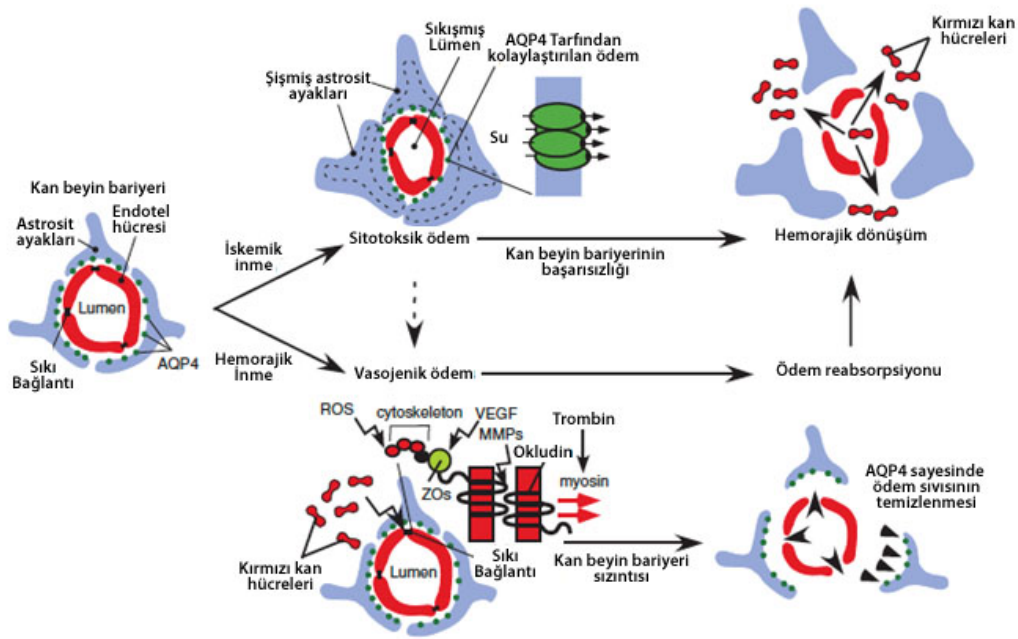
Sonuç olarak bütün bu çalışmalar göstermektedir ki vazojenik ödem de su beyine AQP4'den bağımsız olarak girmekte ve hücrelerarası aralıkta birikmekte, ama beyinden suyun çıkışı AQP4 ile transsellüler yolla olmaktadır (118).

2.4.5. İskemik Ödem

İskemi/reperfüzyon sürecinde klinik bozulmaya neden olan önemli nedenlerden bir tanesi de beyin ödemidir (33). İskemide sitotoksik ve vazojenik olmak üzere iki tip ödem görülür. Sitotoksik ödem, iskemiden hemen sonra iyonik ve metabolik kontrolün ortadan kalkması ile hücrelerarası sıvının hücre içine girmesiyle ortaya çıkar. Hücre içi potasyum kaybı ile sodyum hücre içine girererek hücre içi su ve iyon miktarını artırır (23). Bütün beyin hücreleri sıvı aldıkları için şişer, ancak hücreler arası sıvının hücre içine yer değiştirmesi nedeniyle bütün beyin dokusunda hacimsel artış olmaz (68). Ultrastruktürel incelemeler, enerji yetmezliğinden 5 dakika sonra astrositik son ayaklarda şişmeyi göstermektedir (41). Astrositik şişme serebral iskemiden 24 saate kadar devam eder ve sonrasında nekroz görülür (58). Nöronlar astrositlere göre daha geç şişer ancak daha önce büzülürler (68). İskemiden 6 saat sonra nöronların % 15'inde nekroz görülürken 12 saatte ise bu oran % 65'e ulaşmaktadır (57).

Endotelial hücrelerde ise çekirdek ve sitoplazmadaki şişme 2. saatte başlamaktadır (58). Astrositik şişme ve integrin adhezyon molekül ifadesinin kaybı sonucu son ayaklar, endotelyumdan ayrılırlar (37, 206). Bütün bunlara karşın sitotoksik ödem, KBE'den bağımsız olarak gelişmektedir.

Vazojenik ödem ise direkt olarak KBE'nin bütünlüğünün bozulması ile ilgilidir. Büyük moleküllere geçirgenliğin artması sonucu intravasküler sıvı içeriği hücreler arası aralığa geçer (68). Vazojenik ödemde tüm beyin hacmi artar, sıvı birikimi gri maddeden çok beyaz maddede birikme eğilimindedir (15). Vazojenik ödem iskemik inmeden sonra yaklaşık 2-5 gün içinde en yüksek seviyesine ulaşır (68, 184). İnflamatuar ve oksidatif işlemler, vazojenik ödemin oluşumuna bu süre içinde katkıda bulunmaktadır.



Şekil 2.4.2. İskemide sitotoksik ve vazojenik ödemin gösterilmesi. İskemik ödemde perivasküler astrositik son ayaklarda AQP4 ile su alımı artmakta daha sonra KBE'de bozulma nedeniyle vazojenik ödem gelişmektedir (235).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Protokol

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi, Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 13.10.2005 tarih ve 2005/58-6 sayılı izni ile Hacettepe Üniversitesi, Deney Hayvanları Laboratuvarları'nda yapıldı.

3.2. Deney Hayvanları

Deneyde Sprague-Dawley türü 180-250 g ağırlığında erkek sıçanlar kullanıldı.

Denekler 6 gruba ayrıldı ve her grupta 6 sıçan kullanılması planlandı. Ancak 7 sıçan deney sırasında öldü. A grubu *sham*, diğer gruplara iskemi ve reperfüzyon yapıldı.

Gruplar:

Grup Sham (n=4): Bu grupta sadece normal değerleri almak için kullanıldı.

Grup 1. saat (n=4): İskemi/reperfüzyon sonrası 1. saat

Grup 6. saat (n=5): İskemi/reperfüzyon sonrası 6. saat

Grup 12. saat (n=5): İskemi/reperfüzyon sonrası 12. saat

Grup 24. saat (n=5): İskemi/reperfüzyon sonrası 24. saat

Grup 48. saat (n=6): İskemi/reperfüzyon sonrası 48. Saat

3.3. Anestezi

Anestezi iki aşamalı olarak uygulandı. İskeminin ilk gününde sadece vertebral arter oklüzyonu yapıldı, 24 saat sonra tekrarlanarak karotid arter oklüzyonu yapıldı. Ketamin+Xylazine 90 mg/kg + 10 mg/kg dozunda kullanıldı. (Ketalar® Ketamine Hydrochloride Injection, USP, Parke-Davis, Morris Plains, NJ 079950 ABD), (Rompun®, Xylazin Hydrochlorid %2, Bayer, Mefar İlaç San. A.Ş. İstanbul, Türkiye).

3.4. İskemi Modeli ve Cerrahi Teknik

İlk gün intraperitoneal Ketamin+Xylazine'in verilmesiyle uyutulan sıçan boyun anterior ve posteriorunda cilt kıllardan temizlendikten sonra kraniumun oksipitalinden başlayıp servikal ikinci vertebraya kadar uzanan 2 cm lik orta hat insizyonu yapıldı. Daha sonra, kranium periost künt diseksiyonla disseke edildi. Servikal bölgede ise fascia makasla açılarak orta hatta paravertebral adeleler künt diseksiyonla CARL-ZEISS OPMI-1-FC mikroskop (Carl Zeiss,GmbH, Almanya) ile 1.6 ve 2.4 büyütmede disseke edildi. Her iki alar foramen çıkışında vertebral arterler görüldü ve Codman Bipolar (Johnson and Johnson Co., ABD) ile koagüle edildi. Cilt 4/0 ipek ile suture edildi. Sıçanlar ilk cerrahiden sonra normal oda sıcaklığında bakım ve beslenmeye alındı.

Aradan 24 saat geçtikten sonra Ketamin/Xylazine tekrar intraperitoneal olarak verildi. Daha sonra 10 dakika içinde uyuyan sıçan, boyun anteriorundan yapılan 2 cm'lik orta hat insizyonu, mikroskop yardımıyla 1-1.6 lık büyütme ile her iki kommon karotid arterler disseke edilerek Aesculap-Yaşargil anevrizma klipleri (Aesculap , Tutlingen, Almanya) ile 30 dakika süre klibe edildi.

Bu sırada sıçanlara rektal yoldan elektronik termometre konularak homeotermik battaniye yardımıyla (Harward apparatus) vücut ısısı bütün deney boyunca yaklaşık 37 °C' de sabit tutuldu.

Grup üyeleri planlanan sürelerine göre reperfüzyon sonrası 100 mg/kg dozunda pentobarbital verilerek uyutuldu. Kranium açılarak beyin, pons ve

serebellum bir bütün halinde çıkarıldı. Hemisfer ağırlıkları ölçüldü, orta hattın korpus kallosum düzeyinde hemisferik kesiler yapılarak iki hemisfer halinde ayrıldı. Dokular -80°C'de beklemeye alındı.

3.5. Yaş/Kuru Ağırlık

Ödem miktarını ölçmek için her gruptaki sıçanların bir hemisferi alındı, 70°C'de 24 saat fırında kurutuldu. Aşağıdaki formül ile su yüzdeleri hesaplandı.

$$\text{Toplam Su İçeriği (\%)} = \frac{\text{Yaş ağırlık} - \text{Kuru ağırlık}}{\text{Yaş Ağırlık}} \times 100$$

3.6. İmmünohistokimyasal Boyama

Örneklerin hazırlanması

Doku örnekleri en kısa sürede (1-25 dakika) sıvı azot içerisinde -196° derecede donduruldu. Derin dondurucuda antijenitesi bozulmadan kesitlerin elde edilebilmesi için en çok 3 gün bekletildi. Kriyostat (Leica Frigocut 2800E) ile 7 mikrometre kalınlığında seri kesitler önceden jelatinle kaplanmış lamlara alındı. Oda ısısında kurutulduktan sonra slika jel kullanılarak nemi alınmış kapalı kutularda immün işaretleme uygulanana kadar (en çok 1-2 gün) saklandı.

Kullanılan malzeme ve solüsyonların hazırlanması

- Primer antikor
- Sekonder antikor
- Fosfat tampon solüsyonu (PBS)
- Fosfat tamponu solüsyonu-sığır serumu albumini (PBS-BSA) karışımı
- Floresan kromojen

Primer antikorlar

Çalışmada kullanılan primer antikorlar AQP1 ve AQP4 (rabbit ANTI-AQUAPORIN 1 ve 4, Chemicon, AB3594) Bu antikorlar önerilen oranlarda (1:100) PBS-BSA karışımı ile sulandırılarak kullanıldı.

Sekonder antikör

Sekonder antikör (GOAT ANTI-Rat IgG FLUORESCEIN CONJUGATED SECONDARY ANTIBODY, Chemicon, AP132F) PBS-BSA solüsyonu ile 1/200 oranında sulandırıldı.

Hazırlanan fosfat tampon solüsyonu içine 1/40 oranında sığır serum albumini (%22'lik solüsyonu, Sigma 11h9413) eklenerek hazırlandı.

Jelatin kaplanmış lamlara alınan kesitler;

- Saf asetonda, oda ısısında 10 dakika tespit edildi,
- Çevreleri pap-pen (Zymed Laboratories inc. Kod no:71310) ile sınırlandırıldı,
- Oda ısısında, 1 saat süreyle uygun şekilde dilüsyonu yapılmış primer antikorlar kesitlere damlatıldı ve nemli ortamda inkübe edildi,
- PBS yıkama solusyonu ile 3 kez 10 dakika süre ile yıkandı,
- Uygun şekilde hazırlanmış sekonder antikör kesitlerin üzerine damlatıldı ve 30 dakika süreyle ile nemli ortamda bekletildi,
- PBS yıkama solusyonu ile 3 kez 10 dakika süre ile yıkandı,
- DAPI anti fade (DAPI/Antifade Solution, Chemicon S7113) kullanılarak kesitler kapatıldı.

Değerlendirme

İndirekt immunofloresan yöntemi kullanılarak immün boyama uygulanmış kriyostat kesitlerinde AQP1 ve AQP4-ifadelerinin dağılımını saptamak için yarı kantitatif bir değerlendirme sistemi kullanıldı. Kesitler floresan ataçmanlı

mikroskopta (Leica DM 6000B Almanya) incelendi ve fotoğraflandı (Leica DC 490 dijital kamera). Büyütmesi 40x olan görüntüler alındı ve *tiff* formatında kaydedildi.

AQP1 ve AQP4 antikorlarıyla yapılan boyamalarda hem kortikal kesitler hem de ventrikül düzeyinde alınan kesitler karşılaştırıldı. Bu kesitler alınırken AQP1'in daha çok ventriküler koroid pleksusda, AQP4'ün ventrikül komşuluğunda ve korteks parankiminde yer alması nedeniyle bu kesitler alındı.

Bu boyamalar *Macnification 1.6.2* versiyon programıyla (*Orbicule*, Belçika) iMac Bilgisayarda (3.06 GHz Intel Core 2Duo Apple Co. ABD) analiz edildi. Daha sonra bu görüntüler *Macnification* programına yüklenerek renk analizi için kalibrasyon yapıldı. Görüntü seçilerek renk analizi yapıldı.

Renkler üzerinden yeşil renk ağırlıklı boyanan AQP ifadeleri ve kırmızı renkli boyanan hücreler ise hücre çekirdeklerini göstermektedir. Yeşil ve kırmızı renk yoğunluklarının ölçülmesi ile alınan ortalamalar ve standart sapmaları ile istatistiksel değerler elde edildi.

3.7. Western Blotlama

Bu yöntem ile beyin dokusundan protein elde edilerek bu proteinler elektroforezde yürütülür ve moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılır. Saptanmak istenen proteine karşı geliştirilmiş bir antikor ile muamele edilerek, beyin dokusundaki bu protein görünür hale getirilir.

Sıçanların daha önce alınan ve -80°C'de bekletilen beyin dokuları, her grup için ayrı ayrı hazırlanarak RIPA solüsyonunda homojenize edildi. Homojenatlarda spektrofotometre ile protein ölçümü yapıldı, jelle eşit miktarda protein yüklendi. %10'luk Novex Bis-Tris (Invitrogen, ABD) hazır jeli kullanıldı. Jel elektroforez cihazına yerleştirilip her kuyucuğa bir doku örneği yüklendi. Bir kuyucuğa moleküler ağırlık işaretleyicisi, bir kuyucuğa da pozitif kontrol olarak rat aquaporin 1 ve aquaporin 4 kontrol antijeni (Chemicon, ABD) yüklendi. Daha sonra iki saat süre ile 120 voltta elektroforez gerçekleştirildi. Ardından jel

ıkarılarak bir gece boyunca yarı kuru transfer gerçekleştirildi. Daha sonra PVDF membrana (Invitrogen, ABD) transfer olan proteinler %5'lik süt ile bloke edildi. Ardından AQP1 ve AQP4 antikoru (rat, poliklonal, Chemicon, ABD, 1:1000, % 5 sütte) ile bir gece inkübe edildi. Yıkamaları takiben sekonder antikor ile oda ısısında 1 saat inkübe edildi ve kemiluminesans tekniği ile Kodak Image Station 2000 MM kullanılarak görüntüleme yapıldı. İşlem sırasında Western blotlama jelindeki her kuyucuğa eşit miktarda protein yüklenip yüklenmediğini test etmek amacıyla alfa tblin proteini kullanıldı. Elde edilen görüntülerden bantların toplam intensite değerleri NIH image programi ile okundu ve değerler aynı banda sahip alfa tblin değerine orantılandı.

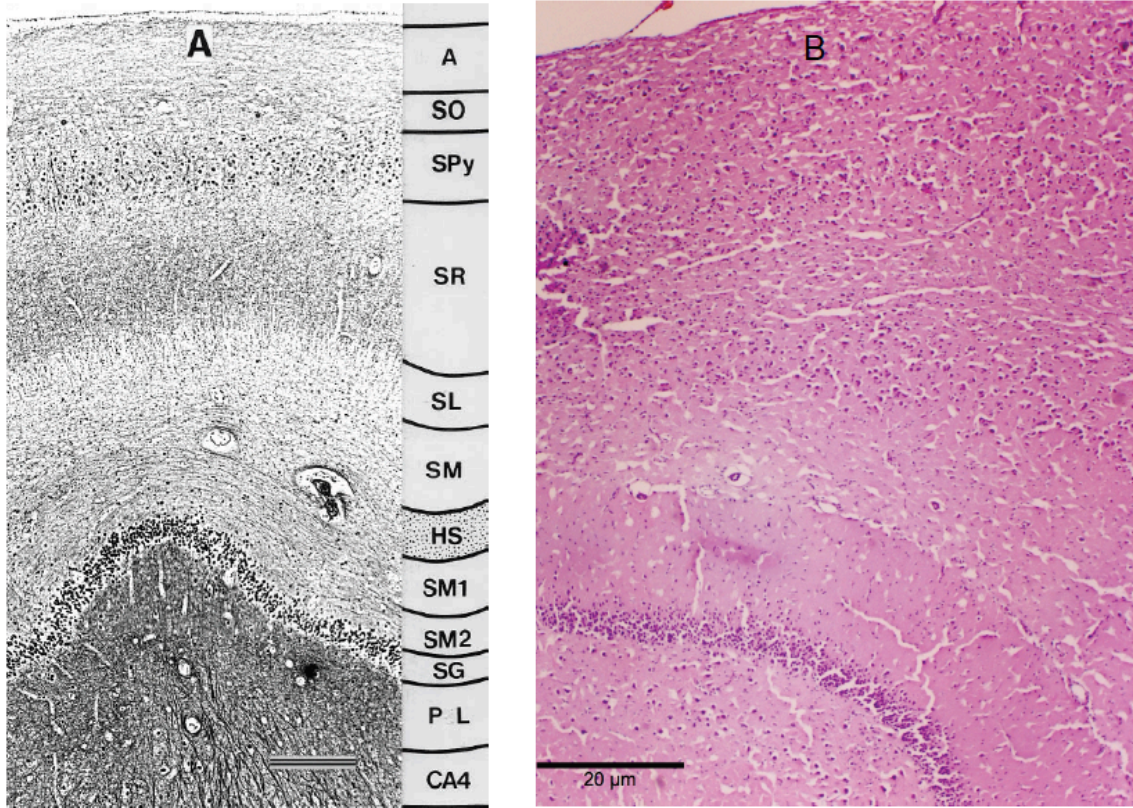
3.8. İstatistiksel Yöntemler

Sonuçlar ortalama ve standart sapma (SD) olarak verildi. Su yüzdesi ve immünohistokimyasal lmler Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı. $p < 0,05$ değerı istatistiksel olarak önemli olarak kabul edildi. İmmün boyama ve western blotlama sonuçları Wilcoxon testi ile karşılaştırıldı.

