

PİNEALEKTOMİZE SIÇANLARIN BEYNİNDE AKUAPORİN 4 VE 1 EKSPRESYON DEĞİŞİKLİKLERİ: MELATONİNİN ROLÜ

Aquaporin 4 and 1 Expression Changes in the Brain of Pinealectomized Rats: Role of Melatonin

Mehmet DEMİR¹  Feyza BAŞAK² 

^{1,2}Karabük Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Karabük

Geliş Tarihi / Received: 01.04.2024

Kabul Tarihi / Accepted: 21.05.2024

ÖZ

Beyinde bir sıvı değişim sistemi olan glenfatik sistem, astrositlerde akuaporin 4 (AQP4) ve ventriküler koroid pleksusta akuaporin 1 (AQP1) su kanalları ile ilişkilidir. Ayrıca beyinde sıvı homeostazının sürdürülmesinde sirkadiyen ritimlerin varlığı bildirilmiştir. Bu çalışmada sirkadiyen ritmi düzenleyen melatonin (pinealektomi ve eksojen melatonin takviyesi) ile AQP4 ve AQP1 arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada 50 adet erkek sıçan beş gruba ayrıldı. Gruplar; Kontrol, Sham Pinealektomi (Sham PX), Melatonin (MEL), Pinealektomi (PX), PX+MEL olarak belirlendi. MEL grubuna 30 gün intraperitoneal MEL (10 mg/kg/gün) enjeksiyonu, PX grubuna ise sadece PX cerrahisi uygulandı. PX cerrahisi (MEL yoksunluğu) ve MEL enjeksiyonlarından sonra beyin dokusunda AQP1 ve AQP4 ifadelerindeki değişiklikler incelendi. AQP1 ve AQP4 seviyelerinde kontrol ve Sham PX grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yokken, PX grubunda anlamlı derecede bir azalma gözlenmiştir ($p<0.001$). PX+MEL grubunda AQP4 seviyesinde artış gözlenirken ($p<0.001$), AQP1 seviyesinin değişmediği tespit edilmiştir. Bu çalışma MEL'in AQP4 aracılığı ile glenfatik sisteme önemli katkı sağladığını ancak bu katkıyı AQP1 ile sağlayamadığını göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Akuaporin 1, Akuaporin 4, Melatonin, Pinealektomi.

ABSTRACT

The brain's glymphatic system, a fluid exchange system, is associated with the aquaporin 4 (AQP4) water channels in astrocytes and aquaporin 1 (AQP1) in the ventricular choroid plexus. Circadian rhythms have also been reported to maintain fluid homeostasis in the brain. In this study, we aimed to determine the relationship between melatonin (pinealectomy and exogenous melatonin supplementation), which regulates circadian rhythm, and AQP4 and AQP1. The study, 50 male rats were divided into five groups (n=10). The groups were determined as Control, Sham Pinealectomy (Sham PX), Melatonin (MEL), Pinealectomy (PX), and PX+MEL. The MEL group received intraperitoneal injection of MEL (10 mg/kg/day) for 30 days, and the PX group received only PX surgery. We examined changes in AQP1 and AQP4 expression in brain tissue after PX surgery (MEL deprivation) and MEL injections. While there was no statistically significant difference in AQP1 and AQP4 levels between the control and Sham PX groups, a significant decrease was observed in the PX group ($p<0.001$). While an increase in AQP4 level was observed in the PX+MEL group ($p<0.001$), the AQP1 level did not change. This study demonstrated that MEL significantly contributed to the glymphatic system via AQP4 but not AQP1.

Keywords: Aquaporin 1, Aquaporin 4, Melatonin, Pinealectomy.

GİRİŞ

Beynin tüm bölgelerine erişen (Mogensen, Delle ve Nedergaard, 2021) ve glial bağımlı lenfatik taşıma olarak adlandırılan glenfatik sistemi (Reddy ve van der Werf, 2020), beyinde çözünen maddelerin taşınması ve metabolitlerin temizlenmesi için benzersiz bir yol sağlamaktadır (Li vd., 2022). Glenfatik sistem, taşınma ve atık eliminasyonunun yanı sıra kafa içi basıncının, beyin omurilik sıvısı (BOS) basıncının ve interstisyel sıvı basıncının düzenlenmesine izin verir (Nycz ve Mandera, 2021). Bunun yanında glikoz, lipidler, amino asitler ve nöromodülatörler dahil olmak üzere çeşitli bileşiklerin beyindeki dağılımını kolaylaştırmaktadır (Jessen, Munk, Lundgaard ve Nedergaard, 2015). Beyindeki kan damarlarını çevreleyen ve içi sıvı dolu olan perivasküler boşluk (PVS) (Zong vd., 2020), beyin glenfatik sisteminin önemli bir parçasıdır (Wang vd., 2021). PVS, BOS'un subaraknoid boşluktan beyin parankimine taşındığı ve interstisyel sıvı değişiminin yapıldığı yerdir (Magdoom vd., 2019). Bu sıvı değişimi, PVS'nin dış sınırını tanımlayan astrosit uç ayaklarında yüksek oranda ifade edilen akuaporin 4 (AQP4) (Bèchet, Shanbhag ve Lundgaard, 2021) ve esas olarak ventriküler koroid pleksusun apikal membranında ifade edilen akuaporin 1 (AQP1) su kanallarına bağlıdır (Kim vd., 2007). Astrositik AQP4, kan-beyin bariyerinden su geçirgenliğini sağlamakla birlikte (Szczygielski, Kopańska, Wysocka ve Oertel, 2021a), paravasküler BOS-interstisyel sıvı değişimini de kolaylaştırmaktadır (L. Yang vd., 2021). AQP4 ekspresyonunun en yüksek seviyeleri, subaraknoid boşluk, ventriküller, kan damarları boyunca ve supraoptik çekirdek dahil olmak üzere vücut su dengesi ve düzenlenmesi ile ilgili alanlarda saptanmıştır (Nielsen vd., 1997). AQP4' ten yoksun hayvanların daha düşük BOS akışına sahip oldukları ve parankimal interstisyumda çözünen madde klirensinde azalma meydana geldiği tespit edilmiştir (Ilyff vd., 2012). AQP1'in de BOS ve intraserebral sıvı homeostazında önemli bir yeri olduğu bilinmektedir (Trillo-Contreras, Toledo-Aral, Echevarría ve Villadiego, 2019). AQP1 su kanalları, hücre membranları boyunca su hareketini kolaylaştırarak endotelial ve epitelyal bariyerlerin geçirgenliğini kontrol eden membran proteinleridir (Mobasher, Airley, Hewitt ve Marples, 2005). Apikal membrandaki ifadesinin daha fazla olması BOS üretimi için suyun transselüler hareketindeki rolünü göstermektedir (Filippidis, Carozza ve Rekate, 2016). AQP1 ayrıca pial kan damarlarını innerve eden nöronlarda da gözlenmiştir ve bu da serebral kan akışının düzenlenmesinde olası bir rolü olduğunu düşündürmektedir (Arciénega, Brunet, Bloch ve Badaut, 2010). Yapılan bir çalışmada, AQP1 null farelerde BOS dolaşımının, vahşi tip farelere kıyasla %25 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Yamaguchi, Hamada, Matsuzaki ve Iijima, 2020). Bu durum kandan

BOS'a su akışını farklı mekanizmaların düzenlediğini düşündürmektedir. AQP1 ve AQP4'ün BOS-interstisyel sıvısı düzenlemesinde temel araçlar olduğu konusunda geniş bir fikir birliği vardır (Abbott, Pizzo, Preston, Janigro ve Thorne, 2018).

Sempatik ve parasempatik innervasyonun yanı sıra uyku ve uyanıklık döngüsünün glenfatik sistemin işlevleri üzerine etkili olduğu bildirilmektedir (Nycz ve Mander, 2021). BOS'un taşınması ve dağılımı, arteriyel pulsasyonlar, solunum ve yavaş vazomasyon tarafından değiştirilebilir. Uyanıklık sırasında noradrenalin seviyelerindeki artış ile sıvı hareketi engellenirken (Goldman, Hablitz, Mori ve Nedergaard, 2020), uyku sırasında noradrenalin seviyelerindeki azalma ve beyin hücre dışı boşluğunun genişlemesi ile sıvı akışına karşı direnç azalmaktadır. Bu durum BOS infiltrasyonu ve dolayısıyla interstisyel solüt klirensinde artış ile kendini gösterir (Plog ve Nedergaard, 2018). Yapılan çalışmalarda interstisyel sıvı boşluğunun genişlemesinin BOS'un beyine girişini kolaylaştırdığı ve uyku sırasında uyanıklığa kıyasla glenfatik sistemin, atık ürünleri daha verimli bir şekilde temizlediği gösterilmiştir (Demiral vd., 2019). Uyku ve dinlenme fazında yüksek olan AQP4'ler kayba uğradığında, glenfatik akışta ve lenf düğümlerine drenajda gündüz-gece farklılıklarının ortadan kalktığı tespit edilmiştir. Böylece BOS dağılımının sirkadiyen kontrol altında olduğu ve AQP4'ün sıvı alışverişine destek verdiği sonucuna varılmıştır (Hablitz vd., 2020a). Bunun yanında BOS bariyerini oluşturan koroid pleksus epitel hücrelerinin de beyin homeostazını sürdürmek için çoklu işlevlerini kontrol edebilen sirkadiyen ritimlere sahip olduğu bildirilmiştir (Quintela vd., 2021).

