

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GLİKOJENİN İSKEMİK İNME VE RETİNAL İSKEMİ ÜZERİNE
OLAN ETKİLERİNİN NÖROGLİOVASKÜLER SEVİYEDE
İNCELENMESİ**

Dr. Gökhan URUK

**Temel Nörolojik Bilimler Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2020**

TEŞEKKÜR

Hayatının merkezine insanı yerleştirerek ilgili, duyarlı, sabırlı, mutlu ve huzurlu bir bilim insanı-tıp doktoru olabilmek amacıyla çıktığım bu yolculukta; bilgi, tecrübe, güler yüz ile beni aydınlatan, cesaretlendiren, bana olan desteğini esirgemeyen, zihnimi toparlayamadığım her koşulda beni doğru şekilde yönlendiren, sanat ve kahkaha güneşi hocam, değerli danışmanım Prof. Dr. Müge Yemişçi Özkan'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tıp-Doktora Bütünleşik Programı'nın kuruluşunda önemli rol oynayan ve çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü'nün eski müdürü Sayın Prof. Dr. Turgay Dalkara'ya ve müdürü Prof. Dr. Bülent Elibol'a da teşekkür ederim. Bilim insanı kimliği, disiplini ve çalışkanlığı ile örnek aldığım, her dönem esprileriyle bana farklı bir bakış açısı sunan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Hülya Karataş-Kurşun'a, eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Prof. Dr. Emine Eren-Koçak'a, doktora eğitimim sırasında başbaşa çalıştığımız, bitmek tükenmek bilmeyen sorularımı cevaplamaya çalışan, kader ortağım Dr. Sinem Yılmaz Özcan'a, enstitüye gelmeye başladığım günden bugüne bilgi, beceri, tecrübe, güler yüz, sıcaklık, dürüstlük ve dobralığıyla varlığını hep hissettiren, sohbet ederken büyük keyif aldığım Dr. Buket Dönmez Demir'e, Dr. Canan Çakır Aktaş'a, transgenik fareler laboratuvarımıza geldiğinde genotipleme kaosu, o dönemdeki her türlü zorluk, yorgunluk ve sıkıntıda bir tık uzaklıkta yardımıyla bulunan Dr. Çetin Demir'e teşekkür ederim. Varlığıyla güç veren, bilimsel olarak düşüncelerini, deneyimlerini paylaşan, yeri geldiğinde her şekilde beni uyarın, desteğini hiç esirgemeyen Uzm. Dr. Aslıhan Taşkıran'a, Aslıhan Bahadır Varol'a, Dr. Özlem Hökelekli'ye ayrı ayrı teşekkürlerimi sunarım. Başlangıçtan sonuna çalışmanın bilimsel ayağında her türlü soruya ve soruna çözümlerle gelen, iyi bir bilim insanı Dr. Luis Alarcon-Martinez'e, bütün süreçte güler yüzüyle desteğini gördüğüm Dr. Öğretim Üyesi Gül Yalçın Çakmaklı'ya, Doç. Dr. Eda Derle Çiftçi'ye teşekkürlerimi sunarım. Günümüzden itibaren bilim dünyasına ve insanı anlama sürecine anlamlı katkıda bulunacaklarına inandığım meslektaşlarım, yakın arkadaşlarım Dr. Anisa Deghani, Erknaz Ecehan Erk, Gülce Küreli'ye her türlü destek ve güzellik için teşekkür ederim. Ayrıca yarattıkları ortamın eğiticiğinden çok faydalandığım iş arkadaşlarım Dr. Burak Uzay ve Dr. Zeynep Kaya'ya da teşekkür etmeden geçemem. Doktoramın son 1 yılında yakından tanıdığım destekçi, güler yüzlü, içten dert ortağım Gökçe Gürler'e, Dr. Nevin Belder'e, ellerinde bir ordunun marifeti ile her seferinde çalışmalarda günü ve hayatı kırtaran, yeri doldurulamaz teknisyenimiz, mucize adam Mesut Frat'a, bütün yasal prosedürler ve yükümlülükler için olmazsa olmaz destekçimiz, kahve-çay eşliğinde sabah sohbeti koyu, bol kahkahalı Nursel İlikli'ye, bana ve enstitümüze destek vermiş ve vermekte olan sekreterlerimiz Gülay Çevrük'e, Merve Esen'e, Tuğba Santaş'a, Hülya Erener ve laboratuvarımızın birleştiricisi Zafer Akdoğan'a desteklerinden ötürü teşekkür ederim. Tez çalışmamda kullandığımız GYS-1 transgenik fareleri bize bağışlayan IRB Barcelona Enstitüsü'nden Dr. Jordi Duran ve Dr. Joan Guinovart ile glikojen moleküllerini dokuda işaretlememize olanak sağlayan antikorları bağışlayan Dr. Hitoshi Ashida ve Dr. Otto Baba'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu tez çalışmasını destekleyen Hacettepe Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, en zor anda benim ve ailemin yanında bulunan Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. Diclehan Orhan'a ve müdür yardımcısı Prof. Dr. Bilge Pehlivanoglu'na teşekkürlerimi sunarım. Uzun yıllardır her anlamda yanımda oldukları ve olacakları için ablalarım Doç. Dr. Gamze Atay ve Dr. Aynur Demirel, Utku Norman ve eşi Gülseren Norman, Dr. Alper Kılıç, Dr. Cihan Kara, Dr. Yunus Uğurlu, Dr. Cemre Türetken, Dr. Özge Berna Gültekin ve eşi Dr. Onurcan Zaim, Dr. Ece Demirbaş ile birlikte adımlarını paylaşmadığım bütün dostlarıma minnettarım. Son olarak sevgili annem Tülün Uruk ve babam Mustafa Uruk kahkahalarını, sevincimi, motivasyonumu paylaşarak çektiğim her türlü zorluk, acı, travmada yaralarımı sarmaya çalışarak beni yoktan var ettiler. Gecemi gündüze çevirebilmek için uykusuz kaldılar, türlü çözümler ürettiler, çevremde iyiliğe destek, kötülüğe kalkan oldular. Bana verdikleri bu sonsuz, karşılıksız ve paha biçilemez destek ile sabırlılarından ötürü en içten teşekkürlerimi, sevgimi, saygımı, emeğimi kısacası hayatımı dolayısıyla önce kendilerine, sonra dostlarıma ve son olarak da beni seven, seveyen bütün insanlara sunarım.

ÖZET

Gökhan, U. Glikojenin İskemik İnme ve Retinal İskemi Üzerine Olan Etkilerinin Nöroglivasküler Seviyede İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Nörolojik Bilimler Programı Doktora Tezi, Ankara, 2020. Kan akımının ani kesilmesi sonucunda ilgili merkezi sinir sistemi bölgelerinde metabolik ihtiyaçları karşılayan enerji miktarında ani bir azalma gerçekleşmektedir. Başarılı rekanalizasyon gerçekleştirilse bile mikrodamarlardaki perisitlerin kasılı kalmasına bağlı olarak parankimde perfüzyon her zaman sağlanamamaktadır. Akut dönemdeki glukoz ve oksijen yokluğunda, beyinde astrosit, merkezi sinir sisteminin bir uzantısı olarak kabul edilen retinada ise Müller hücre son ayaklarında bulunan peri-mikrovasküler glikojenden elde edilen glukozun metabolik ihtiyacın karşılanmasında rol aldığı, mikrodamar kasılmalarıyla ilişkili olduğu, beyin ve retinada iskemi ile azaldığı, üretiminin ve/veya kullanımının bozulduğu durumlarda mikrodamar işlevlerinin bozulduğu düşünülmektedir. Bunların mekanizmalarının aydınlatılması amacıyla bu tez çalışmasında beyine intraserebroventriküler, retinaya intravitreal olarak glikojen fosforilaz enzimini inhibe ederek glikojen kullanımını engelleyen 1,4-dideoksi-1,4-imino-d-arabinitol (DAB) uygulanarak çeşitli zaman aralıklarında etkisi incelenmiş, merkezi sinir sisteminde glikojen sentaz-1 (GYS-1) enzimi ifade etmeyen erişkin fareler (GYS-1^{NestinKO}) kullanılmıştır. Peri-mikrovasküler glikojenin, farmakolojik veya genetik olarak azaltılmasıyla beyinde ve retinada iskemi ile indüklenene benzer şekilde mikrodamarlarda kasılmaların ortaya çıktığı, iskemi yapıldığında beyinde enfarkt hacminin arttığı saptanmıştır. Mikrodamar kasılmalarının glikojen ile ilişkisi histopatolojik olarak gösterilmiştir. Yabancıl ve GYS-1^{NestinKO} farelerde retinal iskemi ve intravitreal DAB enjeksiyonları ile kontralateral gözde de retinal mikrodamar kasılmalarının arttığı ilk kez gözlenmiştir. Ayrıca kan-beyin/kan-retina bariyerinin kontrolünde önemli rol oynadığı bilinen PDGFR- β pozitif perisit sayısının azaldığı ve bu perisitlerin damar duvarından ayrıldığı, NG2 ve CD13 pozitif perisitlerin beyinde kasılmaların gerçekleştiği bölgelerde bulunduğu, ayrıca klaudin-5, GLUT-1 ifadesinin ciddi olarak azaldığı, buna karşın ZO-1 ve AQP4 düzeylerinin korunduğu bulunmuştur. Glikojenin beyin ve retinada nöroglivasküler düzeydeki etkilerinin ortaya konması, iskemik beyin ve retina hastalıklarının patofizyolojisini anlamada önemlidir ve potansiyel tedavileri belirlemede göz önüne alınmalıdır.

Anahtar Kelimeler: iskemik inme, mikrodolaşım, glikojen, perisit, 1,4-dideoksi-1,4-imino-d-arabinitol (DAB), GYS-1^{NestinKO}, beyin, retina

Destekleyen Kurum: HÜBAP (Proje no: THD-2017-14025 ve TDK-2019-17652).

ABSTRACT

Gökhan, U. Investigation Of The Effects Of Glycogen On Ischemic Stroke And Retinal Ischemia At Neurogliovascular Level. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Neuroscience, Ankara, 2020. Ischemic stroke results in sudden blood flow cessation thus leads to sudden onset unmet energy requirements. Although the clotted artery is recanalized and blood flow is restored back, brain perfusion may not be sustained due to pericyte contraction. Under glucose deprived and hypoxic conditions, glucose derived from the glycogen stored around peri-microvascular astrocyte endfeets may serve as emergency fuel to meet metabolic demand during acute period of ischemic stroke. These mechanisms should be investigated in retina, because retina is known as an extension of central nervous system and has highest number of pericyte among other tissues. Effects of intracerebroventricularly and intravitreally administered glycogen phosphorylase inhibitor 1,4-dideoxy-1,4-imino-d-arabinitol (DAB) are investigated through several time points. Moreover, transgenic mice in which glycogen synthase-1 expression is knocked out throughout its central nervous system (GYS-1^{NestinKO}) are used in this study. These models demonstrate ischemic-like phenotype and microvascular constrictions under normal circumstances. When ischemia is introduced to glycogen utilization disrupted mice, infarct volumes are increased compared to wild type littermates. Increased number of retinal microvascular constrictions contralaterally after ischemia in transgenic and wild type and intravitreally DAB injected mice are observed first time. Interaction of glycogen and microvascular constrictions are shown with both Periodic acid Schiff (PAS) and immunofluorescent anti-glycogen antibodies. In addition, important cellular alterations regarding blood-brain/retina barrier are observed. Number of PDGFR- β positive pericytes becomes less and detaches from their respective microvascular wall while NG2 and CD13 expressing pericytes seem unaffected among these mice. Claudin-5 and GLUT-1 levels decline despite comparable preservation of ZO-1 and AQP4. Revealing impact of glycogen at neurogliovascular level in both brain and retina may become crucial for understanding the pathophysiology of ischemic stroke and retinal diseases together with the possible use of more effective therapeutic approaches of stroke.

Keywords: Ischemic stroke, microcirculation, glycogen, pericyte, 1,4-dideoxy-1,4-imino-d-arabinitol (DAB), GYS-1^{NestinKO}, brain, retina.

Supported by HÜBAP (Project no: THD-2017-14025 and TDK-2019-17652)

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xvi
TABLolar	xxii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1.Beyin ve Retinada Enerji Kullanımı	3
2.2.Glikojen Metabolizması	3
2.2.1.Beyinde Glikojen Metabolizması	4
2.2.2.Retinada Glikojen Metabolizması	6
2.2.3.Nörovasküler Ünite, Enerji Metabolizması ve Glikojen	7
2.3. Astrosit-Nöron Laktat Taşıma Sistemi (<i>'Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle'</i> (ANLS))	8
2.4.Beyinde İskemik İnme	9
2.5.İskemik İnme ve Retinal İskemide Glikojenin Rolü	10
2.6. Kan-Beyin ve Kan-Retina Bariyeri (KBB ve KRB)	12
2.6.1.Kan-Beyin Bariyeri (KBB)	12
2.6.2.Kan-Retina Bariyeri (KRB)	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1.Deney Hayvanları ve Barınma Koşulları	20
3.2.Anestezi ve Yaşamsal Bulguların Takibi	20
3.3.Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeleri	21
3.4.İntraserebroventriküler (isv) ve İntravitreal	23
1,4-Dideoksi-1,4-İmino-D-Arabinitol (DAB) Enjeksiyonu	

3.5. İntraserebroventriküler (isv) 1,4-Dideoksi-1,4-İmino-D-Arabinitol (DAB) Enjeksiyonu	23
3.6.Geçici Fokal Serebral İskemi Modeli	24
3.7.Kalıcı Distal Fokal Serebral İskemi Modeli	25
3.8. Lazer Benekli Kontrast Görüntüleme ile Kortikal Kan Akışının İncelenmesi ve Perfüzyon Haritasının Oluşturulması	26
3.9.İntravitreal DAB Solüsyonunun Enjeksiyonu	27
3.10.Kalıcı Retinal İskemi Modeli	27
3.11. Lazer Benekli Kontrast Görüntüleme ile Farede Sistolik Kan Basıncının İncelenmesi	28
3.12. GYS-1 ' <i>Nestin Knock-Out</i> ' (GYS-1 ^{NestinKO}) Farelerin Genotiplenmesi ve Çaprazlanarak Üretilmesi	29
3.12.1.GYS-1 ^{NestinKO} Farelerin Üretilmesi	29
3.12.2.' <i>Polymerase Chain Reaction</i> ' (PCR) ve Agaroz Jel Elektroforezi ile Genotip Belirleme	30
3.13.Histokimyasal ve İmmünofloresan İncelemeler	31
3.13.1.Periyodik Asit Schiff (PAS) Histokimyasal İşaretlemesi	33
3.14.Beyin ve Retinal Dokularda Western Blotlama ile Protein Analizi	34
3.14.1.Homojenizasyon ve Protein Yoğunluk Ölçümü	34
3.14.2.Örnek Hazırlama	35
3.14.3.Jele Yükleme ve Yürütme	36
3.14.4.Transfer	36
3.14.5.Blokaj ve Primer Antikor İnkübasyonu	37
3.14.6.Görüntüleme	38
3.15.Retinal Sindirme (' <i>Retinal Digest</i> ') Hazırlanması	39
3.16.Beyin ve Retinal Dokuların Görüntülenmesi	39
3.17. Beyinde ve Retinada Mikrodamar Kasılmalarının ve PDGFR- β Pozitif Perisitlerin Sayımı	39
3.18. Mikrodamar Çevresinde Kasılma ve PAS ile İşaretlenen Glikojene Özgü Sinyalin Ölçümü	41
3.19.İskemik Beyin Kesitlerinden İskemik Doku Hacminin Ölçümü	41
3.20. Beyinde ve Retinada Mikrodamar Yoğunluğunun	43

Değerlendirilmesi Amacıyla Mikrodamar Dallanmalarının Sayımı	
3.21. İstatistiksel Yöntemler	43
4. BULGULAR	44
4.1. GYS-1 ^{NestinKO} ve GYS-1 ^{Heterozigot} Farelerde Glikojen Sentaz-1 (GYS-1) Beyinde Bulunmamaktadır ve Retinada Azdır	44
4.2. Peri-Mikrovasküler Glikojenin Üretilmediği (GYS-1 ^{NestinKO}) veya Glikojen Kullanımının Engellendiği (Glikojen Fosforilaz İnhibitörü 1,4-Dideoksi-1,4-İmino-D-Arabinitol (DAB) Enjeksiyonu) Durumlar Beyin ve Retina Mikrodamarlarında Kasılmaya Neden Olur	49
4.2.1. GYS-1 ^{NestinKO} Farelerde Beyin Mikrodamar Kasılmaları Yabanıl (C57BL/6) Kontrollerden Daha Fazladır	50
4.2.2. İntraserebroventriküler 1,4-Dideoksi-1,4-İmino-D-Arabinitol (DAB) Enjeksiyonu Beyin Mikrodamarlarında Kasılmaya Neden Olur	52
4.2.3. GYS-1 ^{NestinKO} Farelerde Retinal Mikrodamar Kasılmaları Yabanıl Kontrollere Göre Daha Fazladır	56
4.2.4. İntravitreal 1,4-Dideoksi-1,4-İmino-D-Arabinitol (DAB) Enjeksiyonu Retinal Mikrodamarlarda Kasılmalara Neden Olur	58
4.3. Beyin ve Retinada Glikojenin Nörogliovasküler Düzeyde İncelenmesi	62
4.3.1. Beyinde Mikrodamar Kasılmaları Perimikrovasküler Glikojen ile İlişkilidir	62
4.3.2. Retinada Mikrodamar Kasılmaları Perimikrovasküler Glikojen ile İlişkilidir	68
4.4. GYS-1 ^{NestinKO} ve isv DAB Enjeksiyonu Yapılan Farelerde Gerçekleştirilen Fokal Serebral İskemi	70
4.5. GYS-1 ^{NestinKO} ve Vitreus İçine DAB Enjeksiyonu Yapılan Farelerde Gerçekleştirilen Retinal İskemi	79
4.6. Beyinde Peri-Mikrovasküler Glikojenin Nörogliovasküler Ünite Elemanlarına Etkileri	84
4.6.1. Beyinde Peri-Mikrovasküler Glikojenin Nörogliovasküler Ünite Elemanlarından Perisitlere Etkileri	84
4.6.2. Beyinde Peri-Mikrovasküler Glikojenin Nörogliovasküler Ünite Elemanlarından Astrositlere Etkileri	95

4.6.3. Beyinde Peri-Mikrovasküler Glikojenin Endotelyal Sıkı Bileşke Proteinlerine Etkileri	99
4.7. Retinada Peri-Mikrovasküler Glikojenin Nörovasküler Ünite Elemanları Üzerine Etkileri	104
4.7.1. Retinada Peri-Mikrovasküler Glikojenin Nörogliovasküler Ünite Elemanlarından Perisitlere Etkileri	104
4.7.2. Retinada Peri-Mikrovasküler Glikojenin Nörogliovasküler Ünite Elemanlarından Astrositler ve Müller Hücrelerine Etkileri	107
4.7.3. Retinada Peri-Mikrovasküler Glikojenin Endotelyal Sıkı Bileşke Proteinlerine Etkileri	108
5. TARTIŞMA	111
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	120
7. KAYNAKLAR	122
8. EKLER	
Ek-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzin Belgesi-1	
Ek-2: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzin Belgesi-2	
Ek-3: Tez Çalışması ile İlgili Orjinallik Raporu	
Ek-4: Tez Çalışması ile Bildiri Özeti-1	
Ek-5: Tez Çalışması ile Bildiri Özeti-2	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

aCSF	Yapay beyin-omurilik sıvısı (<i>'artificial Cerebrospinal fluid'</i>)
Ang-1	Anjiopoetin-1
Ang-2	Anjiopoetin-2
ANOVA	<i>'Analysis of Variance'</i> testi
AP	Anteroposterior
ATP	Adenozin Tri Fosfat
AQP4	<i>'Aquaporin-4'</i> (su taşıyıcısı-4)
α-DKA	Alfa-Düz Kas Aktini
BCA	Bikükürinik asit (<i>'bicinchoninic acid'</i>)
BSA	<i>'Bovine serum albumin'</i>
CCA	Ana Karotit Arter (<i>'Common carotid artery'</i>)
CCD	<i>'Charge-coupled device'</i>
Con	<i>'Conditional'</i>
dOSA	Distal Orta Serebral Arter
DAB	1,4-dideoksi-1,4-imino-d-arabinitol
ddH₂O	Deionize distile su
Dimedon	5,5- Dimethyl-1,3-cyclohexanedione
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSO	Dünya Sağlık Örgütü (<i>'World Health Organization (WHO)'</i>)
DV	Dorsoventral
ECA	Eksternal Karotit Arter (<i>'external carotid artery'</i>)
ECL	Elektro-kemoluminesan (<i>'electrochemiluminescent'</i>)
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EtBr	Ethidium bromür
FACS	Floresans ile Aktifleştirilmiş Hücre Ayrımı (<i>'Fluorescence activated cell sorting'</i>)
FeCl₃	Demir (III) Klorür
GFAP	Glial fibriler asidik protein
GLUT-1	Glukoz taşıyıcısı-1

GP	Glikojen fosforilaz (<i>'glycogen phosphorylase'</i>)
GPI	Glikosilfosfotidilinositol
GYS-1	Glikojen Sentaz-1 (<i>'glycogen synthase-1'</i>)
GYS-1^{Heterozigot}	Glikojen Sentaz-1 Heterozigot
GYS-1^{NestinKO}	Glikojen Sentaz-1 Nestin <i>'Knock-out'</i>
HBSS	<i>'Hank's Balanced Salt Solution'</i>
HRP	<i>'Horseradish peroxidase'</i>
ICT	<i>'inverse correlation time'</i>
İ/R	İskemi/Rekanalizasyon
İHC	İmmünohistokimya (<i>'immunohistochemistry'</i>)
K⁺	Potasyum iyonu
KBB	Kan-Beyin Bariyeri
KRB	Kan-Retina Bariyeri
LRP5/6	Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili protein 5/6 (<i>'low density lipoprotein receptor-related protein 5/6'</i> (LRP5/6))
MCT-1	Monokarboklisat taşıyıcısı-1
MES	<i>'2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid'</i>
MMP	Matriks metalloproteinaz
MOPS	<i>'3-(N-morpholino) propanesulfonic acid'</i>
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
Na⁺	Sodyum iyonu
NaCl	Sodyum Klorür
Na⁺-K⁺ ATPaz	Sodyum-potasyum ATPaz
NG2	<i>'Neural-glial antigen-2'</i>
NGS	Normal keçi serumu
NIBP	<i>'non-invasive blood pressure'</i>
NO	Nitrik Oksit
OSA	Orta serebral arter
PAS	Periyodik Asit Schiff
PBS	Fosfat tamponlu serum fizyolojik (<i>'phosphate buffered saline'</i>)
PBS-T	Fosfat tamponlu serum fizyolojik-Triton-X 100
PCR	<i>'Polymerase Chain Reaction'</i>

PDGF-BB	Platelet ilişkili büyüme faktörü-beta (<i>'Platelet-derived growth factor-beta'</i>)
PDGFR-β	Platelet ilişkili büyüme faktörü reseptör-beta
PFA	Paraformaldehit
PKA	cAMP bağımlı protein kinaz A
pOSA	Proksimal Orta Serebral Arter
PVDF	Poliviniliden florür
RIPA	<i>'Radioimmünoprecipitation assay buffer'</i>
ROI	<i>'Region of Interest'</i>
ROS	Reaktif Oksijen Türleri (<i>'reactive oxygen species'</i>)
Rec	<i>'recombined'</i>
RPE	Retinal Pigment Epiteli
RPM	Dakikada dönüş sayısı (<i>'rate per minute'</i>)
SRA	Santral Retinal Arter
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SHH	<i>'Sonic-hedgehog'</i> sinyal yolağı
TAE	Tris-baz, Asetat ve EDTA
TBS	Tris tamponlu serum fizyolojik
TBS-T	Tris tamponlu serum fizyolojik-Tween 20
TGF-β	<i>'Transforming-growth factor-beta'</i>
Tie2	<i>'Tyrosine-protein kinase receptor-2'</i>
tPA	Doku Plazminojen Aktivatörü (<i>'tissue plasminogen activator'</i>)
VEGF	Vaskülo-endothelyal büyüme faktörü (<i>'Vasculo-endothelial growth factor'</i>)
ZO-1	<i>'Zonula Occludens-1'</i>

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Glikojen metabolizmasının hücre içi sinyal yolları ile ilişkisi	5
2.2. Nörovasküler ünite şematik gösterimi	7
2.3. İskemik inmede mikrodamar üzerindeki perisitlerin kasılması	10
2.4. Retinal iskemide mikrodamar kasılması-glikojen ilişkisi	12
3.1. İntraserebroventriküler enjeksiyonun şematik gösterimi	23
3.2. İntraluminal filaman modeli ile farelerde geçici fokal serebral iske mi modelinin şematik gösterilmesi	24
3.3. Distal OSA iskemisi-şematik gösterimi	26
3.4. İntravitreal enjeksiyonun ve retinal iskeminin şematik gösterimi	28
3.5. GYS-1 ^{NestinKO} farelerin çaprazlanması	30
3.6. IV58B6 ve ESG1A9 antikollarının bağlandıkları glikojen moleküllerinin şematik gösterimi.	32
3.7. Coomassie mavisi ve Ponceau çözeltileriyle boyanan jel ve membran	37
3.8. Retinal sindirme protokolünün şematize edilmiş hali	39
3.9. Semi-stereolojik değerlendirilmenin şematik gösterimi	40
3.10. GYS-1 ^{NestinKO} hayvanlarda 2 saat kalıcı distal OSA iskemisi sonrası Nissl ve PAS histokimyasal işaretlemesi	42
4.1. “con”, “rec” ve “cre” genlerine yönelik PCR sonrası jel elektroforezi UV görüntülemesi	44
4.2. C57BL/6 yabancı, GYS-1 ^{Heterozigot} ve GYS-1 ^{NestinKO} fare beyininde anti-GYS-1 antikoru ile immüno floresan işaretlemesi	45
4.3. C57BL/6 yabancı, GYS-1 ^{Heterozigot} ve GYS-1 ^{NestinKO} fare retinasında anti-GYS-1 antikoru ile immüno floresan işaretlemesi	46
4.4. C57BL/6 yabancı, GYS-1 ^{Heterozigot} ve GYS-1 ^{NestinKO} farelerde beyin, retina ve karaciğer dokularında Western blotlama ile GYS-1 ifadesi	47
4.5. C57BL/6 yabancı ve GYS-1 ^{NestinKO} fare retinalarında ıslak transfer koşullarında GYS-1 Western blotlama ile GYS-1 ifadesi	48
4.6. Lektin ile işaretlenmiş mikrodamarlarda kasılma örneği	49
4.7. C57BL/6 yabancı ve GYS-1 ^{NestinKO} farelerin beyinlerinde mikrodamar kasılma sayımları	50

4.8.	C57Bl/6 yabancı ve GYS-1 ^{NestinKO} farelerin beyinlerinde kapiller dallanma gösterimi ve sayımı	51
4.9.	Kontrol ve DAB isv enjekte edilmiş beyinlerde mikrodamar kasılmaları	52
4.10.	Steril serum fizyolojik ve DAB isv uygulamasından 1 saat sonra sakrifiye edilen fare beyinlerinde OSA alanı boyunca mikrodamar kasılmaları	53
4.11.	DAB isv enjeksiyonu sonrası çeşitli zaman dilimlerinde sakrifiye edilen fare beyinlerinde mikrodamar kasılmaları	54
4.12.	C57BL/6 yabancı, GYS-1 ^{NestinKO} , serum fizyolojik ve DAB isv enjekte edilen farelerde mikrodamar kasılma sayımları	55
4.13.	C57BL/6 yabancı ve GYS-1 ^{NestinKO} farelerin retinalarında mikrodamar kasılma sayımları	56
4.14.	C57BL/6 yabancı ve GYS-1 ^{NestinKO} farelerin retinalarında kapiller dallanma gösterimi ve sayımı	57
4.15.	C57BL/6 yabancı ve GYS-1 ^{NestinKO} farelerin retinalarında mikrodamar kasılmalarının kapiller dallanma sayılarına oranlanması	58
4.16.	Serum fizyolojik ve DAB intravitreal enjeksiyonu sonrası mikrodamar gösterimi	59
4.17.	İntravitreal DAB uygulanmış retinalarda mikrodamar kasılma sayımı	60
4.18.	C57BL/6 yabancı, GYS-1 ^{NestinKO} ve intravitreal DAB uygulandıktan 2 saat sonra sakrifiye edilen farelerin retinalarında mikrodamar kasılmalarının kapiller dallanma sayılarına oranlanması	61
4.19.	DAB intravitreal enjeksiyonu sonrası kontralateral göz retinada mikrodamar kasılmaları	61
4.20.	Serum fizyolojik isv enjekte edilen beyin kesitlerinde kortekte PAS ve lektin işaretlemesi	62
4.21.	İsv DAB enjeksiyonundan 1 saat sonra beyin kesitlerinde kortekte PAS ve lektin işaretlemesi	63
4.22.	Serum fizyolojik isv enjeksiyonu sonrası 2 saat kalıcı OSA iskemisi ve DAB isv enjeksiyonundan 1 saat sonra gerçekleştirilen 2 saat iskemi/3 saat reperfüzyon beyinlerinin kesitlerinde kortekte PAS ve lektin işaretlemesi	64
4.23.	PAS ve lektin işaretlemesi sonrasında yarı otomatik bilgisayar yazılımı ile beyin mikrodamar çevresindeki glikojene ait sinyalin ölçümü	65
4.24.	Beyin korteksinde glikojen ve astrositlerin immünofloresan	66

olarak işaretlenmesi	
4.25. Diastaz uygulanmış beyin kesidinde glikojen ve damarların immünofloresan olarak işaretlenmesi	66
4.26. 2 saat kalıcı iskemi sonrası beyinde ESG1A9 antikoru ile gerçekleştirilen immünofloresan işaretleme	67
4.27. 2 saat kalıcı iskemi sonrası beyinde iskemik penumbra da kasılan mikrodamar ile glikojenin ilişkisi	67
4.28. Kontrol retinada ESG1A9 ve IV58B6 antikorumu ile gerçekleştirilen immünofloresan işaretleme	68
4.29. İskemik retinada ESG1A9 ve IV58B6 antikorumu ile işaretlenen glikojenin mikrodamar ile ilişkisi	69
4.30. Distal OSA iskemisi sırasında Lazer benekli kontrastlanma görüntülemeleri ile kortikal kan akımı değerlendirilmesi.	71
4.31. Yabanıl (C57BL/6) ve GYS-1 ^{NestinKO} farelerde 2 saat kalıcı distal OSA iskemisi sırasında Lazer benekli kontrastlanma görüntüleri ile elde edilen ortalama kortikal kan akım değişimi	72
4.32. Yabanıl (C57BL/6) ve GYS-1 ^{NestinKO} hayvanlarda 2 saat kalıcı distal OSA iskemisi sırasında kuyruktan ölçülen sistolik kan basıncı (mmHg) değerlerinin gösterimi	73
4.33. GYS-1 ^{NestinKO} farelerde 2 saat kalıcı distal OSA iskemisi sonrası Nissl ve PAS histokimyasal işaretleme.	74
4.34. 2 saat kalıcı distal OSA iskemisi gerçekleştirilen C57BL/6 yabanıl ve GYS-1 ^{NestinKO} transgenik farelerin beyinlerinde PAS işaretleme	74
4.35. Serum fizyolojik ve DAB isv enjeksiyonu sonrası 2 saat kalıcı distal OSA iskemisi gerçekleştirilen farelerin beyinlerinde PAS işaretleme	75
4.36. C57BL/6 yabanıl, GYS-1 ^{NestinKO} , Serum fizyolojik ve DAB isv enjeksiyonu sonrası 2 saat kalıcı distal OSA iskemisi gerçekleştirilen farelerin enfarkt hacimleri	76
4.37. C57BL/6 yabanıl, GYS-1 ^{NestinKO} , Serum fizyolojik ve DAB isv enjeksiyonu sonrası 2 saat kalıcı distal OSA iskemisi gerçekleştirilen farelerin Lektin ile işaretlenmesi	77
4.38. DAB isv verilmiş beyinlerde iskemi/reperfüzyon yapılan farelerin mikrodamar kasılma sayımları	78
4.39. DAB isv enjeksiyonundan 1 saat sonra 2 saat iskemi ve 3 saat	79

	reperfüzyondan gerçekleştirilen beyinlerde PDGFR- β ve Lektin işaretlemesi	
4.40.	C57BL/6 yabanıl ve GYS-1 ^{NestinKO} farelerin 1 saat kalıcı iskemi gerçekleştirilen retinalarında Lektin işaretlemesi	80
4.41.	C57BL/6 yabanıl farelerin 1 saat kalıcı iskemi gerçekleştirilen retinalarında PDGFR- β ve Lektin işaretlemesi	80
4.42.	GYS-1 ^{NestinKO} transgenik farelerin 1 saat kalıcı iskemi gerçekleştirilen retinalarında PDGFR- β ve Lektin işaretlemesi	81
4.43.	İntravitreal DAB uygulandıktan sonra 1 saat kalıcı iskemi gerçekleştirilen retinalarda PDGFR- β ve Lektin işaretlemesi	81
4.44.	C57BL/6 yabanıl ve 1 saat kalıcı retinal iskemik farelerin damar ağları tripsin ile sindirme yöntemiyle elde edilmiş retinalarında PAS ve Hematoksilen işaretlemesi ile bu perisitlerin sayımı	82
4.45.	GYS-1 ^{NestinKO} transgenik farelerde 1 saat kalıcı retinal iskemi sonrası kontralateral göz retinasında Lektin işaretlemesi ve mikrodamar kasılmaları	83
4.46.	C57BL/6 yabanıl ve GYS-1 ^{NestinKO} farelerin beyinlerinde PDGFR- β pozitif perisitlerin gösterimi ve sayımı	85
4.47.	Serum fizyolojik ve DAB isv enjeksiyonlarından 1 saat sonra beyinlerde PDGFR- β pozitif perisitlerin gösterimi	86
4.48.	DAB isv enjeksiyonlarından 6 saat sonra beyinlerde PDGFR- β pozitif perisitlerin gösterimi	87
4.49.	DAB isv enjeksiyonlarından 24 saat sonra beyinlerde PDGFR- β pozitif perisitlerin gösterimi	88
4.50.	Serum fizyolojik ve DAB isv enjeksiyonları sonrası PDGFR- β pozitif perisit sayımları	89
4.51.	Serum fizyolojik ve DAB isv enjeksiyonları sonrası PDGFR- β ifade eden perisitlerin mikrodamar duvarından ayrılma oranları	90
4.52.	C57BL/6 yabanıl ve GYS-1 ^{NestinKO} farelerin beyinlerinde NG2 ve Lektin işaretlemesi	91
4.53.	C57BL/6 yabanıl, GYS-1 ^{NestinKO} , Serum fizyolojik, DAB isv enjeksiyonundan 1, 6 ve 24 saat sonra beyinlerde NG2 ve Lektin işaretlemesi	92
4.54.	C57BL/6 yabanıl, GYS-1 ^{NestinKO} , Serum fizyolojik, DAB isv enjeksiyonundan 1, 6 ve 24 saat sonra beyinlerde CD13 ve Lektin işaretlemesi	93

4.55.	C57BL/6 yabancı ve GYS-1 ^{NestinKO} farelerin beyinlerinde alfa-düz kas aktini (α -DKA) ve Lektin işaretlemesi	94
4.56.	Serum fizyolojik ve DAB enjekte edilmiş beyinlerde GFAP-S100 ve Lektin işaretlemesi	95
4.57.	C57BL/6 yabancı ve GYS-1 ^{NestinKO} farelerin beyinlerinde AQP4 ve Lektin işaretlemesi	96
4.58.	Serum fizyolojik, DAB isv enjeksiyonundan 1, 6 ve 24 saat sonra beyinlerde AQP4 ve Lektin işaretlemesi	97
4.59.	C57BL/6 yabancı ve GYS-1 ^{NestinKO} farelerin beyinlerinde GLUT-1 ve Lektin işaretlemesi	98
4.60.	Serum fizyolojik, DAB isv enjeksiyonundan 1, 6 ve 24 saat sonra beyinlerde GLUT-1 ve Lektin işaretlemesi	99
4.61.	C57BL/6 yabancı, GYS-1 ^{NestinKO} , Serum fizyolojik, DAB isv enjeksiyonundan 1, 6 ve 24 saat sonra beyinlerde kludin-5 ve Lektin işaretlemesi	100
4.62.	C57BL/6 yabancı ve GYS-1 ^{NestinKO} farelerin beyinlerinde ZO-1 ve Lektin işaretlemesi	101
4.63.	Serum fizyolojik, DAB isv enjeksiyonundan 1, 6 ve 24 saat sonra beyinlerde ZO-1 ve Lektin işaretlemesi	102
4.64.	C57BL/6 yabancı ve GYS-1 ^{NestinKO} farelerin Western blotlamada perisit, astrosit, endotelial sıkı bileşke ve PDGF-BB/PDGFR- β sinyal yolağı ilişkili proteinlerin gösterimi	103
4.65.	C57BL/6 yabancı ve GYS-1 ^{NestinKO} farelerin bütün retinasında PDGFR- β ve Lektin ile işaretlemesi	105
4.66.	C57BL/6 yabancı, GYS-1 ^{NestinKO} , intravitreal serum fizyolojik ve DAB enjekte edilmiş retinaların damar ağlarının tripsin ile sindirme yöntemiyle elde edildikten sonra PAS-Hematoksilen ile işaretlenmesi	106
4.67.	Yabancı (C57Bl/6) kontrol, GYS-1 ^{NestinKO} , intravitreal serum fizyolojik ve DAB enjekte edilmiş, tripsin ile retinal sindirme yöntemiyle damar ağları elde edilmiş retinalarda toplam perisit sayımı	107
4.68.	C57BL/6 yabancı ve GYS-1 ^{NestinKO} farelerin bütün retinalarında AQP4-GLUT1 ve Lektin ile işaretlemesi	108
4.69.	C57BL/6 yabancı ve GYS-1 ^{NestinKO} farelerin bütün retinalarında kludin-5 ve Lektin işaretlemesi	109

- 4.70.** C57BL/6 yabancı ve GYS-1^{NestinKO} farelerin retinalarında 110
Western blotlamada perisit, Müller hücreleri ve astrosit son ayakları,
endotelyal sıkı bileşke ve PDGF-BB/PDGFR- β sinyal yolağı
ilişkili proteinlerin gösterimi.

TABLÖLAR

Tablo		Sayfa
3.1.	İmmünofloresan ve Western Blot çalışmalarında kullanılan primer antikorlar.	21
3.2.	İmmünofloresan ve Western Blot çalışmalarında kullanılan sekonder antikorlar ve Fab fragmanlar.	22
3.3.	Kullanılan cihazlar ve Sarf Malzemeler	22
3.4.	Genotip ve GYS-1 gen ifadesi.	30
3.5.	Primer Sekansları.	31
3.6.	PCR Koşulları.	31

1. GİRİŞ

İskemik inme, ilgili beyin bölgelerine kan akımının aniden durması nedeniyle gelişen nörolojik bir tablodur. Tromboembolik iskemik inmede geçerli tek tedavi seçeneği inmeden sonraki ilk 4,5 saat içinde doku plazminojen aktivatörü (tPA) ile veya mekanik trombektomi ile tıkalı damarın açılmasıdır (1). Tıkanan damar yeniden açılrsa yani rekanalizasyon sağlansa bile beyin parenkiminde reperfüzyon her zaman sağlanamamaktadır. Bu durum "no-reflow" fenomeni olarak adlandırılmaktadır ve mikrodamarların kasılı kalmasına bağlı olduğu gözlenmiştir. Mikrodamar kasılmaları nörovasküler ünitenin önemli bir elemanı olan perisitlerle ilişkilendirilmiştir (2). Doku perfüzyonunu olumsuz etkileyen bu mikrovasküler kasılmalarda rol oynayan mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu mekanizmaların aydınlatılmasında beyin yanı sıra retinanın da incelenmesi önemlidir. Retina beyinden sonra perisit oranının en yüksek olduğu dokudur. Ayrıca merkezi sinir sisteminin (3) bir uzantısı olması, ortak embriyolojik kökenden gelişmesi hem de beyni koruyan kafatası gibi bir kemik tabakası ile çevrelenmemesi, histopatolojik olarak inceleme kolaylığı sağlaması nedeniyle büyük bir öneme sahiptir (4).

İskemi sırasında beyin ve retina artmış enerji ihtiyacını karşılayamamaktadır. Enerji konusundaki arz ve talep dengesizliği bilinmekle birlikte nedenleri yeterince bilinmemektedir. MSS'ne gelen kan akımının azalması ve/veya kesilmesi durumunda metabolik ihtiyaçları karşılayan enerji miktarında ani bir azalma gerçekleşmektedir. Perisitlerin kasılmasının ise iskemi sonrası yaklaşık 1 saat gecikerek ortaya çıktığı gözlenmiştir (2). Akut dönemde, glukoz yokluğunda ve hipoksik koşullarda, perimikrovasküler astrosit son ayaklarında veya retinada Müller hücrelerinde bulunduğu bilinen glikojenden (5) elde edilen metabolitlerin metabolik ihtiyacın karşılanmasında önemli bir rol aldığı düşünülebilir. Astrositlerde bulunan glikojenden elde edilen glukozun yoğun uyarım sırasında nöronlara destek olduğu (6), bu glikojenden elde edilen laktatın nöronlara iletilerek hafızanın oluşturulması ve korunmasında görev aldığı (7) ve iskemik hasar sonrasında astrositlerin nöronlara göre daha geç bir dönemde ölmesinde (8) glikojenin önemi gösterilmiştir.

Bunlardan yola çıkılarak bu çalışmada, farede retinada ve beyinde iskemi/rekanalizasyon sonrası mikrodamarlardaki daralma ve kasılmalar ile perimikrovasküler glikojen arasındaki ilişki nöroglivasküler düzeyde incelenmiş amaçlanmıştır. Retina ve beyine glikojen fosforilaz enzimini inhibe ederek glikojen kullanımını engelleyen 1,4-dideoksi-1,4-imino-d-arabinitol (DAB) uygulanmıştır. Daha önce retinada DAB enjeksiyonunun retinal iskemide mikrodamar kasılmaları üzerindeki etkileri laboratuvarımızda sadece tek zaman aralığında ve tek dozda incelenmiştir (9). Bu doktora tez çalışmasında DAB enjeksiyonunun farklı zaman aralıklarında ve dozda retinal mikrodamar kasılmaları, KRB ve nöroglivasküler ünite elemanları üzerinde etkileri araştırılmıştır.

Farmakolojik bu girişimin yanı sıra sadece MSS'nde glikojen sentaz-1 geni ve protein ifadesi bulunmayan GYS-1^{NestinKO} fareler kullanılmıştır. Bu transgenik farelerde de beyin ve retinada mikrodamarlarda kasılmaların ortaya çıktığı bunların iskemi ile arttığı, KBB/KRB'ni oluşturan hücresel elemanlar ve özellikle de perisitlerde değişiklikler olduğu immünohistokimyasal ve Western blotlama ile saptanmıştır.