4. BULGULAR

4.1. Deney hayvanlarında iskemi/reperfüzyon sonrası ödemin gösterilmesi

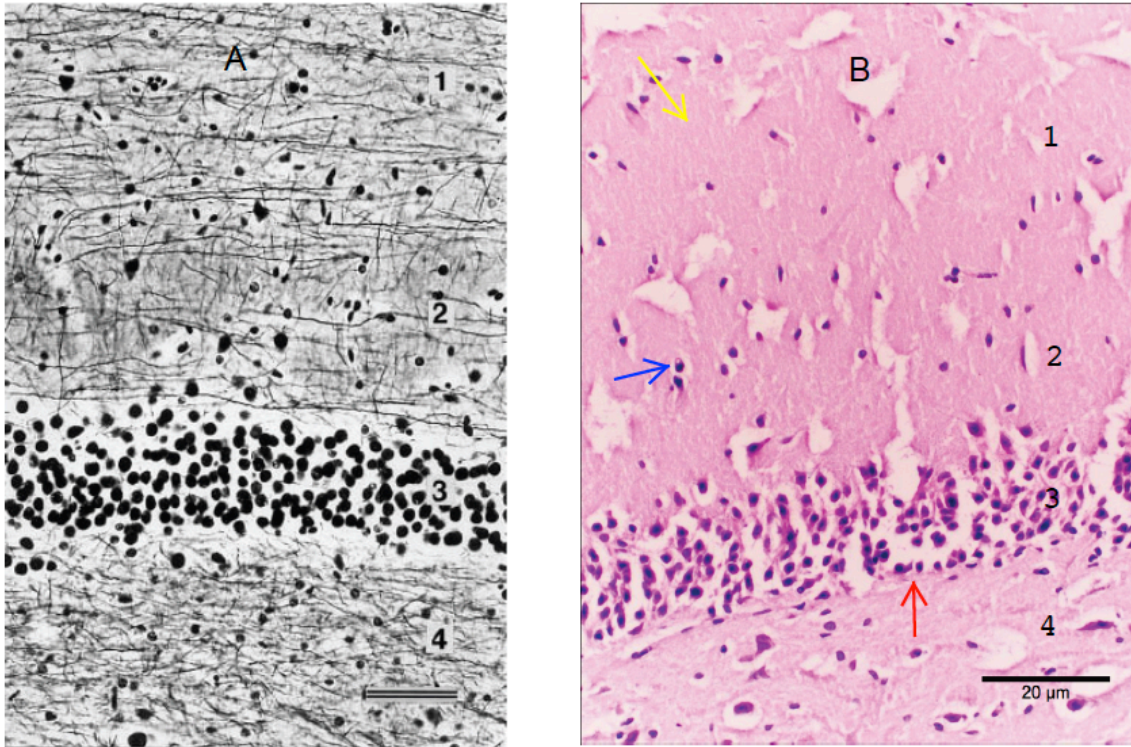
Beyinde global iskemiyeye en duyarlı bölgelerin başında hippocampal CA1 ve CA4 bölgeleri, serebellumun Purkinje hücreleri serebral neokorteks (3-4 katmanlar) ve bazal ganglia (globus pallidus) ve talamus (retiküler nükleus) gelir (175). Deney hayvanlarında iskeminin en çok etkilendiği bölge olan hipokampus kesitleri alındı ve hematoxilen eozin (HE) ile boyandı. Bu görüntüler normal olan histopatolojik görüntülerle karşılaştırıldığında iskemi/reperfüzyon sonrası, iskeminin gerçekleştiği ve ödemin oluştuğu görüldü (Şekil 4.1.1).



Şekil 4.1.1. A: Hipokampusun normal görünüşü gümüş boyama olup Duvernoy'dan alınmıştır (42). **B:** İskemi/reperfüzyondan 24 saat sonrası, ödem ve nekrozun olduğu hipokampusun HE boyama görüntüsü.

A: Alveus, SO: Stratum oriens, SPy: Stratum pyramidale, SR: Stratum radiatum, SL: Stratum lakunozum, SM: Stratum molekölare, HS: Hippokampal sulkus, SM1: Stratum molekölare dış 2/3'ü, SM2: Stratum molekölare iç 1/3'ü, SG: Stratum granülozum, PL: polimorfik tabaka, CA4: Kornu amnios'un alanı.

Büyütülmüş bir kesitte hipokampusun stratum granulozum tabakasındaki çekirdeklerin bütünleşmiş dizisinin açıldığı, stratum molokülere tabakasına doğru yer değiştirdiği ve stratum moloküler tabakasında nöronlarda şişme, hücre çekirdeklerinde kromatolizis görüldü (Şekil 4.1.2).



Şekil 4.1.2. Girus dentatus'un görüntüsü. A: Gümüş boyama, Duvernoy'dan alınmıştır (42). B: İskemi/reperfüzyon 24 saat sonrası HE boyama görüntüsüdür. Hücreler arası aralıkta genişleme (sarı ok), vazojenik ödemde, çekirdeklerde vakuolleşme (mavi ok), sitotoksik ödemde, stratum granulozum tabakasının bütünlüğünün bozulması (kırmızı ok), iskemide görülmektedir.

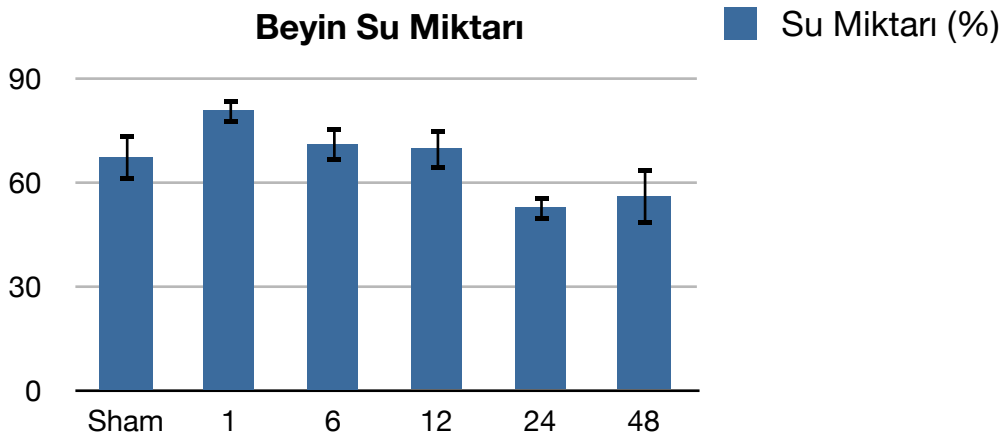
1. Stratum molekülare, dış tabaka, 2. Stratum molekülare, iç tabaka, 3. Stratum granulozum, 4. Polimorfik tabaka

4.2. Yaş/Kuru Ağırlık Bulguları

Deney hayvanlarının beyinde yapılan yaş/kuru ağırlık ölçümlerinde su yüzdesi oranı, kontrol grubuna göre reperfüzyonun ilk 1, 6 ve 12 saatlerinde artış görüldü, daha sonra 24 ve 48 saatlik reperfüzyon süresinde azalma görüldü (Tablo 4.2, Şekil 4.2).

Tablo 4.2. Grupların yaş/kuru ağırlıktan elde edilen su yüzdeleri

Gruplar	Ortalama (%)	SD
Sham	67.346	±6.655
1. saat	81.02	±3.83
6. saat	71.209	±5.163
12. saat	69.879	±6.013
24. saat	52.863	±3.75
48. saat	55.997	±8.188



Şekil 4.2. Yaş/Kuru ağırlıktan elde edilen su yüzdesinin grafik olarak gösterilmesi. Gruplardan 24. saatten sonra su yüzdesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$). Reperfüzyon süresi artıkc beyin su miktarında azalma görüldü.

4.3. İmmünohistokimyasal AQP-ifadesi Boyama Sonuçları

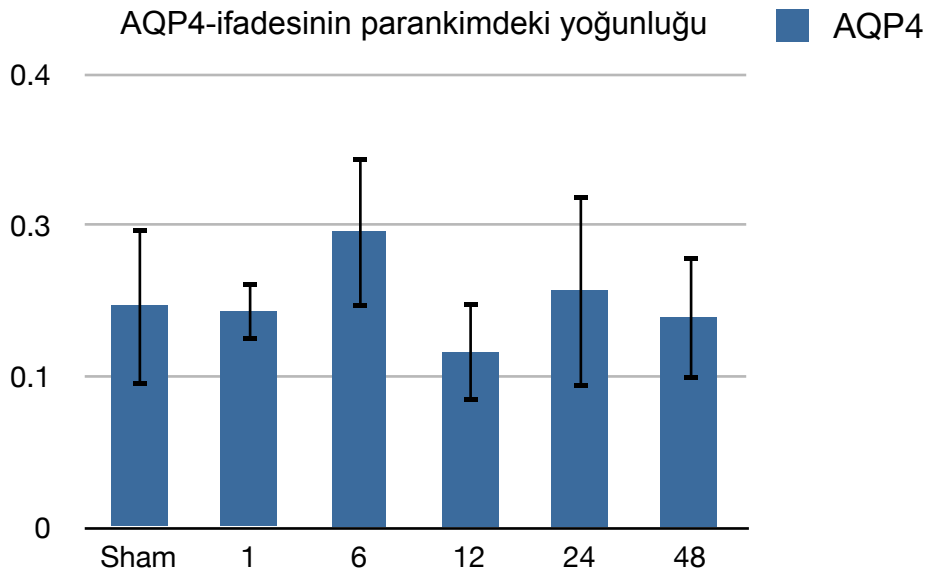
4.3.1. Parankimdeki AQP4-ifadesi ve Hücre Yoğunluk Ölçümleri

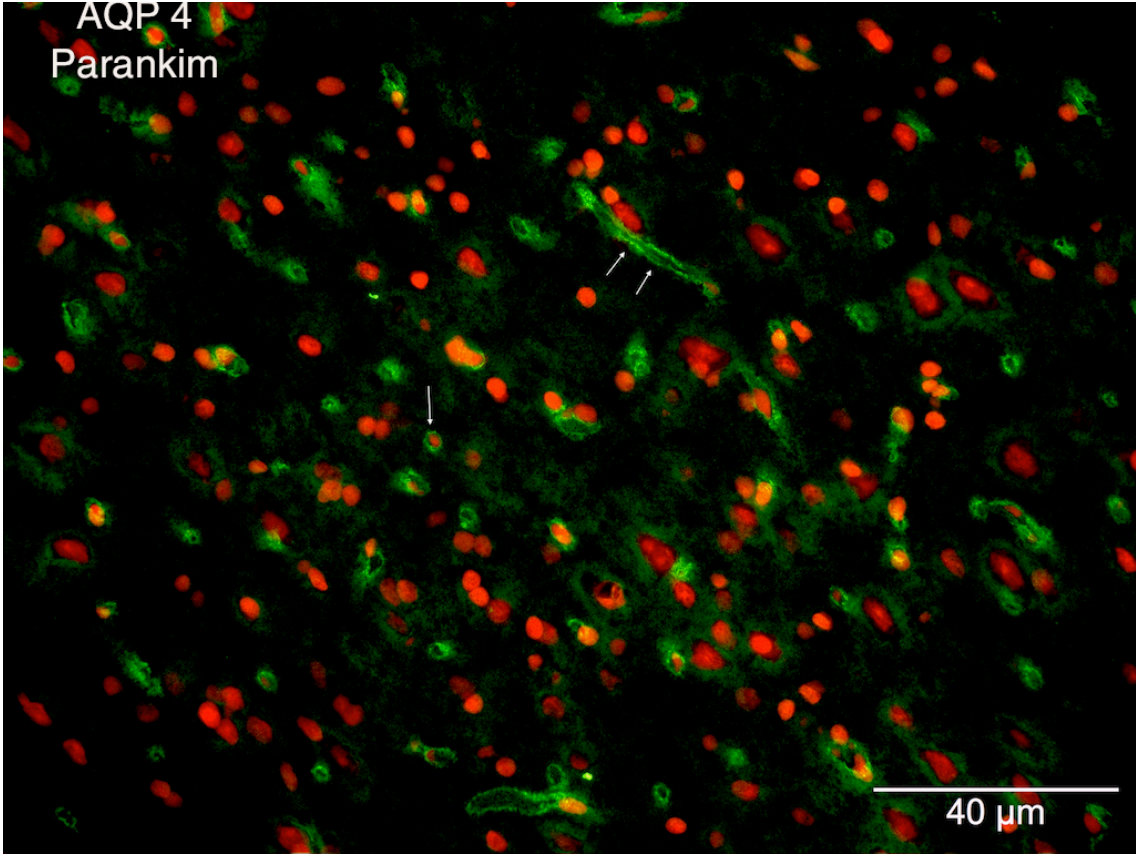
AQP4-ifadesinin parankimdeki yoğunlukların ölçülmesinde iskemi/reperfüzyonun 6 saatinde artış görülürken, 12 saatte azalma, 24 ve 48 saatlerinde başlangıç düzeyine dönmektedir. Bu değerlerde, gruplar arası istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı (Tablo 4.3.1.1, Şekil 4.3.1.1). Boyanma daha çok kapillerler çevresinde görülmektedir (Şekil 4.3.1.2).

Hücre çekirdeği yoğunlukları bakıldığında ise yine gruplar arası anlamlı bir fark bulunmadı. Ancak ödemin regüler bir şekilde geliştiği görüldü (Tablo 4.3.1.2., Şekil 4.3.1.3).

Tablo 4.3.1.1. Parankimde AQP4-ifadesi ölçümleri

Gruplar	Ortalama	SD
Sham	0.1960178750	± 0.07054843792
1. saat	0.1906394000	± 0.02593234532
6. saat	0.2615193800	± 0.06705470547
12. saat	0.1550583600	± 0.04385312138
24. saat	0.2093828400	± 0.08559291695
48. saat	0.1856443867	± 0.05475834785

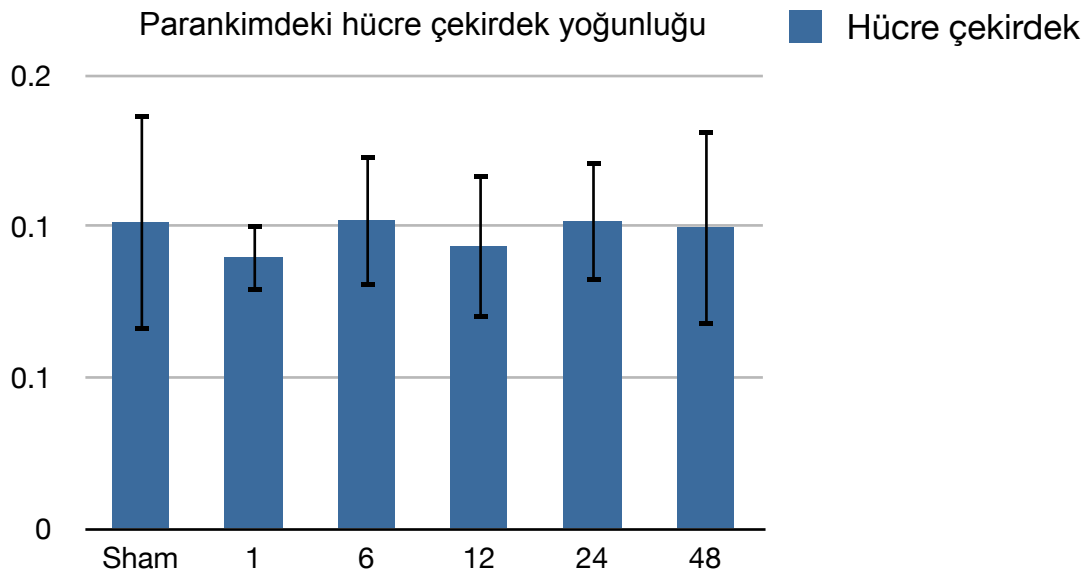
**Şekil 4.3.1.1.** AQP4'in parankimdeki ölçümlerinde 6 saatte yükselme ve 12 saatte bir azalma görüldü. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.



Şekil 4.3.1.2. AQP4-ifadesinin parankim içinde immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. Parankimde ventriküle göre daha yoğun boyanan AQP4 damar etrafında (tek ok) uzunlamasına bir kapiller boyunca yer aldığı (oklar) görülmektedir.

Tablo 4.3.1.2. Parankimdeki hücre çekirdek yoğunluğu

Gruplar	Ortalama	SD
Sham	0.1351433925	± 0.04773032786
1. saat	0.1197896250	± 0.0152211868
6. saat	0.1362539800	± 0.02930144324
12. saat	0.1246221440	± 0.0320930518
24. saat	0.135733200	± 0.02669307736
48. saat	0.1329891850	± 0.04323450879

**Şekil 4.3.1.3.** Parankimdeki hücre çekirdek yoğunluğunun grafik ile gösterilmesi. İstatistiksel olarak gruplar arası anlamlı fark yoktur.