Endojen bir sirkadiyen saat tarafından üretilen sirkadiyen ritimler (Sebti, Hebras, Pourcet, Staels ve Duez, 2022), beyinde hipotalamustaki suprakiazmatik nükleusta (SKN) bulunan merkezi bir pacemaker tarafından yönlendirilir (Soofiyani vd., 2021). Doğal olarak ışığa duyarlı retina ganglion hücreleri karanlık/aydınlık bilgilerini retinohipotalamik yol vasıtasıyla SKN'ye iletmektedir (Bonsall ve Lall, 2013). Retina ve retinohipotalamik yol haricinde sirkadiyen sistemin önemli parçalarından biri ise (Richardson, 2005) melatonin sentezinden sorumlu bir fotonöroendokrin organ olan pineal bezdir (Gheban vd., 2021). Bu bez esas olarak pinealositlerden oluşur ama aynı zamanda çoğunluğu astrosit olan interstisyel hücreleri de içermektedir (Villela vd., 2013). Pineal bezden salınan melatonin son derece geniş bir dağılıma sahiptir, her hücreye ve tüm subsellüler kompartımanlara girme yeteneğine sahiptir (J Reiter, Tan, Rosales-Corral ve C Manchester, 2013). Melatonin, geceleri kana ve BOS'a salınarak sirkadiyen ritmi ve uyku-uyanıklık döngüsünü düzenlediği için kendine özgü birçok özelliğe sahiptir (Samanta, 2020). Melatoninin hem kültürde hem de eksojen olarak uygulandığında astrositlerin mitotik aktivitesinde doza bağlı bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca

melatoninin diensefalik astrositlerde mitotik aktiviteyi uyarması bu hormonun beyin gelişiminde trofik bir rolü olduğunu düşündürmektedir (Paulose, Peters, Karaganis ve Cassone, 2009). Endojen melatonin uyku ve sirkadiyen ritimler üzerinde akut ve gecikmeli etkilere sahiptir. Ancak endojen melatoninin yokluğu veya yetersiz kaldığı çeşitli durumlarda melatoninin etkisinin devamlılığı için eksojen melatonin ihtiyacı oluşabilmektedir.

Bu çalışmanın amacı, geceleri kana ve BOS'a salınarak sirkadiyen ritmi ve uyku-uyanklık döngüsünü düzenleyen melatoninin yoksunluğunun (pinealektomi) ve eksojen melatonin takviyesinin, AQP4 ve AQP1 ile ilişkisini ortaya koymaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmanın Etik Yönü

Çalışma Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 21/04/2022, Karar numarası: 2022/4/7, Kayıt numarası: E-55212866-050.99-125555). Tüm deneysel prosedürler, deney hayvanlarının kullanımına ilişkin Hayvan Etik Kurulu Yönergesine uygun olarak gerçekleştirildi.

Deney Grupları ve Deney Tasarımı

Çalışma 250-300 g ağırlığında 50 erkek Wistar Albino sıçan üzerinde yürütüldü. Sıçanlar beş gruba ayrıldı (n=10). Sıçanlar 21±1°C sıcaklık ve 12 saat aydınlık/karanlık periyoda sahip bir ortamda tutuldu ve ad libitum olarak normal musluk suyu ve standart sıçan yemi ile beslendi.

Gruplardaki hayvanlar aşağıdaki tedavi ve prosedürlere tabi tutuldu.

1- Kontrol grubu: Bu grupta herhangi bir uygulama yapılmadı (n=10).

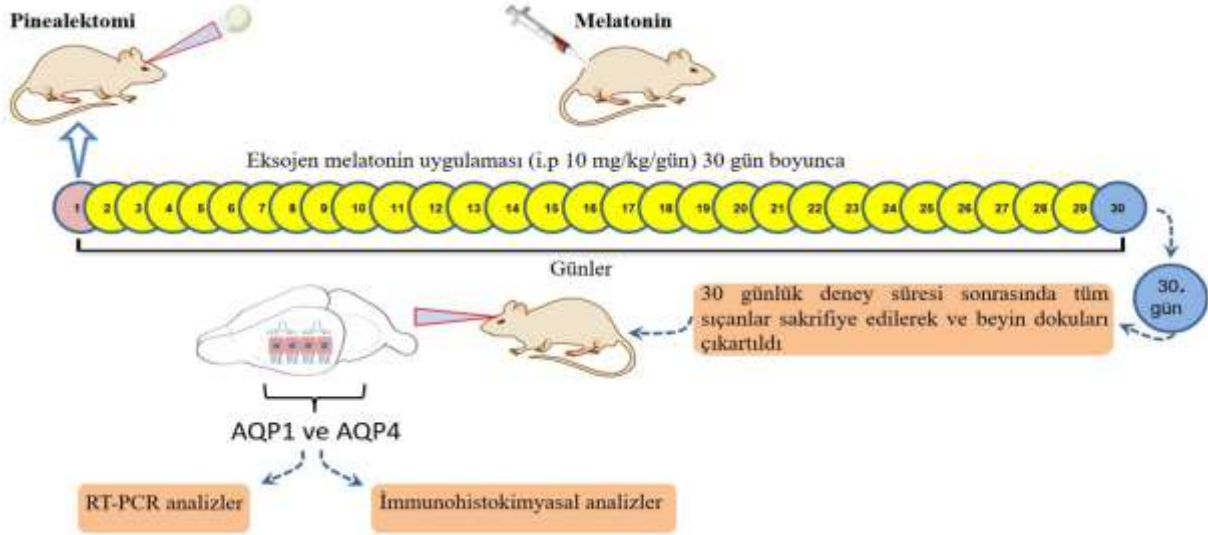
2- Sham Pinealektomi (Sham PX) grubu: Bu gruptaki sıçanlara çalışmanın ilk gününde sham PX uygulandı, yani pineal beze erişmek için kafatasında bir delik açıldı; bu delikten forseps ile erişim sağlandı, ancak pineal bez çıkarılmadı. Sıçanlara 30 gün boyunca intraperitoneal (ip) MEL çözücüsü enjeksiyonları yapıldı (n=10).

3- Melatonin (MEL) grubu: Bu gruptaki sıçanlara çalışmanın ilk gününden itibaren 30 gün boyunca ip MEL (10 mg/kg/gün) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (Yang, He, Wang ve Zhang, 2021) enjeksiyonu yapıldı (n=10).

4- Pinealektomi (PX) grubu: Bu gruptaki sıçanlara çalışmanın ilk gününde PX prosedürü uygulandı (n=10).

5- PX+MEL grubu: Bu gruptaki sıçanlara çalışmanın ilk gününde PX prosedürü uygulandı. Ek olarak, MEL (10 mg/kg/gün) ilk günden başlayarak 30 gün boyunca ip olarak enjekte edildi (n=10).

Tüm bu gruplardaki hayvanlar tedavi edildikten sonra, sıçanlar deneyin 30. gününde dekapite edildi. Beyinler çıkarıldıktan sonra, beyinler önce sağ ve sol hemisferlere ayrıldı; tüm beynin bir yarısı AQP1 ve AQP4 ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile belirlemek için, diğer yarısı ise immünohistokimyasal analiz için kullanıldı. Çalışmanın deneysel protokolü Şekil 1'de ifade edildi.



Şekil 1. Çalışmanın Deneysel Protokolü

MEL Çözeltilisinin Hazırlanması ve Enjeksiyonu

MEL çözücüsü olarak etanol kullanılmış ve salin ile uygun konsantrasyona ayarlandı (Matsubara vd., 2003). Sıçanlara çalışmanın ilk gününden başlayarak 30 gün boyunca ip MEL (10 mg/kg/gün) MEL grubuna ve MEL çözücüsü ise Sham PX grubuna enjekte edildi (Z. Yang vd., 2021).

Pinealektomi Cerrahisi

Anestezi uygulanmış sıçanlar (ksilazin-ketamin kokteyli (sırasıyla 10 mg/kg-90 mg/kg i.p.)) stereotaksik bir çerçeveye yerleştirildi (Qureshi, Kung, Hou, Collins III ve Sisto, 2022). Sıçanların üst kafa derisi tıraş edildi ve Lambda bölgesini ortaya çıkarmak için orta hat boyunca enseye doğru kesildi. Kafatası kemiğinin lambda bölgesine yakın dairesel bir parçası Proxxon Micromot 50/E matkap (Almanya) kullanılarak çıkarıldı. Pineal bez forseps ile çıkarıldı ve sıçanlar yoğun bakıma alındı.

mRNA Ekspresyon Düzeyinin Tespiti

Beyin dokusundan AQP1 ve AQP4 gen ekspresyonları Exicycler 96 (Biooner) Real time PCR cihazı kullanılarak tespit edildi. Beyin dokusundan total RNA pürifikasyonu için Total RNA Extraction Kit (Hibrigen, MG-RNA-01-100) kullanıldı. Toplam RNA saflığı ve

konsantrasyonları bir nano hacim spektrofotometresi ile belirlendi (IMPLEN, Germany). RNA izolasyonundan sonra total RNA'dan cDNA sentezi cDNA synthesis kit (Hibrigen, MG-CDNA-01) yardımı ile yapıldı. 2X SYBR green PCR mix (Hibrigen, MG-SYBR-01-500) ve rat spesifik primerler AQP1 (RefSeq ID: NM_012778.2) AQP4 (RefSeq ID: NM_001270559) kullanılarak cDNA gen bölgeleri amplifiye edildi. Gen ekspresyonlarındaki değişiklikleri hesaplamak için $2^{-\Delta\Delta}$ Ct metodu (Livak ve Schmittgen, 2001), Housekeeping kontrol gen olarak β -actin (RefSeq ID: NM_031144) kullanıldı.