Böylece literatürde ilk kez glikojenin nöroglivasküler düzeyde KBB/KRB'nde önemi ve iskemideki rolü gösterilmiştir. Ayrıca bu araştırmalar için retinal sindirme protokolü ilk kez uygulanmış ve laboratuvarımıza kazandırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Beyin ve Retinada Enerji Kullanımı

Vücut ağırlığının sadece %2'sini oluşturan beyin, vücuttaki oksijen tüketiminin %20'sinden sorumludur ve glukozun %25'ini kullanır (10). Bu yüksek metabolik ihtiyaç, nöronal bağlantıları oluşturan sinapsların aktivitesinden kaynaklanmaktadır. Nöronlar söz konusu olduğunda, enerji kullanımı, aksiyon potansiyellerini ve sinaptik potansiyelleri başlatan iyonik pompaların aktivitesi ile ilgilidir. Uyarıcı sinaptik bağlantıların ve iyonik dengelerin korunmasında kullanılan ATP, beyinde kullanılan toplam ATP'nin %45'ini oluşturmaktadır (11). Miyelinli hipokampal aksonlardaki enerjinin %80'inden fazlasının postsinaptik potansiyeller tarafından harcandığı deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (12). Ana mekanizmalar göz önüne alındığında, nöronlarda, astrositlerde ve Müller hücrelerinde bulunan enerji ATP veya NADPH formunda bulunmaktadır ve kullanılan ATP'nin temel kaynağı glukozdur. Sonuç olarak beyindeki ve retinadaki glukozun tek ve sınırlı deposu astrositlerde bulunan glikojendir (13).

2.2. Glikojen Metabolizması

Glikojen, glukozun temel depolanma şekli olarak kabul edilir. Esas olarak karaciğer ve iskelet kasında depolanır ancak böbrek, kalp, beyin ve yağ gibi dokular da glikojen sentez yeteneğine sahiptir. Karaciğerdeki glikojen depoları kan glukoz seviyelerinin ana tamponu olarak kabul edilir. Glikojen metabolizması, glikojen sentezi ve glikojen yıkımının dengesiyle gerçekleşir. Bu iki süreç, glikojenolizi uyaran hormonların (örn., glukagon, kortizol, epinefrin, norepinefrin) eşzamanlı olarak glikojenezi inhibe ettiği şekilde karşılıklı olarak düzenlenir (14).

'*De novo*' glikojen sentezi için ilk birkaç glukoz molekülü glikojenin olarak bilinen bir proteine eklenir. Glikojen, bir homodimer olarak işlev görür ve enzim üzerindeki bir tirozin kalıntısına bir UDP-glukozun C-1'ini ekleyerek kendi glikozilasyonunu katalize eder. Bu reaksiyon, glukozun diğer alt üniteye

eklenmesiyle bir alt birim tarafından gerçekleştirilir. İlk glukoz tortusunun eklenmesinin ardından, her bir glikojen alt birimi, $\alpha(1,4)$ glikozidik bağlarla eklenir. Ekli glukoz daha sonra aşağıda tarif edilen mekanizma yoluyla ilave glukoz molekülleri eklemek için glikojen sentaz (15) tarafından gerekli olan primer olarak görev yapar (14).

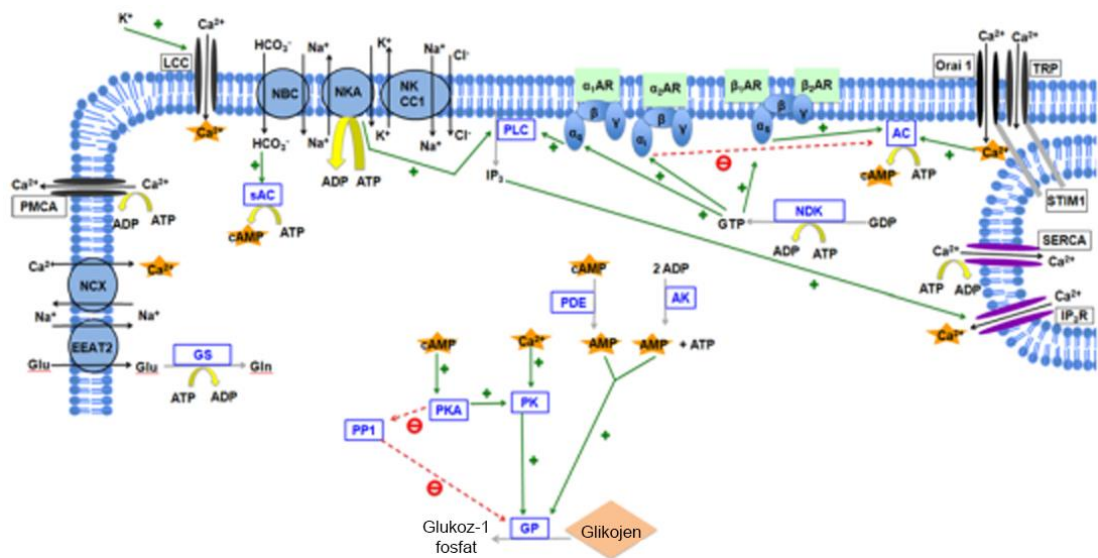
İki farklı glikojen sentaz enzimi vardır. Geniş olarak ifade edilen enzim *GYS-1* geni tarafından kodlanırken karaciğer, kalp ve pankreas enzimi *GYS-2* geni tarafından kodlanır. *GYS-1* geni, 19q13.33 kromozomunda bulunur ve kas enziminin iki izoformunu kodlayan iki alternatif olarak eklenmiş mRNA'yı üreten 16 ekzondan oluşur. İzofom 1, 737 amino asitten oluşur ve izofom 2, 673 amino asitten oluşur. *GYS-2* geni 12p12.1 kromozomunda bulunur ve 703 amino asitlik bir protein üreten 18 ekzondan oluşur.

Glikojenoliz adı verilen depolanmış glikojenin bozulması glikojen fosforilaz ve glikojen dallanmasını yıkan enzim (*'glycogen debranching enzyme'*) enzimin etkisi ile gerçekleşir. Biyolojik olarak aktif glikojen fosforilaz bir homodimer olarak bulunur. Glikojene bağlanma, glikojen fosforilazın, fizyolojik taleplere yanıt olarak depolanmış glukozu hızlı bir şekilde serbest bırakmasına izin verir. Fosforilazın katalitik etkisi, glikojen molekülleri içindeki $\alpha(1,4)$ bağı ile eklenmiş tek glukoz birimlerini fosforolitik olarak uzaklaştırmaktır. Bu reaksiyonun ürünü, glukoz-1-fosfat ve bir glukoz birimi daha az olan bir glikojen molekülüdür (14).

2.2.1. Beyinde Glikojen Metabolizması

Beyin, temelde glukozu enerji kaynağı olarak kullanmaktadır; ancak astrositlerde bulunan en önemli karbonhidrat deposu glikojendir ve nöronal aktivasyon sırasında glikojen döngüsü artmaktadır (13). Glikojen döngüsü glikojen sentaz ve glikojen fosforilaz aktivitelerinden etkilenmektedir. Beyin glikojeni sinaptik enerji metabolizmasına önemli düzeyde katkıda bulunurken hızlı bir döngüyle kontrol edilir (16). Astrosit glikojen döngüsü nöronal aktivite ile artmaktadır (10, 17) ve kesişen sinyal yollarıyla sıkı bir kontrol altındadır (18).

Astrosit son ayaklarında bulunan glikojen, yıkılarak sinapslarda kullanımı için salınır (6). Astrositlerdeki glikojen, kısmen oksidatif metabolizma ve kısmen de laktat üretimi için kullanılan pirüvata indirgenir (19). Astrositlerin *in vitro* glikojenden üretilen laktatı serbest bıraktığı gösterilmiştir (20-23). Kısa ve uzun dönem hafızanın oluşmasında bu yolak önemli bir görev üstlenmektedir (7). Glikojen sentaz enziminin bulunmadığı hayvanlarda da öğrenme ilişkili sinaptik plastisite ve uzun dönem hafızanın olumsuz yönde etkilendiği saptanmıştır (24). Astrositlerde bulunan glikojen metabolizması kandan taşınan glukozun azaldığı durumlarda ve yoğun nöronal aktivasyon sırasında önemli bir rol oynamaktadır (6). Astrositlerdeki hızlı glikojen mobilizasyonu, glukoz tutulumunu astrositlere indirgeyerek nöronlar tarafından daha fazla glukoz alınmasını sağlar (25, 26). Glikojen metabolizması, bazı metabolit, iyonlar ve hücre içi sinyal yollarının dengesinden sorumludur (Şekil 2.1). Nöronal aktivasyon ile artan hücre dışı potasyum astrositler tarafından glikojenin kullanımı ile alınır ve glikojen fosforilaz enziminin DAB ile durdurulması sonucunda Sodyum-Potasyum ATPaz ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPaz}$) pompası çalışmaz hale gelir (27). Diğer bir taraftan astrosit kültüründe DAB uygulaması, hücre dışı K^+ ve D-aspartat ilişkili trikarboksilik asit döngüsündeki hızlanmayı engellerken glikolitik döngüde dengeleyici bir hızlanmaya neden olur (19). Bununla birlikte yine astrosit kültürlerinde glikojen fosforilaz enziminin inhibisyonu ile hücre dışı glutamatın alımı glukozun varlığından bağımsız olarak bozulur (28).



Şekil 2.1. Glikojen metabolizmasının hücre içi sinyal yolları ile ilişkisi (29).

Glikojeni depolayan astrositler, iskemik durumda nöronlara göre daha dayanıklıdır ve daha geç dönemde ölürlür (8). İskemi sırasında glikojen metabolizması glikojen fosforilaz, cAMP bağımlı protein kinaz A (PKA) aktivitesinin azalması ve glikojen dallanmasını yıkan enzim ('*glycogen debranching enzyme*') ifadesindeki düşüşe bağlı olarak bozulur (30). Buna ek olarak hipoksi sırasında artan glikojen düzeyleri astrositlere metabolik düzeyde destek olur. Bunun yanı sıra beyaz cevher miyelinle sarıldıktan sonra öncesine göre astrositlerde bulunan glikojeni kullanarak daha fazla iskemik toleransa sahip olur (31).

2.2.2. Retinada Glikojen Metabolizması

Avasküler olan kobay ve tavşan retinaları en fazla glikojeni depolarken, vaskülerize olan fare ve sıçan retinaları ise en az depolayanlar olarak gözlenmektedir. Tavşan retinalarındaki glikojenin konsantrasyonu, retina tarafında fotoreseptör tabakasına kıyasla Müller hücresi son ayağında ~100 kat daha yüksek bulunmaktadır (32). Karanlık, iç retinada bazı nöronların aktivitesini artırırken, diğerlerinin aktivitesini azaltmakla birlikte (33) bu adaptasyon sıçan retinalarında depolanan glikojen miktarını %60 oranında azaltmaktadır (34). Böylece, genel retinal enerji tüketimi, karanlıkta en az %200 artmaktadır.

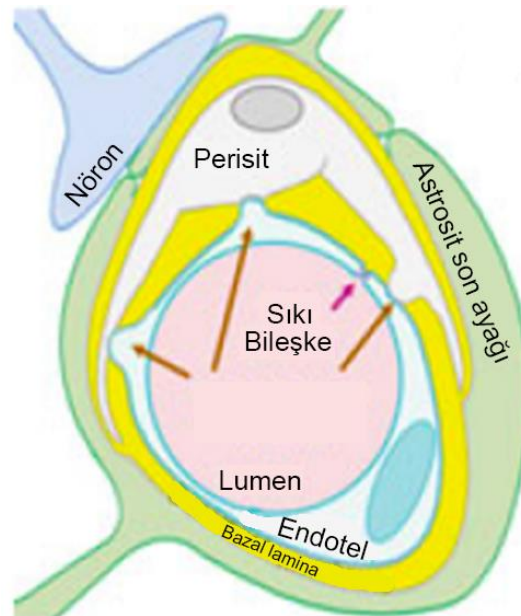
Tüm retinada '*in vitro*' glikojen içeriği yüksek konsantrasyonlu glukoz, glutamat ve insülin uygulamalarıyla artmaktadır. Beynin aksine retina glikojen seviyelerinin norepinefrin, yüksek konsantrasyonlu KCl ve depolarizasyon uygulamalarıyla değişmediği gözlenmiştir. İnsülin ayrıca Müller hücre kültürlerinde glikojen içeriğinde bir artışa neden olmaktadır. İnsülinin, hem retinanın hem de Müller hücre kültürlerinde etkisi, fosfatidil-inositol 3-kinaz inhibitörleri tarafından bloke edilmekte ve retinadaki glikojen içeriği, insülin sinyal yolu ile düzenlenmektedir. '*In vitro*' deneyler, insülinin, Müller hücre kültürlerinin yanı sıra retinada glikojen içeriğini arttırdığını ortaya koymuştur (35). Retinanın baskın makrogliaları, retinanın ve optik sinirin vaskülerize kısımlarındaki astrositler olan Müller hücreleri, glikojen fosforilaz (GP) izozim paternindeki beyin ve omurilik

astrositlerinden farklıdır. Bu durum retinal makroglia ve beyin astrositlerinde glikojenin farklı rolleri olduğunu gösterebilir (36).

2.2.3. Nörovasküler Ünite, Enerji Metabolizması ve Glikojen

Kullanılan ATP'nin temel kaynağı glukozdur ve beyindeki glukozun tek ve sınırlı deposu astrositlerde bulunan glikojendir. Uyarıcı nöronal aktivasyon sırasında sinaps çevresinde glikojen döngüsü hızlanmaktadır (10). Hem perisinaptik bölgede hem de nörovasküler ünite de gerçekleştiği düşünülen sıkı metabolik kontrol, yüksek enerji ihtiyacının düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

Işık ve elektron mikroskopları kullanılarak yapılan histolojik çalışmalar, astrositlerin sinaptik aktiviteyi algılamak ve mikrodamarlardan kaynaklanan enerji substratlarını beyin parankimine iletmek için ideal bir şekilde konumlandırıldığını göstermektedir. Astrositler, yaklaşık 80-100 μm çapında son ayaklara sahiptir (37-39). Bu son ayaklardan biri, mikrodamar duvarına karşı dayanırken, diğerleri ise sinapsları desteklemektedir (Şekil 2.3). İntraparenkimal mikrodamarların tüm dış yüzeyi astrosit son ayakları ile kaplıdır (40, 41) ve bu ayaklar arasında sadece 20 nm'lik yarıklar bulunmaktadır (42).



Şekil 2.2. Nörovasküler ünite şematik gösterimi (43).

. Bu morfolojik özelliklere ek olarak, astrositler, özellikle glutamat olmak üzere diğer metabolitleri, perisinaptik lamellar son ayaklar üzerinde yer alan reseptörler gibi stratejik bölgelerdeki proteinler aracılığıyla algılayarak sinaptik aktiviteyi değerlendirme yeteneğine sahiptir (40, 44, 45). Bu aktivite, özellikle glukoz olmak üzere substratların mikrodamarların lümeninden beyin parankimine taşınması, son ayaklar üzerinden membranlar üzerinde ifade edilen glukoz taşıyıcıları ile sağlanmaktadır.

2.3. Astrosit-Nöron Laktat Taşıma Sistemi ('Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle' (ANLS))

Astrositlerin beyinde enerji kullanımının sadece %5-15' ini oluşturduğu düşünülmektedir (11, 46). Son çalışmalar, aksiyon potansiyellerinin enerji tüketiminin daha önce öne sürülenden düşük olduğunu göstermektedir (12). Bu durum, astrositlerin genel beyin enerji maliyetlerine katkısının yeterince önemsenmediğini düşündürmektedir. Bununla birlikte deneysel kanıtlar, astrositlerin gerçekte aldığı glukoz miktarının enerji gereksinimlerine göre orantısız biçimde yüksek olduğunu göstermektedir (47). Enerji sübstratlarının astrositlerden nöronlara transferi bu ikircikli duruma basit bir açıklama getirmektedir. Bu sistematik açıklama, astrosit-nöron laktat taşıma sistemi (ANLS) modeli olup Pellerin ve Magistretti tarafından 25 yıl önce önerilmiştir (48). Bu modelin 4 ana bileşeni bulunmaktadır. Sırasıyla nöronal aktivite sonucunda hücre dışı glutamat (glutamaterjik nörotransmisyon yoluyla) artmaktadır ve bu glutamat spesifik glial glutamat taşıyıcıları tarafından sodyum iyonu (Na^+) -bağımlı bir mekanizmayla astrositlere geri alınmaktadır. Bölgesel Na^+ konsantrasyonundaki artış Na^+/K^+ ATPaz'ı (özellikle $\alpha 2$ alt birimini) aktive eder ve böylece astrositlerde ATP tüketimini, glukoz alımını ve glikolizi arttırmaktadır (49). Artan glikoliz sonucunda laktat üretiminde ve hücre dışı alana salınmasında büyük bir artış görülmekte ve bu laktat ATP üretimi için nöronlar tarafından enerji substratı olarak kullanılabilir (50, 51).

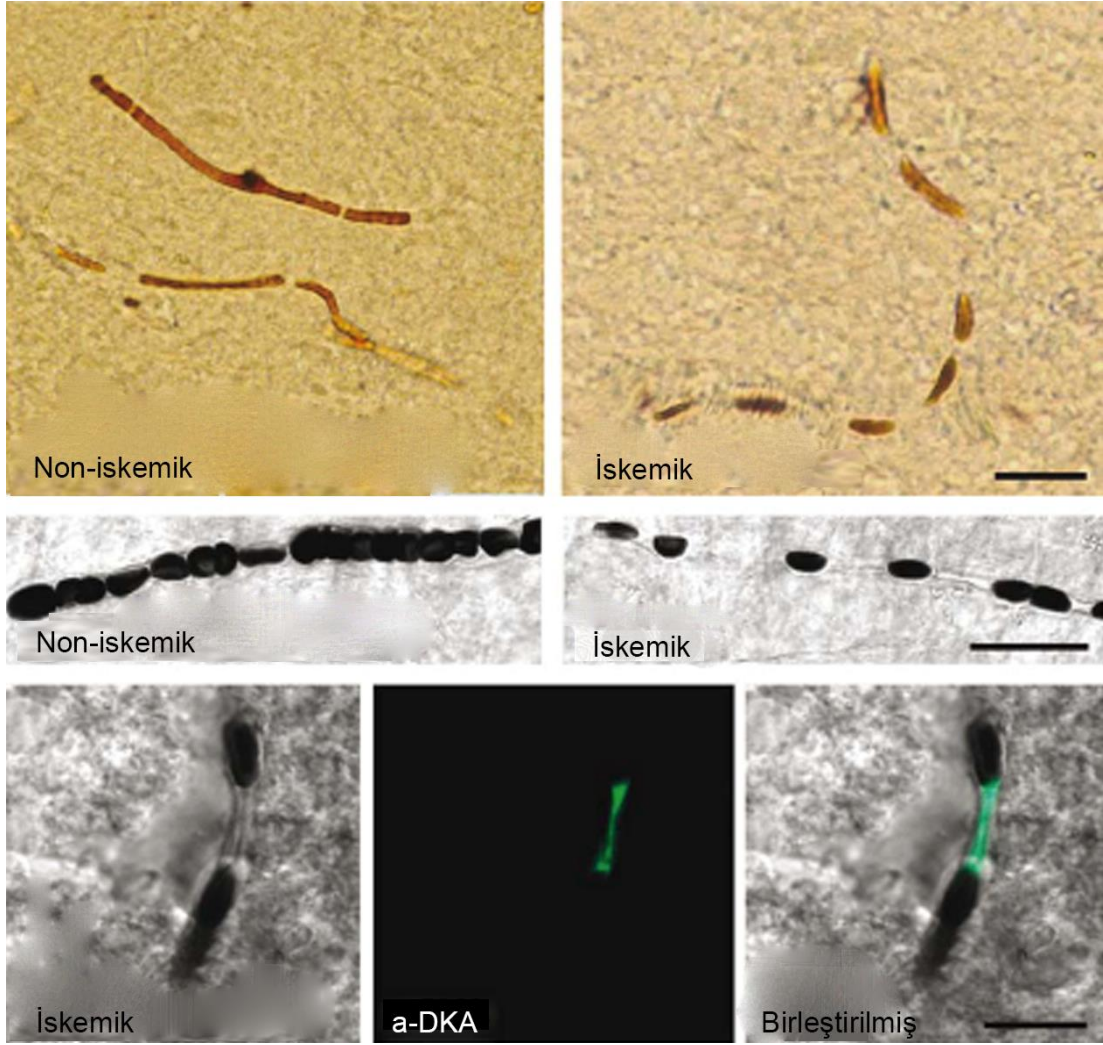
2.4. Beyinde İskemik İnme

İskemik inme, ilgili beyin bölgelerine kan akışının aniden durması nedeniyle gelişen nörolojik bir tablodur. Serebral damarlarda trombotik veya embolik olarak tıkanma söz konusudur. İskemik inme, yetişkin dönemde fonksiyon kaybının ve ölümlerin önemli nedenlerinden biridir ve Dünya Sağlık Örgütü (52) verilerine göre tüm dünyada 60 yaş üstü toplumda ikinci sırada ve 15-59 yaş arasında beşinci sırada gelen ölüm nedenidir (53). Bir yılda inme nedeniyle ölen insan sayısı 17 milyondur. Önümüzdeki 20 yılda inme insidansının %25 oranında artacağı öngörülmektedir. İnme hastalarının %40'ında kalıcı yeti yitimi gelişmekte ve sadece %10'unda tam iyileşme sağlanabilmektedir. İskemik inme, ciddi boyutta sosyoekonomik yük getirmektedir (54, 55).

İnmede trombolitik tedavinin kullanılmaya başlanması bu hastalıkta çığır açmış, ancak yine de öngörülen başarıyı yakalayamamıştır. Zaman kısıtlılığı en önemli sorunlardan biri olup, iskemik inme belirtileri başladıktan sonra ilk 4,5 saat içerisinde bu tedavi verilmiş olmalıdır (1). Aksi halde başarılı sonuçlar elde edilemediği gibi mortalite ve morbidite artmaktadır. Tıkalı damar trombolitik tedavi ile açılrsa bile mikrovasküler yatakta gerçekleşen kasılmalar nedeniyle doku perfüzyonu tam olarak gerçekleşmemektedir (56). İnme tanısına, patofizyolojisini aydınlatmaya ve tedavisine yönelik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

İskemik durumlarda da dokunun enerji ihtiyacı tıkanan bir damarın varlığında kan akımının kesilmesine bağlı olarak karşılanamamaktadır. Birçok çalışmada, tıkanan damar girişimsel ya da farmakolojik yöntemlerle açılrsa bile beyin parenkiminde reperfüzyonun her zaman sağlanamadığı gösterilmiştir (57, 58). Bu durum, '*no-reflow*' fenomeni olarak adlandırılmakta ve mikrodolaşım bozukluğundan kaynaklanmaktadır.

Endotelial ve astrosit son ayaklarında şişmeye ek olarak KBB'nde yer alan perisitlerin kasılmasıyla ilişkili olarak beyin mikrodamarlarında boğumlanmalar gözlenmiştir (2, 59) (Şekil 2.3.). Perisit kasılması, farelerde '*in vivo*' olarak da gösterilmiştir (60-62).



Şekil 2.3. Fare beyinlerinin damarları hayvanlar sakrifiye edilmeden önce doldurulmuştur. Beyin kesitlerinde iskemik olmayan karşı hemisferde damar bütünlüğünün korunduğu ancak iskemik hemisferde tespih benzeri, sıralı kasılmaların olduğu saptanmıştır. Bu kasılmalardan eritrositler geçememektedir (orta sıra, siyah). Bu kasılmaların olduğu kapillerin alfa-düz kas aktini (a-DKA) antikoruna ile pozitif immünohistokimyasal olarak pozitif işaretlendiği olduğu yani bunların perisit olduğu laboratuvarımızda yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir (2).

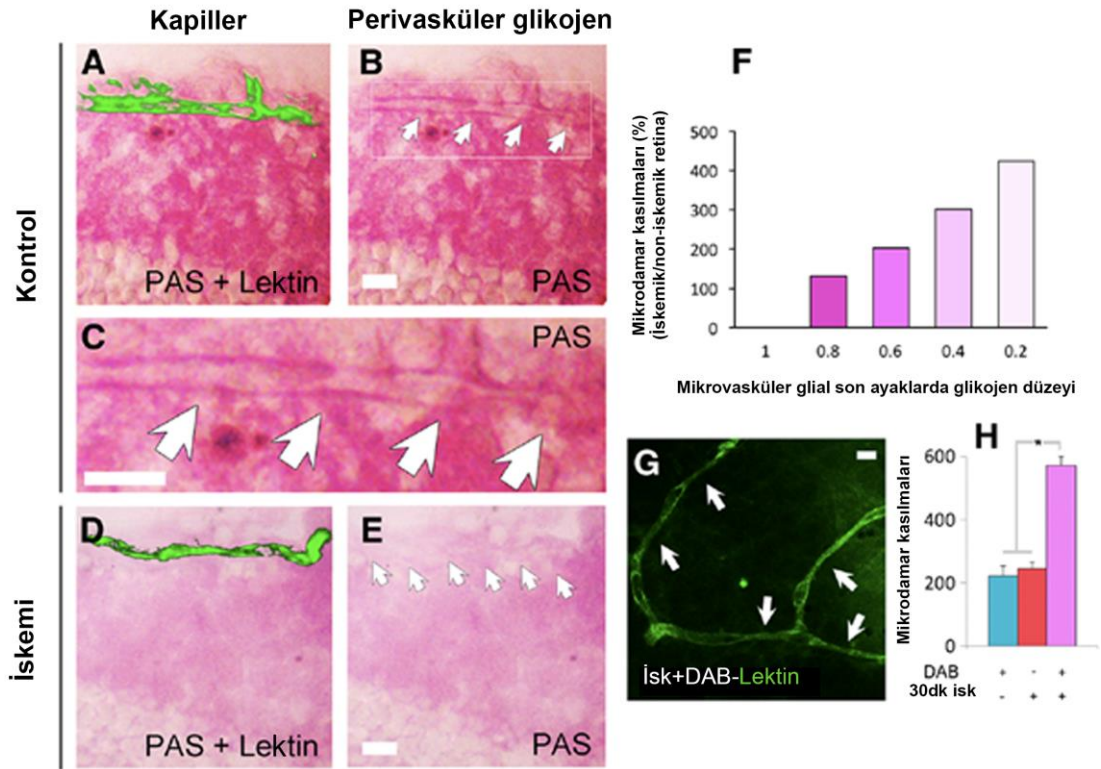
2.5. İskemik İnme ve Retinal İskemide Glikojenin Rolü

İskemik inmenin erken evresinde glukoz ve glikojenin iskemik penumbra arttığı ve 3. günde maksimuma ulaştığı gösterilmiştir (63). Diğer yandan, 1. günün sonunda laktat içeriğinde hızlı bir artış gözlenirken belirgin ATP ve kreatin fosfat tükenmesi gerçekleşmiştir. Bununla birlikte bu bölgede glukoz ve glikojen

miktarının inme sonrası 3. günden 7. güne kadar hızla azaldığı; ancak normal beyinden daha yüksek kaldığı gözlenmektedir (64). Elektron mikroskopik çalışmalar, glikojen bakımından zengin olan bu alanda glikojenin, astrositlerin ve nörofillerin sitoplazmasında bulunduğunu göstermektedir (65). Bununla birlikte, glikojen içeren astrositlerin rolleri veya sonraki histopatolojik değişiklikler aydınlatılamamıştır. Bu bulgulara dayanarak, glikojen birikiminin glikojen fosforilaz ve glikojen sentazdaki aktivite ve/veya miktarsal değişiklikler nedeniyle oluşan glikojenoliz azalmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Astrositlerle ilgili önceki biyokimyasal ve morfolojik bulgulara göre, iskemik şartlar altında penumbra bulunan nöronlarda ve diğer glial hücrelerde enerji kullanımında bir azalma olmasına rağmen kan damarlarından astrositlere glukoz taşınmasında fonksiyonel bozulmanın olmaması sonucunda astrositlerin sitoplazmasında glikojen granüllerinin biriktiği düşünülmektedir.

Diğer bir taraftan oksidatif metabolizmanın gerçekleşmediği iskemi sırasında, glikojenoliz ve glikolizin eşzamanlı çalışmasıyla ATP üretilebilir (66). Ancak yapılan çalışmalarda, iskeminin başlaması üzerine beyin glikojeninin dakikalar içerisinde tükendiği gösterilmiştir (67, 68). Bununla birlikte beyinde normal olarak mevcut olan glikojen deposunun, hipoglisemi sırasında yaklaşık bir buçuk saat boyunca enerji metabolizmasını destekleyebileceği başka bir çalışmada öngörülmüştür (69, 70).

Nörogliovasküler ünite kan akış kontrolü için önemli rol oynayan perisitler (61) hastalık sırasında da patolojik kan akış değişikliklerinden sorumludur (2, 60). Glikojenin azalması ile retinada mikrodamar kasılmalarının eş zamanlı olarak gerçekleştiği tarafımızdan daha önce de gösterilmiştir (9) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Fare retinaları hayvanlar sakrifiye edildikten sonra 20 µm kalınlığında kesilip PAS ve lektin histokimyası ile işaretlenmiştir. Kontrol ve iskemik retina kesitlerinde yapılan incelemelerde iskemi ile mikrodamar kasımları ile PAS işaretli glikojenin damar çevresinde azaldığı gösterilmiştir (9).

2.6. Kan-Beyin ve KRB

2.6.1. Kan-Beyin Bariyeri (KBB)

KBB, MSS'nin mikrodamarlarının benzersiz özelliklerini tanımlamak için kullanılan bir terimdir (71, 72). MSS mikrodamarları, sıkı bağlantılarla bağlanan sürekli deliksiz endotel hücreleri ile bariyer işlevi taşımaktadır (71, 72). Moleküllerin, iyonların ve hücrelerin kan ve beyin arasında hareketi sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir (71, 72). Bu sıkı kontrol, nöronal aktivite için önemli bir rol oynarken MSS'ni toksinlerden, patojenlerden, inflammatuar süreçlerden, hasar ve hastalıklardan korumaktadır (71, 72).

KBB, endotel-perisit-astrofit son ayağı ve bazal lamina arası etkileşimler ile kurulmaktadır (43). Perisitler mikrovasküler endotelial tübün ablüminal yüzeyinde

oturan ve bazal membrana gömülü hücrelerdir (73). Endotelial tüp boyunca uzantılara sahip olsalar da bu uzantıların çoğu bazal lamina içerisinde gömülü durumdadır. Endotel ve perisitler, '*Peg-and-socket*' olarak ifade edilen bölgelerde N-kaderin aracılığıyla adheziv bağlantılar kurmaktadır (74). MSS perisitleri çevre dokuların aksine '*neural crest*' kökenlidir (75). Ek olarak MSS perisit-endotel oranı bakımından bütün vücutta en yüksek orana sahiptir. Retinada 1 perisit başına 1 endotel ve beyinde 1 perisit başına 3 endotel bulunurken, kas dokusunda bu oran 1/100-1/300 arasında değişmektedir (76). Perisitler, damar oluşumu ve damarlanma (vaskülogenez ve anjiogenez), hücre dışı matriks üretimi ve depolanması, yara iyileşmesi, bağışıklık sistemi hücrelerinin trafiği ve kan-akış kontrolü olmak üzere birçok işleve sahiptir ve bu işlevleri sıkı bir biçimde kontrol etmektedir (77). Bazı çalışmalar bu hücrelerin başka MSS hücrelerine dönüşebildiklerini bir başka deyişle multipotent özellikleri olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte KBB oluşumu ile devamlılığının perisitler tarafından kontrol edildiği de gösterilmiştir (78, 79). Diğer bir taraftan da perisitler, kendilerine özgü belirteçlerin olmaması ve komşuluklarında başka perivasküler hücrelerin de bulunması nedeniyle çalışılması ve araştırılması zor hücrelerdir (77). Bununla birlikte PDGFR- β ve NG2 proteinleri yaygın olarak kullanılan kabul görmüş perisit belirteçleri olup, CD13, dezmin, Rgs5, Abcc9, Kcnj8, Dlk, ve Zic1 proteinleri de işaretleme amacıyla kullanılmaktadır (77). Bu hücreler, uzantılarıyla birçok endoteli aynı anda sarabilir ve kasılabilirlik proteinleri ifade ederek mikrodamar çapını kontrol edebilir (2, 60, 61, 80). Farelerde MSS mikrodamarlarında bulunan perisitler patolojik koşullarda mikrodamar kasılmalarıyla ilişkilendirilmiştir (2). Perisit biyolojisi için cevaplanmayı bekleyen önemli sorulardan biri ise söz konusu bu belirteçlerin perisitleri farklı alt gruplara ayırarak farklı özellikler ve işlevler kazandırıp kazandırmadığıdır. Bu konuda yukarıda belirtildiği gibi perisitlerin çeşitli mikrodamar işlevleri için birçok önemi olduğu ileri sürülmekle birlikte (71) PDGF-BB/PDGFR- β ilişkisinin KBB işlevleri için önemi literatürde gösterilmiştir (79). Bazı nörolojik hastalık modellerinin deneysel çalışmalarında perisitlerin damar duvarından ayrıldığı ve hatta fenotipik değişiklikler gösterdiği bulunmuştur (81, 82). Örneğin, anjiopoetin-2 (Ang-2) ifadesindeki artış, PDGF-BB üretiminde azalmaya neden olarak perisit göçü ve mikrovasküler sızıntıyla sonuçlanmaktadır (83). Ang-2, 'VE-cadherin' fosforilasyonu ve yıkımına

neden olarak endotelial bariyer fonksiyonunu bozmaktadır (84). Anjiopoetin-1 (Ang-1) ise bu sıkı bileşke protein kompleksinin yıkımını engellemektedir (85, 86). Buna uygun olarak PDGF-BB eksikliği yaşayan farelerde diyabetik retinopati geliştiren hastalardakine benzer mikroanevrizma oluşumları, damar çap değişimleri ve damar yapısı bozuklukları izlenmektedir (87).

Beypinde perisitlerin PDGFR- β , NG2 ve CD13 proteinlerini farklı anatomik bölgelerde farklı mikrodamar segmentlerinde farklı düzeylerde ifade ettiklerini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (88, 89). Bu farklılıkların birbirinden değişik işlevlere sahip perisitleri belirlediği düşünülse de yeterli bir kanıt bulunmamaktadır (77, 90). NG2 proteininin vasküler gelişim ve patolojik neovaskularizasyon sırasında perisitlerde ifade edildiği gösterilmiştir (91, 92). Ayrıca NG2'nin perisitlerin tümör gelişimi sırasında bazal lamina bileşenlerinden kolajen tip 4'e bağlanması amacıyla kolajen tip 6 için reseptör olarak görev aldığı gösterilmiştir (93-96). Diğer bir taraftan perisit belirteci olarak yaygın kullanımına rağmen CD13 proteininin perisitler için işlevleri yeterince aydınlatılamamıştır (97, 98).

Astrositler, MSS'nde en fazla sayıda bulunan glial hücreler olup uzantıları nöronal bağlantılar ve mikrodamarlar üzerinde bulunmaktadır (99). Astrosit son ayakları, distroglikan, distrofin ve AQP4 gibi proteinler ifade ederek vasküler tübü tamamıyla sarmaktadır ve bu protein birlikteliği astrosit son ayaklarını bazal laminaya bağlamaktadır (100, 101). Bununla birlikte nöronal bağlantılar ve damar ilişkisi astrositler tarafından oluşturulmaktadır. Astrositler, nöronal sinyalleri damarlara ileterek nörovasküler kenetlenmeyi sağlayarak kan akışının kontrolünden sorumludur (102-104). Astrositler, nörovasküler kenetlenmeye ek olarak KBB'nin oluşumu, devamlılığı ve işlevselliği konusunda önemli rol oynamaktadır (99, 105). KBB, astrositlerin oluşumundan ve astrosit son ayaklarının mikrodamarları sarmasından önce perisitlerin kontrolünde tamamlanmakta ve bu durum astrositlerin KBB gelişiminde görev almadığını göstermektedir (79). KBB işlevlerini kontrol eden astrosit kaynaklı faktörlerin tanımlanması sonucunda astrositlerin KBB ve endotel ilişkileri ile endotel morfolojisi, anjiogenez ve gelişmiş bariyerin işlevselliğini kontrol ederek KBB korunumu ve devamlılığı için önemli rol oynadığı anlaşılmıştır (79, 106). Bariyer oluşumu, KBB/KRB gelişimi ve kludin-5

seviyesinin korunması için endotel, perisit ve astrositlerden sinyal molekülleri salınmaktadır. Bunların arasında astrositlerde bulunan '*sonic-hedgehog (SHH)*' sinyal yolağı önemli bir rol oynamaktadır. Astrositlerden salınan SHH endotelyal '*patched homolog 1*' reseptörüne bağlanarak klaudin-5, vasküloendotelyal kadherin (VE-kaderin) ve oklüdin üretiminin kontrol edilmesini sağlar (107). Ayrıca astrositler, vaskülo-endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi anjiojenik faktörleri üretip ortama salarak embriyonik dönemde damar büyümesini, sağ kalımını ve yeniden modellenmesini desteklemektedir (108). Buna rağmen inflammatuar koşullarda VEGF, KBB devamlılığının bozulmasına neden olmaktadır (109, 110). MSS'nde hücre büyümesi, şekillenmesi ve dönüşümü için önemli rol oynayan pleiomorfik diğer bir sitokin olan '*transforming-growth factor-beta*' (TGF- β) nöroprotektif özelliklere sahiptir ve hastalık modellerinde KBB geçirgenliğini azalttığı gösterilmektedir (111). MSS'nde TGF- β astrosit ve endotelden salınmaktadır (112). Buna rağmen astrosit ve endotel kaynaklı TGF- β 'nın KBB üzerindeki işlevleri tam olarak anlaşılamamıştır (111-118).

Astrositler, MSS'nde metabolit ve iyonların dengesinden önemli ölçüde sorumludur ve astrosit son ayakları ile endotel yüzeyi metabolit taşıyıcılarından zengin olup bu hücreler kanda bulunan önemli metabolitlerin dokuya taşınmasında görev almaktadır (71, 72). En yaygın ifade edilenler '*slc2a1 (glukoz-taşıyıcısı-1 (GLUT-1))*', '*slc16a1 (monokarboklisat taşıyıcısı-1 (MCT1))*', '*slc7a1*' ve '*slc7a5*' olup sırasıyla glukoz, laktat ve piruvat, katyonik aminoasitler ile nötral aminoasitler, L-DOPA metabolitlerin taşınmasından sorumludur (71, 72). GLUT-1, uzun zamandır incelenmekte ve bu taşıyıcının KBB/KRB üzerindeki etkileri uzun süredir araştırılmaktadır (11, 18). GLUT-1 proteini sırasıyla endotelin lüminal ve ablüminal yüzeyleri ve astrosit üzerinde glikozile olan ve olmayan formlar ifade etmektedir (119, 120). Endotel, beynin glukoz ihtiyacını karşılayabilmek amacıyla dakikada ağırlığının 10 katına yakın miktarda glukozu kandan dokuya taşımaktadır (119). Bu nedenle GLUT-1 eksikliği insanlarda epileptik sendromlar ile ilişkilendirilmiştir (121). İskemik inmenin GLUT-1 eksikliği fenotipi gösterdiği de belirtilmiş olup (122) GLUT-1 glikozilasyonunun glikojen metabolizması ile ilişkisi-literatürde daha önce adiposit kültürlerinde belirtilmiştir (123). Metabolitler dışında suyun kandan MSS dokularına taşınması da önemlidir. Beyin spesifik su taşıyıcılarının varlığı

birçok grup tarafından gösterildikten sonra beyinde AQP4 proteininin ependimositler ve astrositler boyunca immünohistokimyasal olarak işaretlendiği gösterilmiştir (124, 125). Elektron mikroskopi çalışmalarında AQP4 proteininin astrosit son ayaklarında mikrodamar duvarı üzerindeki hücre membrane yüzeyinde ve beyni saran pial yüzey üzerinde ifade edildiği gösterilmiştir (124) AQP4 de diğer yüzey proteinleri gibi hücre içi döngüye ve dağılıma sahiptir (126). Perfüzyon ile sabitlenmiş beyinlerde AQP4 astrosit son ayaklarında hücre membranında ifade edilirken hücre içinde belirgin AQP4 deposu gözlenmemektedir ve *'in vivo'*da AQP4'ün membrana translokasyonu ile ilgili bir kanıt bulunmamaktadır (127). Buna karşın, kültürdeki astrositlerde belirgin hücre içi AQP4 deposu gözlenmektedir ve bu hücre içi trafik mekanizmaları çeşitli çalışmalarda incelenmektedir (128-131). Bununla birlikte PDGF-BB mutasyonu taşıyan farelerde *'in vivo'* koşullarda AQP4 lokalizasyonunda bozulma gösterilmiştir (132). Bununla birlikte astrosit son ayaklarında AQP4 düzeyi geçici fokal serebral iskemi sonrası azalmaktadır (133, 134). Bu çalışmada α -syntrophin ve AQP4'ün sitoplazmik ucu arasındaki bağlantının iskemiye hassas olduğu gösterilmektedir (133, 134). Astrosit son ayaklarında AQP4 düzeyindeki düşüş iskemi dışında epilepsi (135, 136), travmatik beyin hasarı (137), Alzheimer's hastalığı (138) gibi hastalık modellerinde de gözlenmektedir. Genellikle hücre içi AQP4 lokalizasyonu, astrositlerin aktifleşmesi sonucunda bozulmaktadır ve bu durum AQP4 ifadesinin parenkimal hücre membranında artışı ile birlikte son ayak ilişkili membranda ifade azalışıyla gerçekleşmektedir (130).

Endotel hücreleri, mezoderm kökenli basit skuamoz epitel hücreleridir (139-141). Büyük arter ve ven iç duvarları onlarca endotel hücrelerine sahipken mikrodamarlar kendi üzerine katlanan tek bir endotel hücresi ile damar lümenini çevrelemektedir (139-141). MSS endotel hücreleri iyon ve metabolitlerin parasellüler taşınmasını sıkı bir biçimde kontrol etmektedir (142-144). Bu sıkı bariyer, endotel hücrelerinin kan ve beyin taraflarında farklılaşmasına neden olarak kan ve beyin arasında iyon ve metabolit değişimini düzenlemektedir (145, 146). Bununla birlikte MSS endotel hücreleri diğer dokularda bulunan endotel hücrelerine göre çok daha fazla mitokondri içermektedir (147). Bu şekilde de sıkı bariyer kontrolü için gerekli olan bütün işlevlerin yerine getirilmesi amacıyla ATP üretimi sağlanmaktadır (147).

MSS endotel hücreleri sıkı bileşke proteinleri ile birbirine tutunarak iyonlar ve metabolitler için yüksek dirençli parasellüler bariyer oluşturmaktadır. Bu hücre içi iskeletine bağlanan transmembran sıkı bileşke proteinleri kısaca klaudin, oklüdin ve *'junctional adhesion molecule (JAM)'* aileleridir (148). Klaudin ailesi 25'ten fazla üyesi olan W-GLW-C-C parçasını ilk ekstrasellüler döngüsünde barındıran bir tetraspanin protein grubudur (149). *'In-vitro'* çalışmalar klaudin proteinlerinin parasellüler bariyer oluşumu ve işlevi için önemli rol oynadığını göstermektedir (148, 150-155). Küçük molekül ağırlığı (800 daltona kadar) olan maddelerin KBB/KRB geçişinde görev almaktadır (156). Beyin ve retinada klaudin-1, 3, 12 gibi diğer klaudin proteinlerinin ifade edildiği ancak klaudin-5'in 600 kat daha fazla olarak üretilerek bu dokularda en çok ifade edilen üyesi olduğu bilinmektedir (157). İskemik inme sonrası klaudin-5 azalmış (158) ve kronik dönemde de yerini klaudin-1 almıştır (159) ancak bu durumda KBB tam işlevsel olarak çalışmamaktadır. ZO-1 ise ZO ailesinin incelenen ilk üyesi olup MSS'nde yüksek düzeyde ifade edilmektedir (160). Diğer sıkı bileşke proteinleri ile hücre iskeletine F-aktin aracılığıyla bağlanarak endotelin ve mikrodamar bütünlüğünün sağlanmasında önemli rol oynamaktadır (160-162).