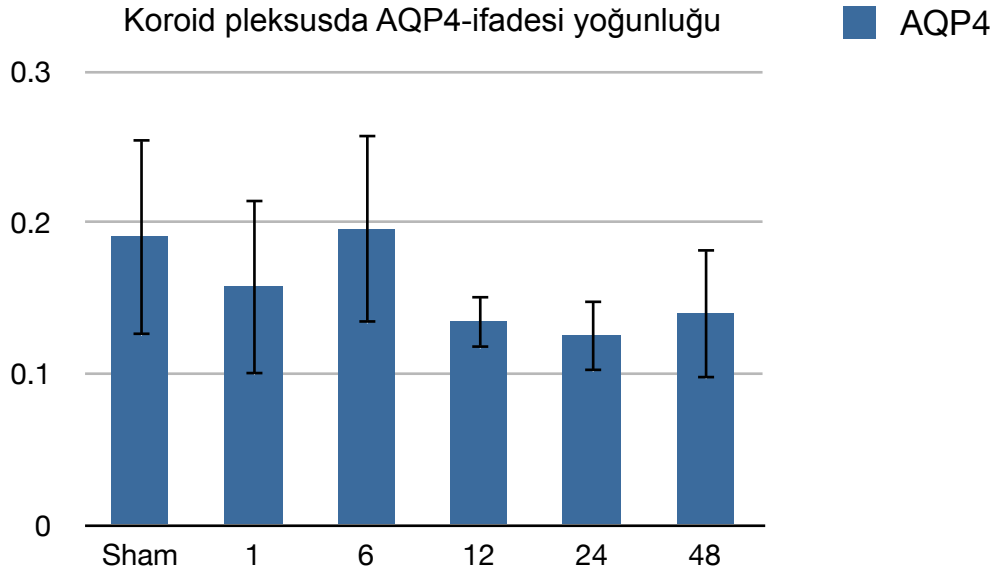
4.3.2. Koroid pleksusdaki AQP4 ve Hücre Yoğunluk Ölçümleri

AQP4 koroid pleksusda daha az boyanmasına karşın komşuluğundaki yapılarda yoğun boyanma görüldü (Şekil 4.3.2.2). Ventrikül içinde ölçümlerde gruplar arası bir fark bulunmadı (Tablo 4.3.2.1, Şekil 4.3.2.1).

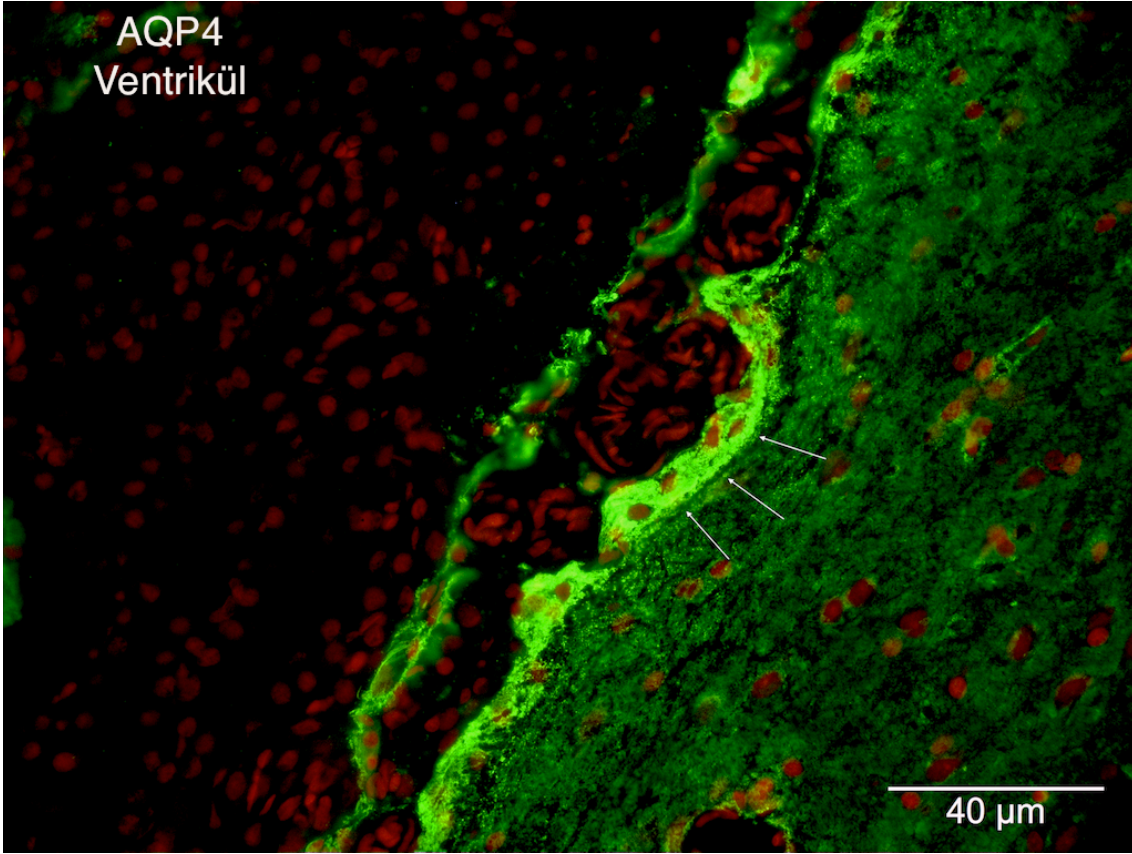
Ventrikül içindeki koroid pleksus hücre çekirdeği ölçümlerinde gruplar arası belirgin farkın olmadığı görüldü (Tablo 4.3.2.2 ve Şekil 4.3.2.3.).

Tablo 4.3.2.1. Koroid pleksusda AQP4-ifadesinin ölçümleri

Gruplar	Ortalama	SD
Sham	0.1911330500	±0.0660082993
1. saat	0.1581354250	±0.05900227758
6. saat	0.1960391000	±0.06276269702
12. saat	0.1346636600	±0.0180164665
24. saat	0.1257807900	±0.02451528806
48. saat	0.1401571217	±0.04369043356



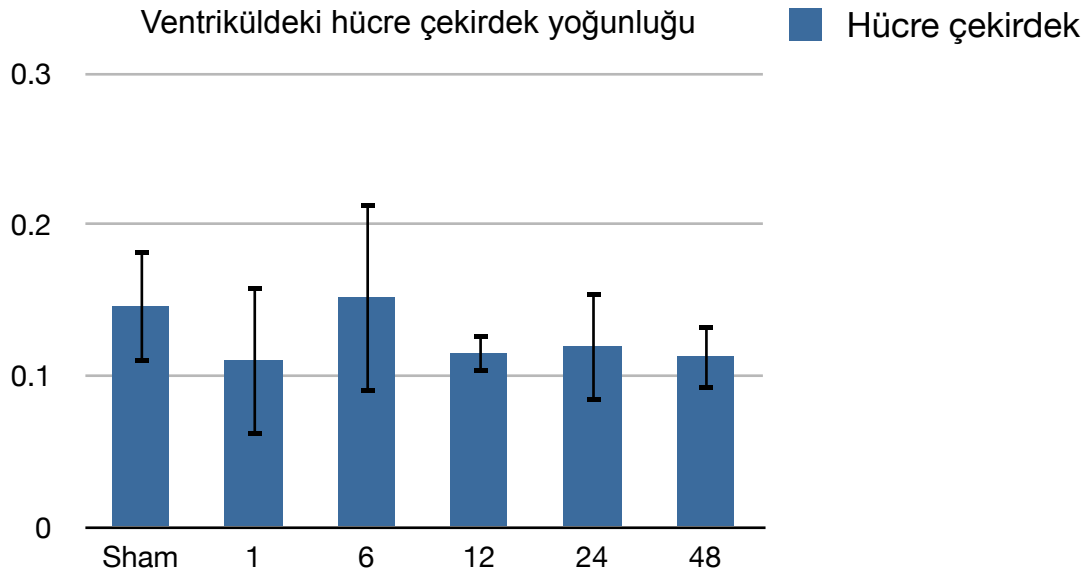
Şekil 4.3.2.1. AQP4'in koroid pleksusdaki ölçümlerinin grafik olarak gösterilmesi. Ventrikülün subependimal bölgesinde yer alan değerleri iskemi/reperfüzyonda giderek azalmaktadır, ancak istatistiksel anlamlılık yoktur.



Şekil 4.3.2.2. AQP4-ifadesinin ventrikül içindeki koroid pleksustaki yoğunluğunun immün-histokimyasal olarak gösterilmesi. Ventrikül içinde daha az ifade olurken ventrikülü döşeyen epandima komşuluğunda daha yoğun olarak ifade olmaktadır (oklar).

Tablo 4.3.2.2. Ventriküldeki içindeki hücre yoğunluğunun ölçülmesi

Gruplar	Ortalama	SD
Sham	0.146128500	± 0.03750050026
1. saat	0.1102906650	± 0.04978639911
6. saat	0.1522149840	± 0.06336135425
12. saat	0.1151277200	± 0.01276383558
24. saat	0.1194799080	± 0.03682283777
48. saat	0.11278550033	± 0.02180523209

**Şekil 4.3.2.3.** Ventrikül içinde yer alan hücrelerin zaman içindeki dağılımı. Gruplar arası anlamlı bir fark yoktur.

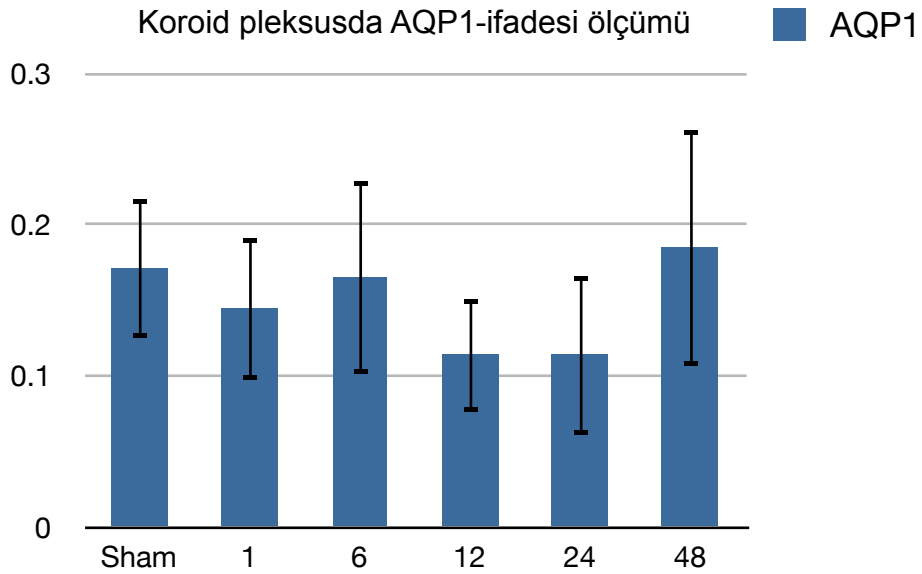
4.3.3. Koroid pleksusda AQP1-ifadesi ve Hücre Yoğunluğu Ölçümleri

AQP1-ifadesinin ventrikül içinde koroid pleksusda yoğun olduğu, zaman içindeki dağılımında ise iskemi/reperfüzyonun 1 ve 6 saatlerinde hafif azalmakla birlikte esas olarak 12 ve 24 saatlerde belirgin azalma gösterdi ve bu azalmanın istatistiksel olarak da 1, 6 ve 24 saatlere göre anlamlı ($p<0.05$) bulundu (Tablo 4.3.3.1 ve Şekil 4.3.3.1 ve Şekil 4.3.3.2).

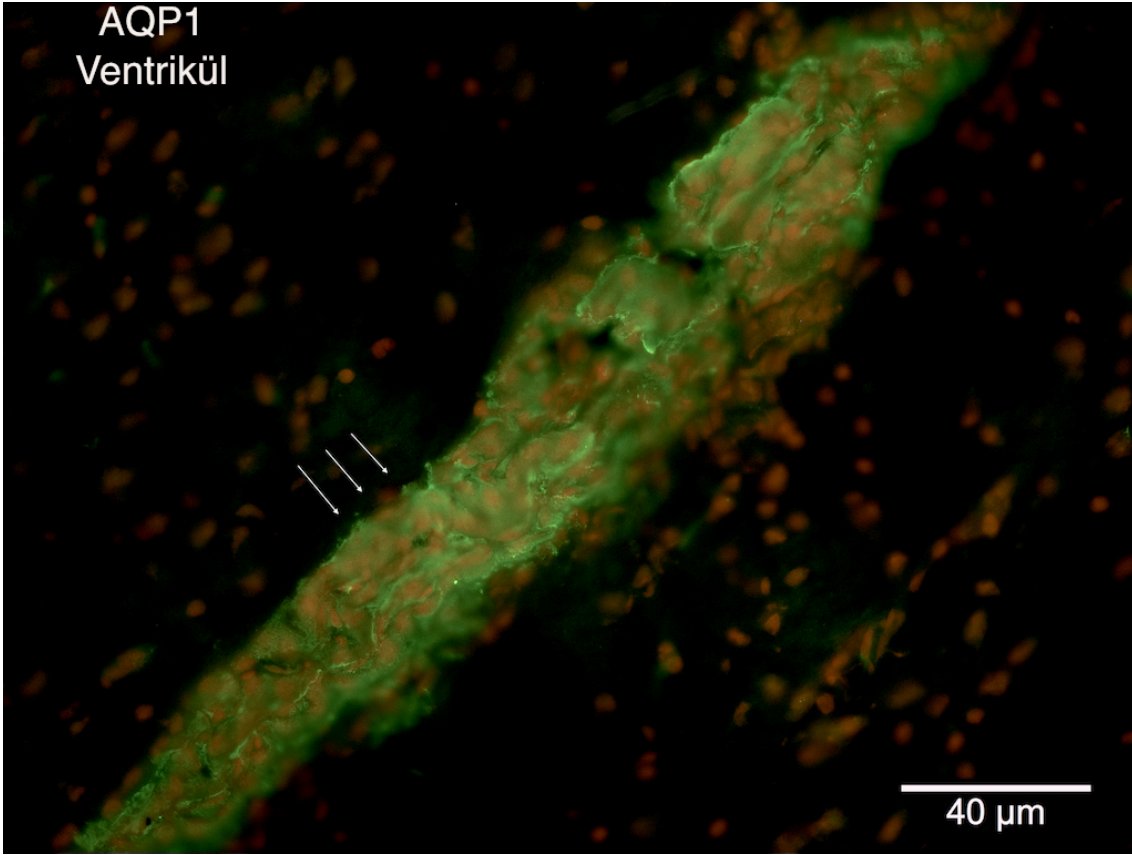
AQP1 ifadesi ile ilişkili hücre yoğunluğundaki azalma paralellik gösterdi. Elde edilen sonuçlarda gruplar arasında anlamlı bir istatistiksel fark bulunmadı (Tablo 4.3.3.2, Şekil. 4.3.3.3).

Tablo 4.3.3.1. Koroid pleksusda AQP1-ifadesinin yoğunluk ölçümleri

Gruplar	Ortalama	SD
Sham	0.1714585000	±0.0463967288
1. saat	0.1447301250	±0.04741918389
6. saat	0.1655549560	±0.06376668111
12. saat	0.1144753820	±0.03791508362
24. saat	0.1140329660	±0.05257119848
48. saat	0.1848630000	±0.07799356754



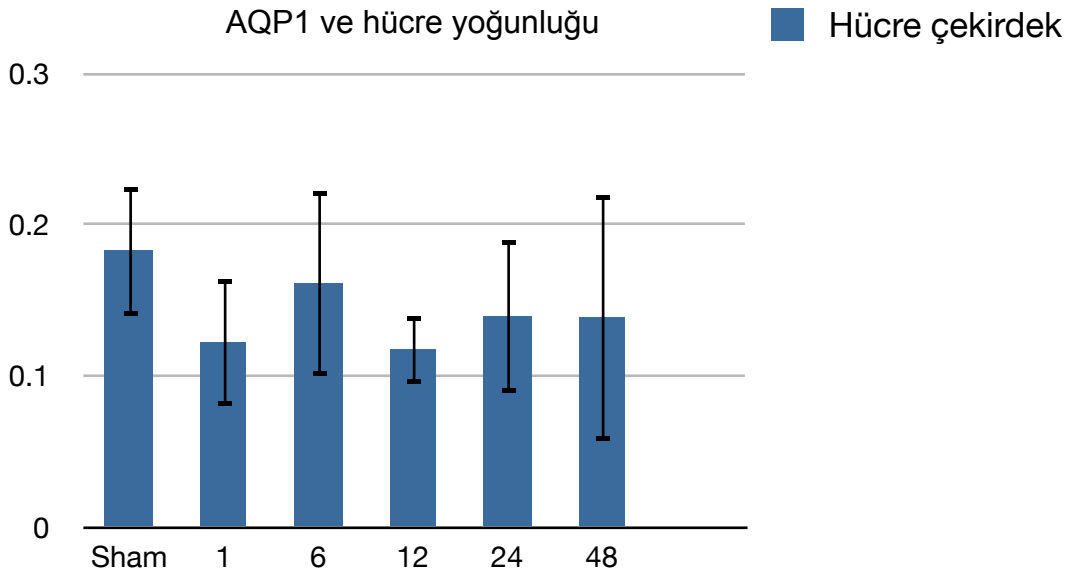
Şekil 4.3.3.1. AQP1-ifadesinin ventrikül düzeyinde ölçümlerinin grafikte gösterilmesi. İskemi/reperfüzyonun 12 ve 24 saatlerinde belirgin azalma gösterdi ve değer istatistiksel olarak ($p < 0.05$) anlamlı bulundu.



Şekil 4.3.3.2. AQP1-ifadesinin koroid pleksusdaki immünohistokimyasal boyamaları görülmektedir. AQP1 koroid pleksusda daha yoğun boyanmaktadır (beyaz oklar).

Tablo 4.3.3.2. AQP1-ifadesinin birlikte bulunduğu ventriküldeki hücre yoğunluk ölçümleri

Gruplar	Ortalama	SD
Sham	0.1831357250	±0.04312914701
1. saat	0.1223711075	±0.04175775144
6. saat	0.1613853860	±0.061074911155
12. saat	0.1179780420	±0.02287425575
24. saat	0.1394178860	±0.05066074398
48. saat	0.1386988350	±0.08173350727



Şekil 4.3.3.3. Ventrikül içinde yer alan hücrelerin çekirdeklerinin yoğunluk dağılımının iskemi/reperfüzyon sonrası zaman içindeki değişkenliğini göstermektedir.