İmmünohistokimyasal Analizler

Tespit, hidrasyon, dehidrasyon, saydamlaştırma ve parafine gömmeden oluşan rutin bir histoloji prosedürü gerçekleştirildi. Parafin bloklardan adhesivli slaytlara 5 μ m'lik kesitler almak için bir mikrotom kullanıldı. Hematoksilen-Eozin (H&E) boyama sonrası dokuların histolojik değerlendirmesi yapıldı. AQP 1 ve 4 antikorlarının değerlendirilmesi için slaytlar, her biri 15 dakika olmak üzere iki kez ksilende deparafinize edildi ve daha sonra azalan etanol serisine alındı. Distile su ile yıkandıktan sonra antijen retrieval adımı için Sitrat Buffer solüsyonu (pH:6) (Citrate Buffer 100X-Sigma-Aldrich® C-9999) kullanıldı. Slaytlar mikrodalgada 800W'ta 15 dakika tutuldu. Endojen peroksit aktivitesinden kaçınmak için 20 dakika boyunca %3'lük H₂O₂ çözeltisi kullanıldı. Bir HRP/AEC(ABC) Saptama İmmünohistokimya Kiti (Abcam®, ab93705) kullanıldı. Fosfat Tamponlu Salin (PBS) ile üç kez yıkandıktan sonra 5 dakika boyunca protein blok solüsyonu (Abcam®, 61720) kullanıldı. Anti-Aquaporin 1 antikor (Abcam®, ab9566) ve Anti-aquaporin 4 antikor (Abcam®, ab9512), fosfat tamponlu normal antikor seyreltici (ScyTek Lab, ABB125) ile 1:100 oranında seyreltildi ve slaytlar, bir gece 4°C'de tutuldu. Ertesi gün PBS ile yıkandıktan sonra biyotinlenmiş keçi anti-polivalent serumu (Abcam®, 62887) lamlara damlatıldı ve 30 dakika bekletildi. Tekrar bir PBS yıkama aşaması gerçekleştirildi ve Streptavidin peroksidaz çözeltisi (Abcam®,62926) 30 dakika süreyle kullanıldı. İmmünohistokimyasal boyama için 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) kromojen (Pierce™ DAB Substrate Kit, Katalog numarası: 34002) kullanıldı. Distile su ile hızlı bir yıkamanın ardından slaytlar arka plan boyaması için Mayer'in Hematoksilen solüsyonuna (GBL®, REF:5002) alındı. Maksimum 2 dakika süren kontrollü boyamanın sonunda kesitler musluk suyuyla yıkandı, son olarak alkol serisine ve ksilene alındı. Yapıştırmak için Entellan®, değerlendirme ve fotoğraf çekmek için Leica® DM2500 LED araştırma mikroskobu kullanıldı. Kesitler histolojik puanlama (HSCORE) ile yarı kantitatif olarak değerlendirildiler (Meyerholz & Beck, 2018). (0, boyanma yok; 1+, zayıf ancak tespit edilebilen boyanma; 2+, orta ya da belirgin boyanma; 3+, yoğun boyanma).

İstatistiksel Analizler

İstatistiksel veri analizi, Windows yazılımı için IBM SPSS istatistik sürüm 25.0 üzerinde gerçekleştirilmiştir. Verilerin normal dağılım gösterdiği Kolmogrov Simirnov testi ile belirlendi ($p>0.05$). Çoklu karşılaştırmalar Tukey HSD düzeltmeli One Way Anova Testi ile analiz edildi. Bulgular ortalama \pm standart sapma (SD) olarak sunuldu ve $p < 0.001$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

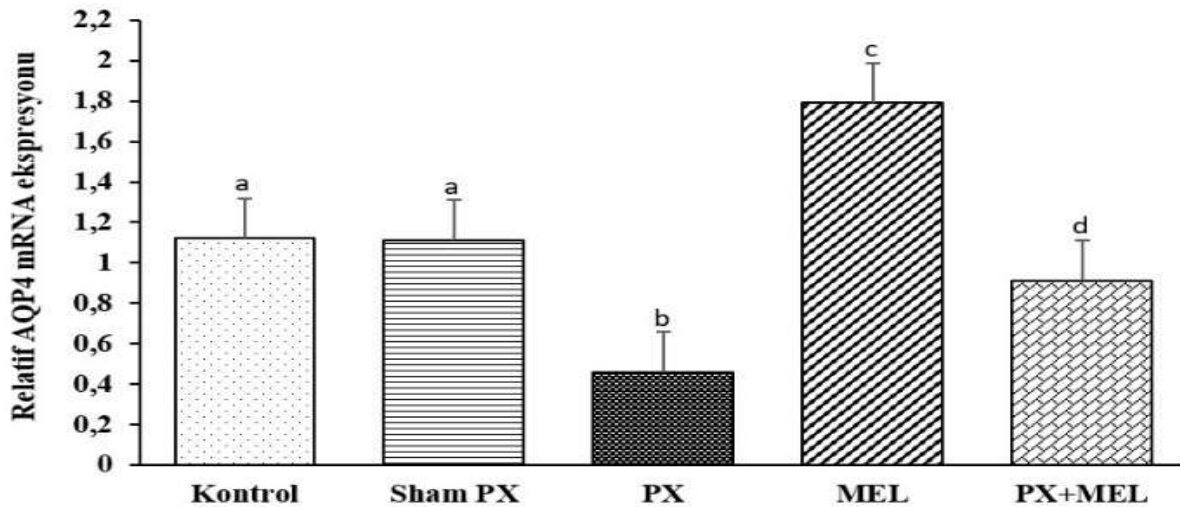
Araştırmanın Sınırlılıkları

Bu çalışmada araştırma projesinin bütçe yetersizliği sebebi ile beyinde bulunan diğer su kanalları değerlendirilemedi, glenfatik sistemde en çok etkin olduğuna inanılan iki su kanalı (AQP1 ve AQP4) düzeyleri değerlendirildi.

BULGULAR

AQP4 mRNA Ekspresyonu Bulguları

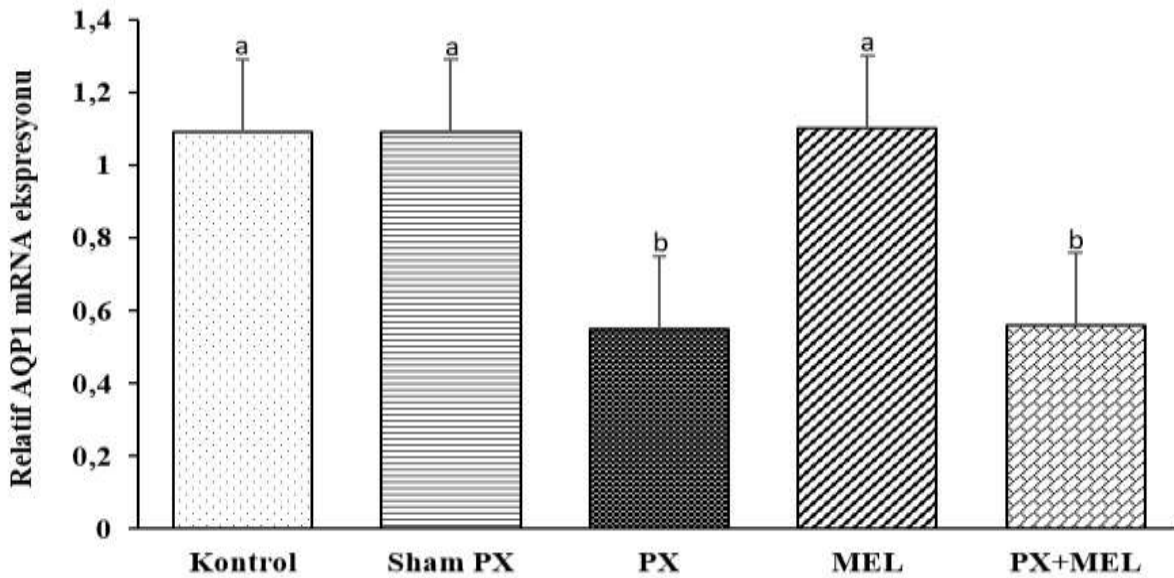
Otuz günlük ip eksojen MEL tedavisinin beyindeki AQP4 mRNA ekspresyonları üzerindeki etkisi Şekil 2’de sunuldu. Çalışmadaki gruplar karşılaştırıldığında Kontrol ve Sham PX grupları arasında AQP4 seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi. PX cerrahi grubunda (PX grubu) AQP4 mRNA seviyesi diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdi ($p<0.001$). Diğer gruplarla karşılaştırıldığında 10 mg ip eksojen MEL verilen MEL grupta AQP4 mRNA ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı görüldü ($p<0.001$). PX cerrahisi uygulanan ve aynı zamanda eksojen MEL tedavisi uygulanan (PX+MEL) grubun AQP4 mRNA ekspresyonunun PX grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme gösterdiği tespit edildi ($p<0.001$).



Şekil 2. Pinealektomi (PX) ve Melatonin (MEL) Uygulamalarının AQP4 mRNA Ekspresyonu Üzerindeki Etkileri. Farklı harflerle işaretlenmiş gruplar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($p<0.001$).