CD146-perisit-endotel ilişkisi incelenmiş bu adezyon molekülünün gelişimsel dönemde ilk önce immatür mikrodamarların endotelinde ifade edildiği gösterilmiştir (117). Damar duvarında artan perisitlerin, TGF- β 1 sentezleyerek endotelial CD146 düzeyinin azalmasına neden olduğu bulunmuştur (117). CD146, perisitlere özgü olarak silindiğinde perisitler mikrodamar duvarında daha az sayıda bulunmuşlardır. Bu sayede CD146'nın PDGFR- β ile koreseptör olarak işlev görerek perisitlerin mikrodamar duvarına tutunmasını sağladığı anlaşılmıştır (117). CD146'nın sadece endotelde silinmesiyle ise endotelial klaudin-5 düzeyi azalmış ve KBB bozulmuştur (117). Bununla birlikte klaudin-5 eksikliği literatürde iskemik inme (158) ile birlikte Alzheimer hastalığı (163), multipl skleroz (164), şizofreni (165) ve major depresyon (166) gibi çeşitli hastalık modellerinde incelenmiş ve önemi gösterilmiştir.

2.6.2. Kan-Retina Bariyeri (KRB)

KRB, KBB'ne oluşum ve devamlılık anlamında çok fazla benzer özellikler taşısa da bazı farklılıklar göstermektedir (167, 168). Retina, vücutta ağırlığı başına en fazla enerji tüketen ve bazal metabolik hızın yüzde 8'inden sorumlu bir dokudur (167, 168). Yapısal olarak beyinden farklı olarak retina, sırasıyla koriokapiller tabaka ile RPE arasında metabolit ve iyon taşınmasından sorumlu dış KRB ve retinal kapiller arası taşımadan sorumlu iç KRB olmak üzere 2 farklı bariyere sahiptir (169). İç KRB'de gerçekleşen bozulmalar diyabetik retinopati başta olmak üzere birçok retinal hastalıkta önemli rol oynamaktadır (169).

Retinal damar gelişimi sırasında endotelial uç hücreleri yüksek miktarda PDGF-BB ifade ederek oluşan yeni damarların çevresine perisitlerin göç etmesini sağlamaktadır (170). Perisitlerin gelişiminin hemen ardından endotel hücreleri arasında sıkı bileşkeler oluşmaktadır (171). Perisitler endotelleri sararak bağlantı proteinleri '*N-Cadherin*' (74) ve '*Connexin-43*' (172) ile fibronektin adhezyon plakları (173) aracılığıyla perisit-endotel bağlantıları oluşturmaktadır. Bu etkileşim endotel gelişimi, KRB oluşumu ve devamlılığı yönünden büyük önem taşımaktadır (3). Buna ek olarak perisitler, endotel işlevlerini (174, 175) ve/veya glial etkileşimleri (78) kontrol edecek faktörler üretilip mikroçevreye salmaktadır. Bununla birlikte damar üzerindeki perisitlerin çevrelemesi endotelial bariyer özelliklerini belirlerken 1:1 perisit/endotel oranı ile retina en yüksek oranda perisit barındıran dokudur (176). Perisitlerin KRB ve mikrodamar işlevleri için önemi perisit kaybıyla sonuçlanan '*in vivo*' modellerde damar hasarı ve artan damar geçirgenliği ile gösterilmektedir (79). Ayrıca TGF- β , endotel hücrelerinin çoğalması ve göçünü engelleyerek KRB işlevlerini düzenlemekte görev almaktadır (177, 178). Bu durumda perisitlerde '*Sphingosine 1-phosphate*' ifadesi artmaktadır; ancak damar gelişimi ve KRB işlevleri anlamında önemi aydınlatılamamıştır (179). TGF- β superaillesinin retinal gelişim ve KRB için önemli rol oynayan üyesi Norrin, Müller hücrelerinde üretilmektedir (180). Norrin, FZD4 ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili protein 5/6 ('*low density lipoprotein receptor-related protein 5/6*' (LRP5/6)) arasında şaperon tetraspanin (TSPAN12) aracılığıyla bağlantı kurarak (181). ' *β -catenin*' fosforilasyonunu sağlamakta ve KRB'nin oluşumunda önemli rol oynamaktadır (180,

182). İnsanlarda FZD4, LRP5, TSPAN12 ve Norrin geni *NDP* mutasyonları ciddi retinal hipovaskülarizasyon sendromları ve körlükle sonuçlanmaktadır (183-189). Bu mutasyon modellerinde kanama sorunları göstermekte ve iç nükleer tabakada yerleşmesi gereken derin kapiller tabaka/ağ oluşmamaktadır (52, 181, 190, 191). Böylece retinada Norrin, beyinden farklı olarak iç KRB oluşumunu, anjiogenezi ve derin kapiller tabaka/ağ oluşumunu kontrol etmektedir. Norrin yolağı dışında Wnt sinyal yolağı da retinal damar gelişimi açısından büyük öneme sahiptir (192). Wnt7a ve Wnt7b eksikliğinde fareler azalan anjiogenez, anormal damarlanma ve KRB/KBB bozuklukları göstermektedir (193). G-protein-ilişkili reseptörlerden Gpr124, gelişim sırasında endotelde ifade edilmekte ve eksikliğinde Wnt7'dekine benzer damar gelişim sorunlarına neden olmaktadır (194). Bunun sonucunda yapılan çalışmalarda Gpr124'ün Wnt7a/7b için ko-aktivatör görevi üstlenerek β -catenin-bağımlı sinyal yolağının kontrolünde önemli rol oynadığı izlenmektedir (195, 196). Daha yeni çalışmalar, glikosilfosfolinositol (GPI)-bağlantılı matriks metalloproteinaz (MMP) inhibitörü Reck proteininin endotelial uç hücrelerinin işlevlerini düzenleyerek damar invazyonunu ve gelişimini Wnt7a/Wnt7b/Gpr124/Reck atipik sinyal yolağıyla kontrol ettiğini göstermektedir (197).

Bariyer oluşumu ve devamlılığı konusunda retina, MSS'nde beyinle uyumlu özellikler gösterse de bazı farklılıklara sahiptir. Örneğin klaudin-5 ifade etmeyen farelerde KRB bozulması gözlenmemektedir (198); ancak KRB/KBB odaklı özellikle diyabet ve iskemik inme modellerinde klaudin-5 ifadesinin azaldığı ve bu durumda bariyer geçirgenliğinin artarak doku hasarının arttığı gösterilmektedir (109, 199). Bununla birlikte klaudin-1 eksikliği gösteren fareler doğumun ilk gününde deri bariyerinin yıkımı nedeniyle ölürken herhangi bir KRB/KBB bozulması göstermemektedir (150, 200, 201). Buna rağmen bazı çalışmalar erişkin farelerde retinal damarların klaudin-1 ifade ettiğini, bu ifade düzeyinin diyabet (202) ve deneysel otoimmün uveoretinit (203) modellerinde düştüğünü göstermektedir. Beyinden farklı olarak klaudin-3 retinal damarlar yerine retinal ganglion hücre tabakasında bulunmaktadır ve retinal klaudin-3 miktarında azalma KRB geçirgenliğini etkilememektedir (198).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları ve Barınma Koşulları

Bu araştırma Hacettepe Üniversitesi Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü Beyin Araştırmaları Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Fareler üzerinde uygulanan tüm deneysel işlemler Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (02/01/2017 tarih ve 2016/60-3 sayılı izin). Toplam 87 adet erişkin Swiss Albino (25–35 gram), 24 adet C57BL/6 yabanıl (25–30 gram) ile 18 adet GYS-1^{NestinKO} (18-20 gram), 6 adet GYS-1^{Heterozigot} (20-25 gram) erkek veya dişi fareler kullanılmıştır. Fareler standart, 12 saat aydınlık – 12 saat karanlık döngüsü (aydınlık- karanlık döngüsü 07:00'de değişmektedir), 22±2°C oda sıcaklığı, %50-60 nem oranı koşullarında barındırılmıştır. Yem ve su kısıtlaması uygulanmamıştır. Haftada bir kez talaş değişimi yapılmış ve kafesler temizlenmiştir.

3.2. Anestezi ve Yaşamsal Bulguların Takibi

Beyin iskemisi deneylerinde cerrahi öncesinde nazal yolla oksijen ile birlikte %3 izofloran anestezisi ile indüksiyon sağlanmış, kuyruk sıkıştırma yöntemi ile anestezi derinliği kontrol edildikten sonra cerrahiye geçilmiştir, cerrahi sırasında %1-2 dozunda idame anestezi uygulanmıştır. Deney sırasında sürekli olarak kalp atım sayısı ve kan oksijen saturasyonu pulse oksimetre ile (*V3304 Digital Table-Top Pulse Oximeter*, Nonin 'Medical Inc'., Amerika Birleşik Devletleri) monitörize edilmiştir. Cerrahi işlemler sırasında 2 L/dakika oksijen desteği sağlanmış, bu miktar gerektiğinde artırılmış ve fare kendiliğinden solunumu devam eder vaziyette takip edilmiştir. Farelere rektal bir prob yerleştirilerek homeotermik battaniye (Harvard Apparatus Limited, İngiltere) yardımı ile vücut sıcaklığının 36,0-37,1°C olması sağlanmıştır. Belirli aralıklarla kuyruk/parmak sıkıştırma ve göz kırpma refleksi kontrol edilerek anestezi derinliği takip edilmiştir. Deney süresince fizyolojik değerleri bozulan (bradikardi, hipoksi) hayvanlar deney gruplarına dahil edilmemiştir.

3.3. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeleri

Çalışmalarda kullanılan primer, sekonder antikorlar ve Fab fragmanlar Tablo 3.1 ve 3.2’de, cihazlar ve sarf malzemeleri Tablo 3.3’te gösterilmektedir.

Tablo 3.1. İmmüno Floresan ve Western Blot çalışmalarında kullanılan primer antikorlar

Primer Antikorlar	Kaynak	Hedef	Poliklonal/monoklonal	Uygulanan dilüsyon oranları	Üretici Firma
Anti-GYS-1	Tavşan	Fare	Monoklonal	1/200 İF için, 1/1000 WB için	Cell Signalling Technologies
Anti-PDGFR-β			Poliklonal	1/200 İF için, 1/5000 WB için	Abcam
Anti-PDGF-BB				1/200 İF için, 1/1000 WB için	
Anti-NG2	Tavşan				Millipore
Anti-Glikojen (ESG1A9)	Hücre kültürü hibridoması		Monoklonal	1/50 İF için	Hitoshi Ashida Lab
Anti-Glikojen (ESG1A9)				1/200 İF için	Otto Baba Lab
Anti-GFAP	Tavşan		Poliklonal	1/100 İF için	Abcam
Anti-S100	Fare		Monoklonal	1/200 İF için	
Anti- <i>Aquaporin 4</i> (AQP4)	Tavşan		Poliklonal	1/200 İF için, 1/1000 WB için	Millipore
Anti-GLUT1				1/200 İF için, 1/1000 WB için	Abcam
Anti-SOX9				1/200 İF için	
Cy3® Anti-αDKA	Fare		Monoklonal	1/200 İF için	Sigma
Anti-αDKA				1/1000 WB için	
Anti-Klaudin 5				1/200 İF için, 1/1000 WB için	Zymed
Anti-ZO-1	1/200 İF için		Acris		
Anti-CD13	Sıçan	1/200 İF için		Sigma	
Anti Beta-Aktin	Fare		1/7500 WB için		
Anti βIII-tubulin	Tavşan	Poliklonal	1/5000 WB için		

Tablo 3.2. İmmünofloresan ve Western Blot çalışmalarında kullanılan sekonder antikorlar ve Fab fragmanlar

Sekonder Antikorlar ve Fab fragmanlar	Kaynak	Hedef	Poliklonal/monoklonal	Uygulanan dilüsyon oranları	Üretici Firma
Alexa Fluor® 488	Keçi	Tavşan/Fare	Poliklonal	1/200 İF için	Jackson Immuno Research
Alexa Fluor® 488		Fare (IgM)			
Alexa Fluor® 555		Tavşan/Fare			
Cy2®		Tavşan/Fare/Sıçan		1/5000 WB için	Molecular Probes, USA
Cy3®		Tavşan/Fare			
'Horseradish Peroxidase' (HRP)		Fare		Stok solüsyonu (1/1)	Thermo Scientific
'AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Goat Anti-Mouse' IgG + IgM					Jackson Immuno Research

Tablo 3.3. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

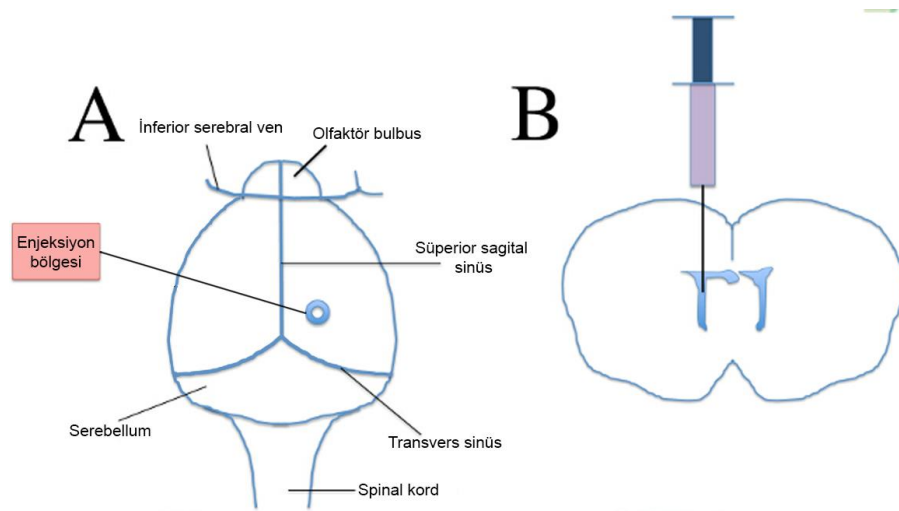
Cihaz Adı	Üretici Firma
Hassas Terazı	Shimadzu-AUX220
Vorteks	Nüve-NM110
Distile Su (ddH ₂ O) Cihazı	Mp Minipure Basic
Tris tamponlu salin (TBS)	ThermoFisher
Fosfat tamponlu salin (PBS)	Sigma
OneTaq® Hot Start master mix	New England Biolabs
'Thermal Cycler'	MyGene Series Peltier MG96G
'MicroPlate' Okuyucu	Tecan Infinite F50
Doku homojenizatörü-Sonikatör	Bandelin Sonopuls
Dikey elektroforez cihazı	Apollo Instrumentation
Yatay elektroforez cihazı	Biorad
Yarı-ıslak transfer cihazı	
Islak transfer cihazı	
pH metre	Thermo-Orion3Star
Kriyostat	Leica-CM1100
Mikrotom	Leica SM2000R
Santrifüj	Hettich Mikro 22R
Santrifüj	Nüve NF 800R
Lazer Benekli Görüntüleme	Thorlabs
'Non-invasive blood pressure (NIBP)' ölçümü	AD Instruments
Anestezi Standı	AMS-Minor 612
Stereotaksik çerçeve	WPI
Elektrikli battaniye	Kent Scientific
Floresan ve Işık mikroskobu	Nikon- E600
Stereomikroskop	Nikon SMZ 745T
Konfokal Mikroskop	Leica TCS SP8

3.4. İntraserebroventriküler (isv) ve İntravitreale 1,4-dideoksi-1,4-imino-d-arabinitol (DAB) Uygulaması

Glikojen fosforilaz inhibitörü olan 1,4-dideoksi-1,4-imino-d-arabinitol (DAB), KBB/KRB'ni geçmemektedir. Glikojen kullanımını kısıtlamak amacıyla anestezi altındaki farelere enjekte edilmek üzere hem retina ile hem beyin için 0,25 M DAB solüsyonu steril serum fizyolojik içinde hazırlanmıştır (204).

3.5. İntraserebroventriküler (isv) 1,4-dideoksi-1,4-imino-d-arabinitol (DAB) Enjeksiyonu

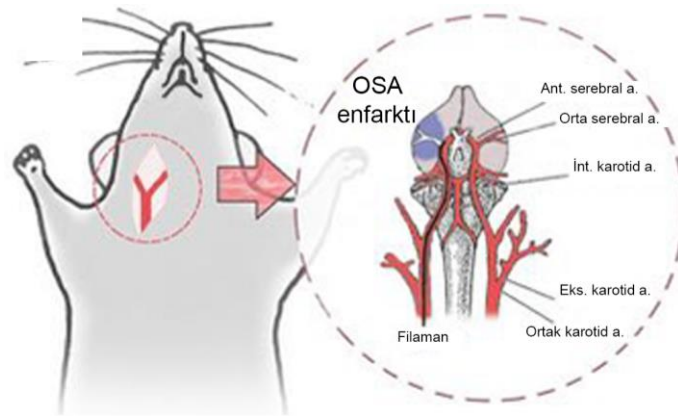
Fareler izofluran anestezisi altında stereotaksik çerçeveye yerleştirildikten sonra sağ veya sol lateral ventriküllerine ulaşacak şekilde orta noktası bregmadan 0,15 mm arka, 0,7 mm laterale bir 'burr hole' açılmıştır. Hamilton şırıngası yardımıyla 3,15 mm derinliğe 10 dakikada ulaşılmış, beş dakika içerisinde 0,25 M (250 mM) DAB (0,75 µL içinde) 0,15 µL/dak hızla enjekte edilmiştir (204) (Şekil 3.1). Enjeksiyon sonrası beş dakika boyunca beklendikten sonra enjektör girilen hızla çıkarılmıştır. Orta hat deri insizyonu emilebilen 4-0 cerrahi dikiş ipi ile kapatılmıştır. Cerrahi sonrası fareler anestezi etkisi ortadan kalkana kadar ısıtıcı battaniye üzerinde bekletilmiştir.



Şekil 3.1. İntraserebroventriküler enjeksiyonun şematik gösterimi (Bregmaya göre; Anteroposterior (AP) -0,15 mm, Mediolateral (8) \pm 0,70 mm, Dorsoventral (205) 3,15 mm) (206). A. Tepeden görünüm. B. Koronal görünüm.

3.6. Geçici Fokal Serebral İskemi Modeli

DAB solüsyonunun isv enjeksiyonundan 30 dakika, 1, 3, 6, 9 ve 24 saat sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir. İntraserebroventriküler DAB enjeksiyonu sonrasında stereotaksik çerçeveden çıkarılan farelerde geçici fokal serebral iskemi yapılmıştır. İzofluran anestezisi altında sırtüstü pozisyonda yatırılarak boyuna orta hat cilt insizyonu yapılmıştır. Devamında paratrakeal kasların diseksiyonu ile karotid bifürkasyon ve internal karotid arter ortaya çıkarılmıştır. Eksternal karotid arter distalden ve ana karotid arter proksimalden 5-0 ipek suture ile bağlanmıştır. İnternal ve eksternal karotid arter bifürkasyonunun 1 mm proksimalinden mikro makas ile arteria karotis kommunis insizyonu yapılmıştır. Ucu sertleştirici (Xantropen M Haereus Kulzer, Optosil®-Xantropen Activator, Bayer, Almanya) karışımı ile kütleştirilip kalınlaştırılmış 8-0 filaman, açılan insizyondan damar içine sokularak internal karotid artere ilerletilmiştir (Şekil 3.2). Filaman orta serebral artere doğru 10 mm kadar ilerletilip direnç hissedildiğinde durulmuştur. 2 saat iskemi sonrasında ip çekilerek rekanalizasyon sağlanmıştır. Rekanalizasyon sonrası fareler anesteziden ayılana kadar 37°C sıcaklıkta tutulmuştur.



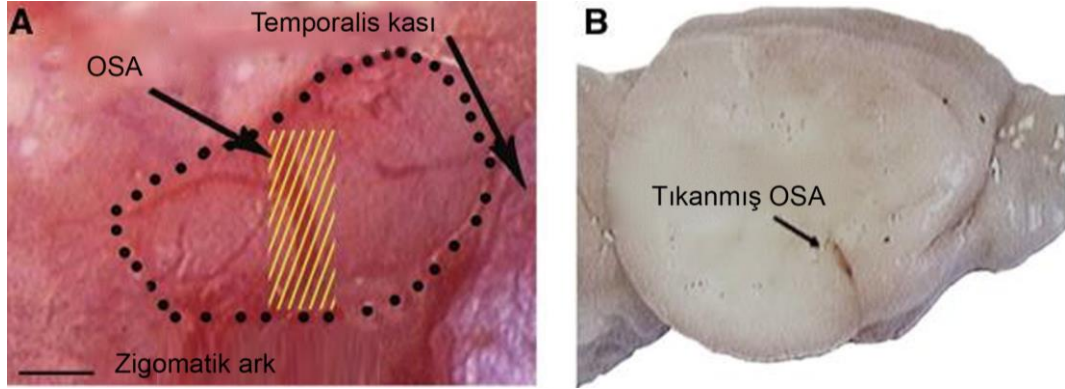
Şekil 3.2. İntraluminal filaman modeli ile farelerde geçici fokal serebral iskemi modelinin şematik gösterilmesi (207).

İmmünofloresan işaretlemeler için fareler sakrifiye edilmeden önce yüksek doz (1 g/kg) kloralhidrat anestezisi ile uyutularak 10 cc heparinli fizyolojik serum ardından 50 cc %4 paraformaldehit solüsyonu ile kardiyak perfüzyon 3-4 dakika içerisinde hızlıca gerçekleştirilmiş ve fareler dekapite edilerek beyinleri çıkarılmıştır.

Tüm beyinler 24 saat boyunca %4 paraformaldehit solüsyonunda bekletilmiştir. Ardından sırasıyla %10, 20 ve 30 sükröz solüsyonlarından geçirilerek kryoproteksiyon sağlanmıştır. Mikrodamarlardaki kasılmaların sayımı, nöroglivasküler düzeyde glikojen ve nörovasküler ünite elemanlarının gösterimi için 20, 50 ve 60 mikronluk frozen kesitler alınarak immüno Floresan işaretlemeler yapılmıştır.

3.7. Kalıcı Distal Fokal Serebral İskemi Modeli

Fareler stereotaksi çemberine yerleştirildikten sonra kafa derisi açılıp, çevre dokulara zarar vermeden sağ temporal kas disekte edilmiştir. Zigomatik ark ile skuamoz kemik kesişimindeki alan yüksek hızlı dril ile inceltilirken serum fizyolojik ile soğutulmuştur. Orta serebral arter (OSA) hattı inceltilmiş kemik altında görünür hale getirilmiştir. Sonrasında distal OSA üzerinde kemikte bir yuvarlak delik ('*Burr hole*') açılmıştır. İnceltilmiş olan kemik, forseps yardımıyla çıkarılmıştır. OSA ve üzerindeki duramatere zarar vermemek için dikkat edilmiştir. İşlem sırasında ve kemik kaldırıldıktan sonra OSA üzerindeki alan 37°C yapay beyin-omurilik sıvısı ('*artificial cerebrospinal fluid*' (*aCSF*')) ile yıkanmıştır. Bölgesel serebral kan akımı OSA sulama alanı olan inceltilmiş parietal kemik bölgesinden lazer benekli kontrast görüntüleme tekniği ile kaydedilmiştir. İskemi öncesi kan akımı 10 dakika boyunca dengelendiğinde, $0,3 \times 1 \text{ mm}^2$ boyutundaki filtre kağıdına emdirilmiş olan %30'luk FeCl_3 duranın intakt kalmasına dikkat edilerek, OSA boyunca yerleştirilmiştir. Serebral kan akımı yaklaşık 2 saat boyunca devamlı olarak izlenmiştir. Filtre kağıdı, lazer benekli kontrast görüntüleme ile serebral kan akımının kesilmesine göre 3-10 dakika sonrasında kaldırılmıştır (208).



Şekil 3.3. Distal OSA üzerine topikal FeCl_3 uygulaması. (A) %30'luk FeCl_3 emdirilmiş bir parça ($0.3 \times 1 \text{ mm}^2$) filtre kağıdı (sarı çizgiler) kranial pencere üzerinden distal OSA hattı boyunca yerleştirilmiştir. Duramater hasarlanmadan bırakılmıştır. (B) Tromboze OSA (kahverengi renk değişimi) segmenti (formalin-fikse beyin). (208).

3.8. Lazer Benekli Kontrast Görüntüleme ile Kortikal Kan Akışının İncelenmesi ve Perfüzyon Haritasının Oluşturulması

Lazer Benekli Kontrast Görüntüleme için cerrahi stereomikroskoba bağlı bir CCD (Basler 602F, Basler Vision Technologies, Ahrensburg, Germany) kamera ve özel olarak tasarlanmış yazılım (209) kullanılmıştır. İnceltilmiş kafatası, özel bir lazer diyot (785 nm dalgaboyu, Thorlabs) ile sürekli aydınlatılmıştır. Lazer benekli kontrast görüntüler deney boyunca her 10 saniyede 1 alınmış ve daha önce literatürde belirtildiği gibi analiz edilmiştir (209). Deney boyunca kortikal kan akımı ile ilgili analizleri gerçekleştirebilmek için görüntüler ImageJ v1.42q yazılımı tarafından görüntü sekansları olarak yüklenmiş ve 'tiff' formatında kaydedilmiştir. Görüntüleri oluşturan her bir piksel üzerinde bulunan kontrast değerlerinin kortikal kan akışı ile ilişkilendirilebilmesi için çoklu 'tiff' dosyasında bulunan her görüntü, yarı-otomatize MATLAB-Simulink® kodu kullanılarak 'inverse correlation time (ICT)' görüntülerine dönüştürülmüştür. Her bir ICT görüntü dizisi için deney başlangıcı öncesi birkaç görüntünün ortalaması alınarak bazal bir görüntü oluşturulmuştur. Deney sırasında takip eden her bir ICT görüntüsünü oluşturan piksel değerleri, ilgili bazal görüntünün değerlerinden çıkarılmış ve bazal görüntüye bölünmüştür. Bu değerlerin ortalamaları alındıktan sonra her bir piksel için elde edilen sonuçlar, deney süresince ortalama yüzde değişimi göstermekte olup bu değerlerden tek bir görüntü

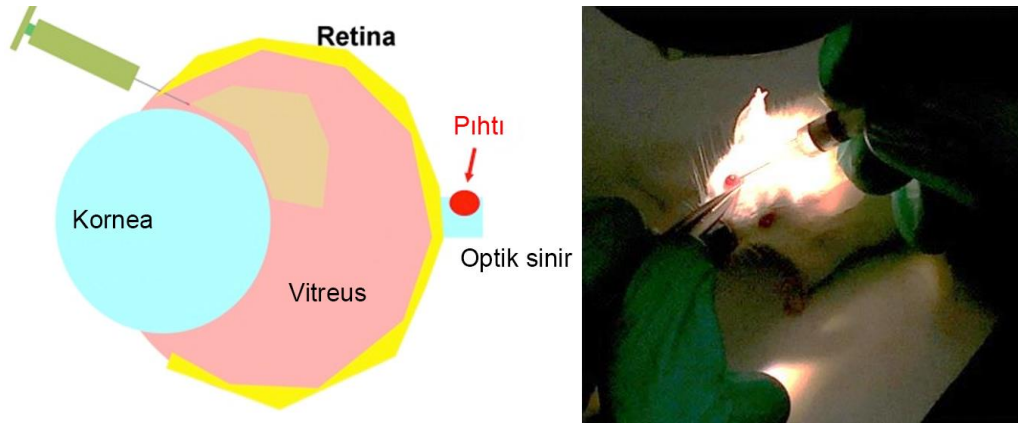
oluşturulmuştur. Ortalama kortikal kan akışı değişimini haritalandırmak için görüntü oluşturulmuş ve bu görüntü renklendirilmiştir. İlgilenilen her bir alanda ('*Region of Interest (ROI)*') ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmış, piksellerin dağılımını gösteren histogramlar oluşturulmuştur.

3.9. İntravitreal DAB Solüsyonunun Enjeksiyonu

DAB serum fizyolojik içinde son konsantrasyonu 0,25 M olacak şekilde hazırlandıktan sonra solüsyonunun 2 µl'si göze intravitreal yoldan (vitreus içine, limbustan 1 mm uzağa) sağ veya sol göze enjekte edilmiştir (Şekil 3.4). Enjeksiyonlarda göze en az hasarı verebilmek için 34 gauge Hamilton iğne kullanılmıştır. Fareler enjeksiyondan 2 saat sonra sakrifiye edilmiştir. Tüm retina deneylerinde intravitreal 2 µl steril serum fizyolojik enjeksiyonu kontrol olarak kullanılmıştır (9).

3.10. Kalıcı Retinal İskemi Modeli

Farelerde retina iskemisi için Demir (III) Klorür ($FeCl_3$) kullanılarak santral retinal arter (SRA) oklüzyonu yapılmıştır. Cerrahi, cerrahi mikroskop altında 4x–25x büyütme kullanılarak yapılmıştır (Carl Zeiss AG, Jena, Almanya). Optik sinir başı ve SRA orbita içerisinde gözlendikten sonra %20 $FeCl_3$ emdirilmiş filtre kağıdı (0,3 x 1 mm) SRA'ı içeren optik sinir üzerine 3 dakika süreyle uygulanmıştır (Şekil 3.4) (9, 208). Böylece $FeCl_3$ uygulaması damar içerisinde pıhtı oluşumuna neden olarak retinal kan akımında azalmaya neden olmuştur. Bu aşamada SRA ve üzerindeki duranın zedelenmemesine özen gösterilerek, aynı zamanda filtre kağıdı ile sıkı bir temas sağlayacak şekilde SRA'nın yeterli bir şekilde ortaya çıkarılması sağlanmıştır. Tüm deneylerde deney esnasında retinal veya vitreal kanama oluşan hayvanlar çalışma dışı bırakılmıştır.



Şekil 3.4. Göze intravitreal enjeksiyonun yapıldığı ve retinal iskemisi için $FeCl_3$ uygulanan bölgelerin (kırmızı pıhtı) şematik gösterimi ve deney sırasında intravitreal enjeksiyonun gösterilmesi.

3.11. Lazer Benekli Kontrast Görüntüleme ile Farede Sistolik Kan Basıncının İncelenmesi

Sistolik kan basıncının deney sırasında monitörizasyonu serebral perfüzyon değişikliklerinin incelenmesi için önemli bir parametredir (210, 211). Sistolik kan basıncı ölçümleri literatürde girişimsel ve girişimsel olmayan yöntemlerle gerçekleştirilmektedir; ancak farede girişimsel olmayan yöntemlerin etkinliği tartışmalıdır (212). Bu nedenle literatürde ilk kez lazer benekli kontrastlı görüntüleme ile kuyruktan sistolik kan basıncı ölçülmüştür. Lazer Benekli Kontrast Görüntüleme için cerrahi stereomikroskoba bağlı bir CCD (Basler 602F, Basler Vision Technologies, Ahrensburg, Germany) kamera ve özel olarak tasarlanmış yazılım (209) kullanılmıştır. Farenin kuyruğuna uygun boyutta özel tansiyon manşonu (ADInstruments) kuyruk proksimaline yerleştirilmiş ve NIBP kontrolörü ile manşon istenildiği zaman şişirilmiştir. Özel bir lazer diyot (785 nm dalgaboyu, Thorlabs) ile sürekli olarak aydınlatılan kuyruk kısmı yer fıstığı yağı ile parlak hale getirilmiştir. Lazer benekli kontrast görüntüleri deney boyunca her 1 saniyede 1 alınarak (1 Hz) 1 dakika boyunca kuyrukte bazal kan akışı görüntülendikten sonra manşon şişirilmiştir, deney boyunca kuyruk kan akışı takip edilmiştir. Kan akımı ile ilgili analizleri gerçekleştirebilmek için görüntüler Fiji (ImageJ) yazılımı tarafından görüntü sekansları olarak yüklenmiş ve *'tiff'* formatında kaydedilmiştir. Damar üzerinde yapılan zamansal kan akışı ölçümleri ile manşondaki basınç grafikleri üst

üste çakıştırılmıştır. Böylece kan akışının kesildiği ve yeniden başladığı noktalarda basınç değerleri ölçülerek sistolik kan basıncı değerleri elde edilmiştir.

3.12. GYS-1 ‘*Nestin Knock-Out*’ (GYS-1^{NestinKO}) Farelerin Genotiplenmesi ve Çaprazlanarak Üretilmesi

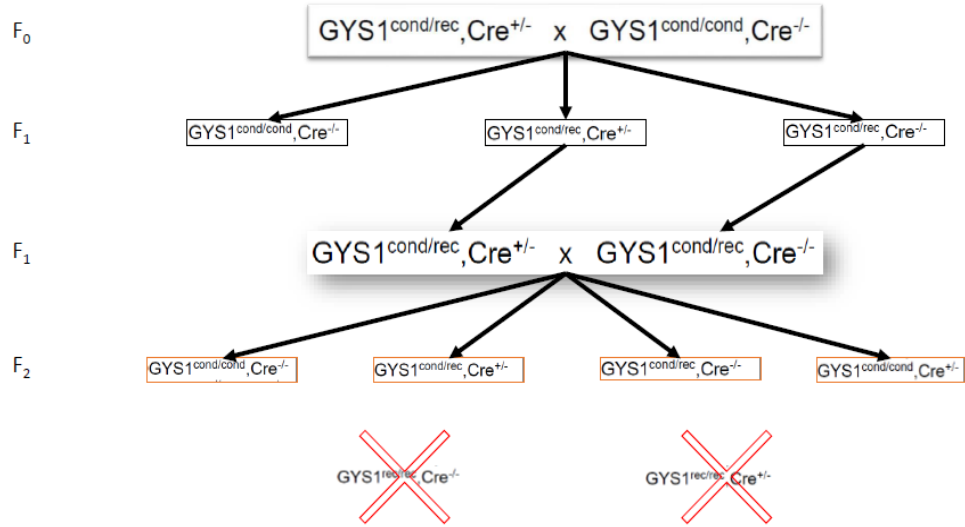
GYS-1 ‘*Nestin Knock-Out*’ (GYS-1^{NestinKO}) genetiği değiştirilmiş fareler ilk olarak IRB Barcelona araştırma enstitüsünde Jordi Duran ve Joan J. Guinovart tarafından üretilerek literatüre kazandırılmıştır (24). Bütün MSS’nde glikojen sentaz-1 geni ve ilgili enzimi ifade etmeyen, bu genetiği değiştirilmiş ve uygun yabanıl (C57BL/6) kontrol fareler Hacettepe Üniversitesi Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü Beyin Araştırmaları Laboratuvarı’na bu enstitü tarafından gönderildi. Toplam 4 adet (2 adet dişi, 2 adet erkek) gönderilen fareler aşağıda ayrıntılı olarak anlatıldığı şekilde genotiplendirilmiştir.

3.12.1. GYS-1^{nestinko} Farelerin Üretilmesi

Nestin geni önündeki promoter bölgesi içerisinde ‘*Cre*’ rekombinaz enzimi ifade eden ‘*Nestin-Cre*’ farelerle, *Cre* rekombinaz enziminin tanıdığı ilgili ‘*lox*’ sekanslarının GYS-1 geni önü ve arkasına yerleştirildiği ‘*conditional(con)*’ farelerin çaprazlanması gerekmektedir. Çaprazlandıktan sonra *Cre* rekombinaz ilgili ‘*lox*’ sekanslarını tanıyarak GYS-1 genini genomdan keserek çıkaracaktır. Bu durumda yeni oluşan allel ‘*recombined(rec)*’ olacaktır. Tarafımıza gönderilen 2 dişi GYS-1^{con/rec}, *Cre*^{-/-} genotipinde olup, 1 erkek GYS-1^{con/rec}, *Cre*^{-/-}, diğer 1 erkek ise istenilen GYS-1^{con/rec}, *Cre*^{-/+} genotipindedir. İlgili çaprazlama şekil 3.5’te, farelerin genotiplerine göre MSS’nde GYS-1 gen ifadesi tablo 3.4’te belirtilmektedir.

Tablo 3.4. Genotip ve GYS-1 gen ifadesi.

Genotip	Beyinde GYS-1 gen ifadesi	Bütün vücutta GYS-1 gen ifadesi
$GYS1^{cond/cond}, Cre^{-/-}$	Yabani (GYS-1 +/+)	Yabani (GYS-1 +/+)
$GYS1^{cond/rec}, Cre^{-/-}$	Heterozigot (GYS-1 +/-)	Heterozigot (GYS-1 +/-)
$GYS1^{cond/rec}, Cre^{+/-}$	Homozigot (GYS-1 -/-)	Heterozigot (GYS-1 +/-)
$GYS1^{rec/rec}, Cre^{-/-}$	Homozigot (GYS-1 -/-) → Ölümcül	
$GYS1^{rec/rec}, Cre^{+/-}$		

**Şekil 3.5.** GYS-1^{NestinKO} farelerin çaprazlanması, Şematik Görünüm. F0: İlk nesil, F1: 1. nesil, F2: 2. nesil, Çarpı işareti: Bütün vücut homozigot fareler (lethal) intraüterin olarak ölmektedir.

Bunun üzerine Jackson Laboratuvarlarının önerdiği hızlı DNA çıkarım protokolü uygulanarak kulaklardan alınan 2 mm çapındaki dokulardan genotiplenecek deoksiribonükleik asit (DNA) çıkarılmıştır.

3.12.2. 'Polymerase Chain Reaction' (PCR) ve Agaroz Jel Elektrofrezisi ile Genotip Belirleme

Fareleri literatüre kazandıran ve tarafımıza gönderen grubun belirttiği sekanslara uygun bir biçimde üretilen primerler ile aşağıda belirtilen protokol kullanılarak 'Polymerase Chain Reaction' (PCR) başlatılmıştır. Her bir gen için primerler Tablo 3.5'te belirtilmiştir.

Tablo 3.5. Primer Sekansları.

'Conditional' allel	'Forward' primer	5' AGGGTCAAGTAGCGGTGTTG 3'
	'Reverse' primer	5' TCAACTTCACAGGCAAAAACC 3'
'Recombined' allel	'Forward' primer	5' TGGAGCTGAGATCACTAAAGG 3'
	'Reverse' primer	5' TTGTGAGTGCTGAACGCCCTAC 3'
'Cre' allel	'Forward' primer	5' GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC 3'
	'Reverse' primer	5' GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT 3'

Her bir PCR; 2µl DNA, 1 µl 'forward' ve 'reverse' primer, 1 µl 'master mix', 6 µl ddH₂O ile toplam 20 µl karışım ile gerçekleştirilmiştir. PCR koşulları tablo 3.6'daki gibidir.

Tablo 3.6. PCR Koşulları.

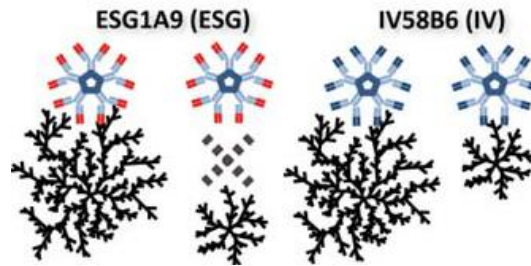
Basamaklar		Sıcaklık	Zaman
Başlangıç Denatürasyon		95°C	30 sn
35 döngü	Denatürasyon	95°C	30 sn
	Bağlanma 'Annealing'	53°C	30 sn
	Uzatma 'Extension'	68°C	1 dk
Son uzatma		68°C	5 dk
Tutma 'Hold'		4°C	

Farelerden alınan DNA örnekleriyle bu koşullar altında PCR gerçekleştirilmiştir. Sonrasında agaroz jel elektroforezi için 1X Tris-baz, Asetat ve EDTA (TAE) içerisinde %2 agaroz ve 0,2-0,5 µg/mL yoğunluğunda olacak şekilde ethidium bromür (EtBr) ısıtılarak çözülmüştür. 5X TAE için; 24,2 g Tris-baz, 5,71 mL asetat ve 10 mL 0,5 M sodyum EDTA 1 L ddH₂O içinde çözülmüştür. Jel soğuduktan sonra örnekler yüklenmiş ve 150 V ile 1 saat yürütülmüştür.

3.13. Histokimyasal ve İmmüno Floresan İncelemeler

Retinada ve beyin dokusunda bulunan glikojen, histokimyasal bir boya olan Periyodik Asit Schiff'in (PAS) doku kesitlerine uygulanmasıyla gösterilmiştir. Glikojen-damar duvarı ilişkisini göstermek amacıyla damarları görünür kılan 'Fluorescein' işaretli 'Lycopersicon Esculentum' lektin ile PAS histokimyasal işaretlemesi birlikte yapılmıştır. Glikojen fosforilaz inhibitörü DAB uygulanarak beyinde ve retinada glikojen kullanımı kısıtlanmış ve kontrol farelerde

nörogliovasküler ünite elemanlarının glikojenle arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla ise PAS ile birlikte sırasıyla astrosit belirteçleri GFAP ve S100, perisit belirteci olan PDGFR- β ve glikojen sentaz-1 (GYS-1) enziminin immünofloresan işaretlemeleri gerçekleştirilmiştir. Bunun yanı sıra literatürde belirtilen ancak ticari olarak satışı bulunmayan glikojenin immünofloresan yöntemlerle görüntülenebilmesi amacıyla üretilmiş glikojen antikorlarından ESG1A9'un temini için Kobe Üniversitesi'nden Prof. Dr. Hitoshi Ashida ile IV58B6 antikorunun temini için Tokushima Üniversitesi'nden Prof. Dr. Otto Baba ile iletişime geçilmiştir. Kullanılan glikojen belirleyici ESG1A9 ve IV58B6 antikorları, Prof. Dr. Hitoshi Ashida ve Prof. Dr. Otto Baba'nın tarafından edilmiştir. IV58B6 bütün glikojen granüllerini, ESG1A9 ise 30'dan büyük yan zincirleri olan glikojen deposunu işaretlemek amacıyla kullanılmıştır (5) (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. IV58B6 ve ESG1A9 antikorlarının bağlandıkları glikojen moleküllerinin şematik gösterimi (Oe ve ark., *Glia* 2016'dan alınmıştır). IV58B6 her büyüklükteki glikojen molekülüne bağlanırken ESG1A9, 30'dan küçük yan zincirli glikojen moleküllerini tanımamaktadır.

'*Fluorescein*' ve '*Texas Red*' işaretli '*Lycopersicon Esculentum*' Lektin histokimyası beyin ve retina damarlarını görüntülemek amacıyla kullanılmıştır. Astrositler GYS-1, GFAP-S100 ve SOX9, perisitler PDGFR- β , NG2, CD13 ve alfa-düz kas aktini (α -DKA), astrosit son ayakları Aquaporin 4 (AQP4), ve GLUT1, endotelial sıkı bileşke ise klaudin-5 ve ZO-1 immünofloresan işaretlemeleri ile astrosit-perisit-endotel ilişkisini nörogliovasküler düzeyde göstermek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Kesitler %0,3 Triton-X içeren PBS ile oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübe edildikten sonra PFA ile kapanmış antijen epitoplarının geri kazanımı amacıyla 80°C'ye ısıtılmış 10 mM sodyum sitrat (pH: 6,0) çözeltisinde 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Bu süreç sayesinde immünofloresan işaretlemelerde kullanılacak primer antikorlarla dokudaki antijenlerin etkileşimi kolaylaşmıştır.