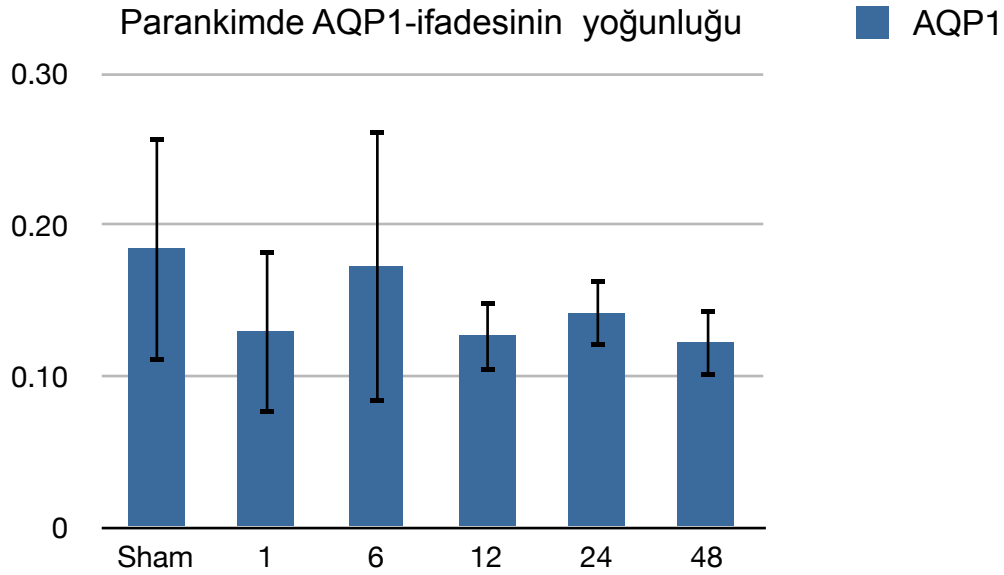
4.3.4. Parankimdeki AQP1 ve Hücre Yoğunluk Ölçümleri

AQP1 daha çok koroid pleksusda yer almasına karşın parankimde de gösterilmiştir. İmmünohistokimyasal boyamalar parankimde daha soluk görülmüştür (Şekil 4.3.4.2). Gruplar arası anlamlı istatistiksel bir fark görülmedi (Tablo 4.3.4.1, Şekil 4.3.4.1).

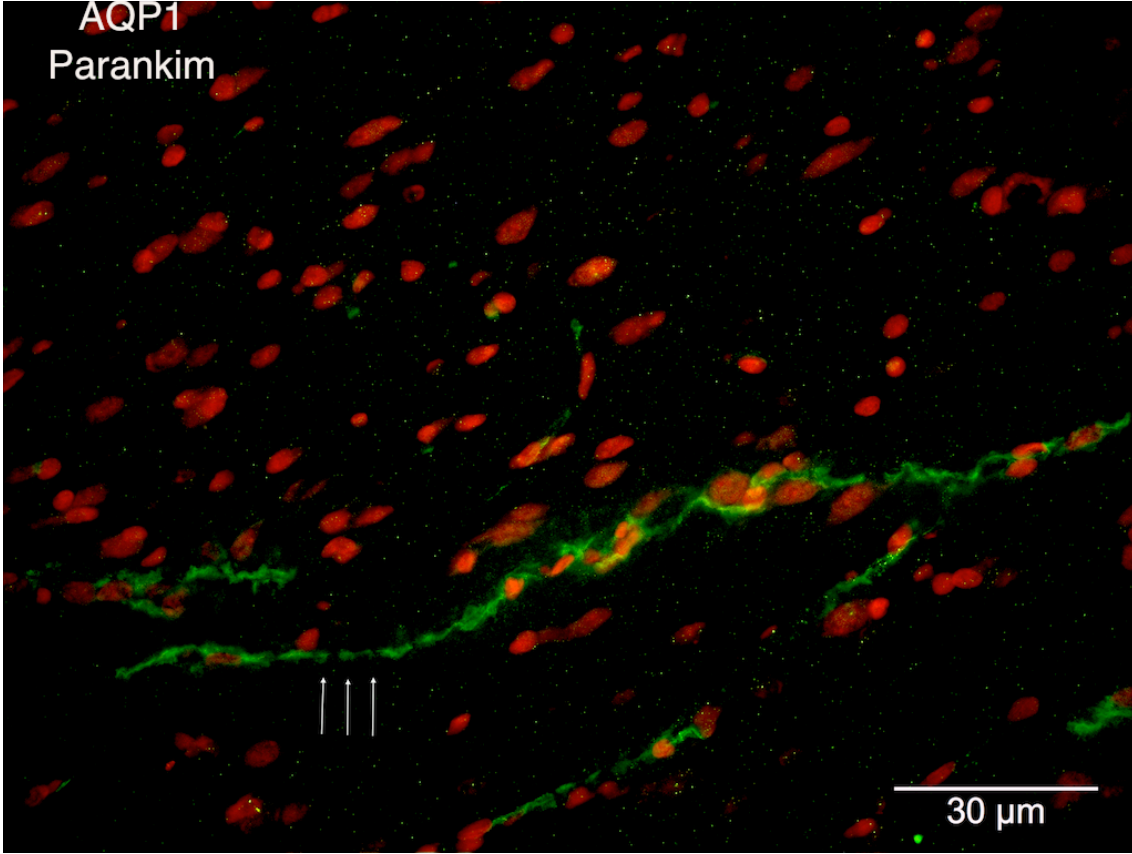
Parankimde AQP1-ifadesi ile birlikte hücre yoğunluk verilerinde iskemi/reprfüzyonun 6 saatinde anlamlı bir artış ($p<0.05$) görüldü (Tablo 4.3.4.2, Şekil 4.3.4.3).

Tablo 4.3.4.1. Parankimdeki AQP1-ifadesinin ölçümleri

Gruplar	Ortalama	SD
Sham	0.1843834250	±0.07473334728
1. saat	0.1297524000	±0.05455391421
6. saat	0.1728420560	±0.09039270685
12. saat	0.1267431260	±0.0233782766
24. saat	0.1417923400	±0.0220708403
48. saat	0.1225440917	±0.02254040261



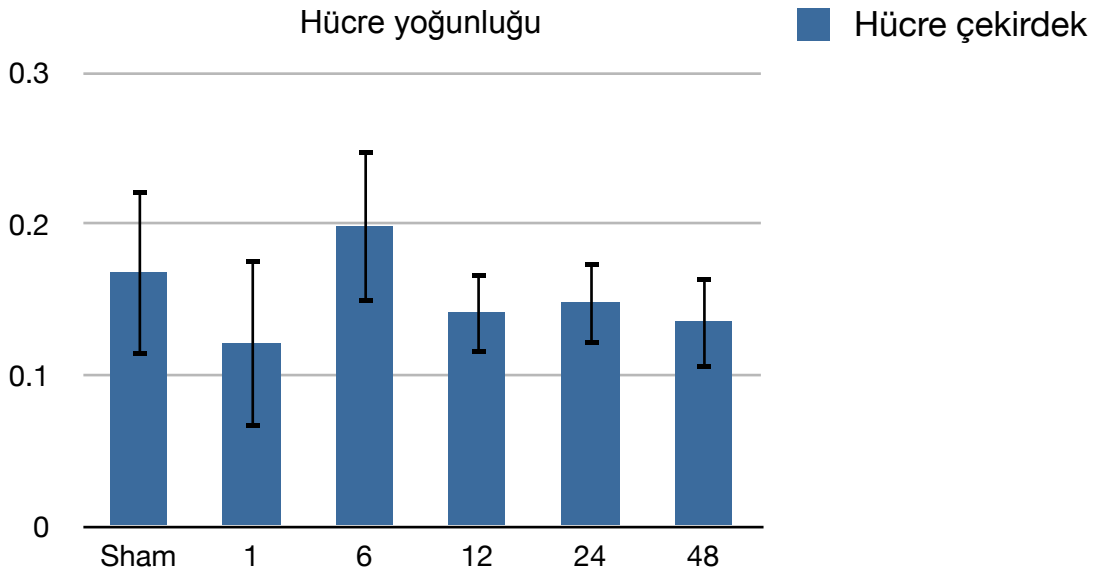
Şekil 4.3.4.1. AQP1'in parankimdeki ölçümlerinin grafik olarak gösterilmesi. Parankim değerlerinde bifazik bir değişim görülmektedir. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.



Şekil.4.3.4.2. Parankimde AQP1-ifadesinin immünohistokimyasal boyama ile gösterilmesi. Boyanmanın daha çok parankimde vasküler bir yapı etrafında yoğun olduğu görülmektedir (beyaz oklar).

Tablo 4.3.4.2. AQP1 ile birlikte bulunan parankimdeki hücre yoğunluğu

Gruplar	Ortalama	SD
Sham	0.167850075	±0.055048378
1. saat	0.121042565	±0.055987825
6. saat	0.1986400480	±0.050897189
12. saat	0.141390696	±0.027288888
24. saat	0.14790300	±0.027923388
48. saat	0.135220800	±0.030797045



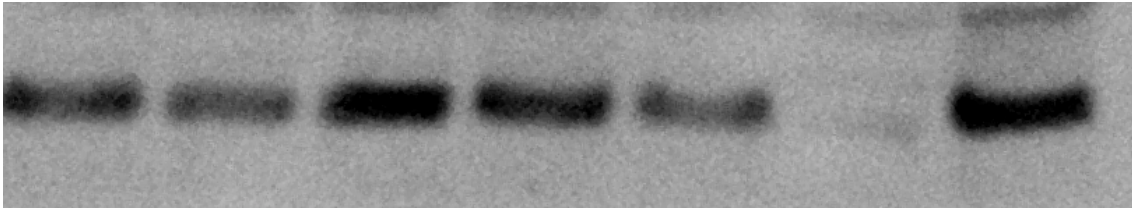
Şekil 4.3.4.3. Parankimdeki hücre yoğunluğu ölçümlerinin grafik olarak gösterilmesi. Parankimde yer alan hücre yoğunluğu iskemi/reperfüzyonun 6 saatinde anlamlı bir artış göstermektedir ($p < 0.05$).

4.4. Western Blotlama Sonuçları

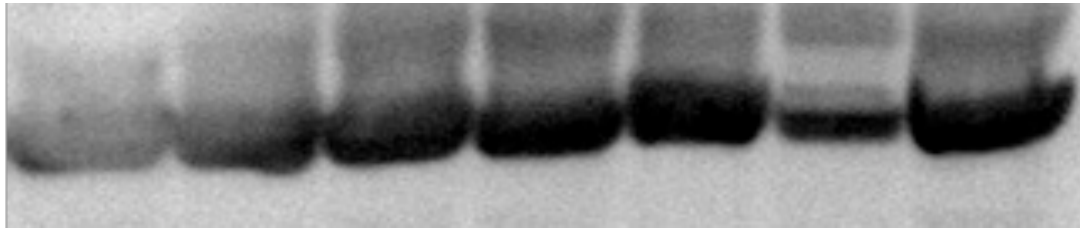
AQP1 ve AQP4 proteinlerine karşı yapılan western blotlama ile gruplar arasında total intensite açısından değerlere bakıldı (Şekil 4.4.1). Veriler ön veri aşamasında olup daha sonra daha detaylı olarak incelenmesi gerekmektedir. Western blotlama tekniği ile gruplar arasında protein analiz ölçümlerde tekniğin uygulamasında zorluklarla karşılaşıldı. Alfa tübülün ile proteinlerin eşit yüklendiği gözlemlendi.

AQP1 Proteini

GRUP Sham 1 6 12 24 48 KONTROL

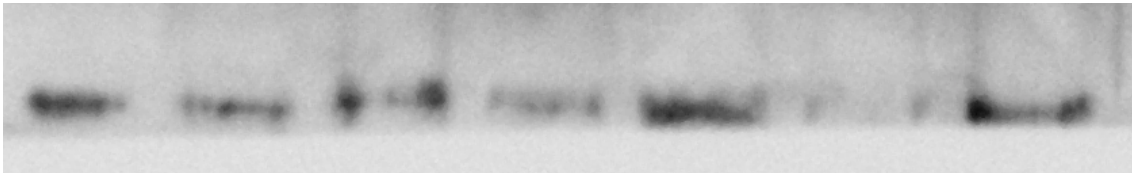


Alfa-tubulin



AQP4 Proteini

GRUP Sham 1 6 12 24 48 KONTROL

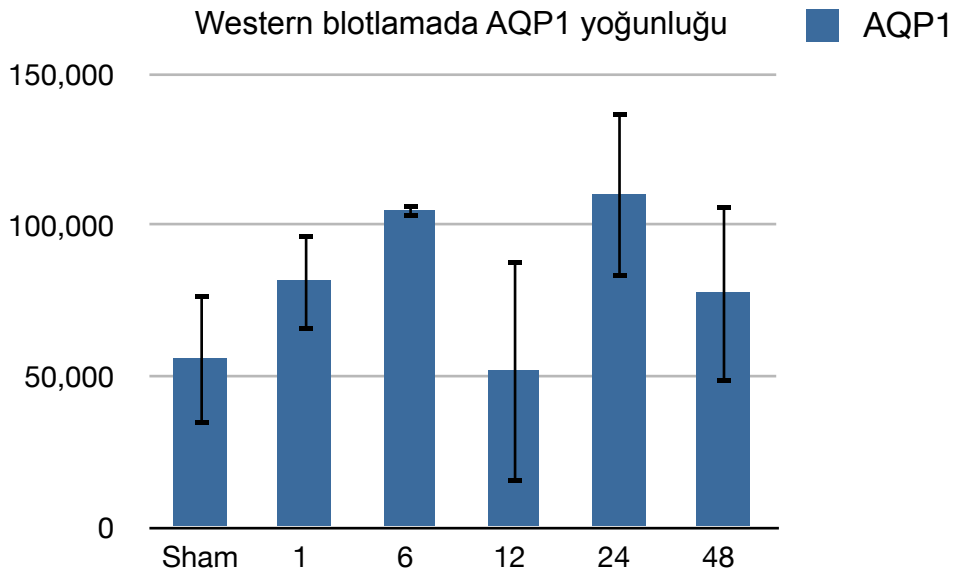


Şekil 4.4.1. Western blotlama. AQP1 (üstte) ve AQP4 (altta) ile yapılan western blotlama ile değişiklik saptanmadı. Alfa-tübülün ile kutucuklara eşit protein yüklendiği gözlemlendi.

Elde edilen görüntülerden bantların toplam yoğunluk değerleri *NIH image* programi ile okundu. AQP1 ile yapılan western blotlama değerlerinde grup ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi (Tablo 4.4.1. ve Şekil 4.4.2.)

Tablo 4.4.1. Western blotlamada AQP1 ifadesi yoğunluk ölçümleri

Gruplar	AQP1	SD
Sham	55,776.49	±21,861.620354
1 saat	81,510.49	±16,315.074762
6 saat	104,907.49	±2,518.007248
12 saat	51,853.99	±36,910.973978
24 saat	110,163.99	±27,584.54556
48 saat	77,584.55	±29,524.377403

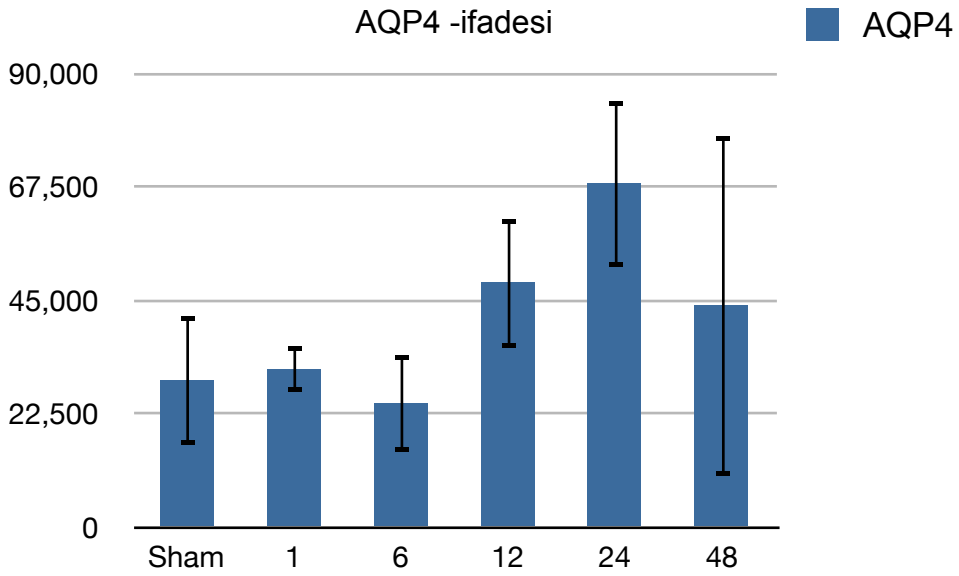


Şekil 4.4.2. Western blotlamada jel üzerinde yürtülen protein değerlerinde anlamlı sonuç çıkmadı.

AQP4 ile yapılan western blotlama değerlerinde grup ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi (Tablo 4.4.2. ve Şekil 4.4.3.)

Tablo 4.4.2. Western blotlamada AQP4 ifadesi yoğunluk ölçümleri

Gruplar	AQP4	SD
Sham	29,153	12,822
1 saat	31,384	4,521
6 saat	24,659	9,615
12 saat	48,558	12,932
24 saat	68,154	16,547
48 saat	43,962	33,681



Şekil 4.4.3. AQP4'ün western blotlamada protein yoğunluklarının grafikte gösterilmesi. İstatistiksel olarak anlamlı çıkmadı.

6. TARTIŞMA

Türlerin Kökeni 1859 yılında Charles Darwin tarafından yazılmasından yaklaşık 100 yıl sonra Homer Smith 1953 yılında insanda dahil olmak üzere tüm memelilerde böbreğin konsantrasyon yeteneğinin olmasının, evrime ve türlerin oluşumuna önemli katkıda bulunduğunu ileri sürmüştür.