AQP1 mRNA Ekspresyonu Bulguları

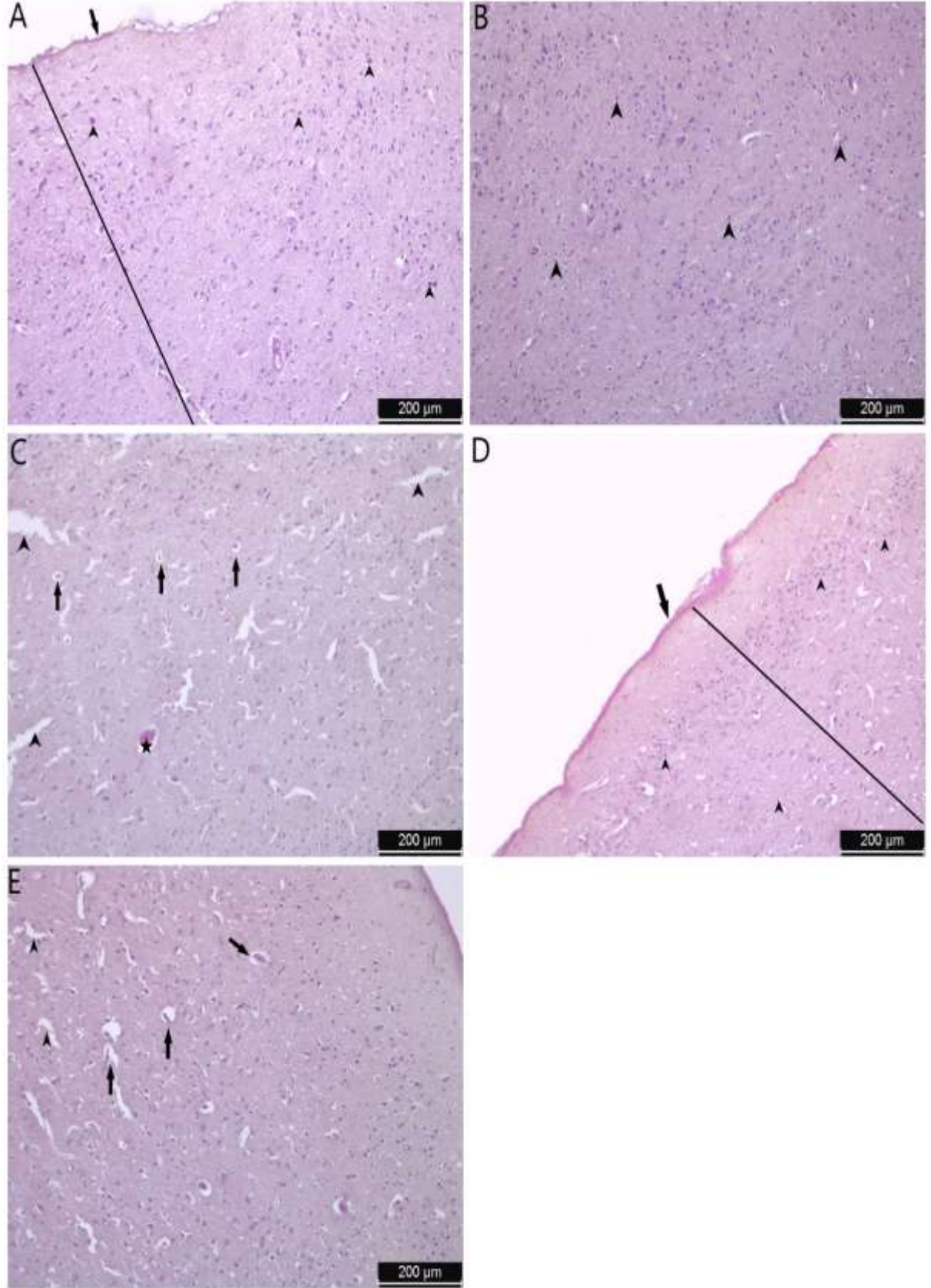
Otuz günlük ip eksojen MEL tedavisinin beyindeki AQP1 mRNA ekspresyonları üzerindeki etkisi Şekil 3'te sunuldu. Çalışmadaki gruplar karşılaştırıldığında Kontrol, Sham PX ve MEL grupları arasında AQP1 seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi. PX cerrahisi yapılarak MEL yoksunluğu oluşturulmuş (PX grup) gruptaki sıçanların AQP1 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p<0.001$). Ancak sadece PX cerrahisi yapılan grubun (PX grup) AQP1 seviyeleri ile PX cerrahisinin yanında MEL tedavisi verilen grubun (PX+MEL grup) AQP1 seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi.



Şekil 3. Pinealektomi (PX) ve Melatonin (MEL) Uygulamalarının AQP1 mRNA Ekspresyonu Üzerindeki Etkileri. Farklı harflerle işaretlenmiş gruplar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($p<0.001$).

Hematoksilen- Eozin Boyama Sonuçları

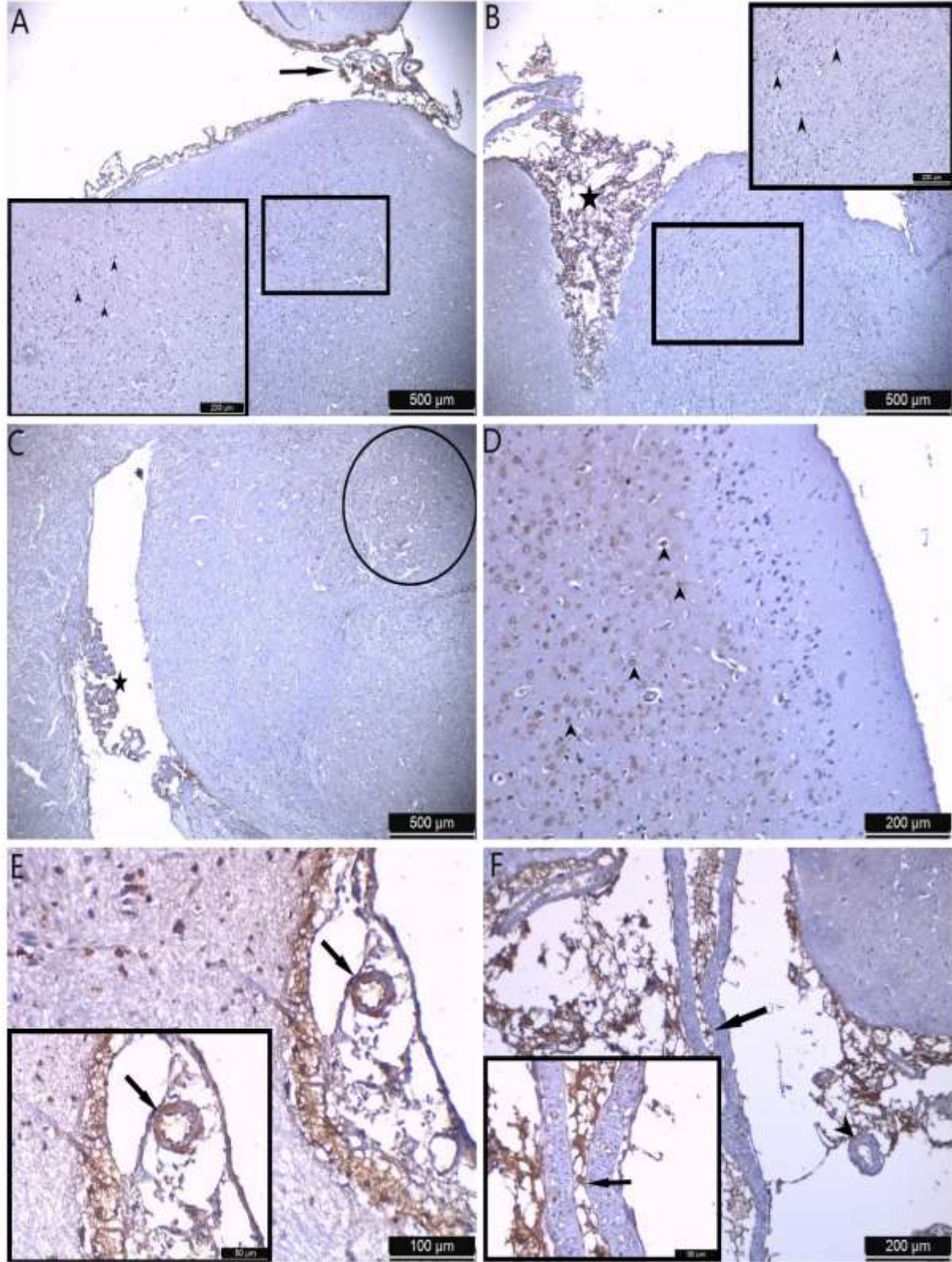
Grupların tümüne uygulanan Hematoksilen-Eozin boyaması sonucunda, grupların tümünde beyin bölümleri ve tabakalarının ayrımı yapılabildi (Şekil 4A-E). PX ve PX+MEL grupları dışındaki bütün beyin dokuları normal histolojik görüntü sergilediler (Şekil 4A, 4B ve 4D). PX grubunda perinöronal vakuolizasyon, geniş dejenere alanlar ve hemorajik alanlar gözlemlendi (Şekil 4C). PX+MEL grubunda ise perinöronal vakuolizasyon gösteren hücre sayısının azaldığı, dejenere alanların küçüldüğü, genel yapının PX grubuna göre daha iyi bir görünüm sergilediği tespit edildi (Şekil 4E).



Şekil 4. Hx E boyaması yapılan beyin dokularında genel görüntü. (A: Kontrol, ok: pia mater, siyah çizgi: serebral korteks, ok başları: serebral kortekse ait hücrelerin çekirdekleri B: Sham, ok başları: serebral kortekse ait hücrelerin çekirdekleri C: PX, ok: perinöronal vakuolizasyon, asteriks: hemorajik alanlar, ok başları: dejenere alanlar D: MEL, ok: pia mater, siyah çizgi: serebral korteks E: PX+MEL ok: perinöronal vakuolizasyon, ok başları: küçülmüş dejenere alanlar)