Özgül olmayan boyanmaları engellemek için kesitler %0,3 Triton-X içeren %1 sığır serum albümini, %10 normal keçi serumu (NGS) (%0,3 PBS-T/ %1 BSA, %10 NGS) çözeltisiyle oda sıcaklığında 1 saat boyunca bloke edilmiştir. Kesitler %0,3 triton-X içeren fosfat tamponlu serum fizyolojikte (PBS) çözünen primer antikorlarla +4°C' de gece boyunca inkübe edilmiştir. Bütün kesitler ile PBS 3 kez yıkandıktan sonra %0,3 triton-X içeren PBS içerisinde uygun floresan proteinlerle işaretli sekonder antikorları oda sıcaklığında 90 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Kesitler tekrar 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra, PBS içerisinde 1/200 oranında çözünen 'Fluorescein' veya 'Texas Red' işaretli 'Lycopersicon Esculentum' Lektin ile damarların incelenmesi amacıyla oda sıcaklığında 4 saat boyunca işaretlenmiştir. Son olarak 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra kesitler çekirdek görüntülemesi için 1/1000 oranında *Hoechst* 33258 (Molecular Probes, ThermoFisher Scientific) içeren kapama solüsyonu ile kapatılmıştır.

3.13.1. Periyodik Asit Schiff (PAS) Histokimyasal İşaretlemesi

PAS histokimyasal işaretlemesi glikojeni işaretlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Beyin ve retina kesitleri %0,3 triton-X içeren PBS ile oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübe edildikten sonra PFA ile kapanmış antijen epitoplalarının geri kazanımı amacıyla 80°C'ye ısıtılmış 10 mM sodyum sitrat (pH: 6,0) çözeltisinde 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Bu süreç hem hücre içerisinde bulunan glikojenin Schiff's ajanı ile histokimyasal tepkimeye girmesi hem de immünofloresan boyamalarda kullanılacak primer antikorlarla dokudaki antijenlerin etkileşimini kolaylaştırmıştır. Floresan sekonder antikorların Schiff's ajanıyla çapraz reaksiyon vermesi dolayısıyla PAS, immünofloresan protokolünden önce gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle doku kesitleri distile su içerisinde %0,5 oranında çözülmüş periyodik asit çözeltisinde (pH: 7,4) 10 dakika boyunca oda sıcaklığında okside edilmiştir. Schiff's ajanının glikojen dışı aldehit grupları ile de tepkimeye girmesi nedeniyle bu grupların bloklanması amacıyla kesitler distile su içerisinde doyurulmuş dimedon çözeltisinde (pH: 7,4) 60°C' de 20 dakika boyunca bekletilmiştir (213). Distile suda yıkanan kesitler Schiff's ajanıyla oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. Isıtılmış distile suda 5 dakika boyunca bekletilerek PAS

tepkimesi sabitlendikten sonra kesitler %0,3 triton-X içeren PBS içerisinde ilgili primer antikorlarıyla veya '*Lycopersicon Esculentum*' Lektin +4°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Bütün kesitler 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra %0,3 triton-X içeren PBS uygun floresan proteinlerle işaretli sekonder antikorları (1/200 oranında) oda sıcaklığında 90 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Son olarak 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra kesitler, çekirdek görüntülemesi için 1/1000 oranında Hoechst 33258 (Molecular Probes, ThermoFisher Scientific) içeren kapama solüsyonu ile kapatılmıştır.

3.14. Beyin ve Retinal Dokularda Western Blotlama ile Protein Analizi

Western Blotlama Protokolü, genel hatlarıyla protein yoğunluk ölçümü ve örnek hazırlama, jele yükleme ve yürütme, membran transferi, blokaj ve primer antikör inkübasyonu ve son olarak membran görüntülemesi şeklindedir (214).

3.14.1. Homojenizasyon ve Protein Yoğunluk Ölçümü

Dokular elde edildikten hemen sonra buz üzerinde doku yaş ağırlığı solüsyonun %30'u olacak şekilde 1/100 proteaz (1x), 1/100 fosfataz inhibitörü içeren parçalama ve homojenizasyon tamponu RIPA ('*radioimmünoprecipitation assay*') içerisinde sonikatör yardımıyla homojenize edilmiştir. RIPA aşağıdaki tarife göre hazırlanmış ve tek kullanımlık alikotlar halinde -20°C'de saklanmıştır. 10 mL tampon için;

- 89,1 mg Sodyum klorür (NaCl)
- 100 µL Triton-100-X
- 52 mg Sodyum deoksikolik asit (55)
- 333,5 µL Tris tamponu (pH= 8,0, 1,5 M)
- 50 µL %10 Sodyum Deodesil Sülfat (SDS)

Örnekler tampon içerisinde homojenize edildikten sonra 2 saat buz üstünde +4°C’de bekletilmiştir. Ardından örnekler +4°C’de 14.000 rpm’de 20 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant ayrılmıştır. Pelletler yeniden protein elde edilmesi ihtimaliyle -80°C’de saklanmıştır. Beyin dokusu için 1/100 ve 1/500, retinal dokulardan 1/20 ve 1/100’lük oranlarda distile su (ddH₂O) içerisinde çözeltiler hazırlanmış ve bu örnekler Pierce bikikürik asit (BCA) protein yoğunluk ölçüm yönteminde kullanılmıştır. 96 kuyucuklu plakalarda standart protein (BSA) örnekleri ikili, yoğunlukları belirlenecek örnekler üçlü olarak 200 µL BCA karışımına 25 µL ilgili dilüsyonlarda eklenmiş ve 37°C’de 30-60 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında 96 kuyucuklu plaka okuyucu yardımıyla spektrofotometrik olarak (560 nm filtre ile) kuyucuklar içerisindeki protein yoğunlukları ölçülmüştür. Standart protein yoğunlukları yardımıyla ilgili örneklerin toplam protein yoğunlukları dilüsyonlardan yola çıkılarak hesaplanmıştır.

3.14.2. Örnek Hazırlama

Her bir kuyucuğa yüklenecek her bir retina ve beyin örneğinde bulunması gereken total protein miktarı, GYS-1 enziminin görüntülenebilir en uygun miktarına göre belirlenmiştir.

- Yüklenecek protein hacmi (µL) = Yüklenecek yeterli toplam protein miktarı (µg) / örnek toplam protein konsantrasyonu (µg/µL)

Kuyucuğa yüklenecek toplam hacme uygun miktarda hazırlanmış örnek tamponu (sample buffer), %10 merkaptolanol olacak ve yukarıdaki formüle göre hesaplanan örnek proteinini içerecek şekilde, distile su (ddH₂O) ile hedef hacme ulaştırılmıştır. Her bir ‘*eppendorf*’ masa başı santrifüj yardımıyla çevrilerek (‘*spin down*’) tüm bileşenlerin karışması sağlanmıştır. ‘*Eppendorf*’lar içerisindeki örnekler 5 dakika 95 °C’ de kaynatılmıştır. Membran ve glikozile proteinlerinin yapısının korunması ve elektriksel akımın uygulanması üzerine jelde uygun şekilde hareket

edebilmesi amacıyla literatürde önerildiği üzere 70°C’de 10 dakika ısıtma da denenmiştir. Ardından örnekler jele yüklenmek için buz üzerine yerleştirilmiştir.

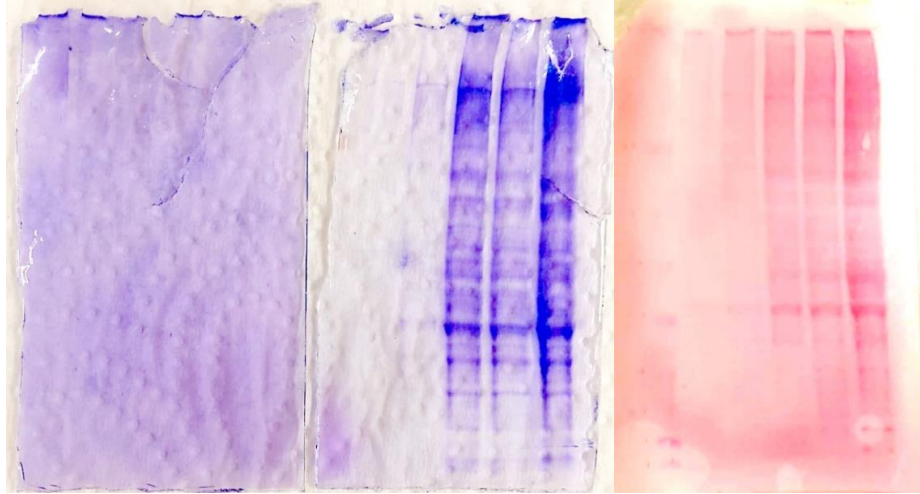
3.14.3. Jele Yükleme ve Yürütme

Örnekleri yüklemek için ticari hazır jeller (Bis-Tris ve/veya Tris-Glisin) kullanılmıştır. Yürütme tamponu (MES/MOPS veya Tris-Glisin), ticari hazır çözeltisi (20X) distile su ile 1X oranına seyreltilerek hazırlanmıştır. Yürütme tamponu elektroforez cihazının içerisine dökülmüş ve tamponun sızmadığına emin olunduktan sonra yürütme tamponunun kalanı cihazda belirtilen seviyeyi aşmayacak şekilde yürütme cihazının haznesine dökülmüştür. Jellerin kuyucukları bir enjektör yardımıyla temizlendikten sonra büyüklükleri bilinen protein merdiveni (*‘ladder’*) 7 µL olmak üzere tüm örnekler yüklenme sıralaması not edilerek jeldeki kuyucuklara küçük pipet yardımıyla yüklenmiştir. Güç kaynağı 120 volt olacak şekilde ayarlandıktan sonra 1,5 saatte yürütme bitirilmiştir.

3.14.4. Transfer

Poliviniliden florür (PVDF) membranlar 5 dakika %100 metanolde, ardından 5 dakika distile suda (ddH₂O) bir karıştırıcı (*‘orbital shaker’*) üzerinde bekletilmiştir. Transfer tampon karışımı hazırlandıktan sonra (%10 metanol, 1X transfer tamponu) PVDF membran ve *‘Whatman’* kartonları 5-10 dakika boyunca bir karıştırıcı üzerinde transfer tamponu içerisinde bekletilmiştir. Yürütmenin bitimiyle iki plaka arasında bulunan jel ile standart *‘ladder’* solda kalacak şekilde transfer sandviçi hazırlanmıştır. Sırasıyla 1 tabaka sünger-Whatmann kartonu-Jel-Membran-Whatmann kartonu-1 tabaka sünger ile hazırlanan sandviç transfer tamponu ile ıslatılarak hazırlanıp yarı-ıslak veya ıslak transfer cihazına yerleştirilmiş ve sırasıyla membran başına 120 mAmp veya toplamda 70 volt (V) olacak şekilde transfer başlatılmıştır. Transfer süresi yarı ıslak transfer için 3,5 saat, ıslak transfer için 2 saat olup büyüklükleri bilinen protein seviyeleri işlemin sonunda PVDF membran üzerinde işaretlenmiştir. Transfer etkinlikleri Ponceau boyası ile membranda,

Coomassie mavisi ile jelde bulunan proteinlerin işaretlenmesi ile incelenmiştir (Şekil 3.7). Bu tez kapsamında GYS-1^{NestinKO} farelerde retinal GYS-1 ifadesi literatürde ilk defa incelenmiştir. Hem glikojen sentaz enziminin hem de çoğu nörogliovasküler ünite ile ilişkili, moleküler ağırlığı fazla olan proteinlerin membrana tam olarak geçişi sadece ıslak transfer ile mümkün olmuştur (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Sol ve ortada Coomassie mavisi ile boyanan jeller. Solda, ıslak transfer sonrası, ortada yarı-ıslak transfer sonrası jellerde transfer edilmeyen proteinlerin görüntüsü. Soldan sağa sırasıyla 10-30-50-100-200 µg protein (beyin dokusu) yüklenmiştir. Sağda ıslak transfer sonrası Ponceau çözeltisiyle boyanan PVDF membran.

3.14.5. Blokaj ve Primer Antikor İnkübasyonu

PVDF membranlar oda sıcaklığında 1 saat blokaj karışımında (TBS-Tween (%0,1) içine hazırlanmış %5'lik yağsız süt tozu) bir karıştırıcı üzerinde bekletilmiştir. Sonra ilgili primer antikor TBS-Tween (%0,1) içinde hazırlanmış %5'lik BSA karışımında ilgili oranda hazırlanmıştır. Membranlar primer antikorda +4°C gece boyu (12-16 saat) bir karıştırıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Primer antikor inkübasyonu sonrası membranlar oda sıcaklığında 3 kez 10'ar dakika boyunca TBS-T ile bir karıştırıcı üzerinde yıkanmış ve ardından membranlar blokaj çözeltisinde hazırlanan uygun sekonder antikor içeren karışım ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Membranlar oda sıcaklığında 3 kez 10'ar dakika boyunca TBS-T ile yıkanmıştır.

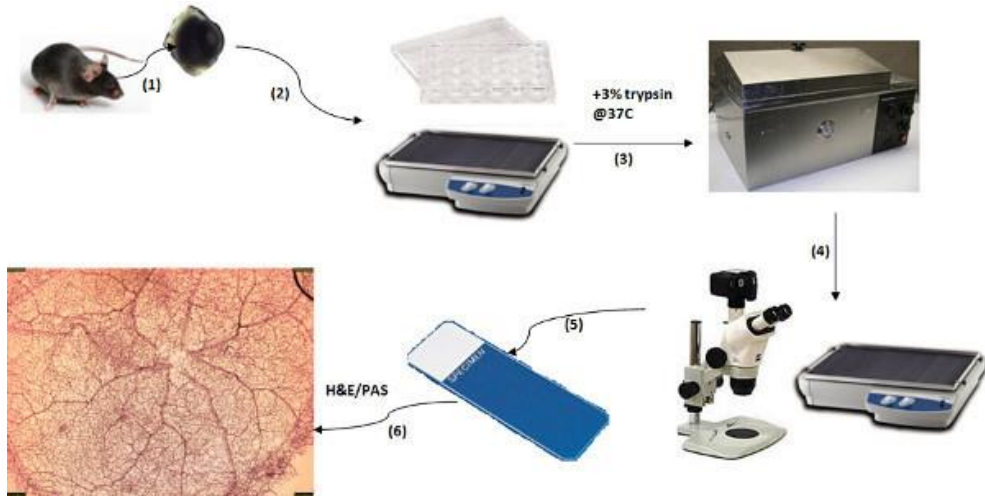
3.14.6. Görüntüleme

Membranlar, sekonder antikor üzerinde bulunan '*horseradish peroxidase*' (HRP) enziminin varlığında tepkime veren taze hazırlanmış elektro-kemoluminesan (ECL) (Pierce Biotechnologies Lumi-Phos ECL) karışımıyla 5 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında Kodak 4000MM Image Station cihazında görüntülenmiştir. Görüntüler ilgili dosyaya kaydedilerek Image J programında analiz edilecek ve bant büyüklükleri '*integrated density*' olarak ölçülerek ve yükleme kontrolü olan β -Aktin veya β III-tubulin'e oranlanarak değerlendirilmiştir. Kullanılan membranlar daha sonraki kullanımlar için şeffaf poşet dosyalar içinde +4°C' de saklanmıştır.

3.15. Retinal Sindirme ('*Retinal Digest*') Hazırlanması

Deneyle sonrasında yüksek doz anestezi altındayken sakrifiye edilen deney ve kontrol grubundaki farelerin gözleri 1 saat boyunca %4 paraformaldehit (PFA) çözeltisinde fikse edilmiştir. Daha sonrasında soğuk PBS içerisinde bulunan gözler, retinal dokuların kurumamasına dikkat edilerek stereomikroskop (Nikon SMZ745T) altına yerleştirilen bir plaka üzerinde diseke edilmiştir. İlgili retinal doku, optik sinir bağlantısı dışında herhangi bir şekilde kesi yapılmadan çıkarılmıştır.

Çıkarılan retina çalkalayıcı üzerinde 500 μ L filtrelenmiş (45 μ m'lik) ddH₂O içerisinde doku bozulması başlayana kadar oda sıcaklığında orbital çalkalayıcı üzerinde bekletilmiştir. Bu sırada %2,5 tripsin, (0,2 M Tris, pH:7,4) olarak hazırlanmış çözeltiden 200 μ L 37°C'de ısıtılmış ve kuyucuğa eklenerek retinal dokunun sindirilmesi sağlanmıştır. Doku yeterli sindirme sağlanınca ddH₂O içerisine alınmıştır. Retina stereomikroskop altına yerleştirilmiş ve retinal damarsal ağ P1000 pipet uçları ve ucu kıvrık forsepsler yardımıyla damar dışı bütün dokulardan arındırılarak ortaya çıkarılmıştır. Sonrasında retinal damarsal ağ, pipet uçları yardımıyla poli-L-lizin kaplı lamaların üzerine alınmıştır. Kuruduktan sonra ilgili histokimyasal (PAS) ve/veya immünohistokimyasal çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bütün protokol literatürdekine benzer şekilde düzenlenmiştir (215).



Şekil 3.8. Retinal sindirme protokolünün şematize edilmiş hali (215).

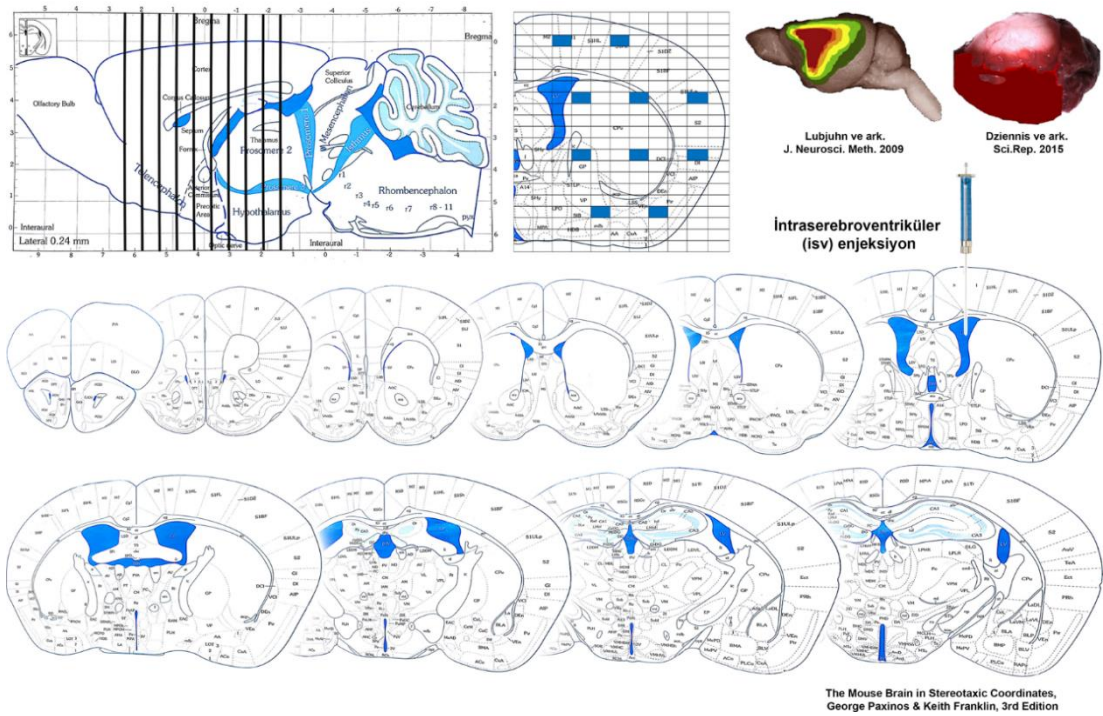
3.16. Beyin ve Retinal Dokuların Görüntülenmesi

Beyin ve retinal dokular, inceleme ve değerlendirmeler amacıyla floresan eklentili ışık mikroskopunda (200x-400x, Eclipse E600, Nikon Instruments Inc., Japan) ve lazer taramalı konfokal mikroskopunda (Leica SP8, Germany) incelenmiştir. Görüntülerin eldesi ve ölçümler için '*Image analysis software*' (NIS Elements, Version 3.22, Nikon Instruments Inc., Japan, Leica SP8) kullanılmıştır.

3.17. Beyinde ve Retinada Mikrodamar Kasılmalarının ve PDGFR- β Pozitif Perisitlerin Sayımı

Damarların takip ve kesim yöntemlerinden etkilenmesi nedeniyle ve daha uzun damar parçalarını elde edebilmek, mikrodamarlardaki kasılma sayımlarını yansız bir şekilde değerlendirmek ve sayabilmek amacıyla beyin kesitlerinde semi-stereolojik çalışma gerçekleştirilmiştir. Beyinler daha önce belirtildiği gibi takip edildikten sonra OSA sulama alanını kapsayacak şekilde (ilk 1 mm'den itibaren 6. mm'ye kadar toplamda 5 mm), her beyinden 50 μ m kalınlığında 10 koronal kesit elde edilmiştir. Bu semi-stereolojik çalışma, her 10 kesitten birinde, toplamda 10 beyin kesitinde yapılmıştır (Şekil 3.9). Bu kesitlerde, '*fluorescein*' işaretli lektin, anti PDGFR- β ve Hoechst 33258 (Molecular Probes, ThermoFisher Scientific) ile sırasıyla damar, perisit ve çekirdekler işaretlenmiştir. Sayımlar 40x büyütme altında,

ilgili alan (disektör) $240 \times 160 \mu\text{m}^2$ ve disektörler arası uzaklık $1000 \times 1200 \mu\text{m}^2$ olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Koronal kesit alımı sırasında oluşabilecek doku hasarının sayımları etkilememesi amacıyla ilk ve son $5 \mu\text{m}$ kalınlık değerlendirilmemiştir. Böylece, her bir disektör alanında incelenen kesit kalınlığı $40 \mu\text{m}$ olarak belirlenmiştir. Her beyinde her bir hemisfer için 10 adet 3 boyutlu disektör hacmi ($40 \times 240 \times 160 \mu\text{m}^3$) incelenerek çapları $9 \mu\text{m}$ 'den küçük olan mikrodamarlardaki kasılmalar ve PDGFR- β pozitif perisitler sayılmıştır. Her bir hemisfer için sayım yapılan toplam alan $3,84 \text{ mm}^2$ 'dir. Bütün parametreler retinal mikrodamar kasılma sayımları için de aynı olup sayımlar bütün retinada gerçekleştirilmiştir. Ölçüm yapılan toplam alan hesaplanmış, kasılma sayımları mm^2 cinsinden ifade edilmiştir.



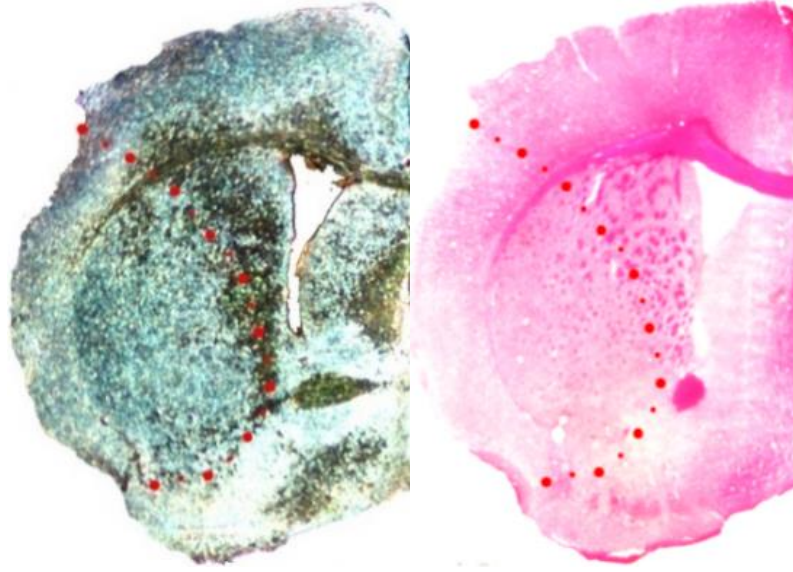
Şekil 3.9. Sol üstte fare beyni sagittal kesitin şematik görünümü. Siyah çizgiler, örneklemenin yapıldığı koronal kesitlerin koordinatlarını göstermektedir. Üst ortada örneklem yapılan koronal kesitlerden birinde sayım yapılan disektörlerin şematik görünümü. Kutuların boyutları $240 \times 160 \mu\text{m}^2$ olup mavi kutular sayımların yapıldığı bölgeleri göstermektedir. Sağ üstte distal OSA iskemisi sonrası etkilenen hacmin şematik görünümü (216, 217). Orta ve altta semi-stereolojik çalışmanın gerçekleştirildiği koronal kesitlerin şematik görünümü. Orta sağda intraserebroventriküler enjeksiyonların gerçekleştirildiği koordinatlarla uyumlu koronal kesitin ve Hamilton enjektörünün şematik görünümü.

3.18. Mikrodamar Çevresinde Kasılma ve PAS ile İşaretlenen Glikojene Özgü Sinyalin Ölçümü

Mikrodamarların yüzeyi üzerindeki glikojen ölçümü için OSA sulama alanını kapsayacak şekilde (ilk 1 mm'den itibaren 6. mm'ye kadar toplamda 5 mm), tüm beyinden 50 µm kalınlığında 100 koronal kesit içerisinde 1/10'u seçilmiştir. Yukarıda belirtilen PAS ve lektin histokimyasal işaretleme yöntemleri ile bu kesitlerde glikojen ve damarlar belirlenmiştir. Daha sonra her bir beyin kesitinde 360 x 240 µm büyüklüğünde her bir kortikal alandan 4-6 disektör alınarak her bir kesit disektör tekniği ile örneklenmiştir. Bu ölçümler için daha önce laboratuvarımızda oluşturulan yazılımın ilk önce mikrodamarları ve yeşil renkli floresan kanaldaki herhangi bir daralmayı belirlediği yarı otomatik bir bilgisayar rutini kullanılmıştır (9) ve daha sonra parlak alan kanalındaki seçilmiş mikrodamarlar üzerindeki glikojen seviyeleri (ortalama parlaklık) belirlenmiştir. Son olarak, yukarıda belirtildiği üzere DAB enjekte edilen, iskemik, iskemik olmayan dokularda mikrodamar çevresinde glikojene özgü sinyal incelenmiştir.

3.19. İskemik Beyin Kesitlerinden İskemik Doku Hacminin Ölçümü

Semi-stereolojik çalışma için elde edilen her bir kesit erken dönemde enfarkt bölgelerinin daha iyi anlaşılması için PAS ve Nissl boyanmıştır. Her iki histokimyasal işaretleme enfarkt alanını ve demarkasyon hattını görüntüleme açısından değerlendirilmiştir. Literatürde belirtildiği gibi Nissl ile işaretlenen kesitler Faz kontrast mikroskopunda, PAS ile işaretlenen kesitler ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir. Aynı kesitlerin bu çalışmalarda elde edilen görüntüleri Şekil 3.10'da gösterilmektedir. Enfarkt alanı ölçümü için bu iki yöntem arasında herhangi bir farklılık gözlenmemesi üzerine bütün değerlendirmeler PAS ile işaretlenen kesitlerde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.10. GYS-1^{NestinKO} hayvanlarda 2 saat kalıcı distal OSA iskemisi sonrası Nissl ve PAS histokimyasal işaretlemesi. Solda faz kontrast ile görüntülenen Nissl işaretlemesi, sağda ışık mikroskobu ile görüntülenen PAS işaretlemesi. Kırmızı noktali işaretlenen alan iskemik enfarktı göstermektedir.

Her bir enfarkt hacmi bölümler arasındaki mesafeyle kesit üzerindeki enfarkt alanı çarpılarak hesaplanmıştır. Lezyonlu kesitlerin enfarkt hacimleri, kontrol hemisferlerdeki alanlara göre oranlanarak iskemisi sonrası dokudaki şişme etkisi azaltılmaya çalışılmıştır (218). Böylece;

- Düzeltilmiş Enfarkt hacmi = $V_{\text{hesaplanan enfarkt}} \times (V_{\text{Kontralateral}} / V_{\text{İpsilateral}})$
- Yüzde enfarkt = $V_{\text{Enfarkt}} / V_{\text{total beyin}} \times 100$
- $V_{\text{Kontralateral}}$ = OSA iskemisi yapılmayan karşı hemisferin toplam hacmi
- $V_{\text{İpsilateral}}$ = OSA iskemisi yapılan hemisferin toplam hacmi
- $V_C \sim d \times \sum A_{\text{Kontralateral}}$, $V_L \sim d \times \sum A_{\text{İpsilateral}}$
- d = kesitler arasındaki mesafe
- $\sum A_{\text{Kontralateral}}$ = OSA iskemisi yapılmayan karşı hemisferin toplam alanı
- $\sum A_{\text{İpsilateral}}$ = OSA iskemisi yapılan hemisferin toplam alanı

3.20. Beyinde ve Retinada Mikrodamar Yoğunluğunun Değerlendirilmesi Amacıyla Mikrodamar Dallanmalarının Sayımı

Mikrodamar dallanmalarının sayımı için OSA sulama alanını kapsayacak şekilde (ilk 1 mm'den itibaren 6. mm'ye kadar toplamda 5 mm), tüm beyinden 50 µm kalınlığında 100 koronal kesit içerisinde 1/10'u seçilmiştir. Mikrodamarlar Lektin histokimyasal işaretleme yöntemleri ile belirlenmiştir. Daha sonra her bir beyin kesitinde 360 x 240 µm büyüklüğünde her bir kortikal alandan 4-6 disektör alınarak her bir kesit disektör tekniği ile örneklenmiştir. Lazer taramalı konfokal mikroskobunda kesit kalınlığı boyunca taranmış ve sonrasında bu görüntüler maksimum floresans yoğunluğuna göre Fiji (ImageJ) kullanılarak üst üste çakıştırılmıştır. Bu görüntüler üzerinde her bir mikrodamar segmentinin dallandığı noktalar 240 x 160 µm boyutundaki alanda manuel olarak sayılmıştır.

3.21. İstatistiksel Yöntemler

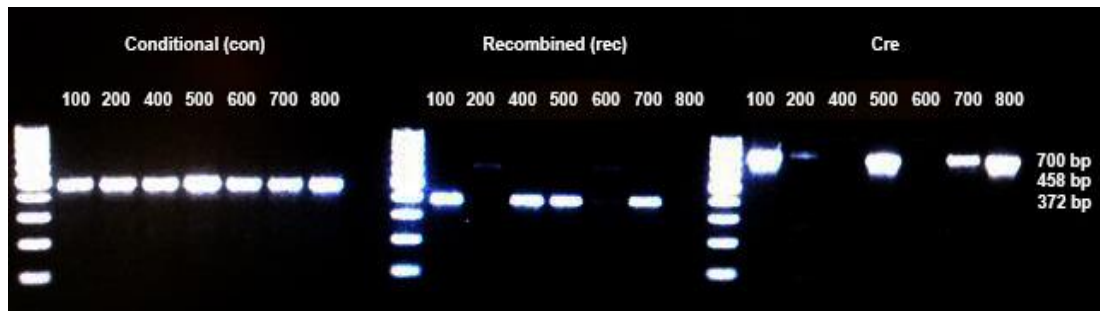
Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. Değerlerin normal dağılım gösterdiğini değerlendirmek için 'Sharipo-Wilk' testi, dağılımın histogramı, varyasyon katsayısı, 'Detrended plot' ve basıklık/sivrilik ('Skewness/Kurtosis') testleri yapılmıştır. Mikrodamar kasılma sayımları, perisit sayımları, beyin kan akımı değişimi yüzde değerleri için her iki grup arası farkları değerlendirmek için 'Mann-Whitney U' testi kullanılmıştır. Kuyruktan lazer benekli kontrastlanma görüntüleriyle ölçülen deney öncesi ve sonrası sistolik kan basıncı değerleri arası farkları değerlendirmek için 'Wilcoxon signed rank', gruplar arası farkları değerlendirmek için 'Mann-Whitney U' testleri kullanılmıştır. Mikrodamar dallanma sayımları sonucunda farkları değerlendirmek için tek yönlü 'Analysis of Variance (219)', her iki grup arası farkları değerlendirmek için 'Students' t-testi' uygulanmıştır. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir. Bütün testler için IBM SPSS 23 istatistiksel analiz programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

İlk olarak beyinde glikojen üretimi genetik olarak bozuk olan GYS-1^{NestinKO} transgenik farelerde deneyler yapılmıştır. Ayrıca bu transgenik farelerin - MSS'nin uzantısı olarak kabul edilen- retinalarında da glikojen kullanım bozukluğunun olup olmadığı araştırılmıştır. Ek olarak hem retina hem de beyinde mikrodolaşımları ve kan beyin bariyeri özellikleri ile ilgili detaylı araştırmalar bulunmadığı için (24) bu özellikleri de detaylı olarak araştırılmıştır.

4.1. GYS-1^{NestinKO} ve GYS-1^{Heterozigot} Farelerde Glikojen Sentaz-1 (GYS-1) Beyinde Bulunmamaktadır ve Retinada Azdır

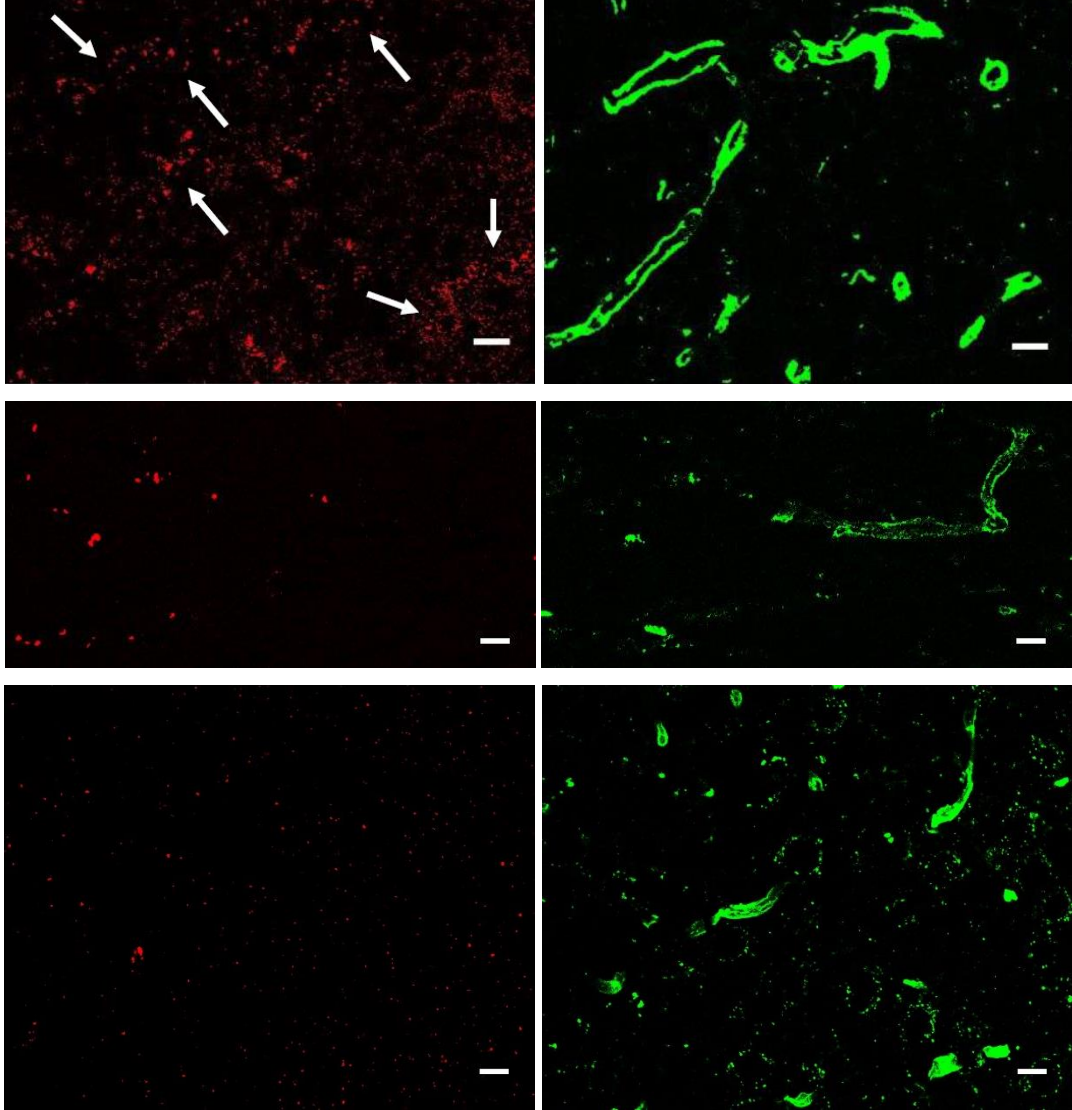
Fareler yöntemler kısmında anlatıldığı şekilde genotiplendikten sonra beyin ve retinal GYS-1 düzeylerini belirlemek üzere sakrifiye edilmiş, bir grup immüno Floresan işaretlemeler (n=3) için, diğer bir grup Western blotlama (n=3) için ayrılmıştır. Birinci nesildeki (F1) doğan yavrularda gerçekleştirilen PCR ve agaroz jel elektroforezi sonuçları Şekil 4.1'de gösterilmektedir. Yöntemler kısmında belirtildiği gibi 'con', 'rec' ve 'cre' pozitif (GYS-1^{con/rec}, Cre^{-/+}) olan fareler GYS-1^{NestinKO} olup deneyler bu farelerle yapılmıştır.



Şekil 4.1. Birinci nesildeki farelerde, 1. nesil (F1) ilgili "con", "rec" ve "cre" genlerine yönelik PCR sonrası jel elektroforezi UV görüntülemesi. Hayvanlar 100, 200, 400, 500, 600, 700 ve 800 olarak kodlanmıştır. Örneğin bu PCR analizinde 100, 500 ve 700 kodlu fareler GYS-1^{NestinKO} olarak saptanmıştır.

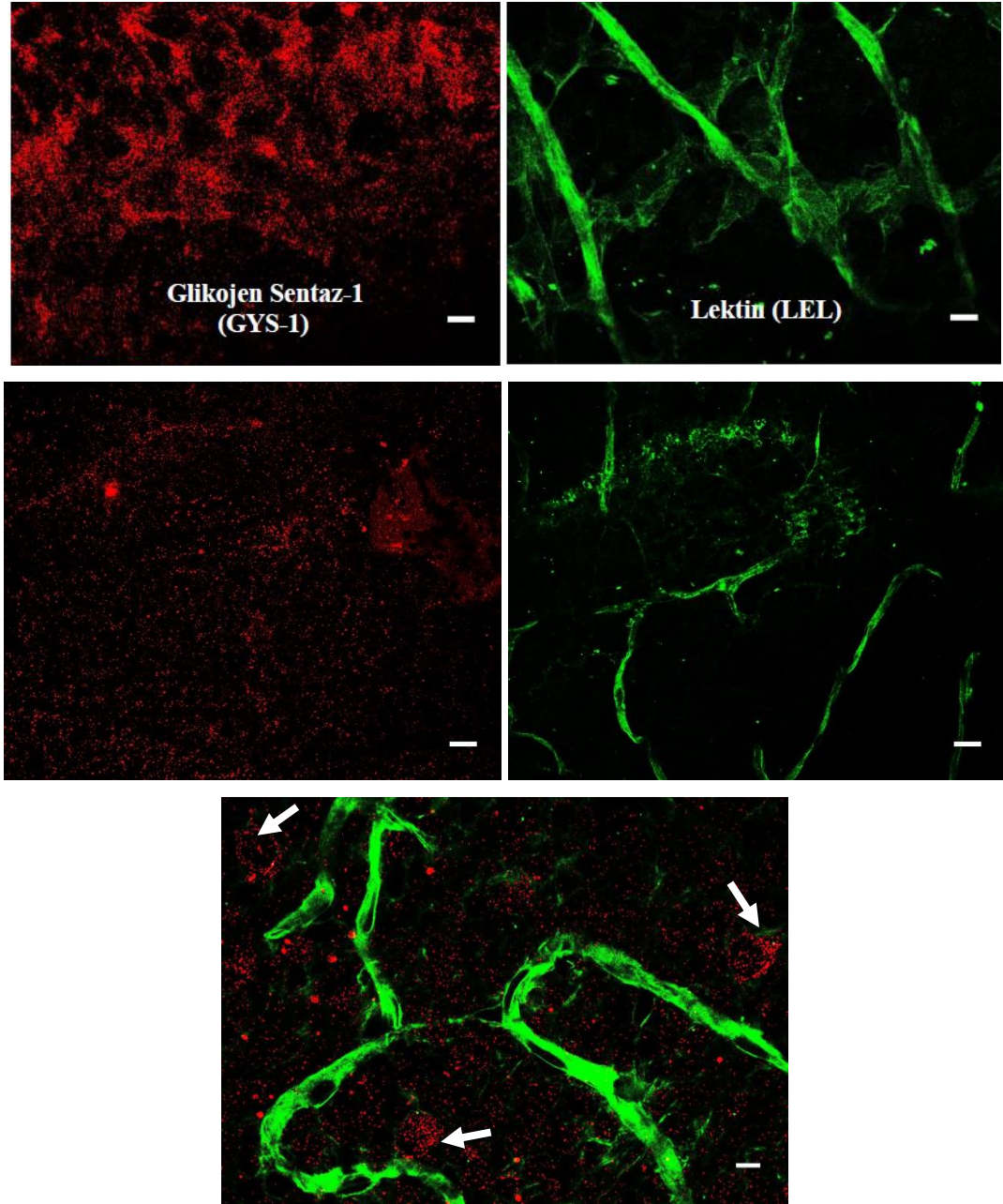
Bunun üzerine öncelikle yabancı kontrol farelerin beyin kesitlerinde anti-GYS-1 antikorunu kullanılarak immüno Floresan çalışması gerçekleştirilmiştir (n=3). Böylece GYS-1 proteininin damar çevresinde daha yoğun olmak üzere bulunduğu

gözlenmiştir (Şekil 4.2. oklar: mikrodamar çevresinde GYS-1 proteini). Sonrasında GYS-1^{Heterozigot} ve GYS-1^{NestinKO} farelerde anti-GYS-1 ile immünofloresan çalışmaları gerçekleştirilmiştir (n=3). Heterozigot transgeniklerde GYS-1 ifadesinde belirgin azalma gözlenirken GYS-1^{NestinKO} farelerde literatürde belirtildiği gibi beyinde GYS-1 işaretlenmesinin çok azaldığı (24), neredeyse gözlenmediği saptanmıştır (Şekil 4.2).