Beyin su metabolizması diğer sistem metabolizmalarına benzemekle birlikte KBE, kan-BOS engeli ve BOS üreten koroid pleksusun olması nedeniyle farklılık göstermektedir. Beyin kapalı ve sert bir kafatası içinde bulunması, çok iyi korunmasının yanında kafa içi basınç artması durumunda ise morbidite ve mortalite üzerine olumsuz etkide bulunmaktadır.

Beyin ödemi, beyin parankiminde net su artışı demektir. Klatzo'nun tanımlamasından bu yana kabul edilen sitotoksik ve vazojenik ödem tipinin işlergesi henüz anlaşılmamış ve etkili bir tedavisi de bulunamamıştır.

AQP'lerin bulunması ile birlikte yeni araştırmalar ışığında beyin su metabolizması anlaşılır hale gelmektedir. Beyin ödeminde AQP'lerin etkinliği son dönemde ilgi çeken bir konu olmuştur.

Daha önceki çalışmalarında klinik ve deneysel global serebral iskemi modeli kullanarak iskemik beyin ödemi çalışmaları yapılmıştır (3-5, 45). Bu çalışmaların birinde beyin su metabolizmasının renin anjiyotensin sistemi ve ANP ile ilişkili olduğu düşüncesinden yola çıkılarak AQP'lerinde bulunması ile bu çalışma planlandı.

Serebral iskemi modeli, deneysel ödem oluşturmada sık kullanılan yöntemlerden biridir. Fokal iskemi modellerinin yanısıra global serebral iskemi reperfüzyon modeli de tercih edilmektedir. İlk tanımlamayı yapan Pulsinelli (161), bu modelin geçerlilik ve güvenilirliğini yapmıştır. Daha sonra birçok araştırmacı bu modeli tercih etmiştir (90, 197).

Bu çalışmada global serebral iskemi modelinin tercih edilmesindeki amaç sıçanlarda oluşturulan dört damar oklüzyonu ile koroid pleksusların iskemisinin tam olarak sağlanması amaçlanmıştır. Koroid pleksuslar baziller dolaşım ve her iki karotid arterden beslenmektedirler (227).

Global serebral iskemi/reprfüzyon ile oluşturulan iskemik ödem sıçanlardan alınan hipokampus görüntüleri ile gösterilmiştir. Ancak hipokampus AQP1 ve AQP4-ifadeleri yoğun olmadığı için immünohistokimyasal çalışmalar için kesitler daha çok ventrikül ve ventrikül komşuluğundaki parankimlerden alınmıştır (17). İskemiye duyarlı hipokampal CA1 ve CA4 bölgeleri, serebellumun Purkinje hücreleri serebral neokorteks (3-4 katmanlar) ve bazal ganglia (globus pallidus) ve talamus (retiküler nükleus) gelir (13, 175). Bu çalışmada hipokampus görüntülerinde iskemi/reperfüzyon sonrası, iskeminin gerçekleştiği, nekroz ve ödemin olduğu görüldü (Şekil 4.1.1 ve 4.1.2).

Yaş/kuru ağırlık ölçümleri, beyin ödemi kantitatif olarak göstermekte kullanılan başlıca yöntemlerden biridir (81). MRG'deki gelişmelerle birlikte beyin ödeminde ki su hareketleri diffüzyon-MR ile *apparent diffusion coefficient* (ADC) haritalaması yapılmakta ve ödem tipleri hakkında radyolojik bilgiler vermektedir (202, 211, 212). Bu çalışmada deneysel modeller için geliştirilmiş MR olanağı bulunamadı.

Yaş/kuru ağırlık ölçümünde elde edilen sonuçlarda reprfüzyonun 1 saatinde beyin su miktarında kontrol grubuna göre artış görülmektedir (Tablo 4.2. ve Şekil 4.2). Bu artışın iskemi sonrasında gelişen hiperperfüzyon sonucu olduğu düşünüldü. İskemi sonrası erken dönem hiperperfüzyon, serebral otopregülasyon bozulmasının bir sonucudur (183). Heiss ve diğ.'nin (67) yaptığı kedilerdeki fokal iskemi çalışmasında reperfüzyonun 30 ve 60 dakikalarında hiperperfüzyonun varlığı gösterilmiştir. Bu hiperperfüzyon bazan oklüzyon öncesi değerlerin %125-300 katına kadar ulaştığı gösterilmiştir (67, 183). Global iskemide ise hiperperfüzyonun benzer etkileri gösterilmiştir (221, 222).

Hiperperfüzyon vasküler yatakta yaralanmaya ve beyin parankiminde şişmeye, serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (49, 187).

Bu çalışmadaki yaş/kuru ağırlık ölçümü Sandoval'ın (181) bifazik ödem oluşumu ile benzer görüntü oluşturmaktadır (Şekil 4.2 ve 2.3.1). İlk saatte görülen ödem, hiperperfüzyonun ortaya çıkması ile sıvı artışına neden olmuştur. İskemi/reperfüzyonun 6 saate kadar olan dönemde, sitotoksik ödem gerçekleşmiştir. Serebral otoregülasyonun sağlanması ile birlikte, iskemi sonrası ortaya çıkan ikincil faktörler KBE'inde geçirgenliği artırmış ve vazojenik ödem ortaya çıkmıştır. 24 saatteki azalma, serebral kan akımının geçirgenliğinin bifazik olması ile açıklandı. Bu çalışmaya benzer sonuçlar, Ito'nun (81), yaptığı geçici iskemi çalışmasında, 21 saatten sonra su içeriğinde azalma görülmüş ve bu azalmanın KBE'nin yeniden yapılanması ile açıklanmıştır.

Çalışmanın ana amacı AQP1 ve AQP4'ün ifadelerinin beyin de diğer AQP tiplerine göre fazla olması nedeniyle iskemik ödem gelişim süresince beyinde buldukları dokuların özelliklerine göre zaman içindeki dağılımını gözlemek ve ödem oluş işlergellerlerine katkıda bulunmaktır.

Serebral su metabolizmasındaki ana etken KBE'dir. Kan plazmasından gelen ve onkotik basınç ile kontrol edilen beyin su metabolizmasının kontrolü serebral otoregülasyon, KBE'ni geçirgenliğini etkileyen iskeminin ortaya çıkardığı etkenler iskemik ödemin önemli bileşenleridir.

İskemik ödemin erken fazında ortaya çıkan sitotoksik ödem de ise temel etken kan akımının azalması ile gerekli oksijen ve enerjiden yoksun kalan hücre duvarındaki Na^+/K^+ -ATPaz ın etkinliğinin azalması sonucudur. AQP'lerin etkinliği burda ortaya çıkmaktadır. KBE engeline yer alan AQP4 iskemik ödemin sitotoksik fazında etkin olduğu görüldü.

AQP4 ve Sitotoksik Ödem

AQP4'ün parankimdeki ifadesinde reperfüzyonun 1 saatinde normale göre azalma gösterdiği 6 saatinde artış 12 saatinde azalma ve sonra 24 ve 48 saatlerde normale döndüğü görüldü. İstatistiksel olarak bu azalma ve artışların anlamlı olmadığı görüldü (Şekil 4.3.1.1). Ödem süresince ödematöz parankimde hücre yoğunluğunda zaman içinde değişim göstermekle birlikte istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmadı (Şekil 4.3.1.3).

İskemik ödemin ilk 6 saatinde KBE intaktır. Kapillerlerden beyin parankimine sıvı sızması olmaz. Sitotoksik ödemde hücre içine giren sıvı hücreler arası sıvıdan gelir. Dolayısıyla hücreler arası aralık daralırken hücrelerde şişme görülür (71, 87, 214). Çalışmanın sonuçları bu süreci doğrular niteliktedir.

Parankimde KBE'ni oluşturan astrosit son ayaklarda yoğun olarak bulunan AQP4'ün reperfüzyonun 1-6 saatleri arasında yükselme göstermesi astrositlerin son ayaklarında şişme ile açıklanabilir. Yapılan çalışmalarda iskeminin ilk döneminde oluşan sitotoksik ödemde, hücre membranındaki enerji yetmezliği sonucu hücreler arası sıvının hücre içine girmesi ile astrosit son ayaklarda şişme olduğu gözlenmiştir (107, 114).

AQP4-yoksun fareler ile AQP4-ifadesi olan farelerde yapılan karşılaştırmalı çalışmaya göre, AQP4 yoksun farelerde mortalitenin daha az olması, nörolojik durumlarının daha iyi olması, iskeminin erken döneminde AQP4'ün beyin aleyhine ödem gelişimine katkısı olduğunu düşündürmektedir (119). AQP4'ün iskemi/reperfüzyonun ilk saatlerinde gelişen sitotoksik ödeme etkisi, net sıvı artışına katkıda bulunduğu anlamına gelmektedir. Bu etkinin, beyin için zararlı bir etki olduğu düşünülmüştür (178, 232, 237).

AQP4 ifadesinin yoğun şekilde bulunduğu astrosit son ayakları, sitotoksik ödemde, ödem sıvısını alarak şişmeye uğrayan ve KBE'ni oluşturan ana

yapılardır (87, 168). Sitotoksik ödem ilerledikçe gri ve beyaz maddedeki bütün hücreleri etkileyerek klinik vermeye başlar

İmmünohistokimyasal boyamalarda, AQP4-ifadesi daha çok parankimde ve ventrikül komşuluğunda subependimal astrositlerde yoğun olmuştur. AQP4 iskemi reperfüzyonu ilk saatinden geçerli olmak üzere ifade olmuş ve ödeme katkıda bulunmuştur. Sitotoksik ödemin başlayıp ve yoğun olduğu iskemi/reperfüzyonun 1. ve 6 saatlerinde arasında bir farkın olmaması AQP4 ifadesinin bu saatlerde devam ettiği şeklinde yorumlanmıştır. İskemi/reperfüzyonun erken döneminde ortaya çıkan sitotoksik ödem nedeniyle hücreler arası sıvı, hücre içine girerek, hücresel şişmeye, hücreler arası sıvı miktarında azalmaya neden olmaktadır. KBE de intakt olduğu için kapiller geçirgenlik artmamıştır. Bu nedenle hücreler arası aralık daraldığı için birim alana düşen hücre yoğunluğunda artış olmasını anlamlı kılmaktadır. 12 saatten KBE'nin geçirgenliğinin artması ile birlikte hücreler arası sıvı miktarında artış ve vazojenik ödem gelişmektedir.

AQP4 ve Vazojenik Ödem

Yapılan bu çalışmada da iskemi/reperfüzyonun AQP4 ifadesinin 6. saatinde artış gösterdiği ki sitotoksik ödemin vazojenik ödemle devam etme süresidir, 12. saatinde azalma, 24. ve 48. saatlerinde ise etkinliğinin tekrar normal sınırlara geldiği gözlenmiştir (Şekil 4.3.1.1). KBE yeniden restore olmuş vazojenik ödem çözülmeye başlamıştır. Hücreler arası ödem sıvısı restore olan KBE'ndeki AQP4'ler yardımıyla kapillerlere boşalarak emilimine olmaktadır. Bu sonuç yaş/kuru ağırlık sonuçları ile bir paralellik göstermektedir. Elde edilen sonuca göre AQP4'ün vazojenik ödemde etkinliği devam etmektedir.

Vazojenik ödem KBE'nin bütünlüğünün bozulması ile kapiller içindeki sıvını hücreler arası aralığa geçmesi sonucu beyinde sıvı artışı olmasıdır. Temel ayırım KBE'nin bütünlüğünün bozulmasıdır. Vazojenik ödem gelişmesi AQP4' den bağımsızdır.

AQP4'ün katkısıyla şişmiş olan astrositik son ayaklar KBE'ndeki NVB'in bütünlüğünü bozmaktadır. Son ayakların şişmesi nedeniyle KBE'nin etrafından ayrıldığı düşünülmektedir (149). İskemi/reprfüzyonun 6. saatinde başlayan vazojenik ödem, sitotoksik ödem nedeniyle şişmeye uğramış astrositik son ayakların KBE'nden ayrılmasıyla ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.4.2).

AQP4'ün vazojenik ödem üzerine etkileri beyin ödeminde araştırılmıştır. AQP4 yoksun farelerle, AQP4 ifadesi olan farelere, beyin tümör eklenmiş ve vazojenik ödem oluşturulmuş ve her iki grup arasında yapılan karşılaştırmada, AQP4 yoksun farelerde su eliminasyonu daha yavaş olduğu görülmüştür (146). Hücreler arasına birikmiş vazojenik ödem sıvısı astrositler yardımıyla kapillere katılmaktadır. Vazojenik ödemin oluşumu AQP4'den bağımsız ancak eliminasyonu AQP4 bağımlıdır. Eliminasyonun glia limitans, ependima ve yeniden restore olma KBE yardımıyla olduğu düşünülmektedir (207). Bu durumda AQP4 vazojenik ödemde sitotoksik ödemdekinin aksine beyin lehine yararlı bir etkide bulunmaktadır.

AQP4 ve Ödem Tedavisi

AQP4'ün beyin ödeminde hücre membranında iki yönlü ve iki aşamalı katkısı olduğu düşünülmektedir. Santral sinir sisteminde AQP4, hücrel su alımını artırmakta (sitotoksik ödemde) hücreler arası suyunda temizlenmesine (vazojenik ödemde) katkıda bulunmaktadır (118).

Bu çalışmanın katkısı daha önceki ayrı ayrı yapılan sitotoksik ve vazojenik ödem modellerinin bir arada görüldüğü global serebral iskemi modeliyle ilk defa gösterilmesidir.

AQP4 ifadesinin ortadan kaldırılması ya da inhibe edilmesindeki amaç, sitotoksik ödemdeki zararlı etkisini ortadan kaldırmaya yönelik olmalıdır. Bu inhibisyonu gerçekleştirecek etken maddenin etkinliği, 6. saatten önce

başlamalıdır. Etkinliği 6. saatten sonra ortaya çıkarsa vazojenik ödem oluşumunu artıracaktır. AQP4'ün ifadesi artırılacaksa 6. saatten sonra yapılmalıdır. Ancak sorulması gereken soru, sitotoksik ödem tamamen bitmiş midir? Bu ayrımı net olarak ortaya koymak, bilimin çözmesi gereken bir sorun gibi gözükmektedir.

Bunun yanısıra su taşınmasında sadece AQP4 sorumlu değildir. AQP4 yoksun farelerde iskemi sonrasında AQP9, AQP5, AQP3 ve AQP8'in ifade olduğunun görülmesi, alternatif su kanallarının da varlığını göstermiştir (230). Geçici serebral iskemi deneyinde AQP9'un iskemi kenarında ifade gösterdiği saptanmıştır (16). AQP9'un özellikle laktat ve su geçirgenliği ile ilgili olduğunu düşündürmüştü, pH'nın 5.52'nin altında olduğunda geçirgenliğin 4 kat artığı gözlenmiştir (209).

Sonuç olarak sitotoksik ödemdeki sıvı girişi AQP4-bağımlıdır. Vazojenik ödem de ise AQP4 -bağımsızdır. Hem sitotoksik hem de vazojenik ödemde ödemin çözülmesi AQP4 -bağımlıdır.

AQP4 ve Koroid Pleksus

AQP4'in hidrosefalik ödemde etkinliği de araştırılmıştır. AQP4 yoksun farelerde kaolin enjekte edilerek oluşturulan kommünike hidrosefalide karşılaştırma yapıldığında, ventrikül hacimlerinin AQP ifadesi olan farelere göre daha geniş bulunmuş ve AQP4 yokluğunun subependimal astrositlerden su taşınmasının olmadığı şeklinde yorumlanmıştır (24).

AQP4-ifadesi ventrikül içinde koroid pleksusda da görüldü ve ödem oluş sürecinde parankimdeki davranış biçimini gösterdi (Şekil 4.3.2.1). Hücre yoğunluğu açısından da parankim ifadeleri ile paralellik gösterdi (Şekil 4.3.2.3).

AQP4'ün koroid pleksusdaki aktivitesi AQP1'e göre az olduğu için tartışılmayacaktır.

AQP1 ve Beyin Ödemi

Bu çalışmanın sonuçlarında immünohistokimyasal boyamalarda ventriküldeki koroid pleksus epitelinde AQP1 ifadesi yoğun olarak gözlemlendi (Şekil 4.3.3.2). İmmünohistokimyasal boyamalarda elde edilen sonuçlara göre AQP1'lerde 12. ve 24. saatlerde azalma görülmüş ve istatistiksel olarak da anlamlıdır ($p < 0.05$) (Şekil 4.3.3.3). Bu azalmanın hem koroid pleksus epitelinde iskemiden 6 saat sonra nekroz gelişmesi, hem de AQP1'in intrakranial basınç arttığında, Monro-Kelli doktrinine göre, artmış kafa içi basınçından korumaya yönelik olarak, BOS yapımını azaltması olarak değerlendirildi. Parankimde çok olmamakla birlikte ifadesi gözlemlendi (Şekil 4.3.3.3).

Kafa içi basınç artması durumunda Monro-Kelli doktrinine göre kafa içi yapılar kendi içinde dengesini bir biri aleyhine değiştirmektedir. Ödem nedeniyle artmış kafa içi basıncı, BOS yapımını azalttığı yıllardır bilinmektedir. Bu azalma ventriküldeki koroid pleksusdaki üretimin azalması şeklindedir. Bu çalışmada dört-damar oklüzyon modelinin seçilmesindeki amaç koroid pleksusda tam iskemi sağlamaya yöneliktir. AQP1'le ilgili çalışmalarda eğer iskemi modelleri kullanılacaksa global iskemi modeli tercih edilmelidir. Koroid pleksusun memelilerde dört damardan kan desteğini alması nedeniyle, fokal iskemilerde koroid pleksus da yeterli iskemi sağlanamayabilir. Ayrıca koroid pleksusun global iskemiyeye verdiği yanıt iskeminin ilk 6. saatinde nekrozun başladığı, ilk 24 saatte ise en yüksek noktaya çıkması, sonrasında da yenilenmenin başlaması şeklindedir (161, 227).