AQP1 ile Yapılan İmmunohistokimyasal Boyama Sonuçları

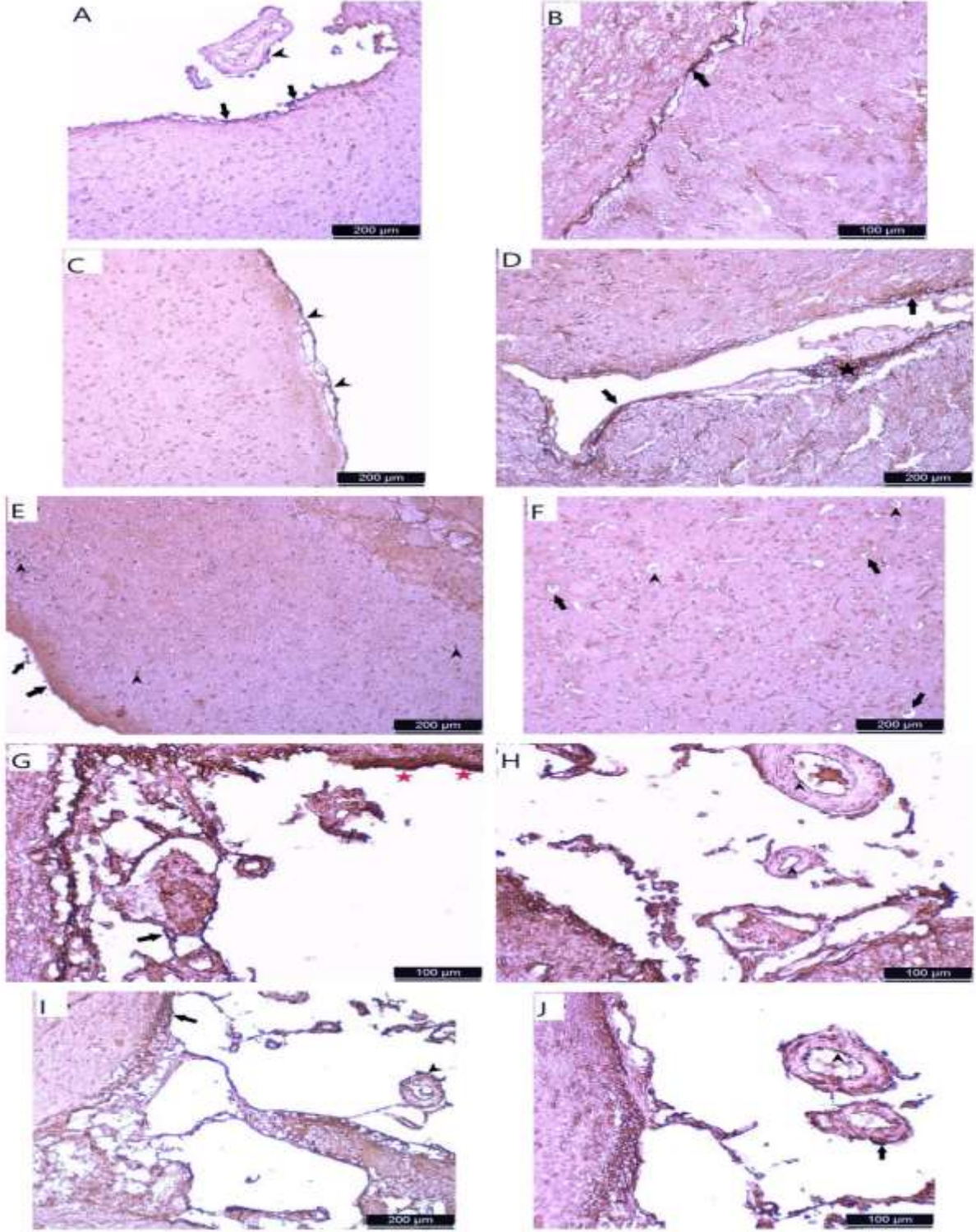
AQP1 ile yapılan immunohistokimyasal boyama sonucunda bütün gruplara ait beyin dokularında pozitif reaksiyon gözlemlendi. Kontrol ve Sham gruplarında birbirine benzer şekilde (Şekil 5A ve B) koroid pleksusta yoğunlaşmış, beyin dokusu genelinde ise oldukça az sayıda hücrede immun pozitivite görüldü. BOS yapımının ve geri emiliminin yapıldığı alanlar olarak ve literatüre uyumlu şekilde bu bölgede görülen pozitivite normal kabul edildi. PX grubunda ise, koroid pleksusa yerleşmiş hücrelerde pozitivite görülürken, buna ek olarak beyin korteksinde sınırlı alanlarda (Şekil 5C) immun pozitif hücreler de görüldü. MEL grubunda koroid pleksusta immun pozitivite gösteren hücreler oldukça kuvvetli idi. Buna ek olarak serebral korteksin moleküler katmanının altında yerleşmiş tüm alanlarda yaygın ancak zayıf immun tutulum gösteren hücreler vardı. Moleküler katmanda lokalize hücrelerde immun tutulum olmadığı dikkat çekiciydi (Şekil 5D). Ventrikül duvarını döşeyen ependim hücrelerinde immun reaksiyon belirgindi. Ek olarak damar duvarını oluşturan endotel hücrelerde tutulum olmazken, tunika media'da immun pozitivite görüldü (Şekil 5E). Son olarak PX+MEL grubuna ait kesitlerde koroid pleksus'un boyanma yoğunluğunun MEL grubuna göre belirgin şekilde azalmış olduğu görüldü. Serebral korteksin genelinde tek tük hücrede pozitiflik belirlenirken, damar duvarlarında ya da damarların iç yüzünde immun pozitif hücreye rastlanmadı (Şekil 5F).



Şekil 5. AQP1 Antikoru ile Boyama. (A: Kontrol, ok: koroid pleksus'ta immunpozitif reaksiyon; ok başları: immunpozitif hücrelerin çekirdekleri, B: Sham, yıldız: koroid pleksus'ta immunpozitif reaksiyon; ok başları: immunpozitif hücrelerin çekirdekleri, C: PX, yıldız: koroid pleksus'ta kontrol ve sham gruplarına göre azalmış immunpozitif reaksiyon; daire: lokal immunpozitivite, D: MEL, ok başları: nöronlarda pozitif immun reaksiyon, doku genelinde yaygın ancak zayıf reaksiyon görülüyor, E: MEL, ok: damar duvarında immun pozitif reaksiyonu işaret ediyor, F: PX+MEL, ok: koroid pleksus'ta immunpozitif reaksiyon gösteren hücreler; ok başı: damar duvarında herhangi bir pozitif reaksiyon görülüyor.)

AQP4 ile Yapılan İmmunohistokimyasal Boyama Sonuçları

AQP4 proteininin beyindeki dağılımını gözlemlemek için immunohistokimya boyaması yapıldı. Boyama sonucunda bütün gruplara ait beyin dokularında pozitif reaksiyon gözlemlendi. Sonuçlar, MEL grubunda AQP4 proteininin dağılımının, PX grubuna kıyasla açıkça arttığını gösterdi. Tüm gruplarda pia mater hattı boyunca AQP4 boyanmasının belirgin olduğu ancak eksojen MEL uygulanan grupta boyama yoğunluğunun belirgin şekilde arttığı görüldü. Özellikle moleküler katmanda yer alan hücrelerin AQP4 ile diğerlerine göre daha yoğun boyandığı görüldü ve bu durum tüm gruplarda gözlemlendi. Kontrol grubunda pia mater hattı, ventriküler sınır hücreleri, endotel hücreleri ve perivasküler hücrelerde boyanma yoğunluğunun düşük olduğu görüldü (Şekil 6A). Sham grubunda ventrikül sınırındaki endotel hücre hattında boyanmanın eksojen MEL uygulanan gruba göre daha az olduğu gözlemlendi. Ancak ventrikülleri çevreleyen endotel hücre hattındaki immün reaksiyon yoğunluğu kontrol grubuna göre daha yüksekti (Şekil 6B). Pozitif boyalı AQP4 hücreleri, eksojen MEL kullanılan gruba kıyasla önemli ölçüde daha azdı (Şekil 6C). PX grubunda pia mater hattı, perivasküler doku ve endotel hücrelerinde boyanmanın yoğunluğunun daha düşük olması, MEL yokluğunda AQP4 su kanallarının aktivasyonunda ciddi bir azalma olduğunu gösterdi. Buna rağmen koroid pleksus, anti AQP4 antikoruna pozitif reaksiyon gösterdi (Şekil 6D). Moleküler katmanda AQP4 immün boyası ile pozitif reaksiyona giren hücrelerin sayısında da artış vardı (Şekil 6E). Bu grupta perinöronal ödem gösteren nöronların olduğu görüldü (Şekil 6F). MEL grubunda, pleksus koroideus boyunca uzanan hücrelerde (Şekil 6G) ve lateral ventrikül duvarını sınırlayan endotel hücre hattında (Şekil 6H) yoğun boyanmanın olduğu gözlemlendi. PX+MEL grubunda, perivasküler astrositlerde, endotel hücrelerinde, pleksus koroideusta ve ventrikül duvarını kaplayan hücrelerde (Şekil 6I-J) PX grubuna kıyasla güçlü immün reaksiyonlar gözlemlendi. İmmün reaksiyonun şiddeti MEL grubuna göre daha zayıftı.



Şekil 6. AQP4 Antikoru ile Boyama (A: Kontrol, oklar: ventriküler hatta düşük yoğunluklu AQP4 immün reaktivitesi, ok başı: perivasküler düşük yoğunluklu AQP4 immunreaktivite, B: Kontrol, ok: düşük yoğunluklu pozitiflik gösteren endepimal hücre çizgisi, C: Sham, ok: AQP4 için düşük yoğunluklu boyama, D: PX, oklar: Ventriküllerin AQP4 pozitif immünoreaktif hücreleri yıldız: koroid pleksusta pozitif reaksiyon, E: PX, oklar: Pia mater'de düşük yoğunluklu immün reaksiyon ok başları: moleküler hücre katmanında pozitif reaksiyon gösteren hücreler, F: PX, oklar: perinöronal ödem gösteren nöronlar ok başları: nöronal dejenerasyon, G: MEL, ok: AQP4 ile immün boyama için pozitif reaksiyon gösteren bir astrosit kırmızı yıldız: lateral ventrikülü kaplayan hücrelerin yüksek yoğunlukta boyanması H: MEL, ok başları: endotel hücrelerinin çok yüksek yoğunlukta boyanması, I: PX+MEL, ok: pia materde güçlü immün reaksiyon ok başı: Güçlü bir pozitif reaksiyona sahip perivasküler yerleşimli astrosit, J: PX+MEL, ok: perivasküler dokuda güçlü immün reaksiyon ok başı: endotelde güçlü pozitif reaksiyon)

TARTIŞMA

Glenfatik sistemin işleyişi, uyku sırasındaki BOS infiltrasyonu ile metabolik atıkları beyinden uzaklaştırmayı sağlayan BOS dolaşımı arasındaki ilişkiye dayanmaktadır (Chong, Garic, Shen, Lundgaard ve Schwichtenberg, 2022; de Laurentis vd., 2021). Bu yüzden koroid pleksus epitelinde ifade edilen ve BOS üretiminden sorumlu olan AQP1 ile beyin-BOS ve kan-beyin bariyerinde bol miktarda ifade edilen ve osmoregülasyona katılan AQP4, glenfatik sistem ile yakından ilişkilidir (King ve Agre, 1996; Manley vd., 2000). Bununla birlikte, son çalışmalar BOS ve interstisyel sıvı dağılımının sirkadiyen ritmin kontrolü altında olduğunu ileri sürmektedir.