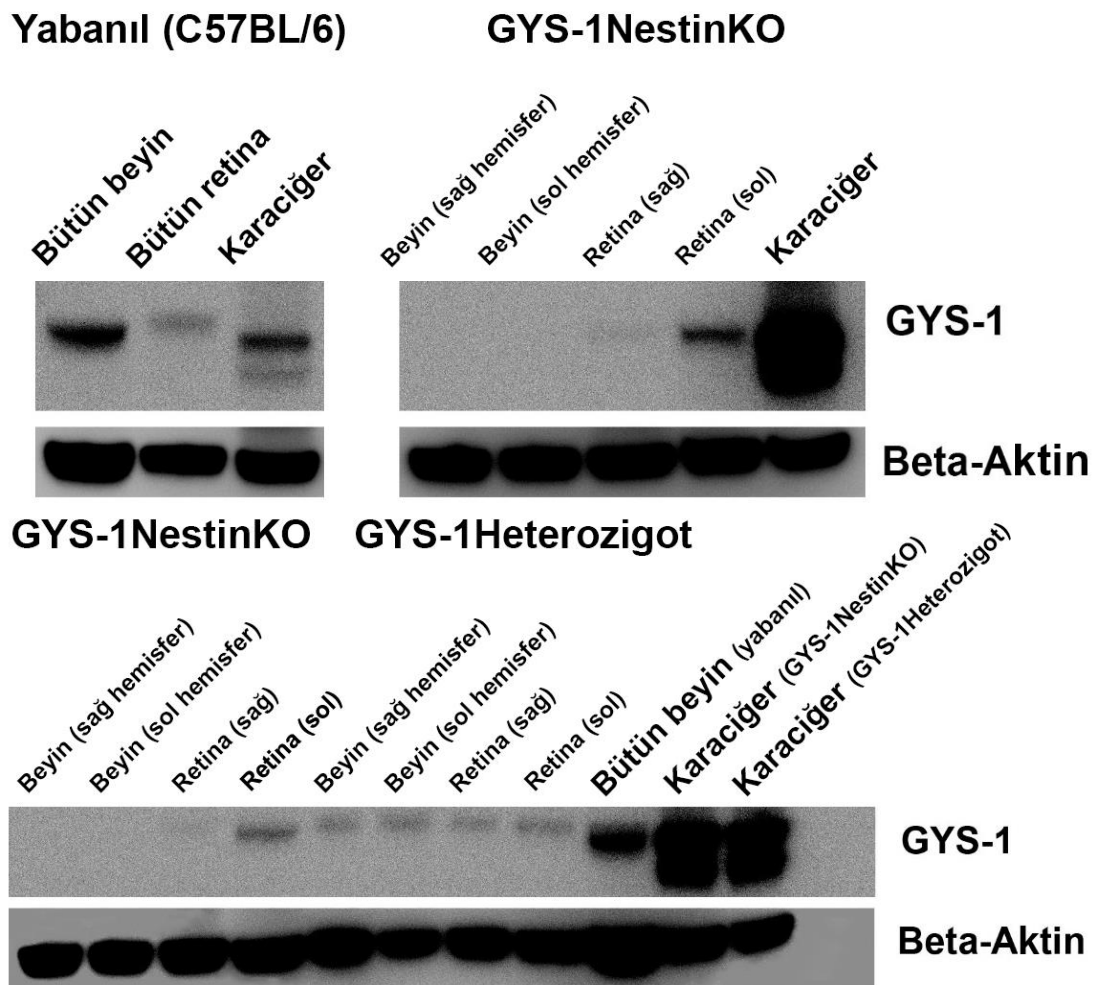
Şekil 4.2. C57BL/6 yabancı, GYS-1^{Heterozigot} ve GYS-1^{NestinKO} fare beyinlerinde anti-GYS-1 antikoruna ile immünofloresan işaretlemesi. GYS-1 (kırmızı) ve damarlar Lektin (yeşil) ile işaretlenmiştir. Oklar mikrodamarların çevresinde daha yoğun olmak üzere GYS-1 proteinini göstermektedir. GYS-1^{Heterozigot} farelerin beyininde GYS-1 proteininde belirgin azalma gözlenmiştir. GYS-1^{NestinKO} farelerde GYS-1 işaretlenmesi bulunmamaktadır. Ölçek: 10 µm.

Retinada GYS-1 ifadesi önce yabancı kontrollerde sonra heterozigot ve GYS-1^{NestinKO} transgeniklerde immünofloresan yöntemlerle incelenmiştir (Şekil 4.3).



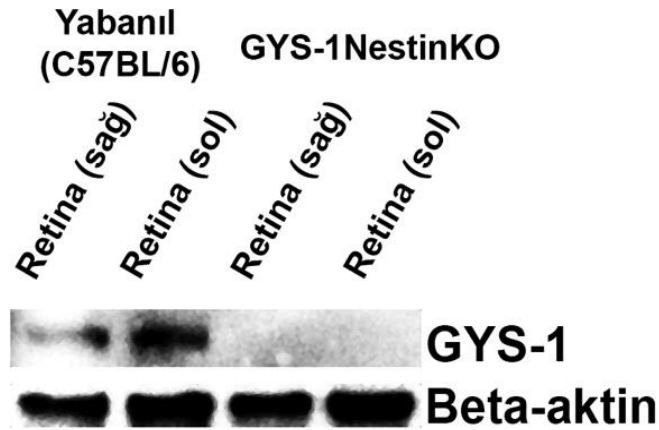
Şekil 4.3. C57BL/6 yabancı, GYS-1^{Heterozigot} ve GYS-1^{NestinKO} fare retinalarında anti-GYS-1 antikorunu (kırmızı) ile immünofloresan ve damarlar Lektin (yeşil) ile işaretlenmiştir. C57BL/6 yabancı fare retinasında GYS-1 yaygın biçimde -muhtemelen Müller hücrelerinde- sitoplazmik olarak gözlenmektedir. GYS-1^{Heterozigot} fare retinasında GYS-1 azlığı gözlenmektedir. GYS-1^{NestinKO} fare retinasında ise GYS-1'in az bir miktar olsa da bulunduğu gözlenmektedir. Oklar GYS-1^{NestinKO} fare retinasında var olan GYS-1 pozitif hücreleri ifade etmektedir. Ölçek: 10 µm.

Bu incelemeler sonucunda GYS-1^{NestinKO} farelerin retinalarında GYS-1 proteininin anlamlı düzeyde azalsa da beyinde olduğu gibi tamamen ortadan kalkmadığı bulunmuştur (Şekil 4.3). Bunun üzerine yabancı kontroller, GYS-1^{Heterozigot}, GYS-1^{NestinKO} farelerin beyin, retina ve karaciğer dokularında Western blotlama yapılmıştır (n=3). Transgenik farelerde karaciğer dokusunda GYS-1 ifade edildiği bilindiğinden karaciğer dokuları transgenik farelerin kendi iç pozitif kontrolleri olarak değerlendirilmiştir (24). Öncelikle yabancı ile GYS-1^{NestinKO} fareler karşılaştırılmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. GYS-1^{NestinKO} ve GYS-1^{Heterozigot} fareler genotiplendikten ve üretildikten sonra transgenik ve C57BL/6 yabancı kontrol farelerin beyin, retina ve karaciğer dokularında GYS-1 proteini yarı-ıslak transfer koşullarında gerçekleştirilen Western blotlama yöntemi ile incelenmiştir. Beta-aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Beyin için 20 µg, retina ve karaciğer için 40 µg protein yüklenmiştir (n=3, 2 tekrar).

Gerçekleştirilen Western blotlamalarda GYS-1^{NestinKO} transgeniklerde beyinde GYS-1 proteininin tamamen ortadan kalktığı, retinal GYS-1'in azaldığı ancak tamamen yok olmadığı gözlenmiştir. Bunun yanı sıra heterozigot transgeniklerde ise hem beyin hem de retinal GYS-1 ifadesinde belirgin düşüş izlenmektedir (Şekil 4.4). Hem immünofloresan bulgularımız hem de GYS-1^{NestinKO} fareden elde edilen iki retinanın farklı düzeyde GYS-1 ifade ettiğinin gözlenmesi üzerine Western blotlama tekniğinde sorunlar olabileceği düşünülmüştür. Bunun üzerine retinayı çıkartırken hem koroideal doku bulaşını engellemek hem de yüklenen bütün proteinlerin PVDF membrana geçişini sağlayabilmek amacıyla retinal dokular soğuk '*Hank's Balanced Salt Solution*' (HBSS) içerisinde stereomikroskop altında elde edilmiş ve Western blotlama ıslak transfer koşulları ile gerçekleştirilmiştir (yöntemde belirtildiği gibi). Bu şekilde gerçekleştirilen Western blotlama sonuçları Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



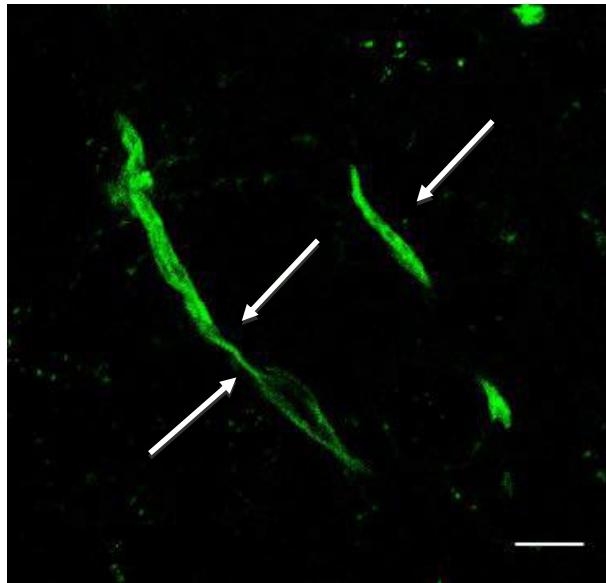
Şekil 4.5. GYS-1^{NestinKO} fareler genotiplendikten ve üretildikten sonra transgenik ve kontrol farelerin retina dokularında ıslak transfer koşullarında gerçekleştirilen Western blotlamada GYS-1 ifadesi, Beta-aktin yükleme kontrolü. Retina için 10 µg protein yüklenmiştir.

Bu incelemeler ile GYS-1^{NestinKO} farelerin beyinlerinde GYS-1 ifade etmediği, retinalarında (immünofloresan n=3, Western blotlama n=2) ise az düzeyde ifade ettiği gözlenmiştir. Böylece literatürde ilk olarak bu transgenik farelerde glikojen eksikliği modelinde retinanın da kullanılabilirliği düşünülmüştür.

4.2. Peri-Mikrovasküler Glikojenin Üretilmediği (GYS-1^{NestinKO}) veya Glikojen Kullanımının Engellendiği (Glikojen Fosforilaz İnhibitörü 1,4-Dideoksi-1,4-İmino-D-Arabinitol (DAB) Enjeksiyonu) Durumlar Beyin ve Retina Mikrodamarlarında Kasılmaya Neden Olur

Glikojenin nöroglivasküler düzeyde etkileri hem beyinde hem de retinada incelenmiştir. Bu amaçla, öncelikle mikrodamar kasılmalarının değerlendirme kriterleri belirlenmiş, sonrasında glikojen döngü fiziyojisi hem farmakolojik hem de genetik olarak bozularak mikrodamar kasılmaları ve nöroglivasküler düzeyde etkilenmeler incelenmiştir. Mikrodamar kasılmalarının dokunun perfüzyonuyla yakın ilişkili olduğu bilinmektedir. Beyin ve retina mikrodamarlarında kasılmaların değerlendirilmesi ve niceliksel incelenmesi amacıyla sayım kriterleri literatürdekine benzer şekilde belirlenmiştir (9):

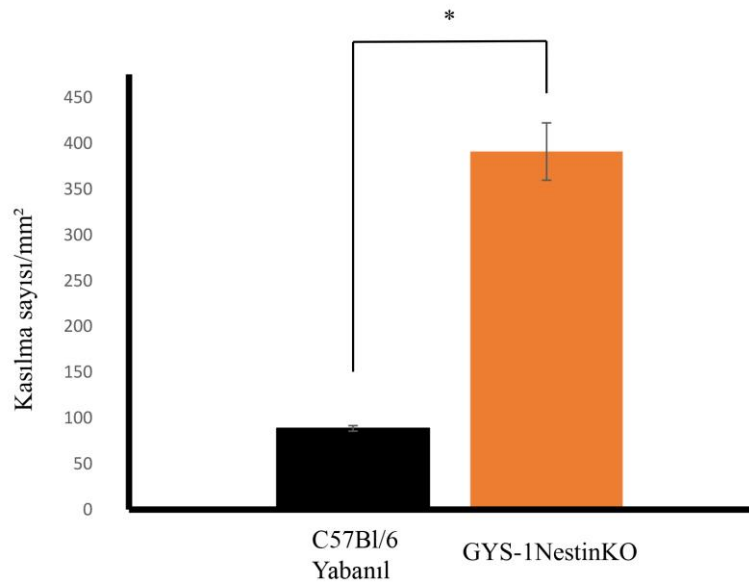
- Damarlar *Lycopersicon Esculentum* Lectin (220) ile işaretlenmelidir.
- Damarların çapları 9 μm 'den küçük olmalıdır.
- Kasılmalar, devam eden mikrodamar parçasının (segment) öncesi ve sonrasına göre en az %20 daralan yerler olmalıdır.
- Kasılmalar arasında en az 1 perisit çekirdeği boyutunda ($\sim 10 \mu\text{m}$) uzaklık olmalıdır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. 'Fluorescein' işaretli Lektin (yeşil) ile işaretlenmiş mikrodamarlarda kasılma olarak değerlendirilerek sayıma katılan kasılmalardan örnek görülmektedir (oklar). Ölçek: 20 μm .

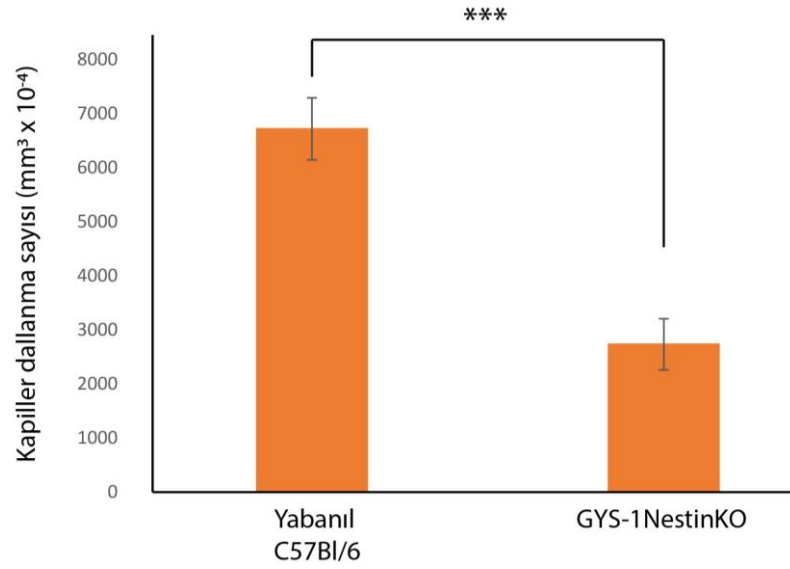
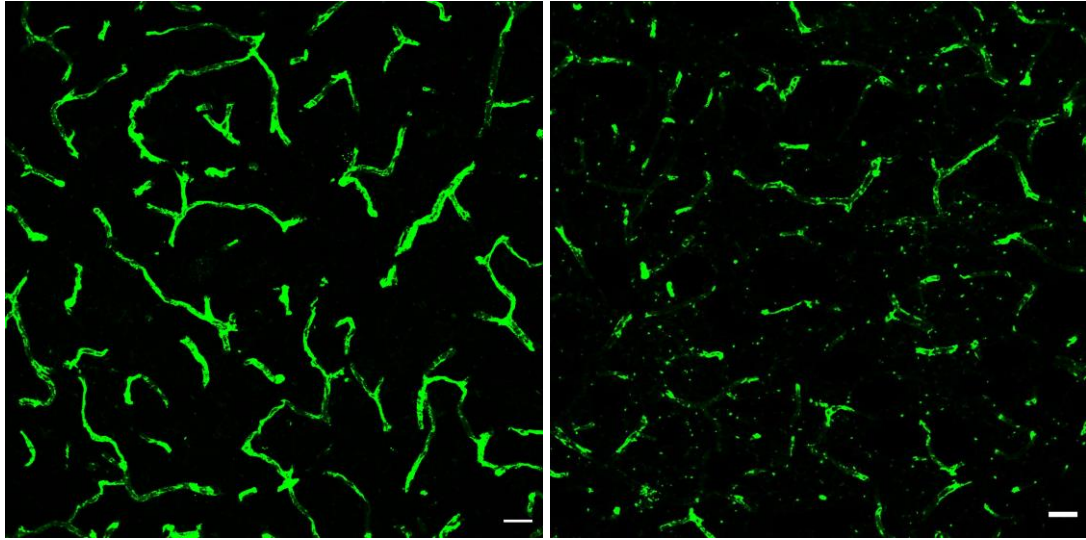
4.2.1. GYS-1^{NestinKO} Farelerde Beyin Mikrodamar Kasılmaları Yabanıl (C57BL/6) Kontrollerden Daha Fazladır

Beyinde DAB ile mikrodamar kasılmaları sayımından sonra GYS-1^{NestinKO} fareler ve yabanıl C57BL/6 kontrollerde bu kasılma sayımları yapılmıştır. GYS-1^{NestinKO} farelerin yabanıl kontrollere göre daha fazla mikrodamar kasılması gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4.7, p=0,012).



Şekil 4.7. Damarlar lektin ile işaretlenmiş ve mikrodamar kasılmaları sayılmıştır. Yabanıl kontrol ve GYS-1^{NestinKO} hayvanlarda ortalama kasılma sayısı/mm² ± standart hata şeklindedir (n=3). *p<0,05, 'Mann-Whitney U test'.

GY-1^{NestinKO} transgenik farelerin beyinlerinde kapiller yoğunlukta belirgin bir azalma gözlenmiştir (Şekil 4.8). Bu nedenle kapiller yoğunluğu ölçme yöntemlerinden biri olan kapiller dallanma noktalarının sayımı literatürde belirtildiği biçimde (221) gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.8).

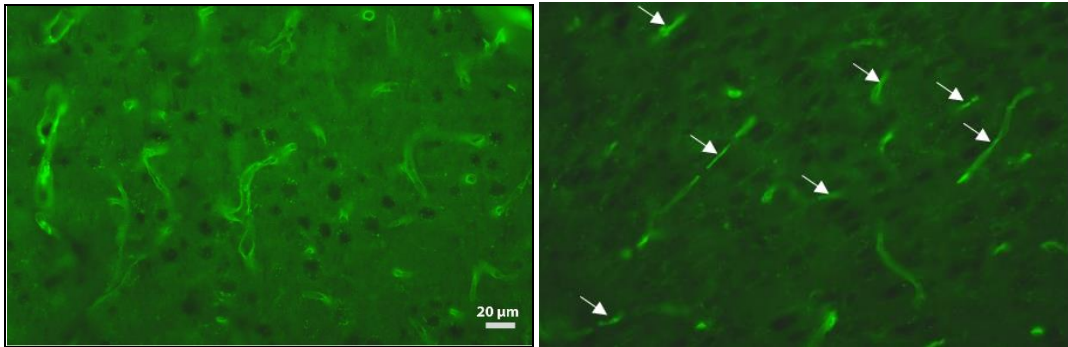


Şekil 4.8. Yabanıl C57BL/6 (üst sol) ve GYS-1^{NestinKO} (üst sağ) farelerin beyin kesitleri (50 µm) damar işaretleyici lektin (yeşil) ile işaretlenmiş ve kapiller dallanmada azalma gözlenmiştir. Ölçek: 20 µm. Lektin ile işaretlenmiş mikrodamarlarda kapiller dallanma noktaları sayılmıştır (alt). Yabanıl kontrol ve GYS-1^{NestinKO} hayvanlarda sayımlar sağ ve sol hemisfer olmak üzere ve OSA alanı içerisinde toplamda 4-6 alan alınmak üzere n=3 farelerde gerçekleştirilmiştir. Ortalama değerler kapiller dallanma sayısı/mm³ x 10⁻⁴ ± standart hata şeklindedir (221). ***p<0,001, 'Student's t-test'.

Bu şekilde GYS-1^{NestinKO} farelerin beyinlerinde kontrollere göre çok daha az kapiller dallanma mevcuttur (Şekil 4.8, n=3, p<0,001).

4.2.2. İntraserebroventriküler 1,4-Dideoksi-1,4-İmino-D-Arabinitol (DAB) Enjeksiyonu Beyin Mikrodamarlarında Kasılmaya Neden Olur

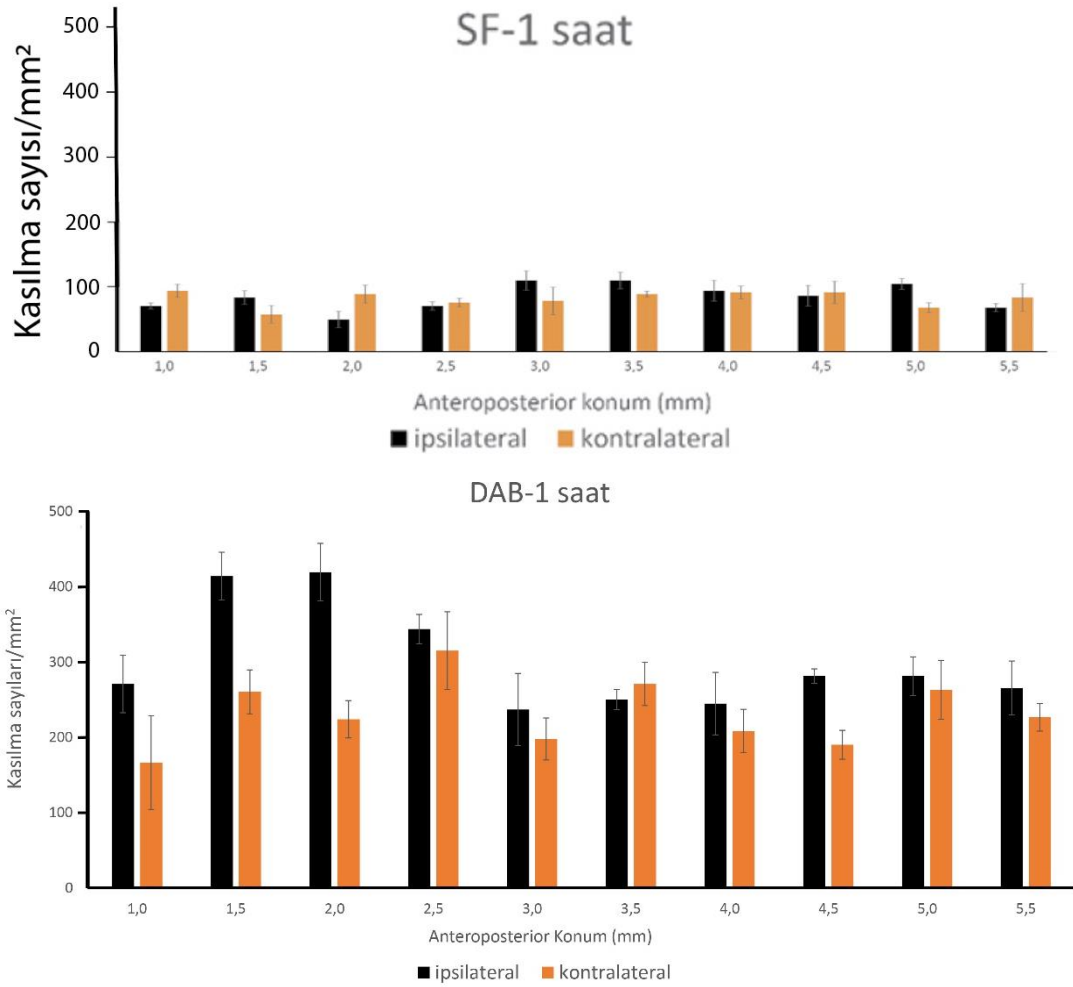
Beyinde DAB enjeksiyon konsantrasyonu literatürde intrahippokampal enjeksiyonda (7) kullanılan doza göre hesaplanmış (204) ve iki doz denenmiştir. Yüksek doz (0,50 M) uygulandığında fareler enjeksiyondan 35-40 dakika sonrasında ölmüşlerdir (n=2), bunun üzerine isv DAB enjeksiyonları 0,25 M dozda gerçekleştirilmiştir. İsv enjeksiyonun etkisini ortadan kaldırabilmek amacıyla bir diğer grup hayvana da DAB'ın çözücüsü olan steril serum fizyolojik enjeksiyonları (yalancı uygulama) gerçekleştirilmiştir (n=3). Aşağıda yalancı uygulama ve 0,25 M DAB (isv) enjekte edildikten 1 saat sonra sakrifiye edilen hayvanların '*Fluorescein*' işaretli lektin ile damarları işaretlenmiş beyin kesitlerinden örnek görülmektedir (Şekil 4.9). Kontrol beyinde ise muhtemelen doku takibi sırasında oluşan az sayıda kasılmalar ve serum fizyolojik enjeksiyonunun yarattığı travmanın etkisi ile oluşan kasılmalar olarak gözlenmiştir. Ancak DAB (isv) enjeksiyonu ile mikrodamarlarda kasılmalarda belirgin artış olduğu saptanmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Kontrol ve DAB isv enjekte edilmiş beyinlerden alınan kesitler Lektin ile işaretlenmiştir. DAB uygulaması ile mikrodamar kasılmalarında artış (oklar) gözlenmektedir. Ölçek: 20 µm.

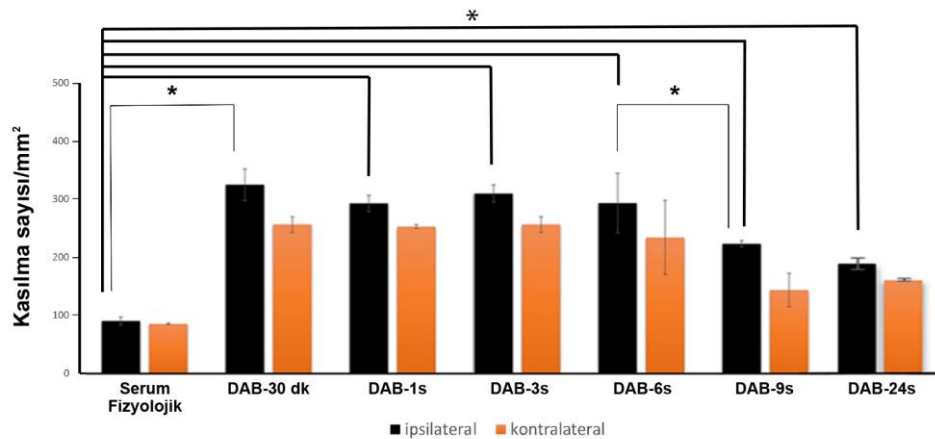
Beyinde bu mikrodamar kasılmaları manuel semi-stereolojik çalışma ile sayılmıştır. Bu sayımlarda DAB enjeksiyonu sonrası değişik zaman noktaları, isv enjeksiyonun gerçekleştirildiği (ipsilateral) ve karşı hemisferler (kontralateral) göz önünde bulundurularak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle DAB enjeksiyonunun antero-posterior ekseninde beyin mikrodamarlarında neden olduğu kasılma incelenmiştir. DAB solüsyonunun 1 saat sonrasında mikrodamarlarda yaygın bir biçimde kasılmaya neden olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.10). Amacımız OSA iskemisi sonrası ortaya

çıkacak değişiklikleri de araştırmak olduğu için kasılmalar orta serebral arter sulama alanı boyunca sayılmıştır. Bu kasılmalar enjeksiyonun gerçekleştirildiği bölgeye yakın alanlarda belirgin şekilde daha fazla miktarda gibi görünse de (anteroposterior 2-3 kesitler, 1,5-2 mm anteroposterior) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($n=3$, $p=0,3$). Bu da bize DAB'ın etkisinin enjeksiyon yerinden yayılarak ortaya çıktığını göstermiştir.



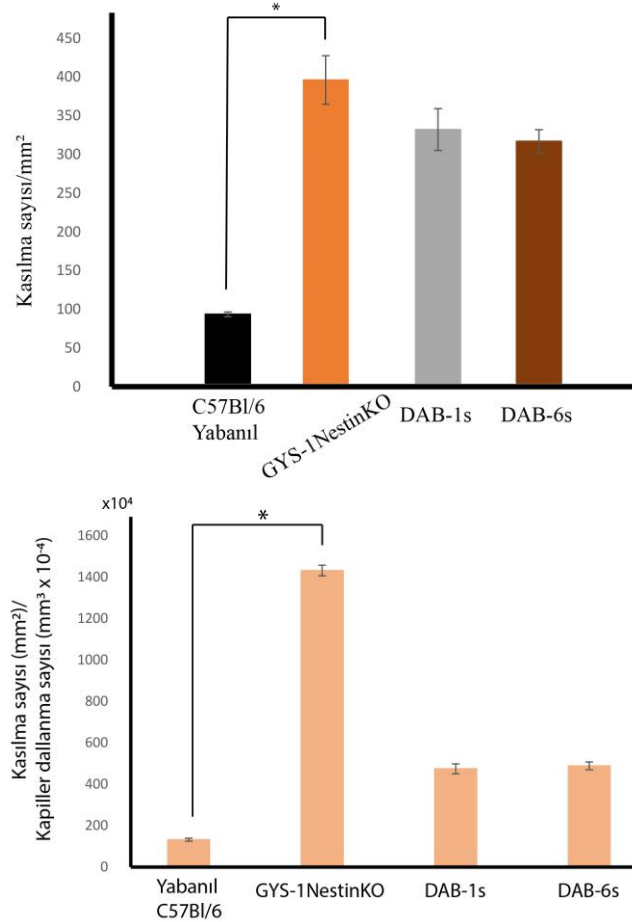
Şekil 4.10. İsv DAB uygulanmış fareler 1 saat sonra sakrifiye edilmiştir. Elde edilen kesitler damar işaretleyici lektin ile işaretlenmiştir ve mikrodamar kasılmaları sayılmıştır. Enjeksiyonun gerçekleştirildiği (ipsilateral) ve karşı hemisfer (kontralateral) ayrı ayrı olmak üzere kesitler 1-6 mm anteroposterior olacak şekilde düzenlenmiştir. Ortalama kasılma sayıları/mm² ± standart hata şeklindedir ($n=3$). Steril serum fizyolojik (isv) uygulanmış kontrol beyinler 1 saat sonra sakrifiye edildikten sonra elde edilen kesitler damar işaretleyici lektin ile işaretlenmiştir ve mikrodamar kasılmaları sayılmıştır. Ortalama kasılma sayıları/mm² ± standart hata şeklindedir ($n=3$).

Steril serum fizyolojik solüsyonunun isv uygulamasından (n=3) 1 saat sonrasında OSA sulama alanı boyunca mikrodamarların DAB solüsyonuna göre çok daha az sayıda kasıldığı gösterilmiştir (Şekil 4.10). Bu kasılmalar bölgelere göre incelendiğinde istatistiksel olarak fark saptanmamıştır (p=0,67). Enjeksiyonun gerçekleştirildiği hemisfer ile kontralateral hemisfer arasında mikrodamar kasılmaları bakımından anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p=0,28). Bu analizlerden sonra isv DAB sonrasında geçen zamana göre mikrodamar kasılmalarında gerçekleşen değişim incelenmeye çalışılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında DAB'ın yarılanma ömrü 6 saat olarak belirlenmiştir (222). Ancak literatürde DAB sadece bir çalışmada beyine isv olarak uygulanmıştır (204) ve daha önce hiçbir çalışmada beyinde mikrodamar kasılması üzerine etkileri gösterilmemiştir. Bu amaçla serum fizyolojik (n=3) ve isv DAB uygulanmış fareler 30 dakika (n=3), 1 saat (n=3), 3 saat (n=3), 6 saat (n=3), 9 saat (n=3) ve 24 saat (n=3) sonrası sakrifiye edilerek damarlar lektin ile işaretlenmiş ve mikrodamar kasılmaları yukarıda belirtilen kriterlere uygun şekilde sayılmıştır (Şekil 4.11). Kasılmalar 30. dakikadan itibaren enjeksiyonun gerçekleştirildiği hemisferde yalancı uygulamaya göre daha fazla gerçekleşmiştir (30 dakika, 3, 9 ve 24 saat için p=0,041; 1 ve 6. saat için p=0,025, n=3); ancak muhtemelen DAB'ın etkisinin azalmaya başlamasıyla 6. saatteki kasılma sayısına göre 9. ve 24. saatte azalma olduğu gözlenmiştir (her iki saatte p=0,041, n=3, Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Serum fizyolojik, isv 0,25 M DAB uygulanmış fareler 30 dakika, 1, 3, 6, 9 ve 24 saat sonra sakrifiye edilerek damarlar lektin ile işaretlenmiş ve mikrodamar kasılmaları sayılmıştır. Enjeksiyonun gerçekleştirildiği (ipsilateral) ve karşı hemisfer (kontralateral) ayrı ayrı olmak üzere sayımlar ortalama kasılma sayısı/mm² ± standart hata şeklindedir (n=3). *p<0.05, 'Kruskal-Wallis' testi.

Bu incelemeler sonucunda isv DAB enjeksiyonu sonucu glikojen fosforilaz inhibisyonunun beyin mikrodamarlarında zamana bağlı olarak kasılmaya neden olduğu gösterilmiştir. GYS-1^{NestinKO} transgenikler ile isv DAB enjekte edilmiş fareler mikrodamar kasılmaları bakımından karşılaştırıldığında ise anlamlı bir fark bulunmamıştır, benzer şekilde kasılma sayısı olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.12, p=0,5);

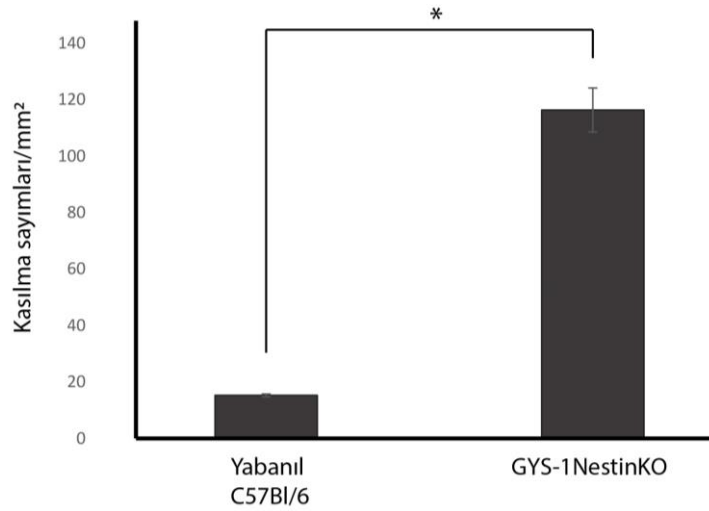


Şekil 4.12. Damarlar lektin ile işaretlenmiş, mikrodamar kasılmaları sayılmıştır. Yabanıl kontrol ve GYS-1^{NestinKO} hayvanlarda sayımlar bütün beyinde, DAB ve yalancı uygulama serum fizyolojik enjeksiyonlarının gerçekleştirildiği (ipsilateral) olmak üzere sayımlar farelerde (n=3) gerçekleştirilmiştir. Ortalama değerler kasılma sayısı/mm² ± standart hata şeklindedir. *p<0,05, 'Kruskal-Wallis' testi. Damarlar lektin ile işaretlenmiş, mikrodamar kasılmaları ve kapiller dallanma noktaları sayılarak oranlanmıştır. Yabanıl kontrol ve GYS-1^{NestinKO} hayvanlarda sayımlar bütün beyinde, DAB ve yalancı uygulama serum fizyolojik enjeksiyonlarının gerçekleştirildiği (ipsilateral) olmak üzere sayımlar n=3 farelerde gerçekleştirilmiştir. Ortalama değerler kasılma sayısı/mm²/kapiller dallanma sayısı (mm³x10⁻⁴) ± standart hata şeklindedir. *p<0.05 'Kruskal-Wallis' testi.

GYS-1^{NestinKO} farelerin beyinlerinde kapiller yoğunluk başına düşen mikrodamar kasılmaları hem kontroller hem de isv DAB enjekte edilmiş beyinlere göre çok daha fazla bulunmaktadır (Şekil 4.20, n=3, p=0,025).

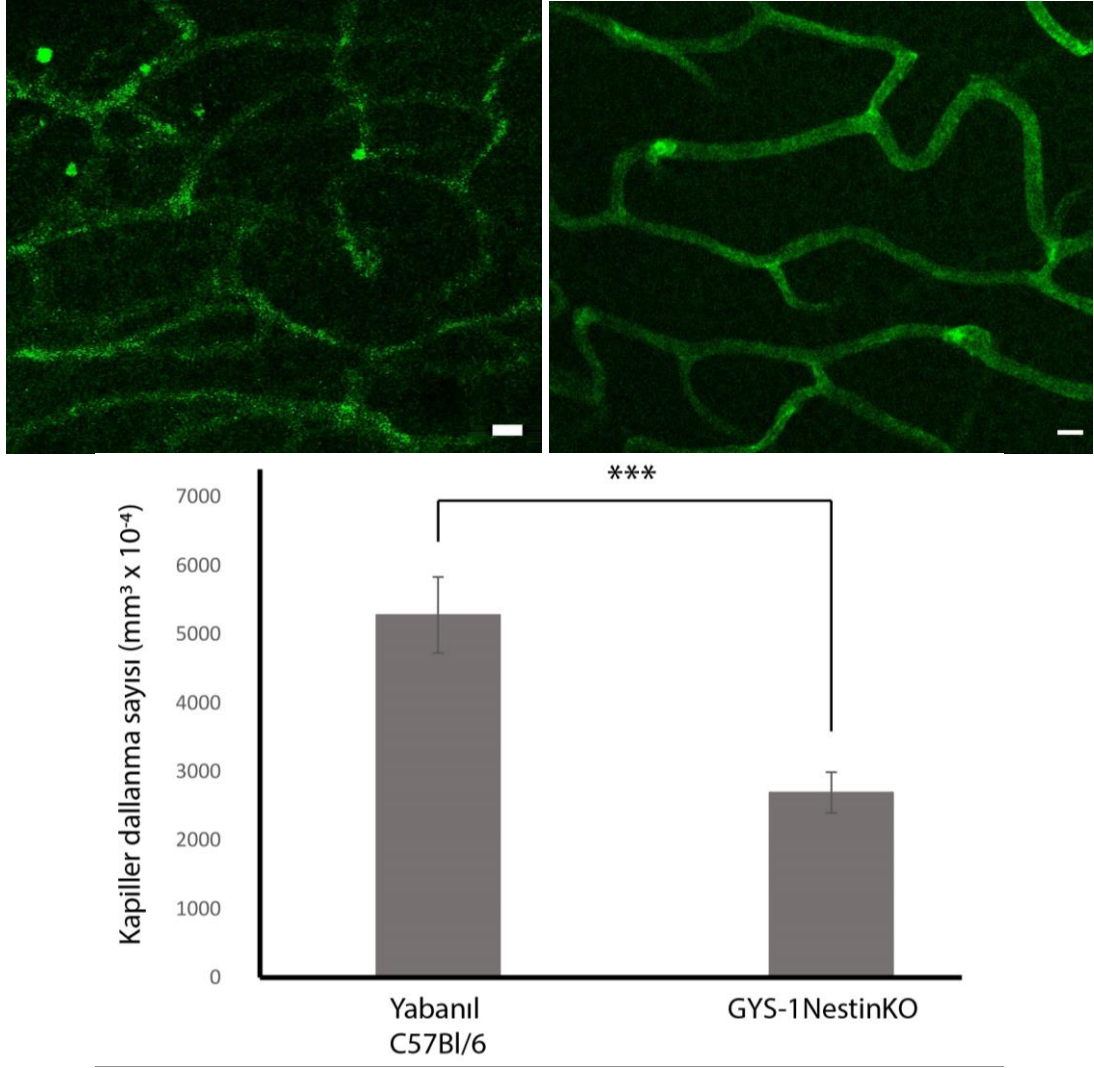
4.2.3. GYS-1^{NestinKO} Farelerde Retinal Mikrodamar Kasılmaları Yabani Kontrolere Göre Daha Fazladır

Retinada GYS-1^{NestinKO} fareler ve yabancı C57Bl/6 kontrollerde kasılma sayımları yapılmıştır. GYS-1^{NestinKO} farelerin yabancı kontrollere göre daha fazla mikrodamar kasılması gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4.13, p=0,012).



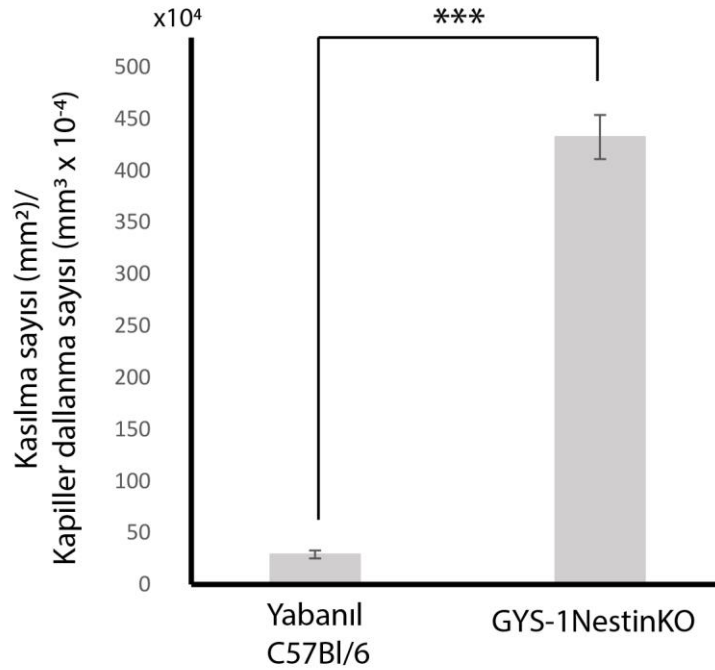
Şekil 4.13. Damarlar lektin ile işaretlenmiş ve retinada mikrodamar kasılmaları sayılmıştır. Yabancı kontrol ve GYS-1^{NestinKO} hayvanlarda ortalama kasılma sayımları/mm² ± standart hata şeklindedir (n=3). *p<0,05, 'Mann-Whitney U' testi.

Diğer bir taraftan GYS-1^{NestinKO} transgenik farelerin beyinlerinde olduğu gibi retinalarının da daha az kapiller yoğunluğa sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.14) ve bu nedenle kapiller dallanma noktalarının sayımı retinada da gerçekleştirilmiştir (n=3, Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Yabanıl C57BL/6 (üst sol) ve GYS-1^{NestinKO} (üst sağ) farelerin retinaları Lektin (yeşil) ile işaretlenmiş ve kapiller dallanmada azlık gözlenmiştir. Ölçek: 10 µm. Lektin ile işaretlenmiş bu mikrodamarlarda kapiller dallanma noktaları sayılmıştır. Yabanıl kontrol ve GYS-1^{NestinKO} hayvanlarda sayımlar bütün retinada 40X büyütmede alınan en az 4-6 alan olmak üzere sayımlar farelerde (n=3) gerçekleştirilmiştir. Ortalama kapiller dallanma sayısı/mm³ x 10⁻⁴ ± standart hata şeklindedir (221). ***p<0,001, 'Students' t-test'.