AQP1 koroid pleksus epitelinin apikal membranında yer alarak beyin omurilik sıvısının üretimini artırdığı düşünülmektedir. Ayrıca kapiller endotelial hücrelerde ifadesi gösterilmiştir (141). AQP1 BOS yapımını kan-BOS engelinden suyun geçişini inhibe ederek sağlamaktadır. AQP1-yoksun farelerle

yapılan çalışmalarda BOS üretiminin % 20-30 oranında azaldığı gösterilmiştir (145).

Western blotlama çalışmasında alınan örneklerde parankim-ventrikül ayrımı yapılamamıştır. Sadece AQP1 ve AQP4 tüm beyinde çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar ön çalışma olup değerlendirme yapılacak düzeyde sonuçlar elde edilemedi.

Beyin ödemi sınıflamasının değiştirme zamanı gelmiştir. Sadece hücrel (sitotoksik) ya da hücreler arası sıvı birikimine dayanan (vazojenik) ödem tipleri tedavide farklılık yaratmamaktadır. Gelecekte ödem tedavisi AQP'ler üzerinden olacaksa sınıflamayı da buna göre yapmak gerekir. Bu nedenle yeni bir ödem sınıflamasını AQP-bağımlı ve AQP-bağımsız ödem olarak yapmak daha iyi olacaktır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Sitotoksik ödemde, sağlam olan KBE'ndeki astrositik son ayaklardaki AQP4, astrositik şişmeye neden olarak iskeminin ilk 6 saatinde ödemi artırmaktadır.
2. KBE'deki astrositik son ayaklardaki şişme, KBE'nin bütünlüğünü bozarak vazojenik ödeme neden olmakta, hücreler arası sıvı miktarını artırmaktadır.
3. KBE'nin yeniden yapılanması ile AQP4 vazojenik ödemin hücreler arası sıvısını kapillerlere aktarak ödemin çözülmesine katkıda bulunmaktadır.
4. AQP4 beyinde iskemik ödem sürecinde her iki ödem tipinde görev almaktadır. Sitotoksik ödemi ödemi artırıcı vazojenik ödemde, ödemi azaltıcı etkisi vardır.
5. Beyin ödemi sınıflamasına katkı olması için yeni ödem sınıflaması: AQP-bağımlı (sitotoksik ödem), AQP-bağımsız (vazojenik ödem) olarak önerilir.
6. AQP4'ün iskemik ödem sürecinde zaman içinde kesintisiz olarak etkindir. Bu nedenle AQP4'in dokularda zaman içindeki dağılımında farklılık saptanmamıştır.
7. Tedavi amaçlı AQP4 inhibisyonu veya aktivasyonu sağlanacaksa iskemik ödem de kullanılması zamanlama açısından sorun doğuracaktır.
8. AQP4 ifadesi artırılarak pür vazojenik ödemin tedavisinde etkin olabilir (tümör, abse vb).
9. AQP1, koroid pleksus epitelinde bulunması nedeniyle BOS yapımını azaltarak KİB'ı azaltmaya yönelik katkısı olmaktadır.
10. Koroid pleksusda iskemisinde AQP1 çalışılacaksa, global iskemi modeli tercih edilmelidir.
11. AQP ile yapılacak çalışmalarda AQP-yoksun deney hayvanları ile karşılaştırma yapılması, sonuçların daha belirgin olmasını sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Agre, P., King, L.S., Yasui, M., Guggino, W.B., Ottersen, O.P., Fujiyoshi, Y., Engel, A., Nielsen, S. (2002). Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol*, 542(Pt 1), 3-16.
2. Aitken, P.G., Borgdorff, A.J., Juta, A.J., Kiehart, D.P., Somjen, G.G., Wadman, W.J. (1998). Volume changes induced by osmotic stress in freshly isolated rat hippocampal neurons. *Pflugers Arch*, 436(6), 991-8.
3. Akdemir, G., Ergungor, F. (2005). [Global cerebral ischemic findings in a woman who attempted to commit suicide by hanging]. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, 11(3), 250-3.
4. Akdemir, G., Ergungor, M.F., Sezer, M., Albayrak, L., Daglioglu, E., Kilinc, K. (2005). Therapeutic efficacy of intraventricular cyclosporine A and methylprednisolone on a global cerebral ischemia model in rats. *Neurol Res*, 27(8), 827-34.
5. Akdemir, G., Luer, M.S., Dujovny, M., Misra, M. (1997). Intraventricular atrial natriuretic peptide for acute intracranial hypertension. *Neurol Res*, 19(5), 515-20.
6. Alliot, F., Rutin, J., Leenen, P.J., Pessac, B. (1999). Brain parenchyma vessels and the angiotensin system. *Brain Res*, 830(1), 101-12.
7. Alliot, F., Rutin, J., Leenen, P.J., Pessac, B. (1999). Pericytes and periendothelial cells of brain parenchyma vessels co-express aminopeptidase N, aminopeptidase A, and nestin. *J Neurosci Res*, 58(3), 367-78.
8. Amiry-Moghaddam, M., Frydenlund, D.S., Ottersen, O.P. (2004). Anchoring of aquaporin-4 in brain: molecular mechanisms and implications for the physiology and pathophysiology of water transport. *Neuroscience*, 129(4), 999-1010.
9. Amiry-Moghaddam, M., Otsuka, T., Hurn, P.D., Traystman, R.J., Haug, F.M., Froehner, S.C., Adams, M.E., Neely, J.D., Agre, P., Ottersen, O.P., Bhardwaj, A. (2003). An alpha-syntrophin-dependent pool of AQP4 in

- astroglial end-feet confers bidirectional water flow between blood and brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(4), 2106-11.
10. Amiry-Moghaddam, M., Ottersen, O.P. (2003). The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci*, 4(12), 991-1001.
 11. Amiry-Moghaddam, M., Williamson, A., Palomba, M., Eid, T., de Lanerolle, N.C., Nagelhus, E.A., Adams, M.E., Froehner, S.C., Agre, P., Ottersen, O.P. (2003). Delayed K⁺ clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(23), 13615-20.
 12. Aoki, K., Uchihara, T., Tsuchiya, K., Nakamura, A., Ikeda, K., Wakayama, Y. (2003). Enhanced expression of aquaporin 4 in human brain with infarction. *Acta Neuropathol*, 106(2), 121-4.
 13. Araki, T., Kato, H., Kogure, K., Saito, T. (1991). Postischemic alteration of muscarinic acetylcholine, adenosine A1 and calcium antagonist binding sites in selectively vulnerable areas: an autoradiographic study of gerbil brain. *J Neurol Sci*, 106(2), 206-12.
 14. Arima, H., Yamamoto, N., Sobue, K., Umenishi, F., Tada, T., Katsuya, H., Asai, K. (2003). Hyperosmolar mannitol simulates expression of aquaporins 4 and 9 through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in rat astrocytes. *J Biol Chem*, 278(45), 44525-34.
 15. Ayata, C., Ropper, A.H. (2002). Ischaemic brain oedema. *J Clin Neurosci*, 9(2), 113-24.
 16. Badaut, J., Hirt, L., Granziera, C., Bogousslavsky, J., Magistretti, P.J., Regli, L. (2001). Astrocyte-specific expression of aquaporin-9 in mouse brain is increased after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21(5), 477-82.
 17. Badaut, J., Lasbennes, F., Magistretti, P.J., Regli, L. (2002). Aquaporins in brain: distribution, physiology, and pathophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22(4), 367-78.
 18. Badaut, J., Petit, J.M., Brunet, J.F., Magistretti, P.J., Charriaud-Marlangue, C., Regli, L. (2004). Distribution of Aquaporin 9 in the adult

- rat brain: preferential expression in catecholaminergic neurons and in glial cells. *Neuroscience*, 128(1), 27-38.
19. Ballanyi, K., *Modulation of glial potassium, sodium, and chloride activities by the extracellular milieu*, in *Neuroglia*, H. Kettenmann, Ransom, B., Editor. 1995, Oxford University Press: New York. p. 289-298.
 20. Bandopadhyay, R., Orte, C., Lawrenson, J.G., Reid, A.R., De Silva, S., Allt, G. (2001). Contractile proteins in pericytes at the blood-brain and blood-retinal barriers. *J Neurocytol*, 30(1), 35-44.
 21. Barr, C.S., Rhodes, P., Struthers, A.D. (1996). C-type natriuretic peptide. *Peptides*, 17(7), 1243-51.
 22. Betz, A.L. (1996). Alterations in cerebral endothelial cell function in ischemia. *Adv Neurol*, 71 301-11; discussion 311-3.
 23. Betz, A.L., Ennis, S.R., Schielke, G.P. (1989). Blood-brain barrier sodium transport limits development of brain edema during partial ischemia in gerbils. *Stroke*, 20(9), 1253-9.
 24. Bloch, O., Auguste, K.I., Manley, G.T., Verkman, A.S. (2006). Accelerated progression of kaolin-induced hydrocephalus in aquaporin-4-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26(12), 1527-37.
 25. Bondy, C., Chin, E., Smith, B.L., Preston, G.M., Agre, P. (1993). Developmental gene expression and tissue distribution of the CHIP28 water-channel protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(10), 4500-4.
 26. Brinton, R.D., Gonzalez, T.M., Cheung, W.S. (1994). Vasopressin-induced calcium signaling in cultured hippocampal neurons. *Brain Res*, 661(1-2), 274-82.
 27. Brown, P.D., Davies, S.L., Speake, T., Millar, I.D. (2004). Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production. *Neuroscience*, 129(4), 957-70.
 28. Castle, N.A. (2005). Aquaporins as targets for drug discovery. *Drug Discov Today*, 10(7), 485-93.
 29. Chen, Y., da Rocha, M.J., Morris, M. (2003). Osmotic regulation of angiotensin AT1 receptor subtypes in mouse brain. *Brain Res*, 965(1-2), 35-44.

30. Clausen, T. (1992). Potassium and sodium transport and pH regulation. *Can J Physiol Pharmacol*, 70 Suppl S219-22.
31. Cowan, F., Whitelaw, A. (1991). Acute effects of acetazolamide on cerebral blood flow velocity and pCO₂ in the newborn infant. *Acta Paediatr Scand*, 80(1), 22-7.
32. Cserr, H.F. (1971). Physiology of the choroid plexus. *Physiol Rev*, 51(2), 273-311.
33. Davalos, A., Toni, D., Iweins, F., Lesaffre, E., Bastianello, S., Castillo, J. (1999). Neurological deterioration in acute ischemic stroke: potential predictors and associated factors in the European cooperative acute stroke study (ECASS) I. *Stroke*, 30(12), 2631-6.
34. Davisson, R.L. (2003). Physiological genomic analysis of the brain renin-angiotensin system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285(3), R498-511.
35. Davson, H., Segal, M.B. (1969). Effect of cerebrospinal fluid on volume of distribution of extracellular markers. *Brain*, 92(1), 131-6.
36. de Vries, G.J., Miller, M.A. (1998). Anatomy and function of extrahypothalamic vasopressin systems in the brain. *Prog Brain Res*, 119 3-20.
37. del Zoppo, G.J., Hallenbeck, J.M. (2000). Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thromb Res*, 98(3), 73-81.
38. DePasquale, M., Patlak, C.S., Cserr, H.F. (1989). Brain ion and volume regulation during acute hypernatremia in Brattleboro rats. *Am J Physiol*, 256(6 Pt 2), F1059-66.
39. Dietrich, W.D., Feng, Z.C., Leistra, H., Watson, B.D., Rosenthal, M. (1994). Photothrombotic infarction triggers multiple episodes of cortical spreading depression in distant brain regions. *J Cereb Blood Flow Metab*, 14(1), 20-8.
40. Dietzel, I., Heinemann, U., Lux, H.D. (1989). Relations between slow extracellular potential changes, glial potassium buffering, and electrolyte and cellular volume changes during neuronal hyperactivity in cat brain. *Glia*, 2(1), 25-44.

41. Dodson, R.F., Chu, L.W., Welch, K.M., Achar, V.S. (1977). Acute tissue response to cerebral ischemia in the gerbil. An ultrastructural study. *J Neurol Sci*, 33(1-2), 161-70.
42. Duvernoy, H., *The Human Hippocampus*. Third ed. 2005, Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag.
43. Dwyer, D.S., Vannucci, S.J., Simpson, I.A. (2002). Expression, regulation, and functional role of glucose transporters (GLUTs) in brain. *Int Rev Neurobiol*, 51 159-88.
44. Ennis, S.R., Ren, X.D., Betz, A.L. (1996). Mechanisms of sodium transport at the blood-brain barrier studied with in situ perfusion of rat brain. *J Neurochem*, 66(2), 756-63.
45. Ergun, R., Akdemir, G., Sen, S., Tasci, A., Ergungor, F. (2002). Neuroprotective effects of propofol following global cerebral ischemia in rats. *Neurosurg Rev*, 25(1-2), 95-8.
46. Fatouros, P.P., Marmarou, A. (1999). Use of magnetic resonance imaging for in vivo measurements of water content in human brain: method and normal values. *J Neurosurg*, 90(1), 109-15.
47. Fishman, R.A. (1975). Brain edema. *N Engl J Med*, 293(14), 706-11.
48. Fitzsimons, J.T. (1998). Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev*, 78(3), 583-686.
49. Frantseva, M.V., Carlen, P.L., Perez Velazquez, J.L. (2001). Dynamics of intracellular calcium and free radical production during ischemia in pyramidal neurons. *Free Radic Biol Med*, 31(10), 1216-27.
50. Frigeri, A., Gropper, M.A., Turck, C.W., Verkman, A.S. (1995). Immunolocalization of the mercurial-insensitive water channel and glycerol intrinsic protein in epithelial cell plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(10), 4328-31.
51. Frigeri, A., Gropper, M.A., Umenishi, F., Kawashima, M., Brown, D., Verkman, A.S. (1995). Localization of MIWC and GLIP water channel homologs in neuromuscular, epithelial and glandular tissues. *J Cell Sci*, 108 (Pt 9) 2993-3002.

52. Frigeri, A., Nicchia, G.P., Nico, B., Quondamatteo, F., Herken, R., Roncali, L., Svelto, M. (2001). Aquaporin-4 deficiency in skeletal muscle and brain of dystrophic mdx mice. *FASEB J*, 15(1), 90-98.
53. Frydenlund, D.S., Bhardwaj, A., Otsuka, T., Mylonakou, M.N., Yasumura, T., Davidson, K.G., Zeynalov, E., Skare, O., Laake, P., Haug, F.M., Rash, J.E., Agre, P., Ottersen, O.P., Amiry-Moghaddam, M. (2006). Temporary loss of perivascular aquaporin-4 in neocortex after transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(36), 13532-6.
54. Fujita, Y., Yamamoto, N., Sobue, K., Inagaki, M., Ito, H., Arima, H., Morishima, T., Takeuchi, A., Tsuda, T., Katsuya, H., Asai, K. (2003). Effect of mild hypothermia on the expression of aquaporin family in cultured rat astrocytes under hypoxic condition. *Neurosci Res*, 47(4), 437-44.
55. Fukui, S., Nawashiro, H., Otani, N., Ooigawa, H., Toyooka, T., Tsuzuki, N., Katoh, H., Ishihara, S., Miyazawa, T., Ohnuki, A., Shima, K. (2003). Focal brain edema and natriuretic peptides in patients with subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl*, 86 489-91.
56. Furman, C.S., Gorelick-Feldman, D.A., Davidson, K.G., Yasumura, T., Neely, J.D., Agre, P., Rash, J.E. (2003). Aquaporin-4 square array assembly: opposing actions of M1 and M23 isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(23), 13609-14.
57. Garcia, J.H., Liu, K.F., Ho, K.L. (1995). Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex. *Stroke*, 26(4), 636-42; discussion 643.
58. Garcia, J.H., Liu, K.F., Yoshida, Y., Chen, S., Lian, J. (1994). Brain microvessels: factors altering their patency after the occlusion of a middle cerebral artery (Wistar rat). *Am J Pathol*, 145(3), 728-40.
59. Gillardon, F., Lenz, C., Kuschinsky, W., Zimmermann, M. (1996). Evidence for apoptotic cell death in the choroid plexus following focal cerebral ischemia. *Neurosci Lett*, 207(2), 113-6.