Bu çalışmada sirkadiyen ritmi düzenleyen MEL'in yoksunluğunun (PX) ve eksojen MEL tedavisinin, AQP4 ve AQP1 ile ilişkisi araştırıldı. Spontan hipertansif sıçanların beyinde AQP1 ve AQP4'ün ekspresyonunun araştırıldığı bir çalışmada AQP1 ve AQP4'ün ifadesinde artış tespit edilmiş ve bu artışın kan beyin bariyerlerindeki ve/veya kan-BOS bariyerindeki sıvı değişimini düzenleyebileceği ileri sürülmüştür (Tomassoni, Bramanti ve Amenta, 2010). Cerrahi olarak 6 hastadan elde edilen beyin kontüzyonu ile ilişkili beyin ödemi dokusunda AQP1 ve AQP4'ün ifadesinin araştırıldığı bir çalışmada, ödemli doku ve çevresinde bulunan astrositlerde AQP1 ve AQP4'ün güçlü bir şekilde ifade edildiği gösterilmiştir. Bu güçlü ifade, hasarlı dokudaki su giriş çıkışının düzenlenmesi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Suzuki vd., 2006). Ancak sıçanlarda AQP4'ün TGN-020 ile inhibisyonunun serebral iskemi sonrası oluşan ödem üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmada, AQP4'ün inhibisyonu ile ödemin azaldığı ve fonksiyonel iyileşmenin sağlandığı ileri sürülmektedir. Bu çalışmanın sonucunda AQP4'ün patolojinin ilk aşamasında hücrel ödeme oluşumuna neden olduğu fakat yaralanma sonrası dönemde ödemin ortadan kaldırılmasında hayati bir rol oynadığı tespit edilmiştir (Sun vd., 2022). Sıçanlarda global serebral iskemik ödem takiben AQP4 ve AQP1 ekspresyonundaki zamana bağlı değişikliklerin araştırıldığı başka bir çalışmada ise AQP4 ekspresyon düzeylerinde değişiklik görülmezken AQP1 ekspresyon düzeylerinde 24. saatteki azalma iskemi sonrası koroid pleksustaki nekroz ile ve 48. saatteki artış ise koroid pleksustaki iyileşme ile ilişkilendirilmiştir (Akdemir, Kaymaz, Gursoy-Özdemir, Akalan ve Akdemir, 2016). Yapılan diğer bir çalışmada farelerde AQP4'ün genetik olarak silinmesi beyin su içeriğinde ve interstisyel sıvı hacminde artış ve ventriküler hacimde azalma ile sonuçlanmıştır (Gomolka vd., 2023). Koroid pleksus epitelinde AQP1'in bloke edilmesinin ise BOS üretimini azalttığı gösterilmiştir. Bu durum fizyolojik koşullarda istenmeyen bir durum olsa da AQP1'in aşağı regülasyonu, kafa içi basıncının artması ve/veya BOS'un zayıf drenajı ile ilişkili bazı

nörolojik bozukluklara karşı koruyucu olabilir (Nabiuni, Nazari, Safaeinejad, Delfan ve Miyan, 2013). AQP1 ile ilgili çalışmalardan elde edilen veriler, AQP1'in aynı zamanda kapılı bir iyon kanalı olarak katkıda bulunabileceğini ve AQP1 aracılı iyonik iletkenliğin BOS salgısının düzenlenmesi için fizyolojik öneme sahip olduğunu göstermektedir (Channels, 2005). Deneysel olarak AQP4 eksikliği ve vazojenik ödem patolojisi oluşturulmuş farelerde artmış beyin şişmesi daha kötü bir sonuca sahiptir, çünkü bu patolojik durumda ödem çözünürlüğü için AQP4'ün gerekli olduğu bildirilmiştir (Papadopoulos, Manley, Krishna ve Verkman, 2004). Hatta AQP4 eksikliği olan farelerin sporadik oranlarda spontan hidrosefali sergilediği rapor edilmiştir (Feng vd., 2009). Çalışmalar, AQP4 eksikliği olan hayvanların, ileri evre merkezi sinir sistemi hasarında kontrol hayvanlarına göre daha yüksek merkezi sinir sistemi su içeriği seviyeleri gösterdiğini ortaya koymuştur (Yates, 2020). İnatçı epilepsi hastalarının anterior temporal neokorteksinin cerrahi örneklerinde AQP1 ekspresyonunun araştırıldığı bir çalışmada yüksek AQP1 ekspresyonu tespit edilmiştir. Ancak astrositlerin AQP1 ekspresyonundaki artışın inatçı epilepsi için neden ya da sonuç olduğu kesinlik kazanmamıştır (Zhou, Sun, Liu, Wang ve Liu, 2008). Yapılan başka bir çalışmada ise Alzheimer'ın erken dönemi ile ilişkili olan sülfatid eksikliği koşulları altında AQP4'ün önemli ölçüde arttığı, diğer ana beyin akuaporinlerinden AQP1'in ise değişmediği ortaya konmuştur (Palavicini vd., 2022).

Çalışmamızda kontrol, sham PX ve MEL gruplarının AQP1 seviyelerinin karşılaştırılmasında bu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi. MEL yoksunluğu (PX cerrahisi) AQP1 seviyesini düşürdü. Ancak PX cerrahisinin yanında MEL tedavisi verilen grupta AQP1 seviyelerinde sadece PX cerrahisi yapılan gruba göre anlamlı bir artış gözlenmedi. Çalışmamızda kontrol ve sham PX grubu AQP4 seviyelerinin karşılaştırılmasında bu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ancak PX cerrahisi yapılan gruptaki (PX grubu) sıçanların AQP4 protein seviyesinin diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdiği bulundu. MEL yoksunluğu olan sıçanlarda tespit edilen AQP4 protein seviyesindeki azalma, kan-beyin bariyerindeki su geçirgenliğinde ve paravasküler BOS-interstisyel sıvı değişiminde bir aksaklık olabileceğini düşündürmektedir. Oysa glenfatik sistemin çalışması için sıvı geçirgenliğinin ve değişiminin fizyolojik sınırlarda devam etmesi önemlidir.

Önceki çalışmalarda uyku sırasında uyanıklığa kıyasla glenfatik sistemin atık ürünlerinin daha verimli bir şekilde temizlediği (Demiral vd., 2019), uyanık beyin sınırlı glenfatik aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir. Hatta uyanık fareler üzerinde yapılan bir çalışmada glenfatik akışın sirkadiyen ritmin kontrolü altında olmadığı tespit edilmiştir (Hablitz vd.,

2020b; Han vd., 2023; Xie vd., 2013). Kronik uyku bozukluğu fare modelinde glenfatik klirensin işlevsel bir düzenleyicisi olan AQP4'ün patofizyolojik rollerini araştıran bir çalışmada, AQP4'ün silinmesinin beyinde glenfatik taşınmanın bozulmasına ve Alzheimer Hastalığında görülen β -amiloid ve Tau proteinlerinin birikmesine neden olduğu gösterilmiştir (Zhang vd., 2020). Ayrıca BOS dağılımının sirkadiyen kontrol altında olduğu ve AQP1 ve AQP4'ün fizyolojik koşullar altında BOS ve intraserebral sıvı homeostazında merkezi roller aldığı bilinmektedir (Szczygielski, Kopańska, Wysocka ve Oertel, 2021b).

MEL'in sirkadiyen ritim düzenleyicisi olarak glenfatik sisteme desteği üzerine yapılan çalışmalar değerlendirilmiş ve MEL'in hem sirkadiyen ritmi düzenlediği hem de PVS'den geçişi kolaylaştırdığı varsayılmıştır (Reiter vd., 2023). Pineal bezde üretilen MEL'in doğrudan üçüncü ventriküle salındığına ve astrositler ile glial hücrelerde MEL bulunduğuna dair kanıtlar vardır (Tan, C Manchester, Sanchez-Barcelo, D Mediavilla ve J Reiter, 2010). Bazı kanıtlar MEL'in BOS'tan spesifik olarak uzaklaştırılmasının fizyolojik etkilerini bozduğunu göstermektedir (Tricoire, Moller, Chemineau ve Malpoux, 2003). Buna ek olarak, başka bir çalışma BOS'un MEL'in epifiz bezinden beyin dokusuna, özellikle de beynin periventriküler bölgelerine taşınması için merkezi bir yol olarak rol oynadığını göstermiştir (Legros, Chesneau, Boutin, Barc ve Malpoux, 2014). Yapılan önceki çalışmalar, depresyon modellerinde glenfatik fonksiyondaki bozukluğun azalmış astrosit sayıları ve AQP4 polarizasyon kaybı ile birlikte ortaya çıktığını göstermiştir. MEL tedavisinin astrosit sayısını ve AQP4 polarizasyonunu koruduğu, dolayısıyla glenfatik sistemin akış ve çıkış işlevleri de dahil olmak üzere temel yapısını ve işlevini restore ettiği ve glenfatik sistemin sirkadiyen ritminin kısmen kortikal astrositlerdeki AQP4 perivasküler vasküler polarizasyon tarafından düzenlendiği ileri sürülmektedir (Hablitz vd., 2020b; Liu vd., 2020; Yao vd., 2023).