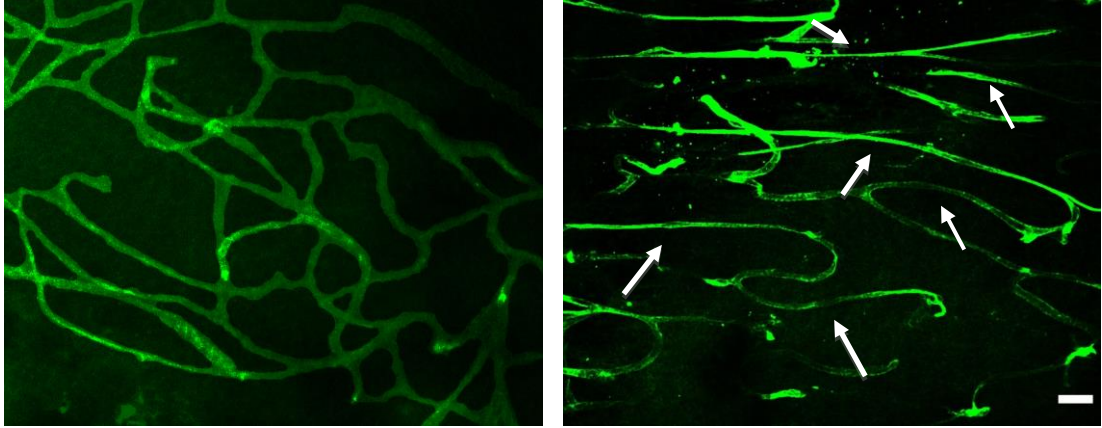
GYS-1^{NestinKO} fareler retinalarında da kontrollere göre çok daha az kapiller dallanma göstermektedir (n=3, p<0,001). Kapiller yoğunluğu daha az olan bu transgenik farelerin normal koşullarda sahip olduğu mikrodamar kasılmasını değerlendirebilmek amacıyla kapiller dallanma sayıları (Şekil 4.14) bu kasılma sayımlarına oranlanmıştır (Şekil 4.15). GYS-1^{NestinKO} farelerin retinalarında kapiller yoğunluk başına düşen mikrodamar kasılmaları kontrollere göre anlamlı olarak fazladır (n=3, her ikisi için p=0,025).



Şekil 4.15. Retinada damarlar lektin ile işaretlenmiş, mikrodamar kasılmaları ve kapiller dallanma noktaları sayılarak oranlanmıştır. Yabanıl kontrol ve GYS-1^{NestinKO} hayvanlarda retinada sayımlar en az 40X büyütmede alınan 4-6 alan olmak üzere farelerde (n=3) gerçekleştirilmiştir. Ortalama değerler kasılma sayısı/mm²/kapiller dallanma sayısı (mm³x10⁻⁴) ± standart hata şeklindedir. ***p<0,001, 'Students' t-test'.

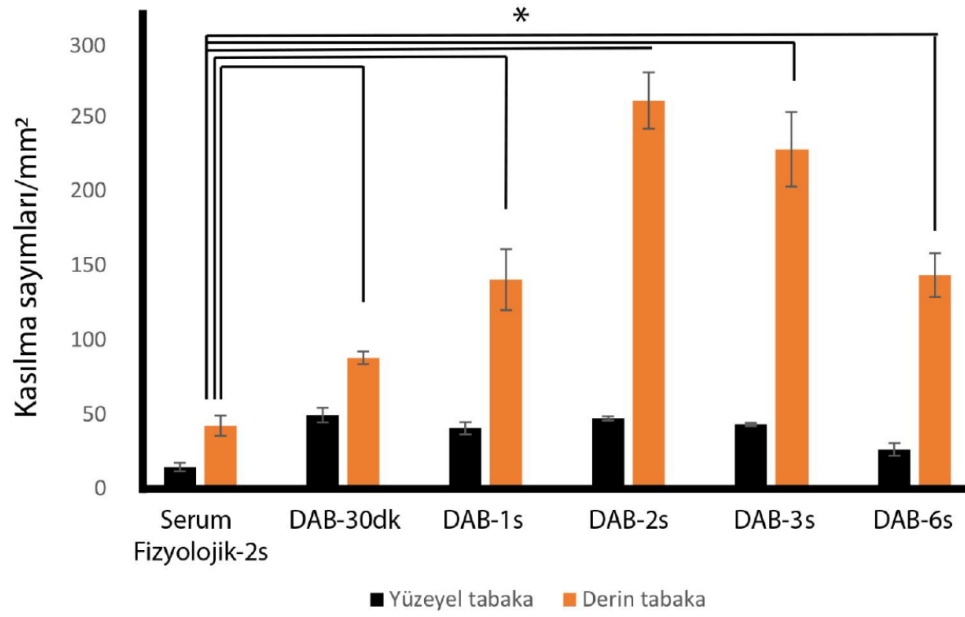
4.2.4. İntravitreal 1,4-Dideoksi-1,4-İmino-D-Arabinitol (DAB) Enjeksiyonu Retinal Mikrodamarlarda Kasılmalara Neden Olur

Vitreusa DAB enjeksiyonunun retinal mikrodamar kasılmaları üzerindeki etkileri daha önce laboratuvarımızda sadece tek zaman aralığında ve dozda incelenmiştir (9). Bu doktora tez çalışmasında ise farklı zaman aralıklarında ve dozlarda intravitreal DAB uygulanmıştır (n=3). DAB ve serum fizyolojik enjekte edilen retinalar damar işaretleyici lektin ile işaretlenmiş ve damarların kısıtlanan glikojen kullanımından yapısal olarak nasıl etkilendiği incelenmiştir. DAB ajanına maruz kalmış retinalardaki mikrodamarlarda özellikle ilk dallanmalardan itibaren kasılmanın gözlemlendiği ve kasılan segmentin uzun olduğu göze çarpmıştır (Şekil 4.16).



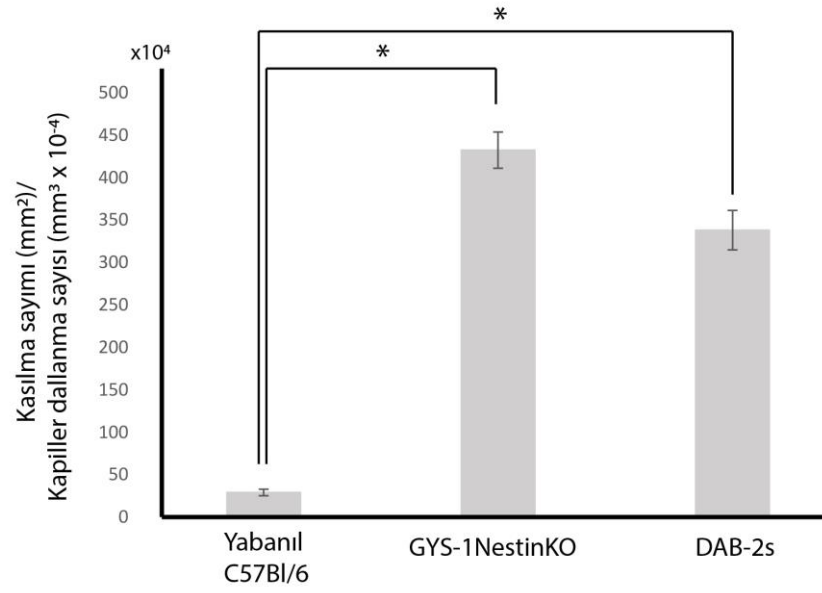
Şekil 4.16. İntravitreal serum fizyolojik (solda) ve DAB (sağda) verilmiş retinalar damar işaretleyici lektin (yeşil) ile işaretlenmiştir. DAB enjekte edilen retinalarda uzun segmentli kasılmalar (oklar) gözlenmiştir. Ölçek: 20 μ m.

Beyinde isv DAB enjeksiyonunun mikrodamarlarda kasılma yapma etkisinin 1 saatte en yüksek düzeyde olduğu gözlenmiştir, ancak isv ile intravitreal enjeksiyonun DAB'ın yayılımı ve etkinin zamansal çözünürlüğü açısından farklı olacağı düşünülmüştür. Bu nedenle intravitreal DAB enjeksiyonunun mikrodamar kasılması üzerindeki etkisi de zamansal olarak incelenmiştir. Beş farklı zaman diliminde intravitreal DAB enjekte edilen fareler sakrifiye edilmiş ($n=3$), retinalar lektin ile işaretlenmiş ve mikrodamarlarda kasılmalar yüzeysel ve derin tabakada olmak üzere sayılmıştır. Retinada derin tabakada sadece mikrodamarların bulunduğu bilinmektedir (223). Bu şekilde incelendiğinde mikrodamar kasılmalarının serum fizyolojik uygulamasına göre daha fazla olmakla birlikte derin tabakada 2. saatte en fazla olduğu gözlenmiştir ($p=0,012$). Yüzeysel tabakada ise enjeksiyonun 30. dakikasından itibaren serum fizyolojik uygulamasına göre daha fazla mikrodamar kasılması izlenmiştir ($p=0,025$). Bununla birlikte enjeksiyon sonrası 3. saat itibarıyla 6. saat ile karşılaştırıldığında DAB'ın mikrodamar kasılmaları üzerindeki etkisi hem yüzeysel hem de derin tabakalarda anlamlı olarak azalmaya başlamıştır ($p=0,025$, Şekil 4.17).

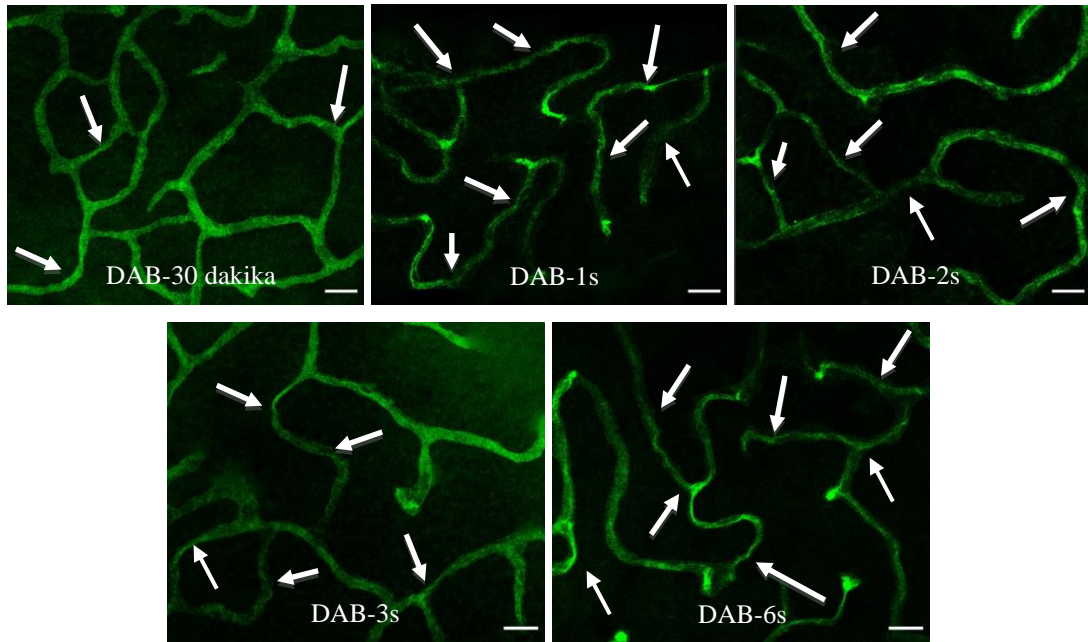


Şekil 4.17. İntravitreal DAB verilmiş retinalarda kontrole göre kasılma sayısında artış olduğu saptanmıştır (n=3, ortalama±SH). Kasılmalar retinanın yüzeysel ve derin tabakalarında incelenmiştir. DAB enjeksiyonun mikrodamar kasılması üzerindeki etkileri daha çok sadece mikrodamarların bulunduğu derin tabakada ve enjeksiyon sonrası 2. saatte gözlenmiştir. *p<0,05, 'Kruskal-Wallis' testi.

GYS-1^{NestinKO} farelerin retinalarında da kontrollere göre çok daha az kapiller dallanma göstermektedir (n=3, p<0,001). Kapiller yoğunluğu daha az olan bu transgenik farelerin normal koşullarda sahip olduğu mikrodamar kasılmasını değerlendirebilmek amacıyla kapiller dallanma sayıları (Şekil 4.14) bu kasılma sayılarına oranlanmıştır (Şekil 4.15 ve 4.17). GYS-1^{NestinKO} ve vitreusa DAB enjeksiyonundan 2 saat sonra sakrifiye edilmiş farelerin retinalarında kapiller yoğunluk başına düşen mikrodamar kasılmaları kontrollere göre anlamlı olarak fazladır (Şekil 4.18, n=3, her ikisi için p=0,025). İntravitreal DAB enjeksiyonu sonrası retinal mikrodamar kasılmalarının yüzeysel ve derin kapiller tabakalarda incelenmesi üzerine, enjeksiyonun gerçekleştirildiği tarafın karşısında (kontralateral göz) bu kasılmaların varlığı araştırılmıştır (Şekil 4.19). DAB enjeksiyonunun 1. saatinde kontralateral gözde retinal kasılmalar anlamlı olarak artmış, 6. saatte azalma göstermemiştir (Şekil 4.19). Bir ön bulgu olarak intravitreal DAB enjeksiyonu sonrası kontralateral gözün etkilendiği gözlenmiştir ve nedenleri ayrıntılı olarak araştırılmaya çalışılacaktır.



Şekil 4.18. Damarlar lektin ile işaretlenmiş, retinada kapiller dallanma noktaları sayılmıştır. Yabanıl kontrol, GYS-1^{NestinKO} ve intravitreal DAB enjeksiyonu 2 saat sonrasında sakrifiye edilen hayvanlarda retinada sayımlar en az 40X büyütmede alınan 4-6 alan olmak üzere farelerde (n=3) gerçekleştirilmiştir. Ortalama değerler kapiller dallanma sayısı/mm³ x 10⁻⁴ ± standart hata şeklindedir. ***p<0,001, Tek yönlü 'ANOVA' testi.

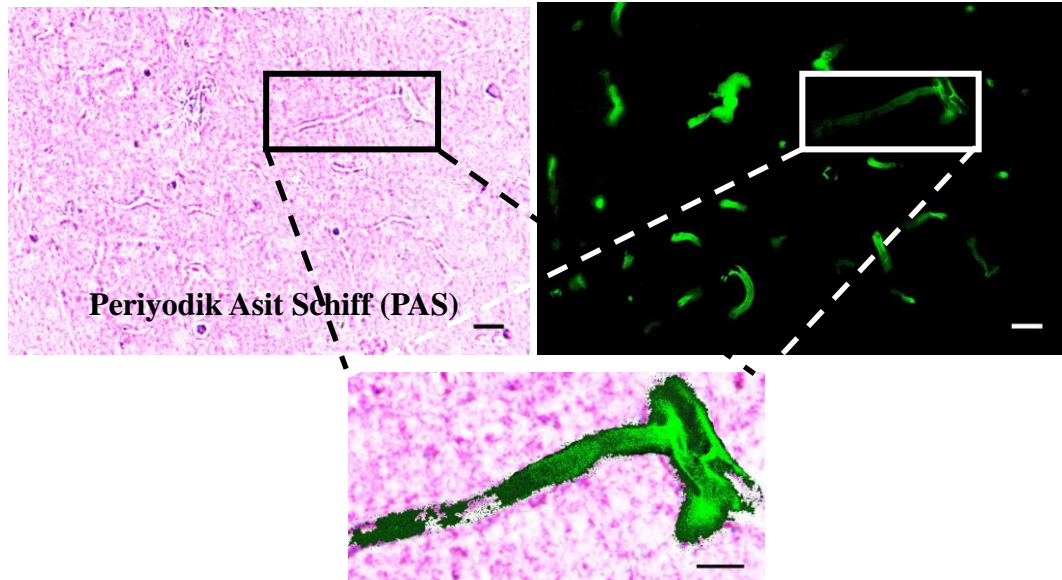


Şekil 4.19. Swiss albino farelerde intravitreal DAB verilmiş fareler, enjeksiyonu takiben 30 dakika, 1,2,3 ve 6 saat sonrasında sakrifiye edilmiştir. Enjeksiyonun gerçekleştirildiği gözün kontralateralinde retinalar elde edilmiş ve damar işaretleyici lektin (yeşil) ile işaretlenmiştir. DAB enjeksiyonunun kontralateral gözündeki retinalarda mikrodamar kasılmaları (oklar) gözlenmiştir. Ölçek: 20 µm.

4.3. Beyin ve Retinada Glikojenin Nörogliovasküler Düzeyde İncelenmesi

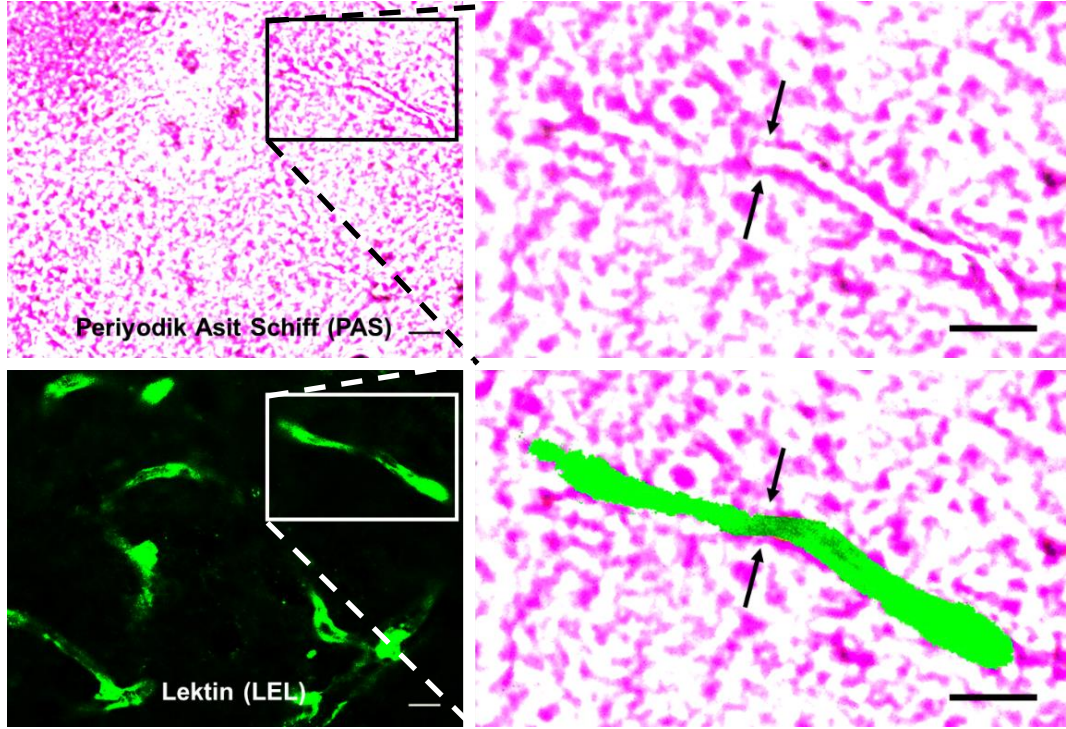
4.3.1. Beyinde Mikrodamar Kasılmaları Perimikrovasküler Glikojen ile İlişkilidir

Dokuda glikojeni göstermek için histokimyasal Periyodik asit Schiff (PAS) yöntemi altın standart olarak kullanılmaktadır. Dokularda bulunan glikoproteinleri ve proteoglikanları değil sadece glikojeni işaretlemek amacıyla bu yöntem literatürdekine uygun bir şekilde dimedon kullanılarak uygulanmıştır (8, 213). PAS ve lektin eş zamanlı histokimyasal işaretlemesinin 50 µm kalınlığındaki dokuda yapılabilmesi için rutin uygulanan protokolde değişiklik yapılmış, lektinin endotel yüzeyine bağlanabilmesi için Periyodik asit ve dimedon çözeltilerinin asitliği azaltılarak fizyolojik pH'da (pH:7,4) hazırlanmıştır. İsv serum fizyolojik (Yalancı Uygulama) (n=3) uygulanan farelerin 50 µm kalınlığındaki beyin kesitlerinde gerçekleştirilen PAS ile lektin ikili histokimyasal işaretlemesi Şekil 4.20'de gösterilmiştir. Koyu mor-pembe renkli PAS pozitif sinyal özellikle mikrodamarların çevresinde yoğun olarak izlenmiştir (Şekil 4.20).



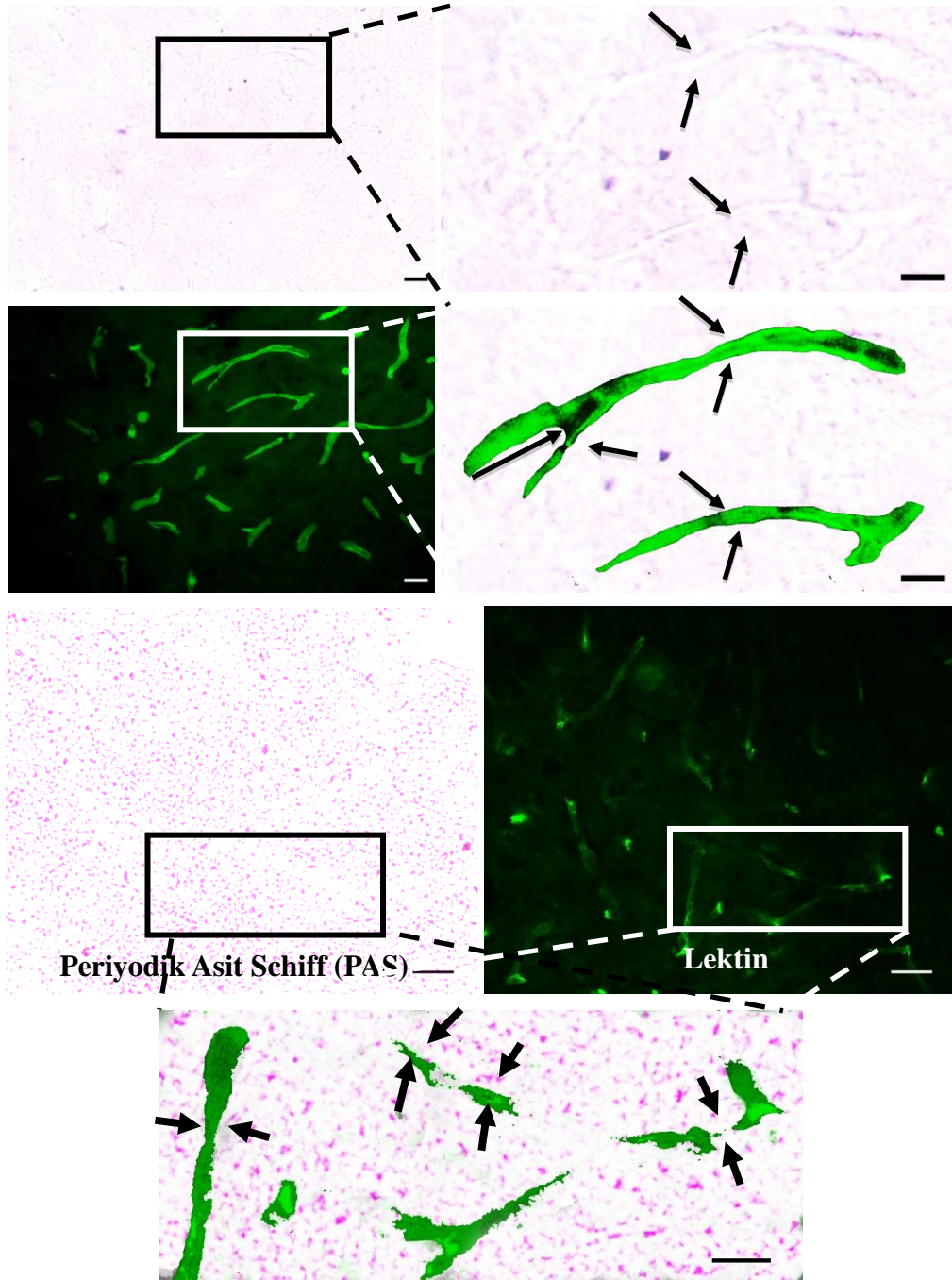
Şekil 4.20. Serum fizyolojik isv enjekte edilen beyin kesitlerinde kortekste PAS ile glikojen (ışık mikroskopi, mor-pembe) ve lektin (floresan mikroskopi, yeşil) ile damarların işaretlemesi. Kutu büyütülmüş ve iki görüntü üst üste çakıştırılmıştır (alt). Koyu mor-pembe renkli PAS pozitif işaretlenme özellikle mikrodamarlar çevresinde yoğun olarak izlenmiştir. Ölçek: üst 20 µm, alt 10 µm.

Bunun üzerine isv DAB enjeksiyonu (n=3) gerçekleştirilen beyinlerin kesitlerinde PAS ve lektin histokimyası yapılmış ve DAB ilişkili mikrodamar kasılması olan yerlerde glikojen sinyalinde artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.21, oklar).

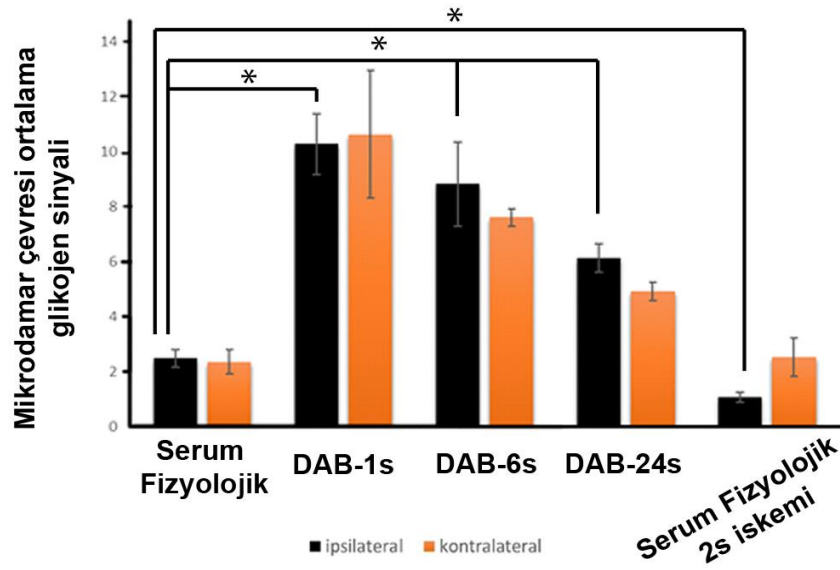


Şekil 4.21. isv DAB enjeksiyonundan 1 saat sonra beyin kesitlerinde kortekste PAS ile glikojen (ışık mikroskopi, mor-pembe) ve lektin (floresan mikroskopi, yeşil) ile damarların işaretlemesi. Kutu büyütülmüş ve iki görüntü üst üste çakıştırılmıştır (sağ alt). DAB ile mikrodamarlarda kasılmanın olduğu, ayrıca özellikle damar çevresinde olmak üzere tüm beyin kesitinde PAS'ın daha koyu renkli olduğu, glikojenin yoğun olduğu gözlenmiştir. Bu koyuluğun özellikle kasılmanın olduğu yerde bulunması dikkat çekici olmuştur. Ölçek: solda 20 μ m, sağda 10 μ m.

Serum fizyolojik isv enjeksiyonundan sonra 2 saat kalıcı OSA iskemisi yapılan beyinde OSA alanı boyunca PAS pozitifliğinde azalma yani açık pembe renk gözlenmiştir (Şekil 4.22). Son olarak da isv DAB enjeksiyonundan 1 saat sonra aynı hemisferde 2 saat OSA iskemisi ile 3 saat reperfüzyon (n=3) sonrasında OSA alanı boyunca glikojen miktarını belirlemek için Periyodik Asit Schiff histokimyası yapılmıştır. Damarlar yine lektin ile işaretlenmiştir. Hem tüm beyinde hem de mikrodamarların çevresinde etkin glikojen fosforilaz inhibisyonuna karşın PAS pozitifliğinde azalma gözlenmiştir (Şekil 4.22).



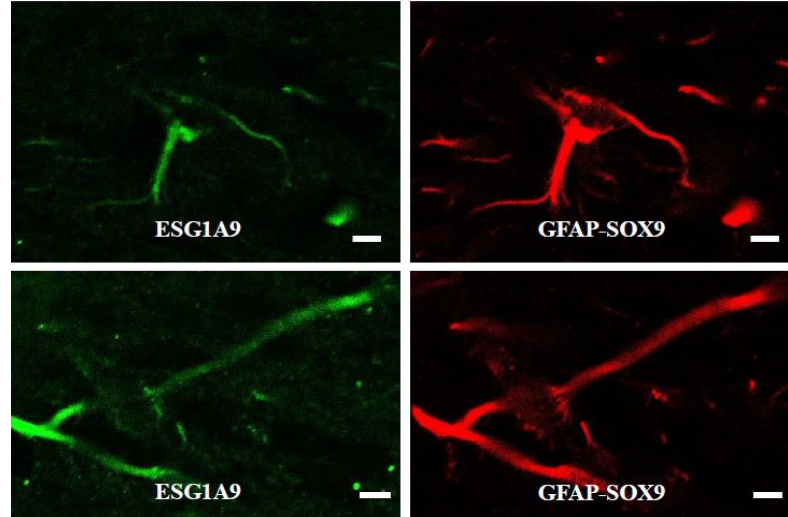
Şekil 4.22. Serum fizyolojik (1. ve 2. sıra) isv enjeksiyonu sonrası 2 saat kalıcı OSA iskemisi, DAB (ipsilateral) isv enjeksiyonundan 1 saat sonra 2 saat iske mi/3 saat reperfüzyon (3. ve 4. sıra) yapılmıştır. Kutular büyütülmüş ve iki görüntü üst üste çakıştırılmıştır (alt). PAS sinyalinin her iki grupta tüm dokuda azaldığı, mikrodamar çevresinde özellikle kasılmaların olduğu yerlerde daha da azaldığı (açık pembe) saptanmıştır (oklar). DAB isv enjeksiyonu ile etkili glikojen fosforilaz inhibisyonuna rağmen peri-mikrovasküler glikojen depoları neredeyse bitmiştir. Mikrodamar çevresi PAS ilişkili parlaklık azalmıştır ve bununla ilişki olarak mikrodamar kasılmaları artmıştır (oklar). Ölçek: 1. ve 2. sıra solda ve 3. sırada 20 µm; 1. ve 2. sıra sağda ve 4. sırada 10 µm.



Şekil 4.23. PAS ve lektin işaretlemesi sonrasında yarı otomatik bilgisayar yazılımı (9) (Macro) (NIS Elements 4.3) yardımıyla DAB enjeksiyonları ve/veya 2 saat kalıcı OSA iskemisi sonrası beyin mikrodamar çevresindeki glikojene ait sinyalin ölçümü (n=3, Ortalama±SH). DAB isv enjeksiyonlarında mikrodamar çevresi glikojene ait ölçülen sinyal serum fizyolojik enjekte edilenlere göre anlamlı olarak fazladır. Serum fizyolojik isv enjeksiyonu sonrası gerçekleştirilen 2 saat kalıcı iskemi ile iskemik ipsilateral kortekste mikrodamar çevresi glikojene ait ölçülen sinyal serum fizyolojik enjekte edilenlere göre anlamlı olarak azalmıştır. *p<0,05, 'Kruskal-Wallis' testi.

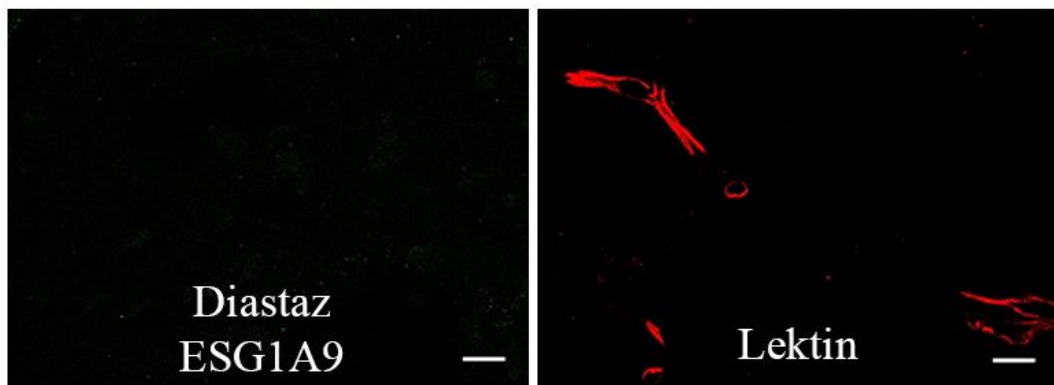
PAS ve lektin işaretlemesi sonrasında laboratuvarımızda daha önce retinal kesitlerde kullanılmak üzere geliştirilen (9) yarı otomatik bilgisayar yazılımı ('Macro', NIS Elements 4.3) yardımıyla beyin mikrodamar çevresindeki glikojene ait sinyalin ölçümü yapılmıştır. Bu ölçümler Şekil 4.23'te gösterilmiştir. Mikrodamar çevresi glikojene ait ölçülen sinyal DAB isv enjeksiyonlarında glikojenin kullanılmamasına bağlı olarak serum fizyolojik enjekte edilenlere göre anlamlı olarak fazladır (Şekil 4.23, n=3, DAB 1. ve 6. saatler için p=0,025, DAB 24. saat için p=0,041). Serum fizyolojik isv enjeksiyonu sonrası gerçekleştirilen 2 saat kalıcı iskemi ile iskemik ipsilateral kortekste mikrodamar çevresi glikojene ait ölçülen sinyal serum fizyolojik enjekte edilenlere göre anlamlı olarak azalmıştır (n=3, p=0,025). PAS histokimyasal işaretlemesi literatürde kabul görmüş bir yöntem olmakla birlikte bütün glikojen granüllerini işaretleyen IV58B6 ve 30'dan büyük yan zincirleri olan glikojen depolarını işaretleyen ESG1A9 antikorları kullanılarak immünofloresan çalışmalar da gerçekleştirilmiştir (5). Glikojenin immünofloresan yöntemlerle görüntülenebilmesi amacıyla üretilmiş bu antikorlar literatürde yer

almakla birlikte ticari olarak satışı henüz bulunmamaktadır. Bu çalışmamızda immünofloresan yöntemlerle de astrositlerde bulunduğu bilinen glikojen, yüksek çözünürlükle incelenmiş, hücreler arası ilişkiler ortaya konmaya çalışılmıştır (Şekil 4.24).



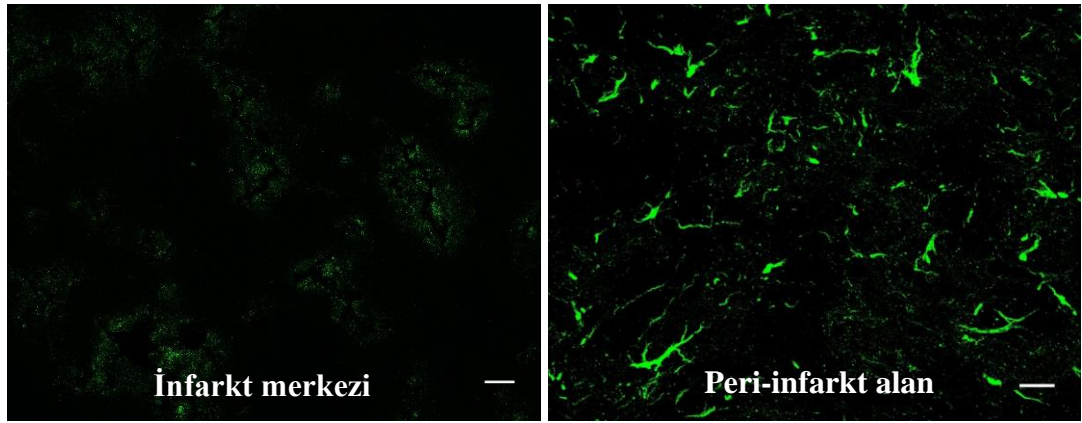
Şekil 4.24. Beyin korteksinde glikojen ESG1A9 antikoruna (yeşil) ve astrositler GFAP ve SOX9 (kırmızı) antikorları ile immünofloresan olarak işaretlenmiştir. Glikojen içeren astrosit son ayaklarının bir mikrodamarı çevreleyip sardığı gözlenmektedir, hatta damar silüet şeklinde izlenmektedir. Ölçek: 10 µm.

ESG1A9 ve IV58B6 antikorunun glikojene özgül olduğu yapılan diastaz uygulaması ile işaretlenmenin tamamen yok olması ile de gösterilmiştir (Şekil 4.25).



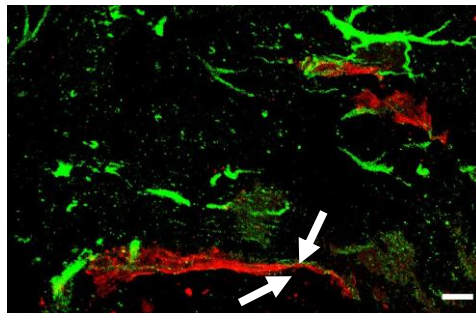
Şekil 4.25. Damarlar lektin ile işaretlenmiştir (kırmızı, üst) glikojen ESG1A9 antikoruna (yeşil) ile immunohistokimyasal işaretlenmiştir ancak diastaz uygulaması yapıldığı için işaretlenmenin neredeyse tamamının kaybolduğu saptanmıştır. Altta iki görüntü karşılaştırılmıştır. Ölçek: 10 µm.

Glikojenin immünofloresan olarak işaretlenmesi ile glikojenin hücre sel depoları daha net ve özgül bir şekilde görüntülenebilmiştir. Sonra kalıcı OSA iskemisi oluşturulmuş ve iskemi süresince glikojenin iskemi merkezinde tükendiği PAS ve immünofloresan çalışmalar ile belirlenmiştir. Aşağıdaki görüntülerde beyinde 2 saat OSA tıkaması ile gerçekleştirilen kalıcı iskemi sonrasında glikojenin infarktın merkezinde neredeyse kalmadığı, peri-infarkt alanda arttığı ve GFAP ifade eden astrositlere benzer bir görünümde olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. Glikojene özgül ESG1A9 antikoruna (yeşil) ile gerçekleştirilen immünofloresan işaretleme ile 2 saat kalıcı iskemi sonrası beyinde bulunan glikojenin incelenmesi. İnfarkt merkezi (sol), ve peri-infarkt (penumbra) alan (sağ) gösterilmiştir. Ölçek: 20 μm .

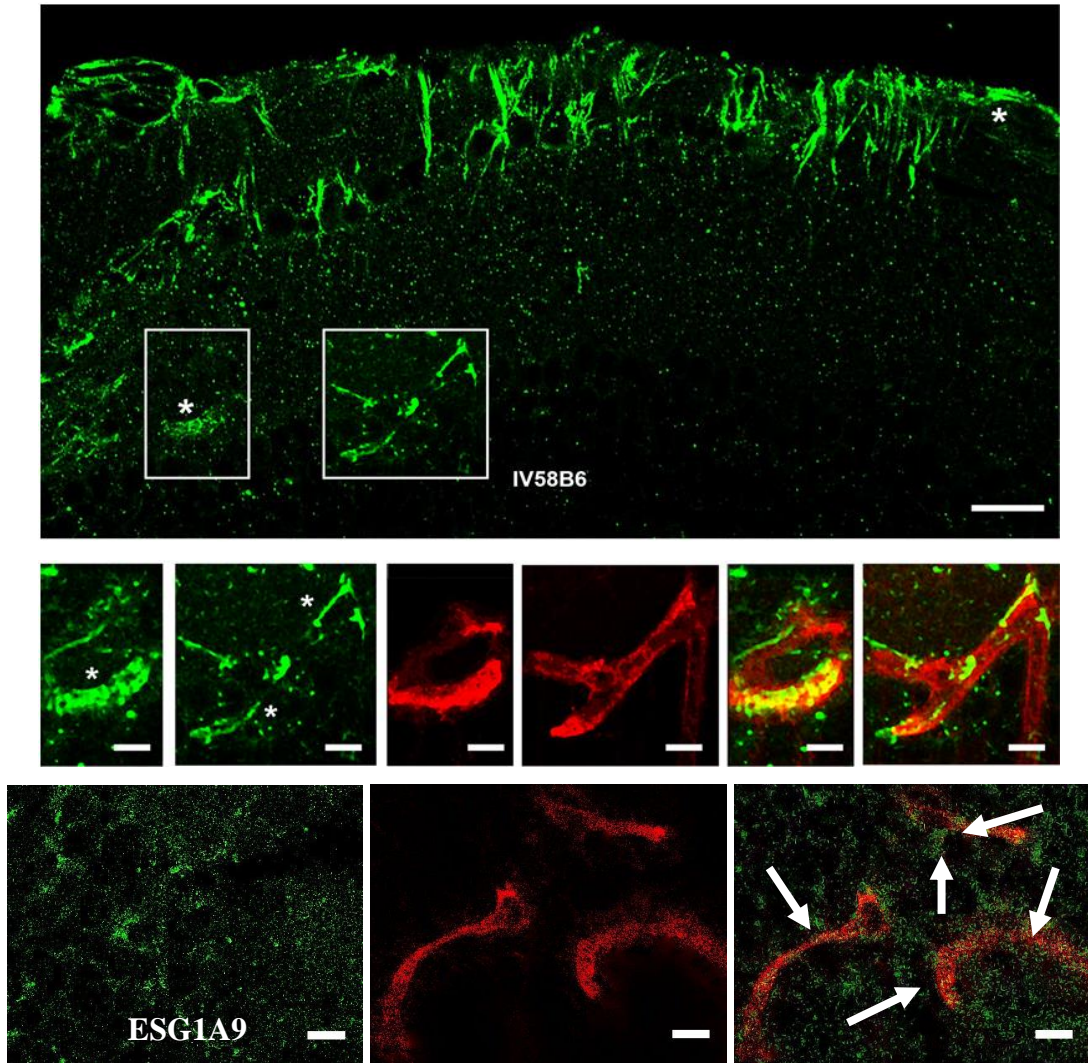
Beyinde 2 saat kalıcı OSA sonrasında peri-infarkt alanda lektinle işaretlenen mikrodamarların (kırmızı) kasıldığı, glikojene ait işaretlemenin mikrodamar duvarına uzanan astrosit son ayaklarında belirginleştiği ve kasılmanın olduğu yerlerde (ok) glikojenin muhtemelen tüketildiği için azaldığı gözlenmektedir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. Beyinde iskemi sonrasında lektinle işaretlenen mikrodamarların (kırmızı) kasıldığı ve kasılmanın olduğu yerlerde (ok) glikojenin azaldığı ESG1A9 immünofloresan işaretlemesi (yeşil) ile gözlenmiştir. Görüntü iskemik penumbra alanından alınmıştır. Altta iki görüntünün büyütülmüş ve üst üste çakıştırılmış örneği görülmektedir. Ölçek: üstte 20 μm , altta 10 μm .