60. Greitz, D., Hannerz, J. (1996). A proposed model of cerebrospinal fluid circulation: observations with radionuclide cisternography. *AJNR Am J Neuroradiol*, 17(3), 431-8.
61. Grieb, P., Forster, R.E., Strome, D., Goodwin, C.W., Pape, P.C. (1985). O₂ exchange between blood and brain tissues studied with ¹⁸O₂ indicator-dilution technique. *J Appl Physiol*, 58(6), 1929-41.
62. Gu, F., Hata, R., Toku, K., Yang, L., Ma, Y.J., Maeda, N., Sakanaka, M., Tanaka, J. (2003). Testosterone up-regulates aquaporin-4 expression in cultured astrocytes. *J Neurosci Res*, 72(6), 709-15.
63. Gunnarson, E., Axehult, G., Baturina, G., Zelenin, S., Zelenina, M., Aperia, A. (2005). Lead induces increased water permeability in astrocytes expressing aquaporin 4. *Neuroscience*, 136(1), 105-14.
64. Gunnarson, E., Zelenina, M., Aperia, A. (2004). Regulation of brain aquaporins. *Neuroscience*, 129(4), 947-55.
65. Hakim, A.M. (1987). The cerebral ischemic penumbra. *Can J Neurol Sci*, 14(4), 557-9.
66. Hasegawa, H., Ma, T., Skach, W., Matthay, M.A., Verkman, A.S. (1994). Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *J Biol Chem*, 269(8), 5497-500.
67. Heiss, W.D., Graf, R., Lottgen, J., Ohta, K., Fujita, T., Wagner, R., Grond, M., Weinhard, K. (1997). Repeat positron emission tomographic studies in transient middle cerebral artery occlusion in cats: residual perfusion and efficacy of postischemic reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 17(4), 388-400.
68. Heo, J.H., Han, S.W., Lee, S.K. (2005). Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radic Biol Med*, 39(1), 51-70.
69. Hertz, L., Chen, Y., Spatz, M. (2000). Involvement of non-neuronal brain cells in AVP-mediated regulation of water space at the cellular, organ, and whole-body level. *J Neurosci Res*, 62(4), 480-90.
70. Higashi, K., Fujita, A., Inanobe, A., Tanemoto, M., Doi, K., Kubo, T., Kurachi, Y. (2001). An inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, expressed

- in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain. *Am J Physiol Cell Physiol*, 281(3), C922-31.
71. Hoehn-Berlage, M., Eis, M., Back, T., Kohno, K., Yamashita, K. (1995). Changes of relaxation times (T1, T2) and apparent diffusion coefficient after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat: temporal evolution, regional extent, and comparison with histology. *Magn Reson Med*, 34(6), 824-34.
 72. Hoehn-Berlage, M., Norris, D.G., Kohno, K., Mies, G., Leibfritz, D., Hossmann, K.A. (1995). Evolution of regional changes in apparent diffusion coefficient during focal ischemia of rat brain: the relationship of quantitative diffusion NMR imaging to reduction in cerebral blood flow and metabolic disturbances. *J Cereb Blood Flow Metab*, 15(6), 1002-11.
 73. Holthoff, K., Witte, O.W. (1996). Intrinsic optical signals in rat neocortical slices measured with near-infrared dark-field microscopy reveal changes in extracellular space. *J Neurosci*, 16(8), 2740-9.
 74. Holthoff, K., Witte, O.W. (2000). Directed spatial potassium redistribution in rat neocortex. *Glia*, 29(3), 288-92.
 75. Horio, Y. (2001). Potassium channels of glial cells: distribution and function. *Jpn J Pharmacol*, 87(1), 1-6.
 76. Hosli, L., Hosli, E., Lefkovits, M., Wagner, S. (1991). Electrophysiological evidence for the existence of receptors for endothelin and vasopressin on cultured astrocytes of rat spinal cord and brainstem. *Neurosci Lett*, 131(2), 193-5.
 77. Hossmann, K.A. (1993). Ischemia-mediated neuronal injury. *Resuscitation*, 26(3), 225-35.
 78. Hsu, C.Y., An, G., Liu, J.S., Xue, J.J., He, Y.Y., Lin, T.N. (1993). Expression of immediate early gene and growth factor mRNAs in a focal cerebral ischemia model in the rat. *Stroke*, 24(12 Suppl), I78-81.
 79. Husted, R.F., Reed, D.J. (1977). Regulation of cerebrospinal fluid bicarbonate by the cat choroid plexus. *J Physiol*, 267(2), 411-28.
 80. Iadecola, C. (1998). Neurogenic control of the cerebral microcirculation: is dopamine minding the store? *Nat Neurosci*, 1(4), 263-5.

81. Ito, U., Ohno, K., Nakamura, R., Sukanuma, F., Inaba, Y. (1979). Brain edema during ischemia and after restoration of blood flow. Measurement of water, sodium, potassium content and plasma protein permeability. *Stroke*, 10(5), 542-7.
82. Ito, U., Spatz, M., Walker, J.T., Jr., Klatzo, I. (1975). Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. I. Light microscopic observations. *Acta Neuropathol*, 32(3), 209-23.
83. Johanson, C.E., Preston, J.E., Chodobski, A., Stopa, E.G., Szmydynger-Chodobska, J., McMillan, P.N. (1999). AVP V1 receptor-mediated decrease in Cl⁻ efflux and increase in dark cell number in choroid plexus epithelium. *Am J Physiol*, 276(1 Pt 1), C82-90.
84. Johnstone, B.M., Patuzzi, R., Syka, J., Sykova, E. (1989). Stimulus-related potassium changes in the organ of Corti of guinea-pig. *J Physiol*, 408 77-92.
85. Jung, J.S., Bhat, R.V., Preston, G.M., Guggino, W.B., Baraban, J.M., Agre, P. (1994). Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(26), 13052-6.
86. Ke, C., Poon, W.S., Ng, H.K., Lai, F.M., Tang, N.L., Pang, J.C. (2002). Impact of experimental acute hyponatremia on severe traumatic brain injury in rats: influences on injuries, permeability of blood-brain barrier, ultrastructural features, and aquaporin-4 expression. *Exp Neurol*, 178(2), 194-206.
87. Kimelberg, H.K. (1995). Current concepts of brain edema. Review of laboratory investigations. *J Neurosurg*, 83(6), 1051-9.
88. Kimelberg, H.K. (2004). Water homeostasis in the brain: basic concepts. *Neuroscience*, 129(4), 851-60.
89. Kirino, T., Sano, K. (1984). Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Acta Neuropathol*, 62(3), 201-8.

90. Kirino, T., Tamura, A., Sano, K. (1984). Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol*, 64(2), 139-47.
91. Klatzo, I. (1967). Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol*, 26(1), 1-14.
92. Klatzo, I. (1987). Pathophysiological aspects of brain edema. *Acta Neuropathol*, 72(3), 236-9.
93. Klatzo, I. (1994). Evolution of brain edema concepts. *Acta Neurochir Suppl (Wien)*, 60 3-6.
94. Klatzo, I., Chui, E., Fujiwara, K., Spatz, M. (1980). Resolution of vasogenic brain edema. *Adv Neurol*, 28 359-73.
95. Klatzo, I., Piraux, A., Laskowski, E.J. (1958). The relationship between edema, blood-brain-barrier and tissue elements in a local brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, 17(4), 548-64.
96. Kiesel, U., Wolburg, H. (2000). Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol*, 20(1), 57-76.
97. Kobayashi, H., Minami, S., Itoh, S., Shiraishi, S., Yokoo, H., Yanagita, T., Uezono, Y., Mohri, M., Wada, A. (2001). Aquaporin subtypes in rat cerebral microvessels. *Neurosci Lett*, 297(3), 163-6.
98. Kofuji, P., Ceelen, P., Zahs, K.R., Surbeck, L.W., Lester, H.A., Newman, E.A. (2000). Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. *J Neurosci*, 20(15), 5733-40.
99. Kuroiwa, T., Cahn, R., Juhler, M., Goping, G., Campbell, G., Klatzo, I. (1985). Role of extracellular proteins in the dynamics of vasogenic brain edema. *Acta Neuropathol*, 66(1), 3-11.
100. Kuroiwa, T., Miyasaka, N., Fengyo, Z., Yamada, I., Nakane, M., Nagaoka, T., Tamura, A., Ohno, K. (2007). Experimental ischemic brain edema: morphological and magnetic resonance imaging findings. *Neurosurg Focus*, 22(5), E11.

101. Kuroiwa, T., Ting, P., Martinez, H., Klatzo, I. (1985). The biphasic opening of the blood-brain barrier to proteins following temporary middle cerebral artery occlusion. *Acta Neuropathol*, 68(2), 122-9.
102. Landgraf, R. (1992). Central release of vasopressin: stimuli, dynamics, consequences. *Prog Brain Res*, 91 29-39.
103. Laterra, J., Keep, R., Betz, Al, Goldstein, G.W., *Blod-Brain-Cerebrospinal Fluid Barriers.*, in *Basic neurochemistry: Molecular, cellular, and medical aspects*, G.J. Siegel, Agranoff, B.W., Albers, R.W., Fisher, S.K., Uhler, M.D. , Editor. 1999, Lippincott-Raven: New York. p. 671-689.
104. Latzkovits, L., Cserr, H.F., Park, J.T., Patlak, C.S., Pettigrew, K.D., Rimanoczy, A. (1993). Effects of arginine vasopressin and atriopeptin on glial cell volume measured as 3-MG space. *Am J Physiol*, 264(3 Pt 1), C603-8.
105. Li, J., Patil, R.V., Verkman, A.S. (2002). Mildly abnormal retinal function in transgenic mice without Muller cell aquaporin-4 water channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43(2), 573-9.
106. Li, J., Verkman, A.S. (2001). Impaired hearing in mice lacking aquaporin-4 water channels. *J Biol Chem*, 276(33), 31233-7.
107. Liang, D., Bhatta, S., Gerzanich, V., Simard, J.M. (2007). Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling. *Neurosurg Focus*, 22(5), E2.
108. Liu, H., Hooper, S.B., Armugam, A., Dawson, N., Ferraro, T., Jeyaseelan, K., Thiel, A., Koukoulas, I., Wintour, E.M. (2003). Aquaporin gene expression and regulation in the ovine fetal lung. *J Physiol*, 551(Pt 2), 503-14.
109. Lo, E.H., Dalkara, T., Moskowitz, M.A. (2003). Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci*, 4(5), 399-415.
110. Longa, E.Z., Weinstein, P.R., Carlson, S., Cummins, R. (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 20(1), 84-91.

111. Longatti, P., Basaldella, L., Orvieto, E., Dei Tos, A., Martinuzzi, A. (2006). Aquaporin(s) expression in choroid plexus tumours. *Pediatr Neurosurg*, 42(4), 228-33.
112. Loo, D.T., Althoen, M.C., Cotman, C.W. (1995). Differentiation of serum-free mouse embryo cells into astrocytes is accompanied by induction of glutamine synthetase activity. *J Neurosci Res*, 42(2), 184-91.
113. Ma, B., Xiang, Y., Mu, S.M., Li, T., Yu, H.M., Li, X.J. (2004). Effects of acetazolamide and anordiol on osmotic water permeability in AQP1-cRNA injected *Xenopus* oocyte. *Acta Pharmacol Sin*, 25(1), 90-7.
114. Ma, T., Yang, B., Gillespie, A., Carlson, E.J., Epstein, C.J., Verkman, A.S. (1997). Generation and phenotype of a transgenic knockout mouse lacking the mercurial-insensitive water channel aquaporin-4. *J Clin Invest*, 100(5), 957-62.
115. MacAulay, N., Gether, U., Klaeke, D.A., Zeuthen, T. (2002). Passive water and urea permeability of a human Na(+)-glutamate cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol*, 542(Pt 3), 817-28.
116. MacAulay, N., Hamann, S., Zeuthen, T. (2004). Water transport in the brain: role of cotransporters. *Neuroscience*, 129(4), 1031-44.
117. Magistretti, P.J., Pellerin, L., Rothman, D.L., Shulman, R.G. (1999). Energy on demand. *Science*, 283(5401), 496-7.
118. Manley, G.T., Binder, D.K., Papadopoulos, M.C., Verkman, A.S. (2004). New insights into water transport and edema in the central nervous system from phenotype analysis of aquaporin-4 null mice. *Neuroscience*, 129(4), 983-91.
119. Manley, G.T., Fujimura, M., Ma, T., Noshita, N., Filiz, F., Bollen, A.W., Chan, P., Verkman, A.S. (2000). Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med*, 6(2), 159-63.
120. Mannello, F., Luchetti, F., Falcieri, E., Papa, S. (2005). Multiple roles of matrix metalloproteinases during apoptosis. *Apoptosis*, 10(1), 19-24.

121. Marmarou, A., Hochwald, G., Nakamura, T., Tanaka, K., Weaver, J., Dunbar, J. (1994). Brain edema resolution by CSF pathways and brain vasculature in cats. *Am J Physiol*, 267(2 Pt 2), H514-20.
122. Masseguin, C., Corcoran, M., Carcenac, C., Daunton, N.G., Guell, A., Verkman, A.S., Gabrion, J. (2000). Altered gravity downregulates aquaporin-1 protein expression in choroid plexus. *J Appl Physiol*, 88(3), 843-50.
123. Meinild, A.K., Klaerke, D.A., Zeuthen, T. (1998). Bidirectional water fluxes and specificity for small hydrophilic molecules in aquaporins 0-5. *J Biol Chem*, 273(49), 32446-51.
124. Mhatre, A.N., Jero, J., Chiappini, I., Bolasco, G., Barbara, M., Lalwani, A.K. (2002). Aquaporin-2 expression in the mammalian cochlea and investigation of its role in Meniere's disease. *Hear Res*, 170(1-2), 59-69.
125. Morimoto, S., Cassell, M.D., Sigmund, C.D. (2002). Glia- and neuron-specific expression of the renin-angiotensin system in brain alters blood pressure, water intake, and salt preference. *J Biol Chem*, 277(36), 33235-41.
126. Mulder, J., Haddad, M.N., Vernon, K., Baum, M., Quigley, R. (2003). Hypothyroidism increases osmotic water permeability (Pf) in the developing renal brush border membrane. *Pediatr Res*, 53(6), 1001-7.
127. Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J.B., Engel, A., Fujiyoshi, Y. (2000). Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*, 407(6804), 599-605.
128. Murphy, V.A., Smith, Q.R., Rapoport, S.I. (1986). Homeostasis of brain and cerebrospinal fluid calcium concentrations during chronic hypo- and hypercalcemia. *J Neurochem*, 47(6), 1735-41.
129. Nag, S., Manias, J.L., Stewart, D.J. (2009). Pathology and new players in the pathogenesis of brain edema. *Acta Neuropathol*, 118(2), 197-217.
130. Nag, S., Picard, P., Stewart, D.J. (2001). Expression of nitric oxide synthases and nitrotyrosine during blood-brain barrier breakdown and repair after cold injury. *Lab Invest*, 81(1), 41-9.

131. Nagelhus, E.A., Horio, Y., Inanobe, A., Fujita, A., Haug, F.M., Nielsen, S., Kurachi, Y., Ottersen, O.P. (1999). Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺ siphoning and water transport in rat retinal Muller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia*, 26(1), 47-54.
132. Nagelhus, E.A., Lehmann, A., Ottersen, O.P. (1996). Neuronal and glial handling of glutamate and glutamine during hypoosmotic stress: a biochemical and quantitative immunocytochemical analysis using the rat cerebellum as a model. *Neuroscience*, 72(3), 743-55.
133. Nagelhus, E.A., Mathiisen, T.M., Ottersen, O.P. (2004). Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience*, 129(4), 905-13.
134. Nagelhus, E.A., Veruki, M.L., Torp, R., Haug, F.M., Laake, J.H., Nielsen, S., Agre, P., Ottersen, O.P. (1998). Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes. *J Neurosci*, 18(7), 2506-19.
135. Namura, S., Maeno, H., Takami, S., Jiang, X.F., Kamichi, S., Wada, K., Nagata, I. (2002). Inhibition of glial glutamate transporter GLT-1 augments brain edema after transient focal cerebral ischemia in mice. *Neurosci Lett*, 324(2), 117-20.
136. Nicchia, G.P., Nico, B., Camassa, L.M., Mola, M.G., Loh, N., Dermietzel, R., Spray, D.C., Svelto, M., Frigeri, A. (2004). The role of aquaporin-4 in the blood-brain barrier development and integrity: studies in animal and cell culture models. *Neuroscience*, 129(4), 935-45.
137. Nico, B., Frigeri, A., Nicchia, G.P., Corsi, P., Ribatti, D., Quondamatteo, F., Herken, R., Girolamo, F., Marzullo, A., Svelto, M., Roncali, L. (2003). Severe alterations of endothelial and glial cells in the blood-brain barrier of dystrophic mdx mice. *Glia*, 42(3), 235-51.
138. Nielsen, S., Frokiaer, J., Marples, D., Kwon, T.H., Agre, P., Knepper, M.A. (2002). Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev*, 82(1), 205-44.

139. Nielsen, S., King, L.S., Christensen, B.M., Agre, P. (1997). Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat. *Am J Physiol*, 273(5 Pt 1), C1549-61.
140. Nielsen, S., Nagelhus, E.A., Amiry-Moghaddam, M., Bourque, C., Agre, P., Ottersen, O.P. (1997). Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci*, 17(1), 171-80.
141. Nielsen, S., Smith, B.L., Christensen, E.I., Agre, P. (1993). Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(15), 7275-9.
142. Niermann, H., Amiry-Moghaddam, M., Holthoff, K., Witte, O.W., Ottersen, O.P. (2001). A novel role of vasopressin in the brain: modulation of activity-dependent water flux in the neocortex. *J Neurosci*, 21(9), 3045-51.
143. O'Connor, E.R., Kimelberg, H.K. (1993). Role of calcium in astrocyte volume regulation and in the release of ions and amino acids. *J Neurosci*, 13(6), 2638-50.
144. Oshio, K., Binder, D.K., Yang, B., Schechter, S., Verkman, A.S., Manley, G.T. (2004). Expression of aquaporin water channels in mouse spinal cord. *Neuroscience*, 127(3), 685-93.
145. Oshio, K., Watanabe, H., Song, Y., Verkman, A.S., Manley, G.T. (2005). Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel Aquaporin-1. *FASEB J*, 19(1), 76-8.
146. Papadopoulos, M.C., Manley, G.T., Krishna, S., Verkman, A.S. (2004). Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *FASEB J*, 18(11), 1291-3.
147. Papadopoulos, M.C., Saadoun, S., Binder, D.K., Manley, G.T., Krishna, S., Verkman, A.S. (2004). Molecular mechanisms of brain tumor edema. *Neuroscience*, 129(4), 1011-20.

148. Papadopoulos, M.C., Verkman, A.S. (2005). Aquaporin-4 gene disruption in mice reduces brain swelling and mortality in pneumococcal meningitis. *J Biol Chem*, 280(14), 13906-12.
149. Papadopoulos, M.C., Verkman, A.S. (2007). Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatr Nephrol*, 22(6), 778-84.
150. Pardridge, W.M., Eisenberg, J., Yang, J. (1985). Human blood-brain barrier insulin receptor. *J Neurochem*, 44(6), 1771-8.
151. Pasantes-Morales, H. (1996). Volume regulation in brain cells: cellular and molecular mechanisms. *Metab Brain Dis*, 11(3), 187-204.
152. Pasantes-Morales, H., Alavez, S., Sanchez Olea, R., Moran, J. (1993). Contribution of organic and inorganic osmolytes to volume regulation in rat brain cells in culture. *Neurochem Res*, 18(4), 445-52.
153. Pasantes-Morales, H., Franco, R., Ochoa, L., Ordaz, B. (2002). Osmosensitive release of neurotransmitter amino acids: relevance and mechanisms. *Neurochem Res*, 27(1-2), 59-65.
154. Patil, R.V., Han, Z., Wax, M.B. (1997). Regulation of water channel activity of aquaporin 1 by arginine vasopressin and atrial natriuretic peptide. *Biochem Biophys Res Commun*, 238(2), 392-6.
155. Peppiatt, C.M., Howarth, C., Mobbs, P., Attwell, D. (2006). Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*, 443(7112), 700-4.
156. Perez-Pinzon, M.A., Tao, L., Nicholson, C. (1995). Extracellular potassium, volume fraction, and tortuosity in rat hippocampal CA1, CA3, and cortical slices during ischemia. *J Neurophysiol*, 74(2), 565-73.
157. Popp AJ, F.P., Kimelberg HK, *Pathophysiology of traumatic brain injury.*, in *Neurosurgery*, R.S.e. Wilkins RH, Editor. 1996, McGraw-Hill: New York. p. 2623-2637
- .
158. Powers, W.J. (1991). Cerebral hemodynamics in ischemic cerebrovascular disease. *Ann Neurol*, 29(3), 231-40.