Çalışmamızda eksojen MEL verilen sıçanlarda (MEL grup) AQP4 seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı görüldü. PX cerrahisi uygulanan ve aynı zamanda eksojen MEL tedavisi uygulanan (PX+MEL) grubun AQP4 seviyelerinin PX grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği tespit edildi. Yüksek AQP4 yoğunluğu, suyun koroid pleksus stromasının içine ve dışına taşınmasını kolaylaştırabilir ve merkezi sinir sistemindeki metabolitler için bir drenaj ve temizleme yolu olarak hizmet edebilir (Mack, Bihlmaier ve Deffner, 2023). MEL'in buradaki olası olumlu etkisi, AQP4 polarizasyon kaybını engellemesi, kan-beyin bariyerinden su geçirgenliğini ve paravasküler BOS-interstisyel sıvı değişimini fizyolojik sınırlara taşınması şeklinde yorumlanabilir. Akuaporinler serebral ödemin oluşmasında veya çözülmesinde önemli bir role sahiptir (Manley vd., 2000). Başka bir deyişle,

AQP4 protein seviyesindeki artış vazojenik beyin ödeminin oluşumunu engeller ve ödemin vazojenik bileşeninin temizlenmesine katkıda bulunur. Akut omurilik hasarı olan farelerde kan-omurilik bariyerinin bozulmasına karşı MEL'in etkinliğini araştıran bir çalışmada, MEL'in mikrovasküler bariyer fonksiyonunu ve omurilik hasarının mikrosirkülasyonunu stabilize edebileceği ve hasarlı kan-omurilik bariyerinin onarımını teşvik edebileceği öne sürülmüştür (Wu vd., 2014). Küçükbaş hayvanlarda yapılan bir çalışmada ise MEL'in hayvan koroid pleksusunda transselüler su taşınımında rol oynayan akuaporinlerin ekspresyonunu arttırdığı rapor edilmiştir (Szczepkowska, Kowalewska ve Skipor, 2019).

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma ile hızlı su taşınmasını sağlayan ve ventriküllerdeki BOS'u düzenleyen su kanallarından AQP4 ifadesinin MEL uygulaması ile önemli ölçüde arttığına, AQP1 ifadesinin ise değişmediğine dair RT-PCR ve immünohistokimyasal kanıtlar sağladık. Bu bulgular, MEL yoksunluğunda beyindeki AQP4 seviyelerinin önemli ölçüde azaldığını ancak eksojen MEL uygulamasının AQP4 protein ekspresyonunu artırarak taşıma ve atık eliminasyonu ile BOS-interstisyel sıvısı düzenlemesini sağlayan glenfatik sistemin sürdürülmesi için umut verici bir ajan olarak kullanılabilceğini göstermektedir.

Not

Bu proje Karabük Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: KBÜBAP-22-KP-144).

KAYNAKLAR

- Abbott, N. J., Pizzo, M. E., Preston, J. E., Janigro, D. ve Thorne, R. G. (2018). The role of brain barriers in fluid movement in the CNS: Is there a 'glymphatic' system? *Acta neuropathologica*, 135(3), 387-407.
- Akdemir, G., Kaymaz, F., Gursoy-Özdemir, Y., Akalan, N. ve Akdemir, E. S. (2016). The time course changes in expression of aquaporin 4 and aquaporin 1 following global cerebral ischemic edema in rat. *Surgical Neurology International*, 7.
- Arciénega, I., Brunet, J., Bloch, J. ve Badaut, J. (2010). Cell locations for AQP1, AQP4 and 9 in the non-human primate brain. *Neuroscience*, 167(4), 1103-1114.
- Bèchet, N. B., Shanbhag, N. C. ve Lundgaard, I. (2021). Glymphatic pathways in the gyrencephalic brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 41(9), 2264-2279.
- Bonsall, D. R. ve Lall, G. S. (2013). Protein kinase C differentially regulates entrainment of the mammalian circadian clock. *Chronobiology International*, 30(4), 460-469.
- Channels, I. A. W. (2005). Physiological roles of aquaporins in the choroid plexus. *Current topics in Developmental Biology*, 67, 181.
- Chong, P. L., Garic, D., Shen, M. D., Lundgaard, I. ve Schwichtenberg, A. J. (2022). Sleep, cerebrospinal fluid, and the glymphatic system: A systematic review. *Sleep Medicine Reviews*, 61, 101572.

- De Laurentis, C., Cristaldi, P., Arighi, A., Cavandoli, C., Trezza, A., Sganzerla, E. P., ...Di Cristofori, A. (2021). Role of aquaporins in hydrocephalus: what do we know and where do we stand? A systematic review. *Journal of Neurology*, 268, 4078-4094.
- Demiral, Ş. B., Tomasi, D., Sarlls, J., Lee, H., Wiers, C. E., Zehra, A., ...Freeman, C. R. (2019). Apparent diffusion coefficient changes in human brain during sleep—Does it inform on the existence of a glymphatic system? *Neuroimage*, 185, 263-273.
- Feng, X., Papadopoulos, M. C., Liu, J., Li, L., Zhang, D., Zhang, H., ...Ma, T. (2009). Sporadic obstructive hydrocephalus in Aqp4 null mice. *Journal Of Neuroscience Research*, 87(5), 1150-1155.
- Filippidis, A. S., Carozza, R. B. ve ReKate, H. L. (2016). Aquaporins in brain edema and neuropathological conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 55.
- Gheban, B.-A., Colosi, H. A., Gheban-Rosca, I.-A., Pop, B., Domşa, A.-M. T., Georgiu, C., ...Crişan, M. (2021). Age-Related Changes of the Pineal Gland in Humans: A Digital Anatomo-Histological Morphometric Study on Autopsy Cases with Comparison to Predigital-Era Studies. *Medicina (B Aires)*, 57(4), 383.
- Goldman, N., Hablitz, L. M., Mori, Y. ve Nedergaard, M. (2020). The glymphatic system and pain. *Medical Acupuncture*, 32(6), 373-376.
- Gomolka, R. S., Hablitz, L. M., Mestre, H., Giannetto, M., Du, T., Hauglund, N. L., ...Nedergaard, M. (2023). Loss of aquaporin-4 results in glymphatic system dysfunction via brain-wide interstitial fluid stagnation. *Elife*, 12, e82232.
- Hablitz, L. M., Plá, V., Giannetto, M., Vinitsky, H. S., Stæger, F. F., Metcalfe, T., ...Nedergaard, M. (2020a). Circadian control of brain glymphatic and lymphatic fluid flow. *Nat Commun*, 11(1), 1-11.
- Hablitz, L. M., Plá, V., Giannetto, M., Vinitsky, H. S., Stæger, F. F., Metcalfe, T., ...Nedergaard, M. (2020b). Circadian control of brain glymphatic and lymphatic fluid flow. *Nature Communications*, 11(1), 4411.
- Han, G., Zhou, Y., Zhang, K., Jiao, B., Hu, J., Zhang, Y., ...Bai, R. (2023). Age-and time-of-day dependence of glymphatic function in the human brain measured via two diffusion MRI methods. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 15, 1173221.
- Iiliff, J. J., Wang, M., Liao, Y., Plogg, B. A., Peng, W., Gundersen, G. A., ...Goldman, S. A. (2012). A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Science Translational Medicine*, 4(147), 147ra111-147ra111.
- J Reiter, R., Tan, D.-X., Rosales-Corral, S. ve C Manchester, L. (2013). The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. *Mini Rev Med Chem*, 13(3), 373-384.
- Jessen, N. A., Munk, A. S. F., Lundgaard, I. ve Nedergaard, M. (2015). The glymphatic system: a beginner's guide. *Neurochemical Research*, 40(12), 2583-2599.
- Kim, J. G., Son, Y. J., Yun, C. H., Kim, Y. I., Nam-Goong, I. S., Park, J. H., ...Damante, G. (2007). Thyroid transcription factor-1 facilitates cerebrospinal fluid formation by regulating aquaporin-1 synthesis in the brain. *Journal of Biological Chemistry*, 282(20), 14923-14931.
- King, L. S.ve Agre, P. (1996). Pathophysiology of the aquaporin water channels. *Annual Review of Physiology*, 58(1), 619-648.
- Legros, C., Chesneau, D., Boutin, J. A., Barc, C. ve Malpoux, B. (2014). Melatonin from cerebrospinal fluid but not from blood reaches sheep cerebral tissues under physiological conditions. *Journal of Neuroendocrinology*, 26(3), 151-163.
- Li, W., Chen, D., Liu, N., Luan, Y., Zhu, S.ve Wang, H. (2022). Modulation of lymphatic transport in the central nervous system. *Theranostics*, 12(3), 1117.