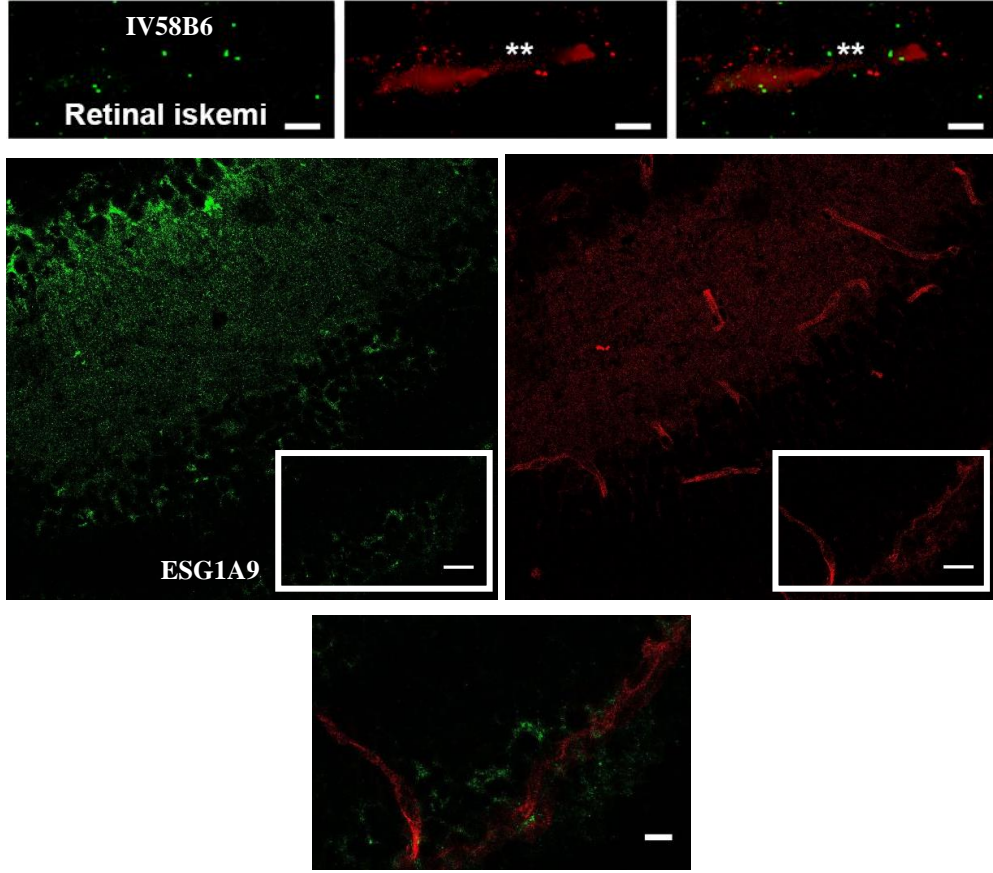
4.3.2. Retinada Mikrodamar Kasımları Perimikrovasküler Glikojen ile İlişkilidir

Retinada da damar çevresindeki glikojeni göstermek için PAS ve immüno Floresan çalışmalar (ESG1A9 ve IV58B6) ile lektin eş zamanlı gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.28). Her iki antikor ile işaretlenen, mikrodamar duvarına uzanan, muhtemelen Müller hücre ayaklarında ve mikrodamar duvarında bulunan glikojen (yeşil) ve lektin birlikte gösterilmiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. Retinadan alınan koronal kesitlerde IV58B6 ve ESG1A9 antikorları ile glikojen (yeşil), mikrodamarlar için lektin (kırmızı) işaretlemesi görülmektedir. Kutular büyütülmüş ve iki görüntü üst üste çakıştırılmıştır. Alt sağda çakıştırılmış (sarı) görüntülerde mikrodamarlar ve muhtemelen Müller hücrelerinin son ayaklarındaki IV58B6 işaretli glikojen (*) gözlenmektedir. Ölçek: üst 1. sıra 20 μ m, orta ve alt sıra 10 μ m. 3. sıra sağda çakıştırılmış görüntüde damarlar etrafında ESG1A9 işaretli glikojen (oklar) gözlenmektedir. Ölçek: 10 μ m.

Retinal iskeminin 1. saatinde derin tabakada bulunan mikrodamar duvarında ve buraya uzanan Müller hücresi son ayaklarında her iki antikorla gerçekleştirilen immüno Floresan işaretlemelerde glikojene ait sinyalin kaybolduğu, yüzeysel büyük damar duvarında ise anlamlı ölçüde azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.29).

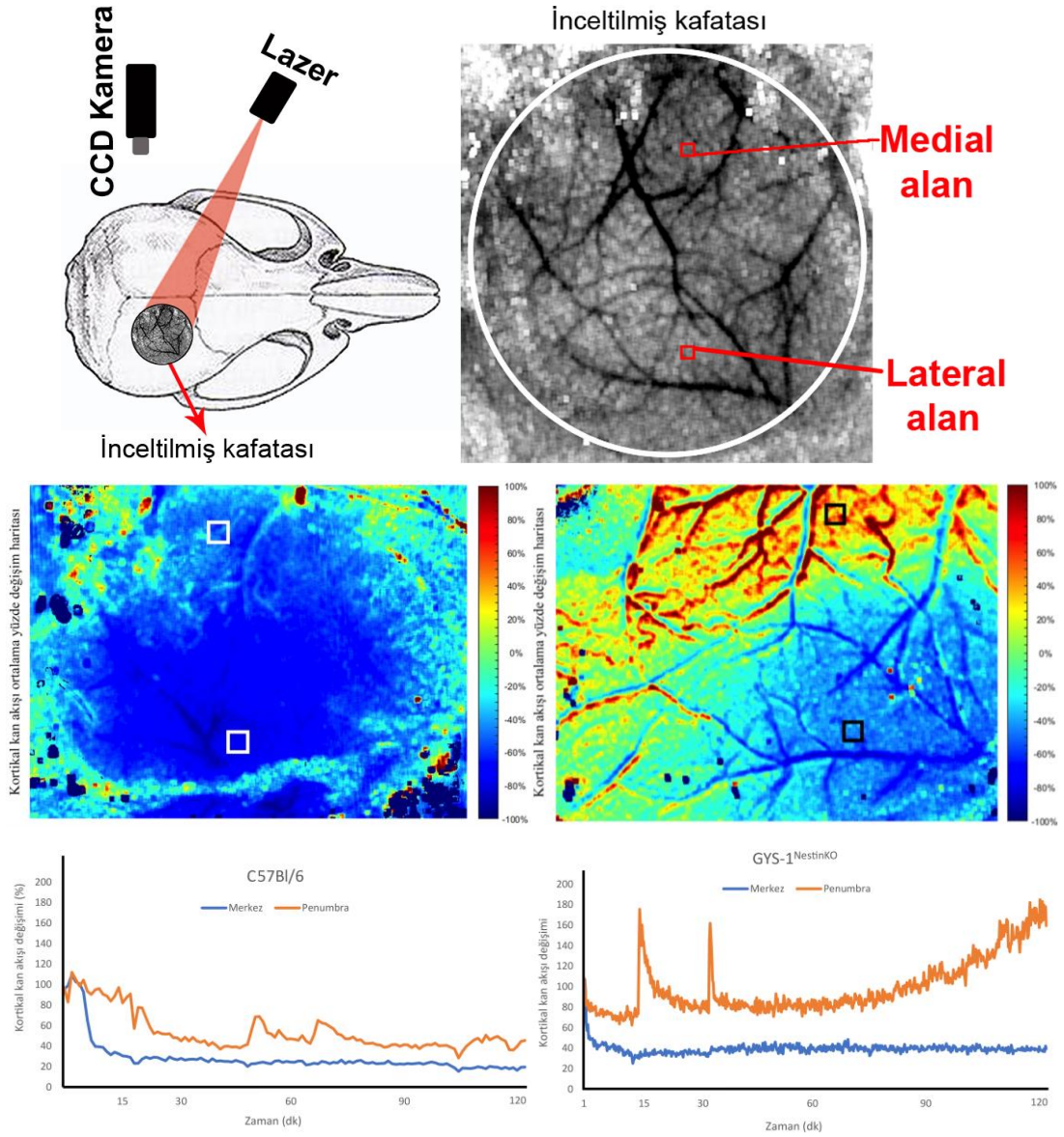


Şekil 4.29. Bir saat retinal iskemi sonrası alınan retinal koronal kesitlerde glikojen IV58B6 ve ESG1A9 antikorları ile immüno Floresan (yeşil), mikrodamarlar Lektin (kırmızı) ile işaretlemesi görülmektedir. Kutular büyütülmüş ve iki görüntü üst üste çakıştırılmıştır (alt sağ). Glikojenin azaldığı ve mikrodamarların kasıldığı (***) saptanmıştır. Ölçek: 2. sırada 20 µm, 1. ve 3. sırada 10 µm.

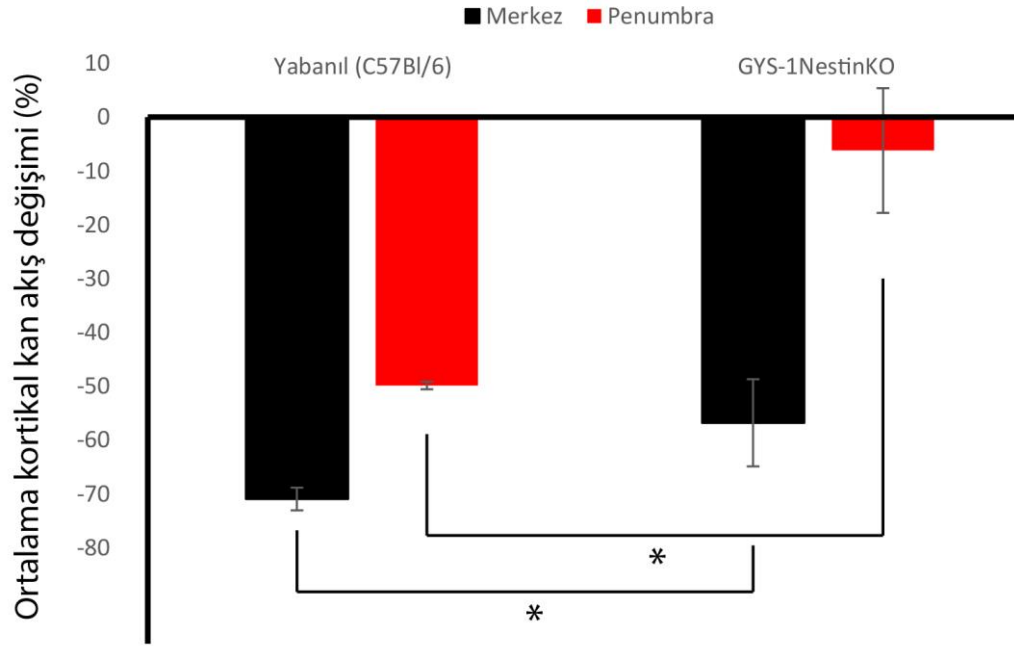
20 µm kalınlığındaki kontrol retinal kesitlerinde gerçekleştirilen PAS ile lektin ikili histokimyasal işaretlemesi ile koyu mor-pembe renkli PAS pozitif sinyal beyindeki gibi damar çevresinde yoğun olarak izlenmiştir. Intravitreal DAB enjeksiyonu (n=3) gerçekleştirilen retinalarda PAS ve lektin histokimyası ile DAB ilişkili mikrodamar kasılması ve artan glikojen sinyali saptanmıştır. 1 saat kalıcı retinal iskemi (n=3) sonrasında mikrodamar kasılmalarının olduğu tüm retinada hem de mikrodamarların çevresinde PAS pozitifliğinde azalmaya işaret eden açık pembe renk gözlenmiştir.

4.4. GYS-1^{NestinKO} ve isv DAB Enjeksiyonu Yapılan Farelerde Gerçekleştirilen Fokal Serebral İskemi

Hem beyin hem de retina da peri-mikrovasküler glikojenin mikrodamar kasılmaları ile ilişkisi ortaya konduktan sonra fokal serebral iskemi modelinde kortikal kan akımı değişiklikleri, deney sırasında hemodinamik dengesizliğe işaret edebilecek sistolik kan basıncı değişiklikleri, deney sonrası histopatolojik iskemik enfarkt hacim ve mikrodamar kasılma incelemeleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca laboratuvarımızda başka bir çalışmada kullanılmak üzere (224) literatürde ilk olarak hazırlanmış yarı-otomatik analiz rutini (MATLAB-Simulink) ile iskemi sırasında lazer benekli kontrastlanma görüntülemeleri ile elde edilen verilerle kortikal kanlanma haritaları oluşturulmuştur. (Şekil 4.30). Bu incelemelerde GYS-1^{NestinKO} farelerde yabancı kontrollere göre farklı kortikal kanlanma değişim haritaları (n=3) elde edilmiştir. Bununla birlikte GYS-1^{NestinKO} transgenikler ve yabancı kontroller kan akım değişiklikleri açısından iskemik merkez ve penumbra da zamansal olarak incelenmiştir (Şekil 4.30). 2 saatlik iskemi sırasında her iki farenin iskemik merkezlerinde kalıcı bir kan akımı azalması gözlenirken (yabancı kontrol: %70,92±2,10, GYS-1^{NestinKO} %56,76±8,09) GYS-1^{NestinKO} transgeniklerin penumbralarında ilk saat içerisinde belirgin bir azalma bulunurken özellikle 90. dakikadan itibaren kan akımında hızlı bir artış izlenmiştir (n=3). Bu şekilde ortalama kan akımı %6,19±11,58 azalmıştır (n=3). İskemik merkez ve penumbra bölgelerinden alınan birer alanda yapılan ortalama kortikal kan akımı iskeminin merkez bölgesinde GYS-1^{NestinKO} farelerde yabancı kontrollere göre anlamlı olarak daha az düşüş göstermiştir (Şekil 4.31, p=0,025). Buna karşın penumbra da kontrollerde olduğu gibi ortalama kanlanmada belirgin bir düşüş gözlenmemiştir (p=0,025).



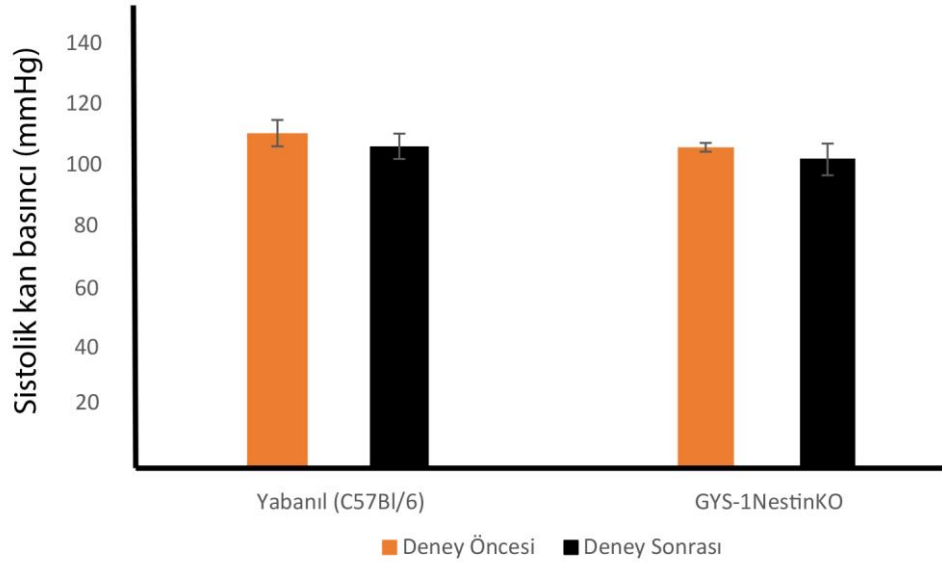
Şekil 4.30. Distal OSA iskemisi sırasında Lazer benekli kontrastlanma görüntülemeleri ile kortikal kan akımı değerlendirilmesi. İnceltilen kafatası ve kraniyel pencerenin şematik çizimi (üst sol), ölçümlerin yapıldığı medial ve lateral alanların şematik gösterimi (üst sağ), 2. sıra solda yabancı (C57Bl/6) ve sağda GYS-1^{Nestin KO} farelerde 2 saat kalıcı distal OSA iskemisi sırasında alınan lazer benekli kontrast görüntüleri ile oluşturulan kortikal kan akımı değişim haritaları. Kutular deney boyunca ölçüm yapılan medial ve lateral alanları göstermektedir. Ortalama kan akımı değişimi incelenen piksel başına deney öncesindeki değerlere oranlanarak yüzde olarak ifade edilmiştir. Haritalar yalnızca olarak renklendirilmiştir. Renk skalası (orta sağ) yüzde 100 artış ve azalış olarak ayarlanmıştır. Kutular ile belirtilen lateral alanlar iskemik merkez, medial alanlar penumbra bölgelerini temsil etmektedir. Altta yabancı (C57BL/6) (sol) ve GYS-1^{Nestin KO} farelerde 2 saat kalıcı distal OSA iskemisi sırasında alınan lazer benekli kontrast görüntülerinin belirtilen alanlardaki kan akımı değişim yüzdelерinin zamansal gösterimi. GYS-1^{Nestin KO} transgeniklerde merkezde ve penumbroda kan akımı kontrollere göre daha az azalmıştır.



Şekil 4.31. Yabanıl (C57BL/6) ve GYS-1^{Nestin KO} farelerde 2 saat kalıcı distal OSA iskemisi sırasında lazer benekli kontrastlanma görüntüleri ile elde edilen ortalama kortikal kan akım değişimi deney öncesine göre yüzde olarak ifade edilmiştir. GYS-1^{Nestin KO} transgeniklerde merkezde ve penumbra kan akımı kontrollere göre daha az olarak azalmıştır. GYS-1^{Nestin KO} transgeniklerde penumbra 2 saat sonunda ortalama kan akımı neredeyse hiç azalmamıştır. * $p < 0,05$, 'Mann-Whitney U' testi.

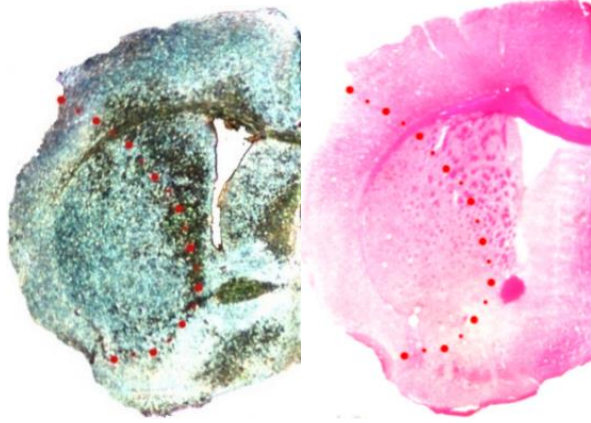
Distal OSA iskemisi sırasında gerçekleşebilecek herhangi bir hemodinamik dengesizlik kortikal kan akımını etkileyerek yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir. Bu nedenle sistolik kan basıncının deney sırasında monitorizasyonu serebral perfüzyon değişikliklerinin incelenmesi için önemli bir parametredir (210). Sistolik kan basıncı ölçümleri literatürde girişimsel ve girişimsel olmayan yöntemlerle gerçekleştirilmektedir; ancak farede girişimsel olmayan yöntemlerin yetkinliği tartışmalıdır (212). Bu nedenle literatürde ilk kez lazer benekli kontrastlı görüntüleme ile kuyruktan sistolik kan basıncı ölçülmüştür. Fare modellerine uygun boyutta bir tansiyon manşonu şişirilip gevşetilirken kuyruk kan akımının kesildiği ve geri başladığı değerlerin ölçülmesi ile bu mümkün olmuştur. Bu çalışma ile deney öncesi ve sonrası elde edilen sistolik kan basıncı değerleri arasında her iki grupta deney sırasında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.32, yabanıl kontroller için $p = 0,109$, GYS-1^{NestinKO} transgenikler $p = 0,285$, $n=3$). Bununla birlikte yabanıl kontrol ve GYS-1^{NestinKO} fareler arasında hem deney öncesinde hem de deney sonrasında sistolik kan basıncı değerleri açısından herhangi anlamlı bir fark

bulunmamıştır (Şekil 4.32, Deney öncesi değerler için $p=0,376$, deney sonrası değerler için $p=0,5$, $n=3$). Bu incelemeler ile fokal serebral iskemide deneyleri sırasında sistolik kan basıncı değerlerinde değişim olmadığı, hemodinamik dengesizliğe işaret edecek herhangi bir bulgunun olmadığı ve bu sayede kortikal serebral kan akımı değerlerindeki değişimlerin sistemik kan basıncı değişimlerine bağlı olmadığı gösterilmiştir.



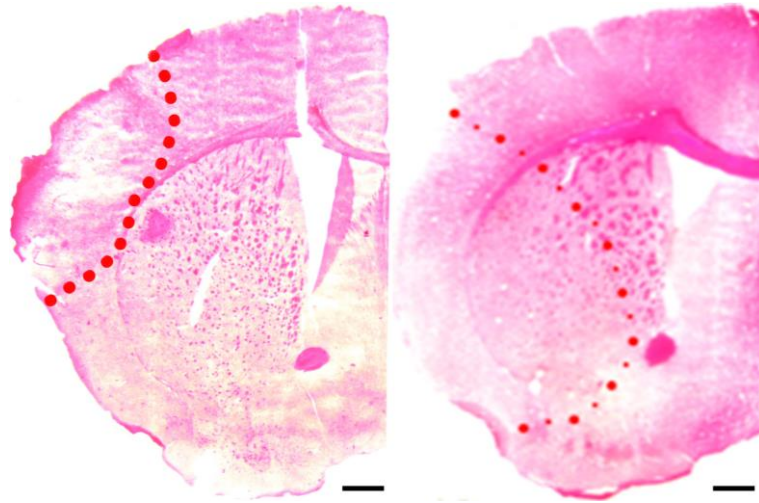
Şekil 4.32. Yabanıl (C57BL/6) ve GYS-1^{NestinKO} hayvanlarda 2 saat kalıcı distal OSA iskemisi sırasında kuyruktan ölçülen sistolik kan basıncı (mmHg) değerlerinin gösterimi. Her iki fare arasında deney öncesi ve sonrasında sistolik kan basıncı arasında fark bulunmamaktadır (*Mann-Whitney U* testi). Her iki deney grubunda deney öncesi ve sonrası sistolik kan basıncı değerleri arasında da anlamlı fark bulunmamaktadır (*Wilcoxon signed rank* testi).

2 saat süren kalıcı distal OSA iskemisi sonrası kurban edilen yabanıl ve GYS-1^{NestinKO} farelerde semi-stereolojik sayıma uygun olarak 50 µm kalınlığında koronal kesitler alınmıştır. Bu kesitlerde iskemik enfarkt hacimlerinin incelenmesi amacıyla literatürde belirtildiği gibi Nissl ve glikojenin işaretlenmesi amacıyla PAS histokimyasal işaretlemeleri gerçekleştirilmiştir (224). Her iki histokimyasal işaretleme enfarkt alanı ve demarkasyon hattı görüntüleme açısından değerlendirilmiştir. Literatürde belirtildiği gibi Nissl ile işaretlenen kesitler Faz kontrast mikroskopunda, PAS ile işaretlenen kesitler ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir. Aynı kesitlerin bu çalışmalarda elde edilen görüntüleri Şekil 4.33'te gösterilmektedir.

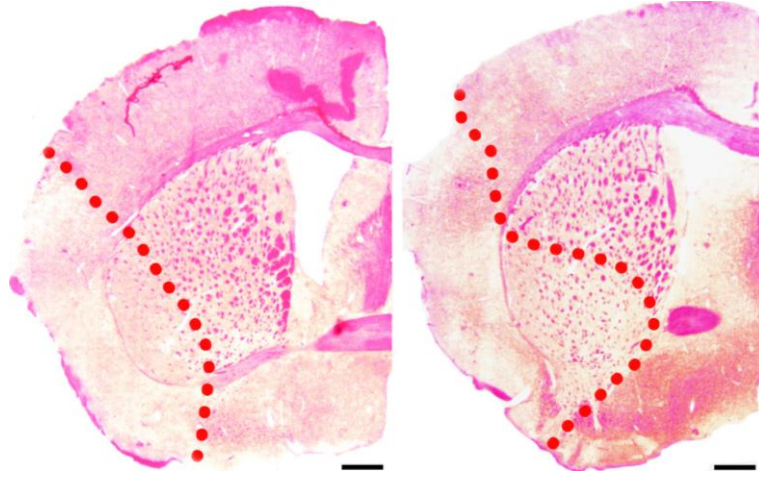


Şekil 4.33. GYS-1^{NestinKO} hayvanlarda 2 saat kalıcı distal OSA iskemisi sonrası Nissl ve PAS histokimyasal işaretlemesi. Solda faz kontrast ile görüntülenen Nissl işaretlemesi, sağda ışık mikroskobu ile görüntülenen PAS işaretlemesi. Kırmızı noktali işaretlenen alan iskemik enfarktı göstermektedir.

Enfarkt alanı ölçümü için bu iki yöntem arasında herhangi bir farklılık gözlenmemesi üzerine bütün değerlendirmeler PAS ile işaretlenen kesitlerde gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.34 ve 4.35).

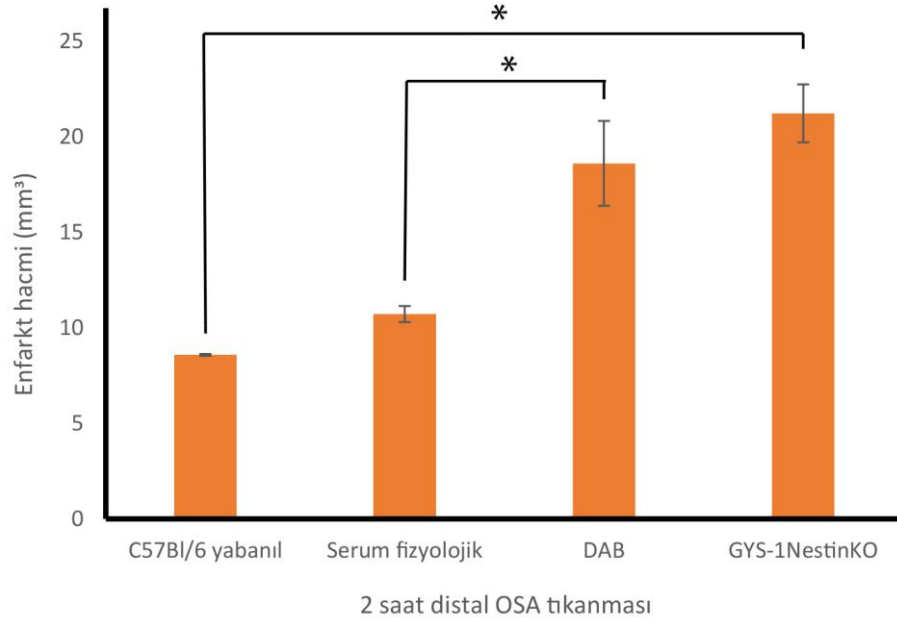


Şekil 4.34. Yabanıl (C57BL/6) (sol) ve GYS-1^{Nestin KO} (sağ) hayvanlarda 2 saat kalıcı distal OSA iskemisi sonrası PAS histokimyasal işaretlemesi. Kırmızı noktali işaretlenen alan iskemik enfarktı göstermektedir. GYS-1^{Nestin KO} transgeniklerin enfarkt hacmi kontrollere göre daha fazladır. 1X büyütme. Ölçek: 500 μ m.



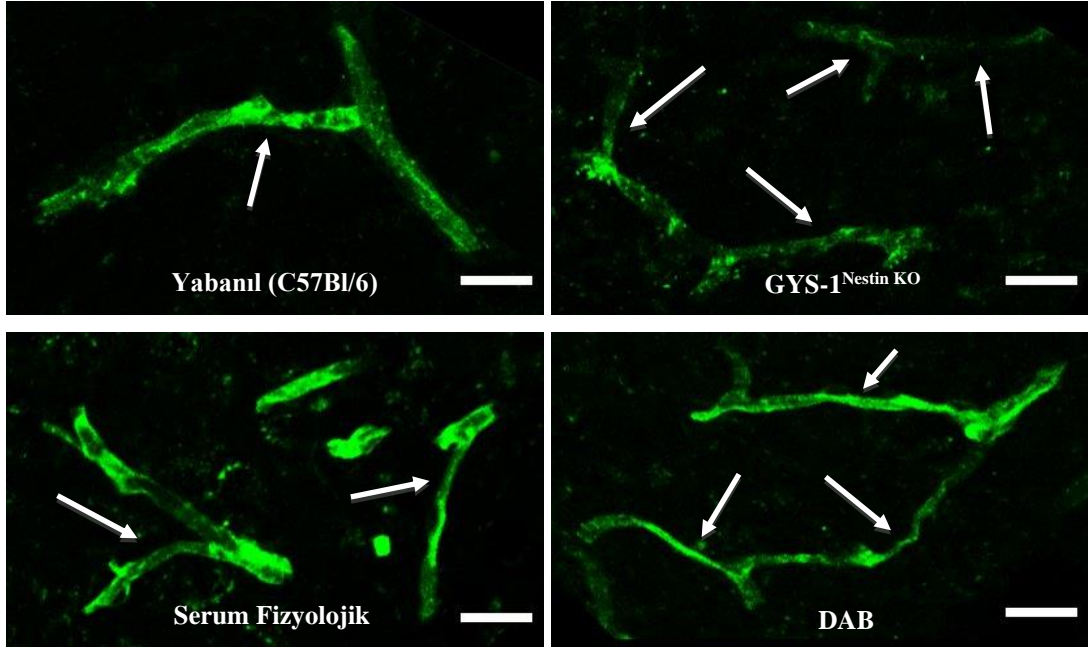
Şekil 4.35. Serum fizyolojik (sol) ve DAB (sağ) isv enjeksiyonu sonrası 2 saat kalıcı distal OSA iskemisi gerçekleştirilen farelerin beyinlerinde PAS histokimyasal işaretlemesi. Kırmızı noktalı işaretlenen alan iskemik enfarktı göstermektedir. DAB (sağ) isv enjeksiyonu iske mi sonrasında enfarkt hacmi kontrollere göre daha fazladır. 1X büyütme. Ölçek: 500 μ m.

Diğer bir taraftan GYS-1^{NestinKO} transgeniklerde kapiller yoğunluğun ve bağlantıların az olduğu gösterilmiştir. Bu da iske mi sırasında hasarlı dokuya çevreden gelebilecek kollateral kan akışı desteğinin yabancı kontrollere göre çok daha az olacağını düşündürmüştür. Bu düşünce bu transgenik farelerde yabancı kontrollere göre iskemik infarkt hacminin artışıyla desteklenmiştir (Şekil 4.36, $p=0,025$, $n=3$). Bununla birlikte DAB isv enjekte edilmiş farelerde gerçekleştirilen distal OSA iskemisi sonrası iskemik hacim serum fizyolojik isv enjekte edilenlere göre de daha fazladır ($p=0,025$, $n=3$). Her iki modelde glikojen kullanımındaki bozulma, iske minin erken döneminde bile iskemik enfarkt hacimlerinde artışa neden olmuştur.



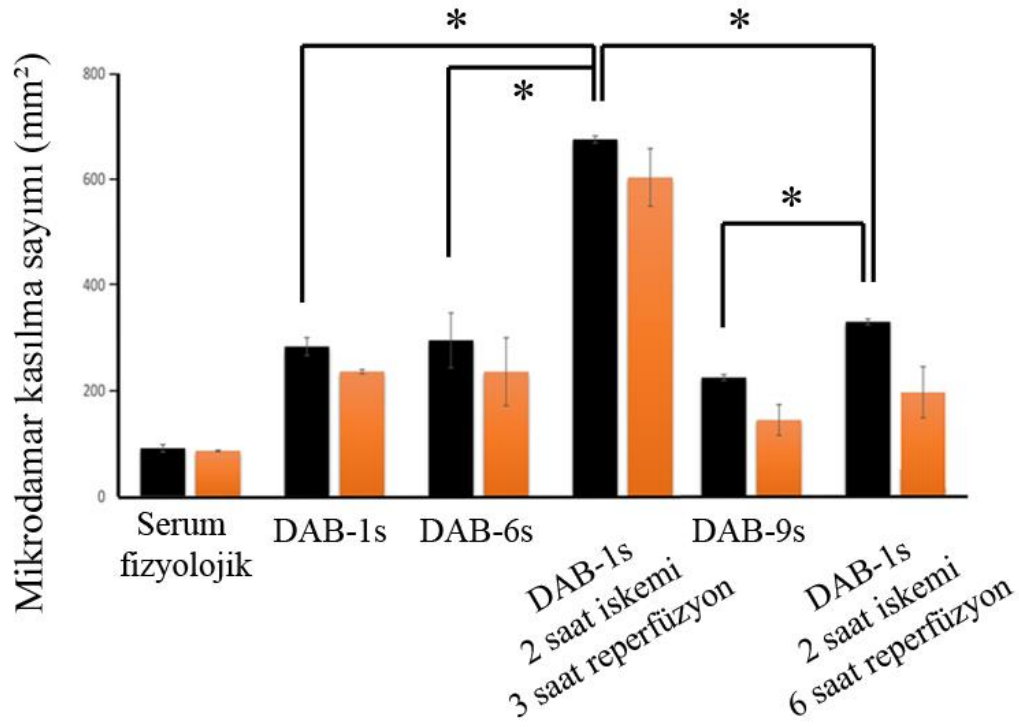
Şekil 4.36. Yabancı (C57BL/6), GYS-1^{NestinKO} transgenikler, Serum fizyolojik ve DAB isv enjeksiyonu sonrası 2 saat kalıcı distal OSA iskemisi gerçekleştirilen farelerin beyinlerinde PAS histokimyasal işaretlemesi ile ölçülen enfarkt hacimleri. GYS-1^{NestinKO} transgeniklerde yabancı kontrollere göre ve DAB (sağ) isv enjeksiyonu sonrasında gerçekleştirilen iskemide enfarkt hacmi serum fizyolojik isv enjekte edilenlere göre daha fazladır. Her deney için 10 kesitte 1X büyütmede alınan görüntülerde iskemik enfarkt alanı ölçülmüştür (n=3). Taranan OSA hacmi içerisindeki iskemik enfarkt iskemik hacim artışı nedeniyle düzeltme yapılarak hesaplanmıştır (218). *p<0,05, 'Kruskal-Wallis' testi.

2 saat süren distal OSA iskemisi sonrasında iskemik enfarkt hacim ölçümünü takiben bu farelerin beyin kesitleri Lektin ile işaretlenmiş ve mikrodamar kasılmaları incelenmiştir (Şekil 4.37). Yapılan incelemelerde GYS-1^{NestinKO} transgeniklerde iskemik alan içerisinde yaygın mikrodamar çökmeleri ve mikrodamar bütünlüğünde bozulma gözlenmiştir (Şekil 4.37). Bu nedenle daha önce belirlenen mikrodamar kasılma parametreleri ile bu farelerde sayım yapılamamıştır. Gerçekleşen histopatolojik değişiklikleri yansız bir biçimde inceleyebilmek ve deneyler arası bu farkları karşılaştırabilmek için başka yöntemler araştırılmaktadır.



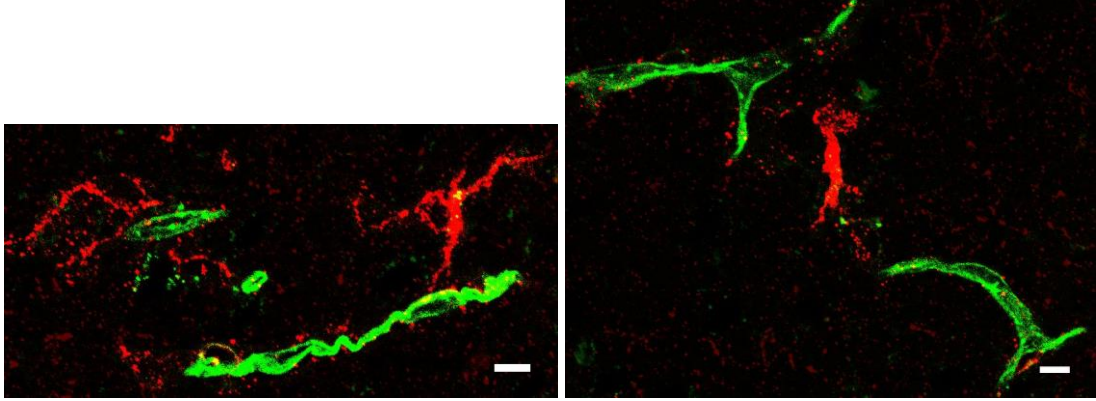
Şekil 4.37. Yabanıl (C57BL/6), GYS-1^{NestinKO} transgenikler, serum fizyolojik ve DAB isv enjeksiyonu sonrası 2 saat kalıcı distal OSA iskemisi gerçekleştirilen farelerin beyin kesitleri Lektin (yeşil) ile işaretlenmiştir. GYS-1^{Nestin KO} transgeniklerde ve DAB isv enjeksiyonu ile daha belirgin mikrodamar kasılmaları (oklar) gözlenmiştir. Ölçek: 10 μ m.

Glikojen üretimi ve/veya kullanımı bozulmuş farelerde distal OSA iskemisi ile gözlenen yaygın mikrovasküler kasılmalar ve çökmeler sonrasında DAB ile serebral glikojen kullanımı engellenmiş farelerde iskemi/rekanalizasyon (İ/R) modelleri uygulanmıştır. Proksimal OSA İ/R modeli ile rekanalizasyon sonrasında mikrodamar kasılmaları incelenmiştir (Şekil 4.38). DAB isv enjeksiyonundan 1 saat sonra yapılan 2 saat iskemi 3 saat reperfüzyon ile mikrodamar kasılmaları DAB enjeksiyonunun hem 1. hem de 6. saatindekine göre çok artmıştır ($p=0,012$, $n=3$). Bununla birlikte DAB isv enjeksiyonundan 1 saat sonra yapılan 2 saat iskemi 6 saat reperfüzyon ile mikrodamar kasılmaları DAB enjeksiyonunun 9. saatindekine göre de daha fazladır ($p=0,012$, $n=3$). Reperfüzyon süresi 3 saatten 6 saate arttırılınca iskeminin mikrodamar kasılması üzerindeki etkileri de azalmıştır ($p=0,025$, $n=3$). Bu durum DAB isv enjeksiyonu sonrası 6. ve 9. saatler arasında ($p=0,041$, $n=3$) DAB'ın glikojen fosforilaz inhibisyonu etkinliğinin ve dolayısıyla mikrodamar kasılması üzerindeki etkisinin azalmasıyla açıklanabilir (Şekil 4.38).



Şekil 4.38. DAB isv verilmiş beyinlerde yapılan iskemi/reperfüzyon ile DAB isv verilmiş farelerin beyinlerinde mikrodamar kasılma sayımları. Siyah: ipsilateral hemisfer, turuncu: kontralateral hemisfer. DAB isv verilmiş beyinlerde yapılan iskemi/reperfüzyon ile DAB isv verilmiş kontrollere göre kasılma sayısında artış olduğu saptanmıştır (n=3, ortalama±SH). Kasılmalar OSA sulama alanında incelenmiştir. DAB isv enjeksiyonundan 1 saat sonra yapılan 2 saat iskemi 3 saat reperfüzyon ile mikrodamar kasılmaları DAB enjeksiyonunun hem 1. hem de 6. Saat sonrasına göre çok daha fazladır. Bununla birlikte DAB isv enjeksiyonundan 1 saat sonra yapılan 2 saat iskemi 6 saat reperfüzyon ile mikrodamar kasılmaları DAB enjeksiyonunun 9. saat sonrasına göre de daha fazladır. DAB enjeksiyonu sonrası geçen süre arttıkça mikrodamar kasılması üzerindeki etkileri de azalmıştır. *p<0,05, 'Kruskal-Wallis' testi.

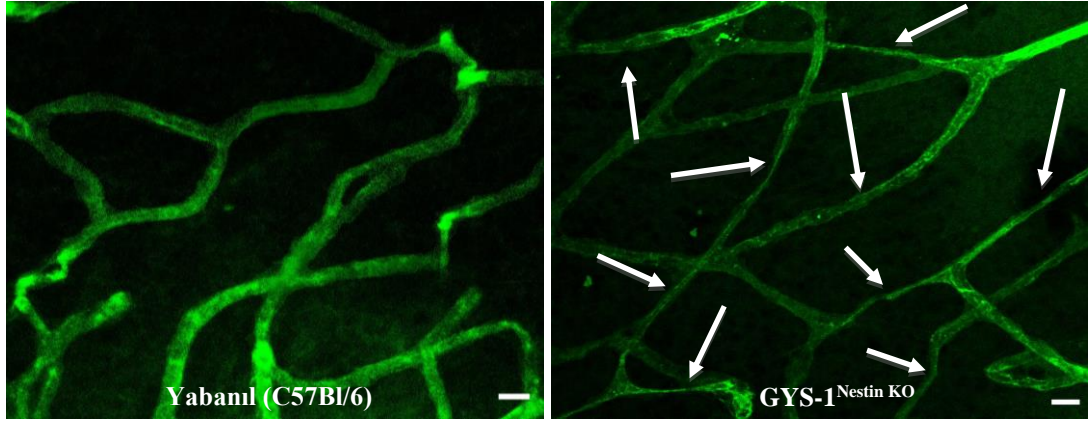
Proksimal İ/R sonrası beyin kesitleri Lektin (yeşil) ve PDGFR-β (kırmızı) ile işaretlenmiş, perisitler incelenmiştir (Şekil 4.39). PDGFR-β pozitif perisitlerin DAB enjeksiyonundan 1 saat sonra 2 saat iskemi ve 3 saat reperfüzyon yapıldığında iskemik penumbra da daha yaygın olmak üzere bütün beyinde mikrodamardan ayrıldığı gözlenmiştir (Şekil 4.39).



Şekil 4.39. Swiss albino farelerde DAB isv enjeksiyonundan 1 saat sonra 2 saat iskemi ve 3 saat rekanalizasyonun ardından beyinler perisit işaretleyici olarak Platelet ilişkili büyüme faktör reseptörü-beta (PDGFR- β) (kırmızı) ile ve mikrodamarlar lektin (yeşil) ile işaretlenmiştir. PDGFR- β pozitif perisitlerin DAB enjeksiyonundan 1 saat sonra 2 saat iskemi ve 3 saat rekanalizasyon uygulaması yapıldığında da iskemik penumbrada daha yaygın olmak üzere bütün beyinde mikrodamardan ayrıldığı gözlenmiştir Ölçek: 10 μ m.

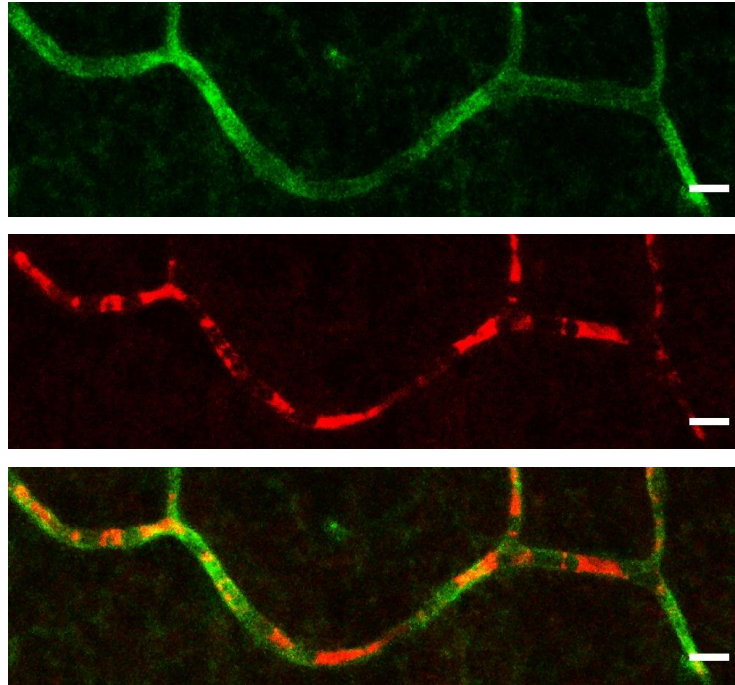
4.5. GYS-1^{NestinKO} ve Vitreus İçine DAB Enjeksiyonu Yapılan Farelerde Gerçekleştirilen Retinal İskemi

GY-1^{NestinKO} ve vitreus içine DAB enjeksiyonu yapılan farelerde gerçekleştirilen 1 saat süren kalıcı retinal iskemi modelinde mikrodamar kasılma incelemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla bütün retinalar Lektin (yeşil) (Şekil 4.40, 4.41, 4.42 ve 4.43) ve PDGFR- β (kırmızı) (Şekil 4.41, 4.42 ve 4.43) ile işaretlenmiş, mikrodamar kasılmaları incelenmiştir. Yapılan incelemelerde GYS-1^{NestinKO} transgenik farelerde (Şekil 4.42) ve DAB sonrası iskemik retinalarda (Şekil 4.43) beyindeki fokal serebral iskemi modellerinde gözlendiği gibi mikrodamarlarda uzun segmentli kasılmalar ve çökmeler çok sayıda gerçekleşmiştir. Bu nedenle daha önce perisit ilişkili mikrodamar kasılmalarının sayımı için belirlenen mikrodamar kasılma parametreleri ile bu farelerde sayım yapılamamıştır. Hem beyinde hem de retinada gerçekleşen histopatolojik değişiklikleri yansız bir biçimde inceleyebilmek ve deneyler arası bu farkları karşılaştırabilmek için başka yöntemler araştırılmaktadır.