159. Preston, E., Sutherland, G., Finsten, A. (1993). Three openings of the blood-brain barrier produced by forebrain ischemia in the rat. *Neurosci Lett*, 149(1), 75-8.
160. Pulsinelli, W.A., Brierley, J.B., Plum, F. (1982). Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol*, 11(5), 491-8.
161. Pulsinelli, W.A., Buchan, A.M. (1988). The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke*, 19(7), 913-4.
162. Quigley, R., Mulder, J., Baum, M. (2003). Ontogeny of water transport in the rabbit proximal tubule. *Pediatr Nephrol*, 18(11), 1089-94.
163. Rama Rao, K.V., Chen, M., Simard, J.M., Norenberg, M.D. (2003). Increased aquaporin-4 expression in ammonia-treated cultured astrocytes. *Neuroreport*, 14(18), 2379-82.
164. Ransom, B., Behar, T., Nedergaard, M. (2003). New roles for astrocytes (stars at last). *Trends Neurosci*, 26(10), 520-2.
165. Rapoport, S.I. (1978). A mathematical model for vasogenic brain edema. *J Theor Biol*, 74(3), 439-67.
166. Rapoport, S.I., *Brain edema and blood-brain barrier.*, in *Primer on cerebrovascular disease*, K.M.A. Welch, Caplan, L.R., Reis, D.J., Siesjö, B.K., Weir, B., Editor. 1997, Academic Press: London. p. 25-38.
167. Rash, J.E., Davidson, K.G., Yasumura, T., Furman, C.S. (2004). Freeze-fracture and immunogold analysis of aquaporin-4 (AQP4) square arrays, with models of AQP4 lattice assembly. *Neuroscience*, 129(4), 915-34.
168. Rash, J.E., Yasumura, T., Hudson, C.S., Agre, P., Nielsen, S. (1998). Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(20), 11981-6.
169. Reichhardt, M. (1905). Zur Entstehung des Hirndrucks. . *Deutsche Zeitschrift fuer Nervenheilkunde.*, (28), 306.

170. Reulen, H.J., Graham, R., Spatz, M., Klatzo, I. (1977). Role of pressure gradients and bulk flow in dynamics of vasogenic brain edema. *J Neurosurg*, 46(1), 24-35.
171. Ribeiro Mde, C., Hirt, L., Bogousslavsky, J., Regli, L., Badaut, J. (2006). Time course of aquaporin expression after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci Res*, 83(7), 1231-40.
172. Rizzolo, L.J. (1999). Polarization of the Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase in epithelia derived from the neuroepithelium. *Int Rev Cytol*, 185 195-235.
173. Rosenberg, G.A., *CSF: formation, absorption, markers, and relationship to blood-brain barrier.*, in *Primer on cerebrovascular diseases*. 1997, Academic Press: London. p. 29-34.
174. Rosenberg, G.A., Yang, Y. (2007). Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. *Neurosurg Focus*, 22(5), E4.
175. Ross, D.T., Graham, D.I. (1993). Selective loss and selective sparing of neurons in the thalamic reticular nucleus following human cardiac arrest. *J Cereb Blood Flow Metab*, 13(4), 558-67.
176. Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P., Welty, D.F. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*, 16(3), 675-86.
177. Ryan, M.C., Shen, P.J., Gundlach, A.L. (1997). Angiotensinogen and natriuretic peptide mRNAs in rat brain: localization and differential regulation by adrenal steroids in hypothalamus. *Peptides*, 18(4), 495-504.
178. Saadoun, S., Papadopoulos, M.C. (2010). Aquaporin-4 in brain and spinal cord oedema. *Neuroscience*, 168(4), 1036-46.
179. Saadoun, S., Papadopoulos, M.C., Davies, D.C., Krishna, S., Bell, B.A. (2002). Aquaporin-4 expression is increased in oedematous human brain tumours. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 72(2), 262-5.

180. Saadoun, S., Papadopoulos, M.C., Hara-Chikuma, M., Verkman, A.S. (2005). Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption. *Nature*, 434(7034), 786-92.
181. Sandoval, K.E., Witt, K.A. (2008). Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis*, 32(2), 200-19.
182. Sarfaraz, D., Fraser, C.L. (1999). Effects of arginine vasopressin on cell volume regulation in brain astrocyte in culture. *Am J Physiol*, 276(3 Pt 1), E596-601.
183. Schaller, B., Graf, R. (2004). Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. *J Cereb Blood Flow Metab*, 24(4), 351-71.
184. Schlaug, G., Siewert, B., Benfield, A., Edelman, R.R., Warach, S. (1997). Time course of the apparent diffusion coefficient (ADC) abnormality in human stroke. *Neurology*, 49(1), 113-9.
185. Schneider, G.H., Baethmann, A., Kempfski, O. (1992). Mechanisms of glial swelling induced by glutamate. *Can J Physiol Pharmacol*, 70 Suppl S334-43.
186. Schousboe, A. (2003). Role of astrocytes in the maintenance and modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neurochem Res*, 28(2), 347-52.
187. Schroeter, M., Jander, S., Witte, O.W., Stoll, G. (1994). Local immune responses in the rat cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion. *J Neuroimmunol*, 55(2), 195-203.
188. Shi, L.B., Skach, W.R., Ma, T., Verkman, A.S. (1995). Distinct biogenesis mechanisms for the water channels MIWC and CHIP28 at the endoplasmic reticulum. *Biochemistry*, 34(26), 8250-6.
189. Shiraishi, K., Sharp, F.R., Simon, R.P. (1989). Sequential metabolic changes in rat brain following middle cerebral artery occlusion: a 2-deoxyglucose study. *J Cereb Blood Flow Metab*, 9(6), 765-73.
190. Siesjo, B.K., Katsura, K., Zhao, Q., Folbergrova, J., Pahlmark, K., Siesjo, P., Smith, M.L. (1995). Mechanisms of secondary brain damage in global

- and focal ischemia: a speculative synthesis. *J Neurotrauma*, 12(5), 943-56.
191. Simard, J.M., Kent, T.A., Chen, M., Tarasov, K.V., Gerzanich, V. (2007). Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet Neurol*, 6(3), 258-68.
 192. Simard, M., Nedergaard, M. (2004). The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*, 129(4), 877-96.
 193. Smith, M.L., Auer, R.N., Siesjo, B.K. (1984). The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia. *Acta Neuropathol*, 64(4), 319-32.
 194. Son, Y.J., Hur, M.K., Ryu, B.J., Park, S.K., Damante, G., D'Elia, A.V., Costa, M.E., Ojeda, S.R., Lee, B.J. (2003). TTF-1, a homeodomain-containing transcription factor, participates in the control of body fluid homeostasis by regulating angiotensinogen gene transcription in the rat subfornical organ. *J Biol Chem*, 278(29), 27043-52.
 195. Sonnewald, U., Westergaard, N., Schousboe, A. (1997). Glutamate transport and metabolism in astrocytes. *Glia*, 21(1), 56-63.
 196. Sontheimer, H. (1992). Astrocytes, as well as neurons, express a diversity of ion channels. *Can J Physiol Pharmacol*, 70 Suppl S223-38.
 197. Spencer, S.J., Galic, M.A., Tsutsui, M., Pittman, Q.J., Mouihate, A. (2008). Effects of global cerebral ischemia in the pregnant rat. *Stroke*, 39(3), 975-82.
 198. Spengos, K., Tsivgoulis, G., Zakopoulos, N. (2006). Blood pressure management in acute stroke: a long-standing debate. *Eur Neurol*, 55(3), 123-35.
 199. Squire, L.R., Ojemann, J.G., Miezin, F.M., Petersen, S.E., Videen, T.O., Raichle, M.E. (1992). Activation of the hippocampus in normal humans: a functional anatomical study of memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(5), 1837-41.
 200. Starling, E.H. (1896). On the Absorption of Fluids from the Connective Tissue Spaces. *J Physiol*, 19(4), 312-26.

201. Stornetta, R.L., Hawelu-Johnson, C.L., Guyenet, P.G., Lynch, K.R. (1988). Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. *Science*, 242(4884), 1444-6.
202. Stroop, R., Thomale, U.W., Pauser, S., Bernarding, J., Vollmann, W., Wolf, K.J., Lanksch, W.R., Unterberg, A.W. (1998). Magnetic resonance imaging studies with cluster algorithm for characterization of brain edema after controlled cortical impact injury (CCII). *Acta Neurochir Suppl*, 71 303-5.
203. Sykova, E., Chvatal, A. (2000). Glial cells and volume transmission in the CNS. *Neurochem Int*, 36(4-5), 397-409.
204. Symon, L. (1980). The relationship between CBF, evoked potentials and the clinical features in cerebral ischaemia. *Acta Neurol Scand Suppl*, 78 175-90.
205. Szmydynger-Chodobska, J., Chodobski, A., Johanson, C.E. (1994). Postnatal developmental changes in blood flow to choroid plexuses and cerebral cortex of the rat. *Am J Physiol*, 266(5 Pt 2), R1488-92.
206. Tagaya, M., Haring, H.P., Stuiver, I., Wagner, S., Abumiya, T., Lucero, J., Lee, P., Copeland, B.R., Seiffert, D., del Zoppo, G.J. (2001). Rapid loss of microvascular integrin expression during focal brain ischemia reflects neuron injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21(7), 835-46.
207. Tait, M.J., Saadoun, S., Bell, B.A., Papadopoulos, M.C. (2008). Water movements in the brain: role of aquaporins. *Trends Neurosci*, 31(1), 37-43.
208. Taniguchi, M., Yamashita, T., Kumura, E., Tamatani, M., Kobayashi, A., Yokawa, T., Maruno, M., Kato, A., Ohnishi, T., Kohmura, E., Tohyama, M., Yoshimine, T. (2000). Induction of aquaporin-4 water channel mRNA after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res Mol Brain Res*, 78(1-2), 131-7.
209. Tsukaguchi, H., Shayakul, C., Berger, U.V., Mackenzie, B., Devidas, S., Guggino, W.B., van Hoek, A.N., Hediger, M.A. (1998). Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel. *J Biol Chem*, 273(38), 24737-43.

210. Tsuyumu, M., Reulen, H.J., Prioleau, G. (1981). Dynamics of formation and resolution of vasogenic brain oedema. I. Measurement of oedema clearance into ventricular CSF. *Acta Neurochir (Wien)*, 57(1-2), 1-13.
211. Unterberg, A.W., Stover, J., Kress, B., Kiening, K.L. (2004). Edema and brain trauma. *Neuroscience*, 129(4), 1021-9.
212. Unterberg, A.W., Stroop, R., Thomale, U.W., Kiening, K.L., Pauser, S., Vollmann, W. (1997). Characterisation of brain edema following "controlled cortical impact injury" in rats. *Acta Neurochir Suppl*, 70 106-8.
213. Vajda, Z., Pedersen, M., Fuchtbauer, E.M., Wertz, K., Stodkilde-Jorgensen, H., Sulyok, E., Doczi, T., Neely, J.D., Agre, P., Frokiaer, J., Nielsen, S. (2002). Delayed onset of brain edema and mislocalization of aquaporin-4 in dystrophin-null transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(20), 13131-6.
214. van Harreveld, A. (1966). Extracellular space in the central nervous system. *Proc K Ned Akad Wet C*, 69(1), 17-21.
215. Vaquero, J., Butterworth, R.F. (2007). Mechanisms of brain edema in acute liver failure and impact of novel therapeutic interventions. *Neurol Res*, 29(7), 683-90.
216. Verkman, A.S. (2002). Physiological importance of aquaporin water channels. *Ann Med*, 34(3), 192-200.
217. Verkman, A.S., Yang, B., Song, Y., Manley, G.T., Ma, T. (2000). Role of water channels in fluid transport studied by phenotype analysis of aquaporin knockout mice. *Exp Physiol*, 85 Spec No 233S-241S.
218. Vogh, B.P., Godman, D.R., Maren, T.H. (1987). Effect of AlCl₃ and other acids on cerebrospinal fluid production: a correction. *J Pharmacol Exp Ther*, 243(1), 35-9.
219. Vorbrodt, A.W., Lossinsky, A.S., Wisniewski, H.M., Suzuki, R., Yamaguchi, T., Masaoka, H., Klatzo, I. (1985). Ultrastructural observations on the transvascular route of protein removal in vasogenic brain edema. *Acta Neuropathol*, 66(4), 265-73.

220. Wang, C.X., Shuaib, A. (2007). Critical role of microvasculature basal lamina in ischemic brain injury. *Prog Neurobiol*, 83(3), 140-8.
221. Wang, J., Lei, B., Popp, S., Meng, F., Cottrell, J.E., Kass, I.S. (2007). Sevoflurane immediate preconditioning alters hypoxic membrane potential changes in rat hippocampal slices and improves recovery of CA1 pyramidal cells after hypoxia and global cerebral ischemia. *Neuroscience*, 145(3), 1097-107.
222. Wang, J.Y., Shen, J., Gao, Q., Ye, Z.G., Yang, S.Y., Liang, H.W., Bruce, I.C., Luo, B.Y., Xia, Q. (2008). Ischemic postconditioning protects against global cerebral ischemia/reperfusion-induced injury in rats. *Stroke*, 39(3), 983-90.
223. Wasterlain, C.G., Posner, J.B. (1968). Cerebral edema in water intoxication. I. Clinical and chemical observations. *Arch Neurol*, 19(1), 71-8.
224. Weinstein, P.R., Hong, S., Sharp, F.R. (2004). Molecular identification of the ischemic penumbra. *Stroke*, 35(11 Suppl 1), 2666-70.
225. Wen, H., Nagelhus, E.A., Amiry-Moghaddam, M., Agre, P., Ottersen, O.P., Nielsen, S. (1999). Ontogeny of water transport in rat brain: postnatal expression of the aquaporin-4 water channel. *Eur J Neurosci*, 11(3), 935-45.
226. Wilkins, M.R., Redondo, J., Brown, L.A. (1997). The natriuretic-peptide family. *Lancet*, 349(9061), 1307-10.
227. Williams, J.L., Jones, S.C., Page, R.B., Bryan, R.M., Jr. (1991). Vascular responses of choroid plexus during hypercapnia in rats. *Am J Physiol*, 260(6 Pt 2), R1066-70.
228. Wright, E.M. (1978). Transport processes in the formation of the cerebrospinal fluid. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 83 3-34.
229. Wu, Q., Delpire, E., Hebert, S.C., Strange, K. (1998). Functional demonstration of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter activity in isolated, polarized choroid plexus cells. *Am J Physiol*, 275(6 Pt 1), C1565-72.
230. Yamamoto, N., Yoneda, K., Asai, K., Sobue, K., Tada, T., Fujita, Y., Katsuya, H., Fujita, M., Aihara, N., Mase, M., Yamada, K., Miura, Y.,

- Kato, T. (2001). Alterations in the expression of the AQP family in cultured rat astrocytes during hypoxia and reoxygenation. *Brain Res Mol Brain Res*, 90(1), 26-38.
231. Yang, B., Verbavatz, J.M., Song, Y., Vetrivel, L., Manley, G., Kao, W.M., Ma, T., Verkman, A.S. (2000). Skeletal muscle function and water permeability in aquaporin-4 deficient mice. *Am J Physiol Cell Physiol*, 278(6), C1108-15.
232. Yang, B., Zador, Z., Verkman, A.S. (2008). Glial cell aquaporin-4 overexpression in transgenic mice accelerates cytotoxic brain swelling. *J Biol Chem*, 283(22), 15280-6.
233. Yool, A.J., Brokl, O.H., Pannabecker, T.L., Dantzler, W.H., Stamer, W.D. (2002). Tetraethylammonium block of water flux in Aquaporin-1 channels expressed in kidney thin limbs of Henle's loop and a kidney-derived cell line. *BMC Physiol*, 2 4.
234. Zador, Z., Bloch, O., Yao, X., Manley, G.T. (2007). Aquaporins: role in cerebral edema and brain water balance. *Prog Brain Res*, 161 185-94.
235. Zador, Z., Stiver, S., Wang, V., Manley, G.T. , *Role of Aquaporin-4 in Cerebral Edema and Stroke*. Handbook of Experimental Pharmacology: Aquaporins ed. E. Beitz. 2009, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 159-179.
236. Zeuthen, T., Wright, E.M. (1981). Epithelial potassium transport: tracer and electrophysiological studies in choroid plexus. *J Membr Biol*, 60(2), 105-28.
237. Zeynalov, E., Chen, C.H., Froehner, S.C., Adams, M.E., Ottersen, O.P., Amiry-Moghaddam, M., Bhardwaj, A. (2008). The perivascular pool of aquaporin-4 mediates the effect of osmotherapy in postischemic cerebral edema. *Crit Care Med*, 36(9), 2634-40.
238. Zhang, Y., Pardridge, W.M. (2001). Rapid transferrin efflux from brain to blood across the blood-brain barrier. *J Neurochem*, 76(5), 1597-600.
239. Zhou, M., Kimelberg, H.K. (2000). Freshly isolated astrocytes from rat hippocampus show two distinct current patterns and different [K(+)](o) uptake capabilities. *J Neurophysiol*, 84(6), 2746-57.

240. Zola-Morgan, S., Squire, L.R., Rempel, N.L., Clower, R.P., Amaral, D.G. (1992). Enduring memory impairment in monkeys after ischemic damage to the hippocampus. *J Neurosci*, 12(7), 2582-96.