- Liu, X., Hao, J., Yao, E., Cao, J., Zheng, X., Yao, D., ...Luo, X. (2020). Polyunsaturated fatty acid supplement alleviates depression-incident cognitive dysfunction by protecting the cerebrovascular and glymphatic systems. *Brain, Behavior, and Immunity*, 89, 357-370.
- Livak, K. J. ve Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Mack, A. F., Bihlmaier, R. ve Deffner, F. (2023). Shifting from ependyma to choroid plexus epithelium and the changing expressions of aquaporin-1 and aquaporin-4. *The Journal of Physiology*, 1-14.
- Magdoom, K. N., Brown, A., Rey, J., Mareci, T. H., King, M. A. ve Sarntinoranont, M. (2019). MRI of whole rat brain perivascular network reveals role for ventricles in brain waste clearance. *Sci Rep*, 9(1), 1-11.
- Manley, G. T., Fujimura, M., Ma, T., Noshita, N., Filiz, F., Bollen, A. W., ...Verkman, A. (2000). Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nature medicine*, 6(2), 159-163.
- Matsubara, E., Bryant-Thomas, T., Pacheco Quinto, J., Henry, T. L., Poeggeler, B., Herbert, D., ...Perry, G. (2003). Melatonin increases survival and inhibits oxidative and amyloid pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 85(5), 1101-1108.
- Meyerholz, D. K. ve Beck, A. P. (2018). Principles and approaches for reproducible scoring of tissue stains in research. *Laboratory Investigation*, 98(7), 844-855.
- Mobasheri, A., Airley, R., Hewitt, S. M. ve Marples, D. (2005). Heterogeneous expression of the aquaporin 1 (AQP1) water channel in tumors of the prostate, breast, ovary, colon and lung: A study using high density multiple human tumor tissue microarrays. *International Journal of Oncology*, 26(5), 1149-1158.
- Mogensen, F. L.-H., Delle, C. ve Nedergaard, M. (2021). The glymphatic system (En) during Inflammation. *Int J Mol Sci*, 22(14), 7491.
- Nabiuni, M., Nazari, Z., Safaeinejad, Z., Delfan, B. ve Miyan, J. A. (2013). Curcumin downregulates aquaporin-1 expression in cultured rat choroid plexus cells. *Journal of Medicinal Food*, 16(6), 504-510.
- Nielsen, S., Nagelhus, E. A., Amiry-Moghaddam, M., Bourque, C., Agre, P. ve Ottersen, O. P. (1997). Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *Journal of Neuroscience*, 17(1), 171-180.
- Nycz, B. ve Mandra, M. (2021). The features of the glymphatic system. *Autonomic Neuroscience*, 232, 102774.
- Palavicini, J. P., Ding, L., Pan, M., Qiu, S., Wang, H., Shen, Q., ...Han, X. (2022). Sulfatide deficiency, an early Alzheimer's lipidomic signature, causes brain ventricular enlargement in the absence of classical neuropathological hallmarks. *International journal of Molecular Sciences*, 24(1), 233.
- Papadopoulos, M. C., Manley, G. T., Krishna, S. ve Verkman, A. (2004). Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *The FASEB Journal*, 18(11), 1291-1293.
- Paulose, J. K., Peters, J. L., Karaganis, S. P. ve Cassone, V. M. (2009). Pineal melatonin acts as a circadian zeitgeber and growth factor in chick astrocytes. *Journal of Pineal Research*, 46(3), 286-294.
- Plog, B. A. ve Nedergaard, M. (2018). The glymphatic system in central nervous system health and disease: past, present, and future. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 13, 379-394.
- Quintela, T., Furtado, A., Duarte, A. C., Gonçalves, I., Myung, J. ve Santos, C. R. (2021). The role of circadian rhythm in choroid plexus functions. *Prog Neurobiol*, 205, 102129.
- Qureshi, F., Kung, P., Hou, W., Collins III, W. F. ve Sisto, S. A. (2022). Serial transurethral cystometry: A novel method for longitudinal evaluation of reflex lower urinary tract function in adult female rats. *Physiol Rep*, 10(1), e15131.

- Reddy, O. C. ve van der Werf, Y. D. (2020). The sleeping brain: harnessing the power of the glymphatic system through lifestyle choices. *Brain Sciences*, 10(11), 868.
- Reiter, R. J., Sharma, R., Cuciello, M. S., Tan, D. X., Rosales-Corral, S., Gancitano, G. ve de Almeida Chuffa, L. G. (2023). Brain washing and neural health: Role of age, sleep, and the cerebrospinal fluid melatonin rhythm. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 80(4), 88.
- Richardson, G. S. (2005). The human circadian system in normal and disordered sleep. *Journal of Clinical Psychiatry*, 66, 3.
- Samanta, S. (2020). Physiological and pharmacological perspectives of melatonin. *Arch Physiol Biochem*, 1-22.
- Sebti, Y., Hebras, A., Pourcet, B., Staels, B. ve Duez, H. (2022). The Circadian Clock and Obesity. In: *Springer*.
- Soofiyani, S. R., Ahangari, H., Soleimani, A., Babaei, G., Ghasemnejad, T., Safavi, S. E., ... Tarhriz, V. (2021). The role of circadian genes in the pathogenesis of colorectal cancer. *Gene*, 804, 145894.
- Sun, C., Lin, L., Yin, L., Hao, X., Tian, J., Zhang, X., ... Yang, Y. (2022). Acutely inhibiting AQP4 with TGN-020 improves functional outcome by attenuating edema and peri-infarct astrogliosis after cerebral ischemia. *Frontiers in Immunology*, 13, 870029.
- Suzuki, R., Okuda, M., Asai, J., Nagashima, G., Itokawa, H., Matsunaga, A., ... Suzuki, T. (2006). Astrocytes co-express aquaporin-1,-4, and vascular endothelial growth factor in brain edema tissue associated with brain contusion. *Paper presented at the Brain Edema XIII*.
- Szczepkowska, A., Kowalewska, M. ve Skipor, J. (2019). Melatonin from slow-release implants upregulates claudin-2 in the ovine choroid plexus. *J. Physiol. Pharmacol*, 70(2), 249-254.
- Szczygielski, J., Kopańska, M., Wysocka, A. ve Oertel, J. (2021a). Cerebral microcirculation, perivascular unit and glymphatic system: role of Aquaporin-4 as the gatekeeper for water homeostasis. *Front Neurol*, 2270.
- Szczygielski, J., Kopańska, M., Wysocka, A. ve Oertel, J. (2021b). Cerebral microcirculation, perivascular unit, and glymphatic system: role of aquaporin-4 as the gatekeeper for water homeostasis. *Frontiers in Neurology*, 12, 767470.
- Tan, D.-X., C Manchester, L., Sanchez-Barcelo, E., D Mediavilla, M. ve J Reiter, R. (2010). Significance of high levels of endogenous melatonin in Mammalian cerebrospinal fluid and in the central nervous system. *Current Neuropharmacology*, 8(3), 162-167.
- Tomassoni, D., Bramanti, V. ve Amenta, F. (2010). Expression of aquaporins 1 and 4 in the brain of spontaneously hypertensive rats. *Brain Research*, 1325, 155-163.
- Tricoire, H., Moller, M., Chemineau, P. ve Malpoux, B. (2003). Origin of cerebrospinal fluid melatonin and possible function in the integration of photoperiod. *Reproduction-Cambridge-Supplement-*, 311-321.
- Trillo-Contreras, J. L., Toledo-Aral, J. J., Echevarría, M. ve Villadiego, J. (2019). AQP1 and AQP4 contribution to cerebrospinal fluid homeostasis. *Cells*, 8(2), 197.
- Villela, D., Atherino, V. F., Lima, L. d. S., Moutinho, A. A., Amaral, F. G. d., Peres, R., ... Scavone, C. (2013). Modulation of pineal melatonin synthesis by glutamate involves paracrine interactions between pinealocytes and astrocytes through NF- κ B activation. *Biomed Res Int*, 2013.
- Wang, S., Huang, P., Zhang, R., Hong, H., Jiaerken, Y., Lian, C., ... Zeng, Q. (2021). Quantity and Morphology of Perivascular Spaces: Associations With Vascular Risk Factors and Cerebral Small Vessel Disease. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 54(4), 1326-1336.
- Wu, Q., Jing, Y., Yuan, X., Zhang, X., Li, B., Liu, M., ... Xiu, R. (2014). Melatonin treatment protects against acute spinal cord injury-induced disruption of blood spinal cord barrier in mice. *Journal of Molecular Neuroscience*, 54, 714-722.

-
- Xie, L., Kang, H., Xu, Q., Chen, M. J., Liao, Y., Thiyagarajan, M., ...Iliff, J. J. (2013). Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science*, 342(6156), 373-377.
- Yamaguchi, T., Hamada, T., Matsuzaki, T. ve Iijima, N. (2020). Characterization of the circadian oscillator in the choroid plexus of rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 524(2), 497-501.
- Yang, L., Chen, Z., Wan, X., Liu, M., Wu, J., Chen, Y., ...Fan, Z. (2021). Angiotensin II Type 1 receptor deficiency protects against the impairment of blood-brain barrier in a mouse model of traumatic brain injury. *International Journal of Neuroscience* (just-accepted), 1-9.
- Yang, Z., He, Y., Wang, H. ve Zhang, Q. (2021). Protective effect of melatonin against chronic cadmium-induced hepatotoxicity by suppressing oxidative stress, inflammation, and apoptosis in mice. *Ecotoxicol Environ Saf*, 228, 112947.
- Yao, D., Li, R., Hao, J., Huang, H., Wang, X., Ran, L., ...Liu, X. (2023). Melatonin alleviates depression-like behaviors and cognitive dysfunction in mice by regulating the circadian rhythm of AQP4 polarization. *Translational Psychiatry*, 13(1), 310.
- Yates, D. (2020). Targeting transport in CNS oedema. *Nature Reviews Neuroscience*, 21(7), 350-351.
- Zhang, R., Liu, Y., Chen, Y., Li, Q., Marshall, C., Wu, T., ...Xiao, M. (2020). Aquaporin 4 deletion exacerbates brain impairments in a mouse model of chronic sleep disruption. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 26(2), 228-239.
- Zhou, S., Sun, X., Liu, L., Wang, X. ve Liu, K. (2008). Increased expression of aquaporin-1 in the anterior temporal neocortex of patients with intractable epilepsy. *Neurological Research*, 30(4), 400-405.
- Zong, X., Lian, C., Jimenez, J., Yamashita, K., Shen, D. ve Lin, W. (2020). Morphology of perivascular spaces and enclosed blood vessels in young to middle-aged healthy adults at 7T: Dependences on age, brain region, and breathing gas. *Neuroimage*, 218, 116978.