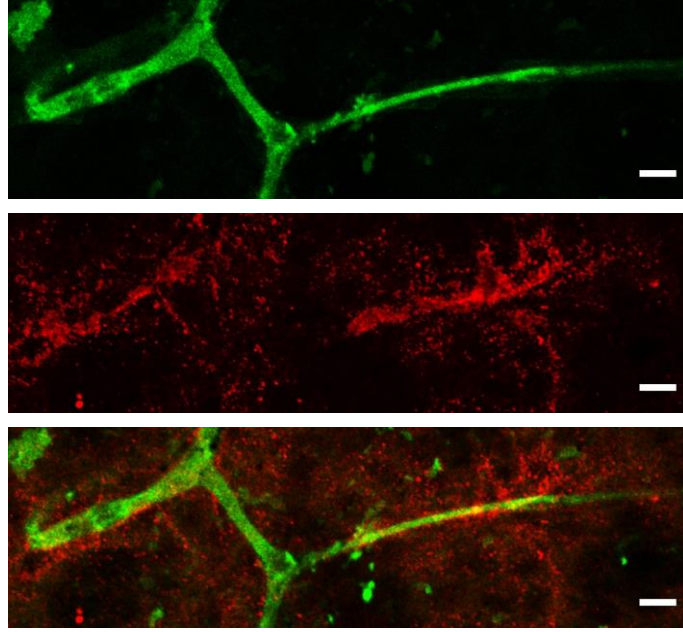


Şekil 4.40. Yabanıl (C57Bl/6) (sol) ve GYS-1^{NestinKO} (sağ) farelerde 1 saat kalıcı retinal iskemi sonrası Lektin (yeşil) işaretlemesi. GYS-1^{NestinKO} farelerde retinal iskemi sonrası mikrodamarlarda yaygın çökmeler izlenmiştir. Bu iskemik retinalarda daha önce belirlenen kasılma sayım parametrelerine uymayan çok sayıda çökmüş mikrodamar segmenti (oklar) bulunmaktadır. Ölçek: 10 µm.

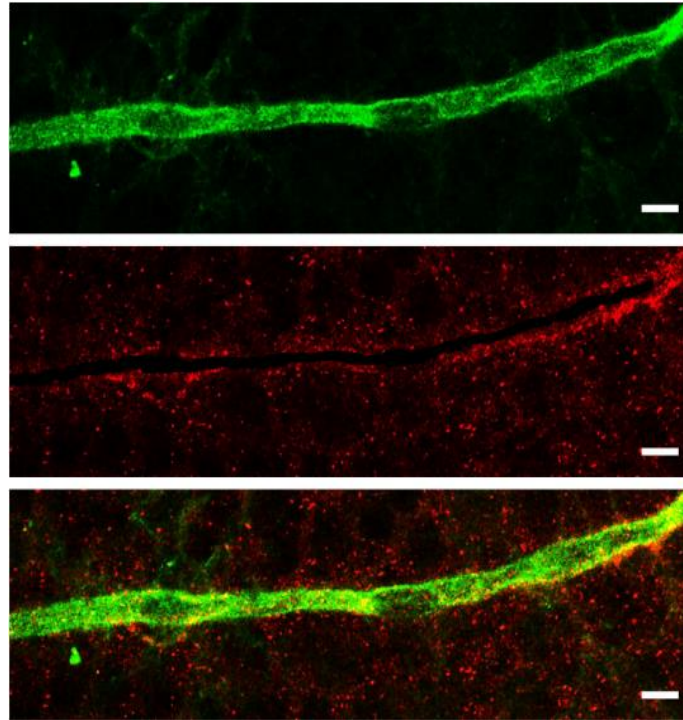
Mikrodamar kasılmalarıyla ilişkili perisitlerin incelenmesi amacıyla bütün retinalar Lektin (yeşil) ve PDGFR-β (kırmızı) ile işaretlenmiştir (Şekil 4.41, 4.42 ve 4.43). Yapılan incelemelerde bütün iskemik retinalarda PDGFR-β pozitif perisitler ile mikrodamar kasılmaları arasındaki ilişki gözlenmiştir (Şekil 4.41, 4.42 ve 4.43).



Şekil 4.41. Yabanıl (C57BL/6) farede 1 saat kalıcı retinal iskemi gerçekleştirilen farelerin retinalarında perisitler PDGFR-β (kırmızı) ve mikrodamarlar Lektin (yeşil) ile işaretlenmiştir. Bu retinalarda mikrodamarlarda perisit ilişkili uzun segmentli kasılmalar ve çökmeler gözlenmiştir. Ölçek: 10 µm.

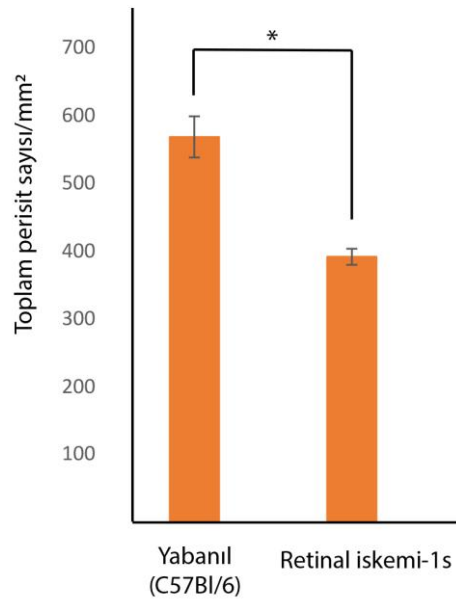
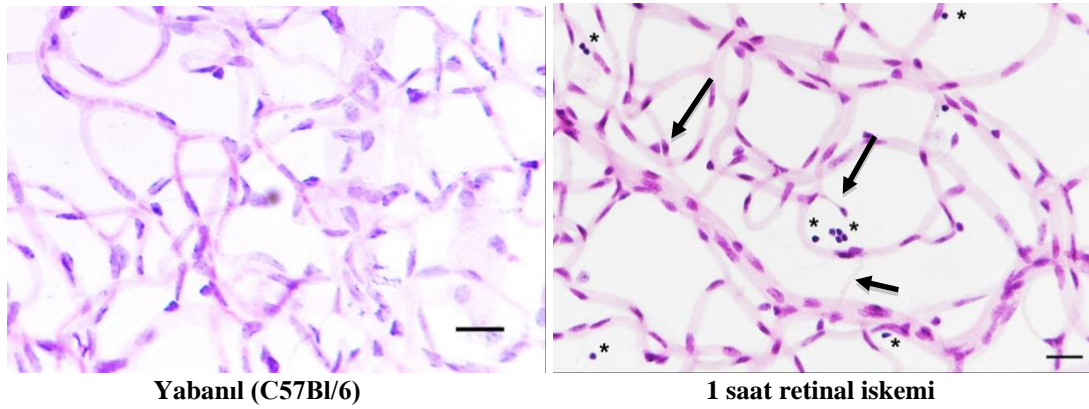


Şekil 4.42. GYS-1^{NestinKO} transgenik farelerin 1 saat kalıcı iske mi gerçekleştirilen farelerin retinalarında perisitler PDGFR-β (kırmızı) ve mikrodamarlar Lektin (yeşil) ile işaretlenmiştir. Bu retinalarda mikrodamarlarda perisit ilişkili uzun segmentli kasılmalar ve çökmeler gözlenmiştir. Ölçek: 10 µm.



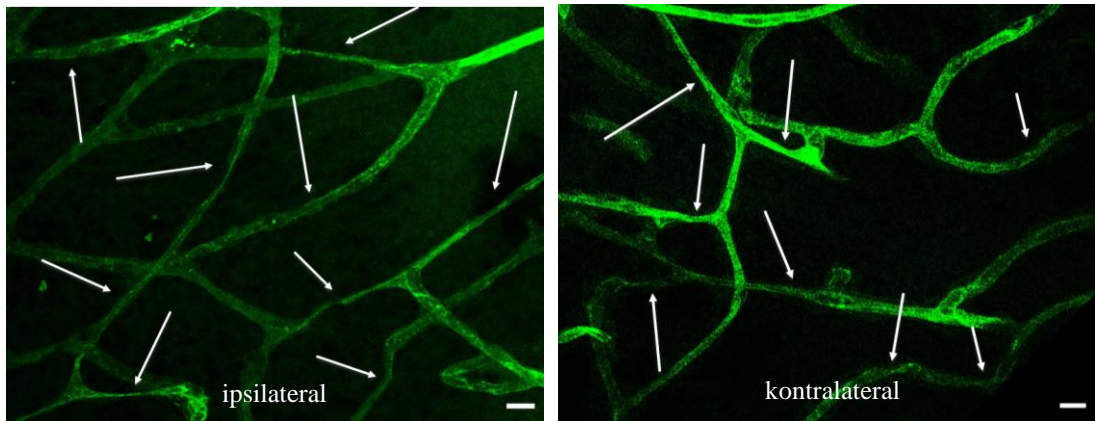
Şekil 4.43. İntravitreal DAB verilmiş ve ardından 1 saat kalıcı retinal iske mi gerçekleştirilen farelerin retinalarında perisitler PDGFR-β (kırmızı) ve mikrodamarlar Lektin (yeşil) ile işaretlenmiştir. Bu retinalarda perisit ilişkili uzun segmentli kasılmalar ve çökmeler gözlenmiştir. Ölçek: 10 µm.

Bütün dokularda gerçekleştirilen kalıcı retinal iskemisi sonrası mikrodamar kasılmalarının PDGFR- β pozitif perisitlerle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.41, 4.42 ve 4.43). Bunun üzerine yabancı (C57BL/6) kontroller ile 1 saat kalıcı retinal iskemisi uygulanan yabancı farelerde tripsin ile retinal sindirme yöntemi kullanılarak damarsal ağ ve perisitler incelenmiştir (Şekil 4.44).



Şekil 4.44. Yabancı (C57BL/6) kontrol (üst) ve 1 saat kalıcı retinal iskemisi uygulanan fare retinalarının damar ağları tripsin ile sindirme yöntemiyle elde edilmiş ve PAS-Hematoksilen ile işaretlenmiştir. Damar duvarından ayrılan perisitler yıldızlar (*) ile işaretlenmiştir. 1 saat kalıcı retinal iskemisi yapılan retinalarda mikrovasküler çökmeler gözlenmiştir (ok). Ölçek: 20 μ m. Bu retinalarda toplam perisit sayımı grafikte (alt sıra) ifade edilmiştir. Sayımlar her bir deneyde (n=3) 40X'lik büyütme altında 6-10 alanda yapılmıştır ve mm² de olacak şekilde gösterilmiştir. 1 saat kalıcı retinal iskemisi sonrasında perisit sayısında azalma gözlenmiştir. *p<0,05, 'Mann-Whitney U' testi.

Bu yöntem sonrasında PAS ve Hematoksilen işaretlemesiyle iskemik retinada perisitler daha rahat incelenmiştir. DAB enjekte edilen retinalarda gözlendiği gibi iskemik retinalarda da damar duvarından ayrılan perisitler bulunmuştur ve bu perisitlerin çekirdekleri intravitreal DAB enjeksiyonu gerçekleştirilen retinalardaki gibi piknotik görünüme sahiptir (Şekil 4.44, yıldızlar). Bunun sonucunda yansız bir değerlendirme yapabilmek için 40X'lik büyütme altında 6-10 alanda perisit sayımı yapılmıştır (n=3). Kontrol ve iskemik retinalarda gerçekleştirilen perisit sayımlarına ait grafik Şekil 4.44'te gösterilmiştir. 1 saat kalıcı iskemi yapılan retinada ($391,80 \pm 11,85$) yabancı kontrollere göre ($568,58 \pm 30,39$) anlamlı düzeyde daha az sayıda perisit bulunmaktadır (Şekil 4.44, n=3, p=0,025). GYS-1^{NestinKO} transgenik farelerde 1 saat kalıcı retinal iskemi sonrası retinal mikrodamar kasılmalarının yaygın olarak izlenmesi üzerine, iskeminin gerçekleştirildiği tarafın karşısında (kontralateral göz) bu kasılmaların varlığı araştırılmıştır (Şekil 4.45). Bir ön bulgu olarak bu transgenik farelerde gerçekleştirilen retinal iskemi, kontralateral gözde yaygın olarak retinal mikrodamar kasılmalarına neden olmuştur. Bu farelerde kontralateral gözün etkilenme nedenleri ayrıntılı olarak araştırılmaya çalışılacaktır.

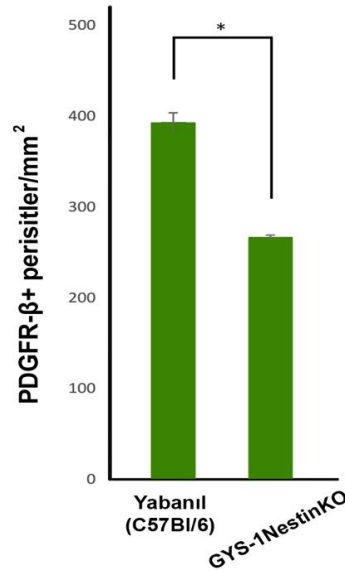
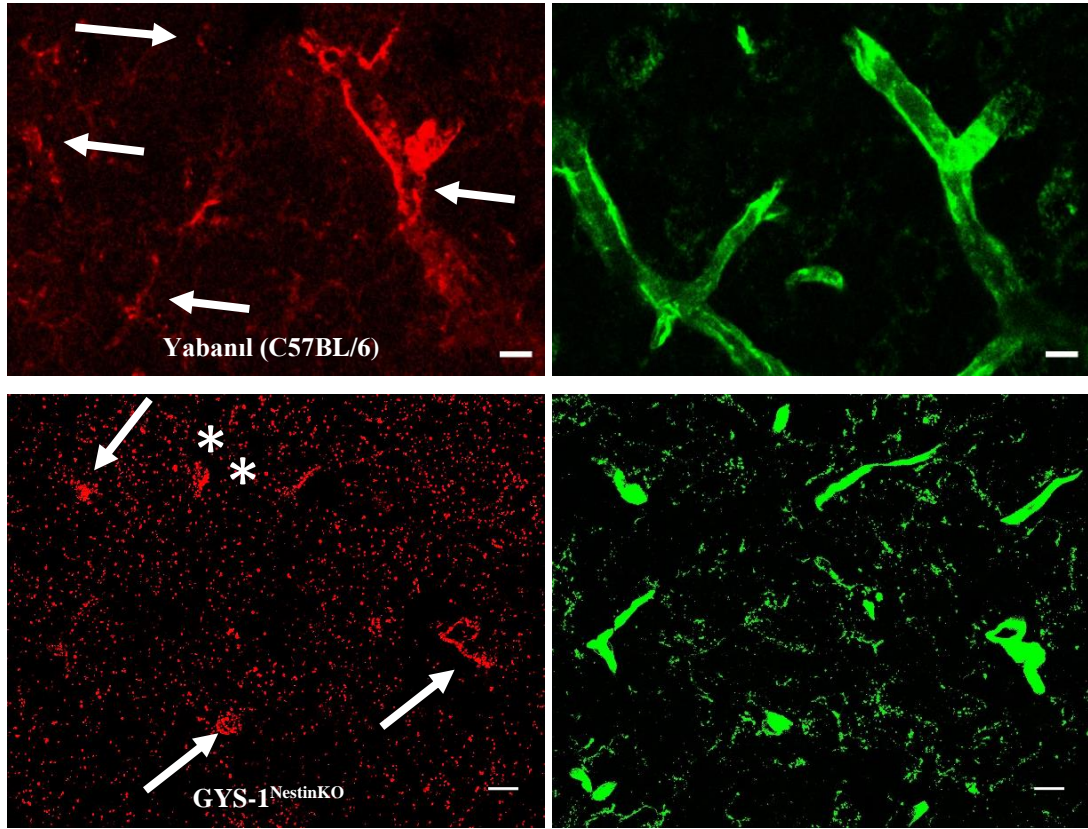


Şekil 4.45. GYS-1^{NestinKO} transgenik farelerde 1 saat kalıcı retinal iskemi gerçekleştirilmiş (ipsilateral, sol) ve iskeminin kontralateralindeki gözde (sağ) retinal mikrodamar kasılmaları damar işaretleyici lektin (yeşil) ile işaretlenerek incelenmiştir. Kontralateral gözdeki retinalarda yaygın mikrodamar kasılmaları (oklar) gözlenmiştir. Ölçek: 20 μ m.

4.6. Beyinde Peri-Mikrovasküler Glikojenin Nöroglivasküler Ünite Elemanlarına Etkileri

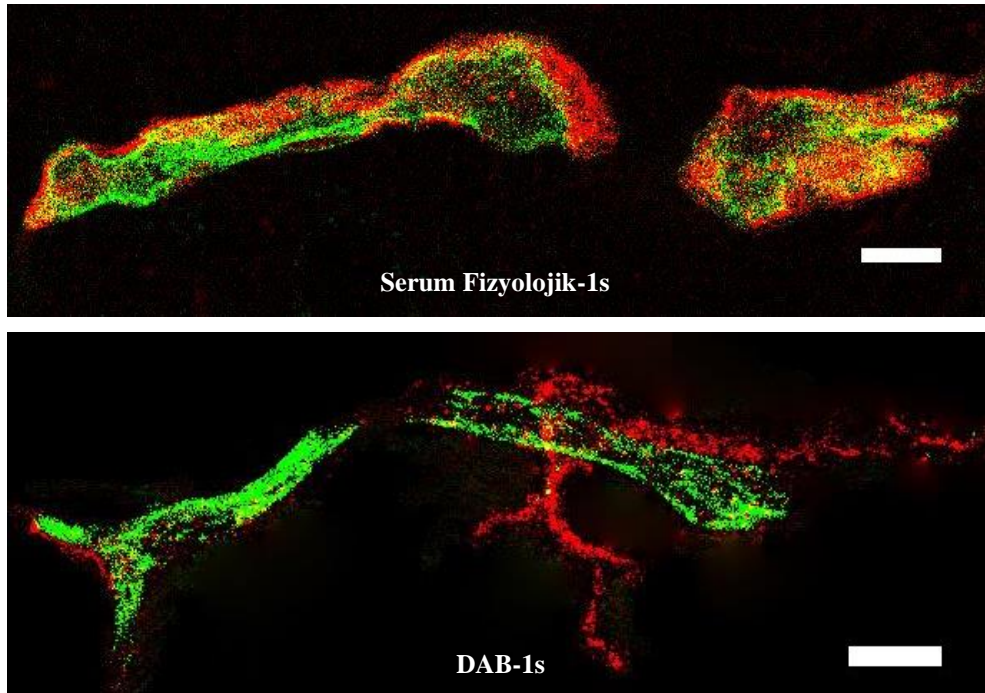
4.6.1. Beyinde Peri-Mikrovasküler Glikojenin Nöroglivasküler Ünite Elemanlarından Perisitlere Etkileri

Hem beyinde hem de retinada glikojen kullanım bozukluğu ve iskemi sonrası perisitlerin mikrodamar duvarından ayrılmaları nedeniyle perisitler daha ayrıntılı olarak incelenmiştir. Perisitlerin KBB kontrolünden belli bir düzeyde sorumlu olması (78, 79) nedeniyle öncelikle perisitler olmak üzere glikojen kullanımının KBB ve KRB elemanları üzerindeki etkileri incelenmiştir. Peri-mikrovasküler glikojenin mikrodamar kasılmalarıyla ilişkisi gözlemlendikten sonra, daha önce laboratuvarımızda yapılan çalışmalar da gözönünde bulundurularak buna neden olan olası hücrelerden perisitler üzerine etkileri araştırılmaya başlanmıştır (2). Bu amaçla öncelikle, yabancı kontrol, sonrasında glikojen metabolizması genetik olarak bozulmuş GYS-1^{NestinKO} farelerin beyinde perisitlere özgü reseptör PDGFR- β ifadesi incelenmiştir (Şekil 4.46). Yansımsız bir değerlendirme yapabilmek için mikrodamar kasılma sayımı için kullandığımız semi-stereolojik parametreler ile PDGFR- β pozitif perisitlerin sayımı GYS-1^{NestinKO} ve yabancı kontrol farelerde (Şekil 4.46) gerçekleştirilmiştir.



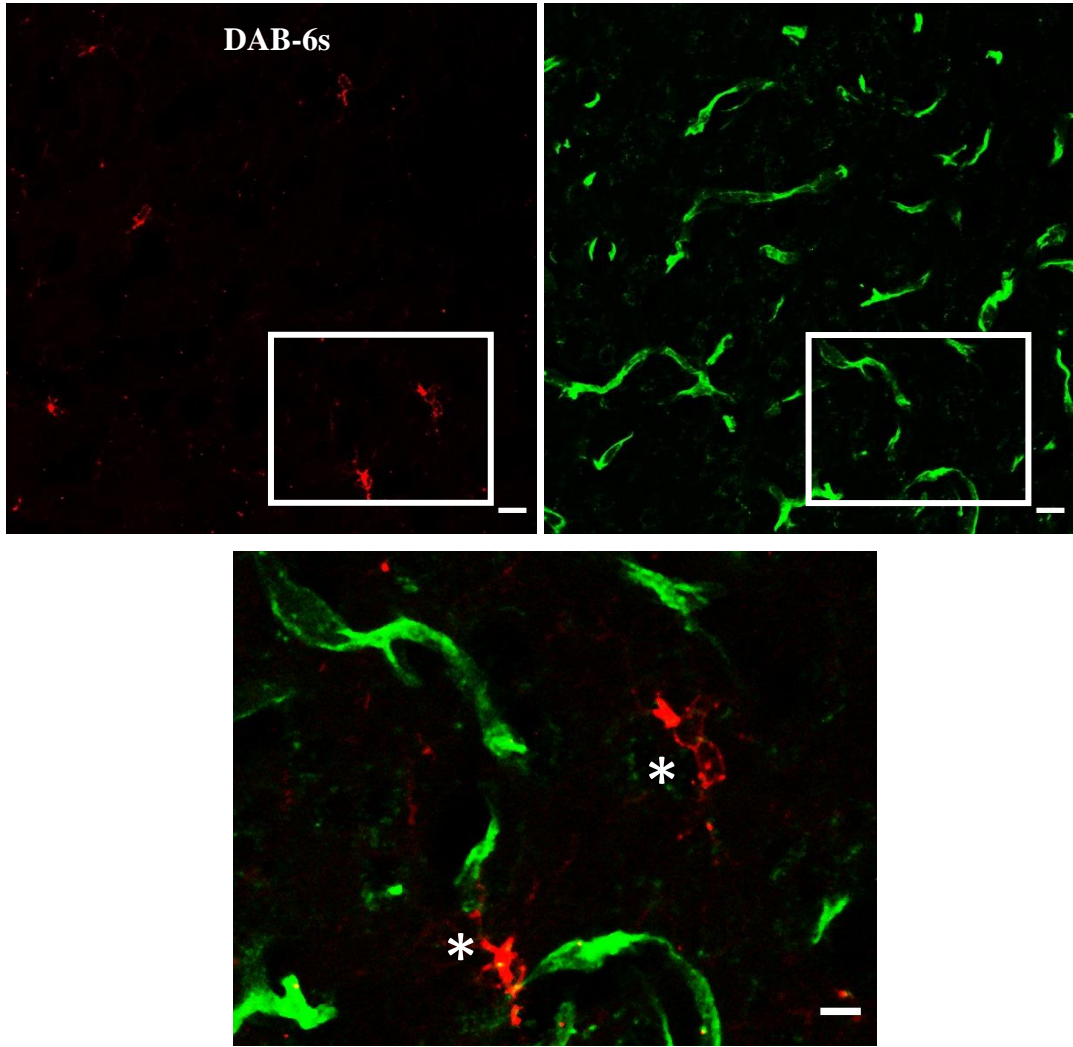
Şekil 4.46. Yabanıl (üst) ve GYS-1^{NestinKO} (alt) farelerin beyin kesitleri perisit işaretleyici olarak Platelet ilişkili büyüme faktör reseptörü-beta (PDGFR-β) (kırmızı, üst sol) ile immüno Floresan ve mikrodamarlar lektin (yeşil, üst sağ) ile işaretlenmiştir. PDGFR-β ifade eden perisitler mikrodamar duvarı üzerindeyken (oklar) damar duvarında bulunmayan PDGFR-β ifade eden hücreler (yıldız) işaretlenmiştir. Ölçek: 20 μ m. C57BL/6 yabanıl ve GYS-1^{NestinKO} farelerin beyinlerinde gerçekleştirilen PDGFR-β pozitif perisit sayımı altta belirtilmiştir. GYS-1^{NestinKO} transgenik farelerde daha az PDGFR-β pozitif perisit bulunduğu saptanmıştır. * $p < 0,05$, 'Mann-Whitney U' testi.

GYS-1^{NestinKO} farelerin beyinlerinde daha az sayıda PDGFR- β pozitif perisit saptanması üzerine ($p=0,012$, $n=3$) isv DAB enjekte edilmiş ve çeşitli zaman dilimlerinde sakrifiye edilmiş farelerin beyin kesitlerinde de PDGFR- β immünofloresan çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Nörogliovasküler seviyedeki immunohistokimyasal incelemelerimizde serum fizyolojik uygulanan beyinlerin kesitlerinde PDGFR- β pozitif perisitlerin çoğunlukla olması gerektiği gibi mikrodamarların çevresinde bulunduğu izlenmiştir (Şekil 4.47).



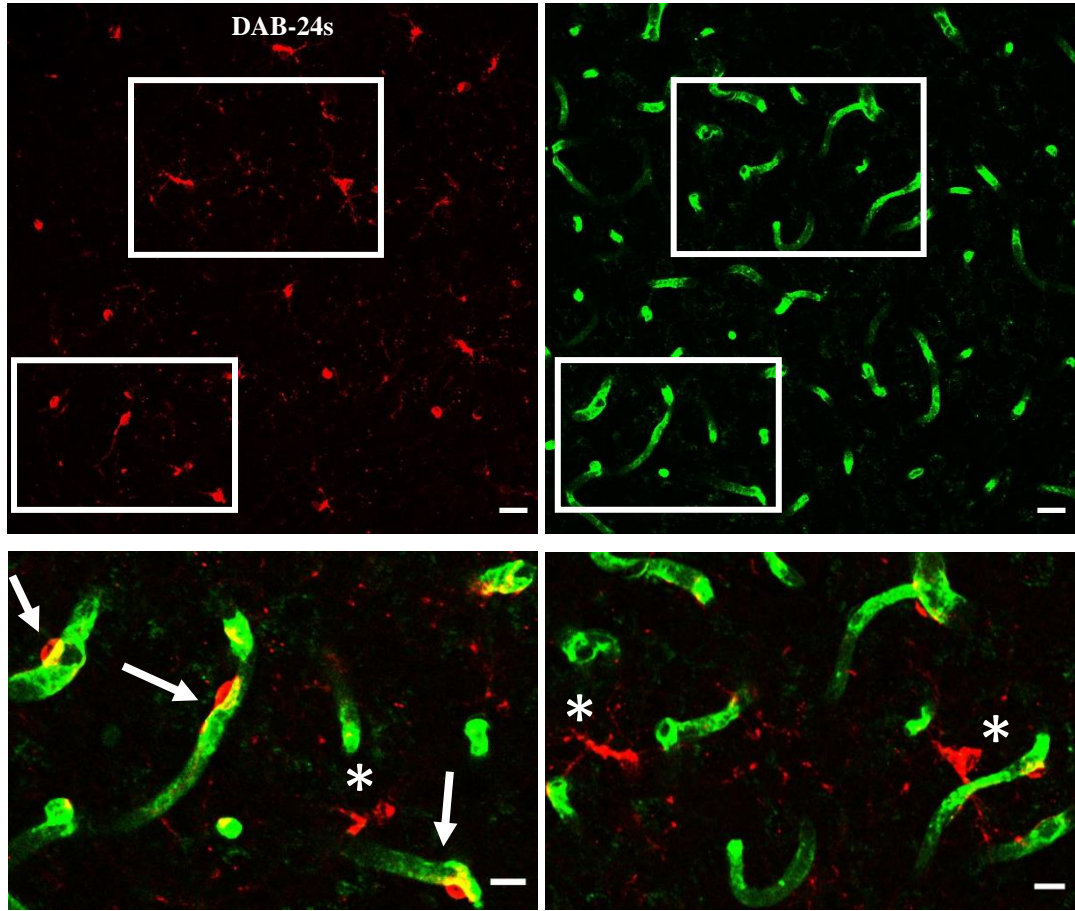
Şekil 4.47. Serum fizyolojik (isv) (üst) ve DAB isv enjeksiyonlarından 1 saat sonra beyinler perisit işaretleyici olarak Platelet ilişkili büyüme faktör reseptörü-beta (PDGFR- β) (kırmızı) immünofloresan olarak ve mikrodamarlar lektin (yeşil) ile işaretlenmiştir. DAB enjeksiyonu sonrası PDGFR- β ifade eden perisit sayısında ve damar duvarıyla birlikteliğinde azalma gözlenmiştir. Ölçek: 10 μ m.

Serum fizyolojik uygulamasının aksine isv DAB enjeksiyonunun ipsilateralinde 30. dakikasından ($n=3$, $p=0,025$) itibaren başlamak üzere PDGFR- β ifade eden perisitlerin sayısı 6. saatte ($n=3$, $p=0,012$) en düşük düzeye ulaşmıştır (Şekil 4.48). Bunun yanında PDGFR- β ifade eden perisitlerin önemli bir kısmının da yakınında olduğu mikrodamar duvarından anlamlı olarak uzaklaştığı dikkati çekmiştir (Şekil 4.48, 1. saat için $n=3$, $p=0,025$, 6. saat için $n=3$, $p=0,012$).



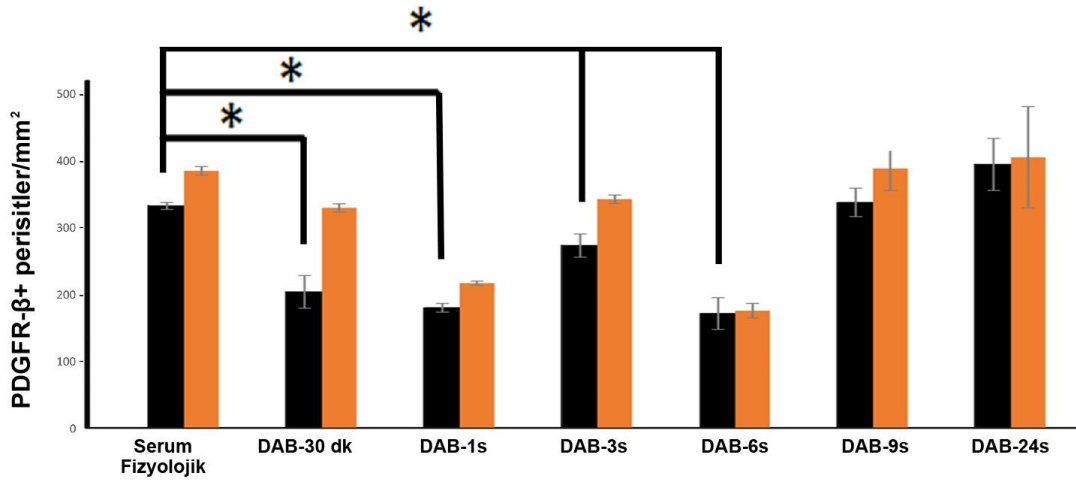
Şekil 4.48. DAB isv enjeksiyonundan 6 saat sonra beyinler perisit işaretleyici olarak Platelet ilişkili büyüme faktör reseptörü-beta (PDGFR- β) (kırmızı) ile immünofloresan ve mikrodamarlar lektin (yeşil) ile işaretlenmiştir. PDGFR- β ifade eden perisitler 1. saate göre daha azalmış, damar duvarından ayrılan perisit oranı artmıştır. Kutular büyütülmüş ve iki görüntü üst üste çakıştırılmıştır (alt). PDGFR- β ifade eden damar duvarında bulunmayan perisitler (yıldız) işaretlenmiştir. Ölçek: 1. sırada 20 μ m, 2. sırada 10 μ m.

DAB enjeksiyonunun 6. saatinde perisit sayısının daha da azaldığı ve mikrodamar duvarından uzaklaştığı gözlenmiştir. PDGFR- β pozitif perisitlerin sayısı muhtemelen DAB etkisinin azalmaya başlamasıyla enjeksiyonun 24. saatinde tekrar artmaya başlamış (n=3, p=0,012) ve bir kısmı da damar duvarında izlenmeye başlamıştır (Şekil 4.49). Buna rağmen yine de PDGFR- β pozitif perisitler serum fizyolojik uygulamasına göre damar duvarından anlamlı düzeyde ayrı bulunmaktadır (n=3, p=0,025).



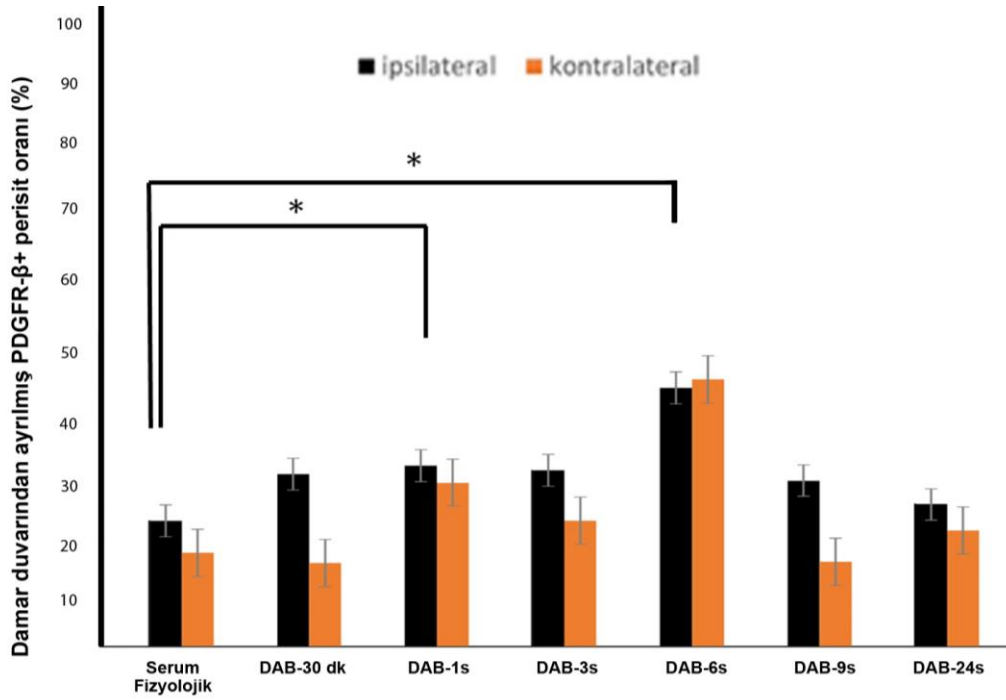
Şekil 4.49. DAB isv enjeksiyonundan 24 saat sonra Swiss albino farelerde beyinler perisit işaretleyici olarak Platelet ilişkili büyüme faktör reseptör-beta (PDGFR- β) (kırmızı, üst sol) ile immüno floresan ve mikrodamarlar lektin (yeşil, üst sağ) ile işaretlenmiştir. Kutular büyütülmüş ve iki görüntü üst üste çakıştırılmıştır (alt 2. ve 3. sıra). 2. sırada PDGFR- β ifade eden perisitler mikrodamar duvarı üzerindedir (oklar) 3. sırada damar duvarında bulunmayan perisitler (yıldız) işaretlenmiştir. Ölçek: Üstte 20 μ m, altta 10 μ m.

DAB enjeksiyonu sonrasında PDGFR- β perisitlerin mikrodamarlardan duvarından uzaklaştığı, inhibisyonun etkisinin azaldığı veya ortadan kalktığı saatlerde ise perisitlerin mikrodamar üzerinde daha çok bulunduğu gözlenmiştir. Beyinde glikojen metabolizması bozulmuş GYS-1^{NestinKO} farelerin PDGFR- β ifade eden perisit morfolojisi ve mikrodamar üzerinde bulunan perisit oranı bakımından DAB'ın yarı ömrü olan (222), enjeksiyonunun 6. saatiyle uygun fenotip gösterdiği saptanmıştır. Bu değişiklikleri yansız bir biçimde incelemek amacıyla isv DAB enjekte edilmiş beyinlerde yapılan semi-stereolojik incelemelerde PDGFR- β pozitif perisit sayımları yapılmıştır (Şekil 4.50).



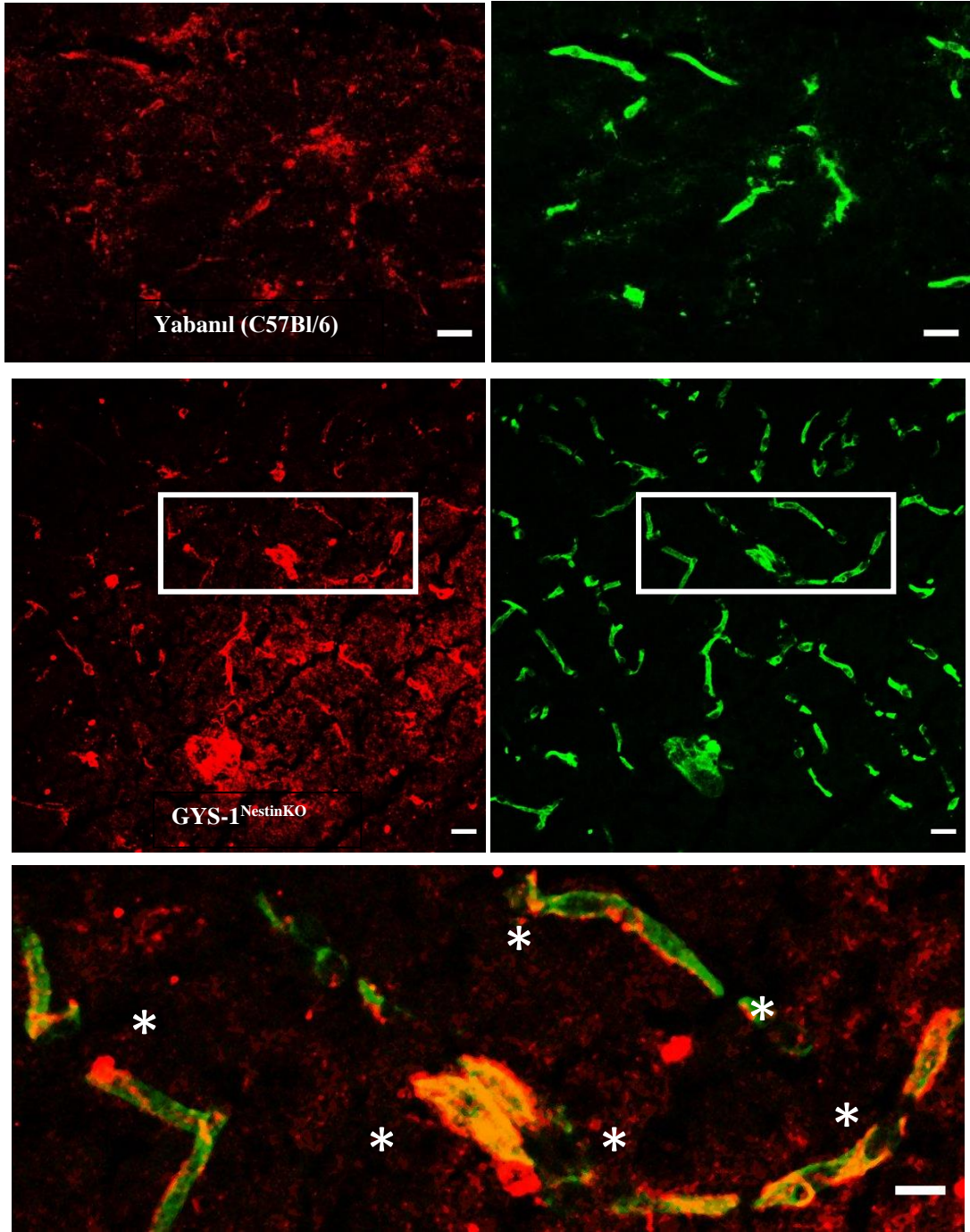
Şekil 4.50. DAB ve serum fizyolojik isv enjekte edilen Swiss albino farelerde Platelet ilişkili büyüme faktör reseptörü-beta (PDGFR-β) ifade eden perisit sayımları. Siyah: ipsilateral hemisfer, turuncu: kontralateral hemisfer. DAB isv enjeksiyonu ile PDGFR-β pozitif perisitlerin sayısında hızla düşüş gözlenmektedir. 9. saat itibariyle bu perisitlerin sayısı tekrar artış göstermekle beraber ancak 24. saat sonunda serum fizyolojik isv enjekte edilen kontrollerdeki PDGFR-β pozitif perisit sayısına ulaşılmıştır. * $p<0,05$, 'Kruskal-Wallis' testi.

DAB isv enjeksiyonu ile PDGFR-β pozitif perisitlerin sayıca azaldığı ($n=3$, 30. dakika ve 1. saat için $p=0,025$, 3. saat için $p=0,041$), enjeksiyonun 6. saatinde en düşük sayıda PDGFR-β pozitif perisit bulunduğu ($n=3$, $p=0,025$) gözlenmiştir. DAB enjeksiyonunun 9. saati itibariyle serum fizyolojik isv enjekte edilen kontrollere göre benzer sayıda bulunmuştur ($n=3$, 9. saat ve 24. saat için $p=0,5$). Bunun ardından mikrodamar duvarından ayrılmış perisitler sayılmış ve PDGFR-β pozitif perisitlerin toplam sayılarına oranlanmıştır (Şekil 4.51). Serum fizyolojik isv enjeksiyonu ile mikrodamar duvarından ayrılmış PDGFR-β pozitif perisitlerin oranı %20,86 iken DAB enjeksiyonundan sırasıyla 30 dakika, 1, 3, 6, 9 ve 24 saat sonrasında %28,72, %30,12, %29,36, %43,03, %27,60 ve %23,63 olmuştur. 6. saat itibariyle en yüksek oranda PDGFR-β pozitif perisit damar duvarından ayrı bulunmaktadır ($n=3$, $p=0,025$). Mikrodamar kasılmalarıyla ilişkili olarak 9. saat itibariyle mikrodamar duvarından ayrılan PDGFR-β pozitif perisitlerin oranı ise azalmaya başlamıştır (DAB isv 6. ve 9 saat için $n=3$, $p=0,025$).



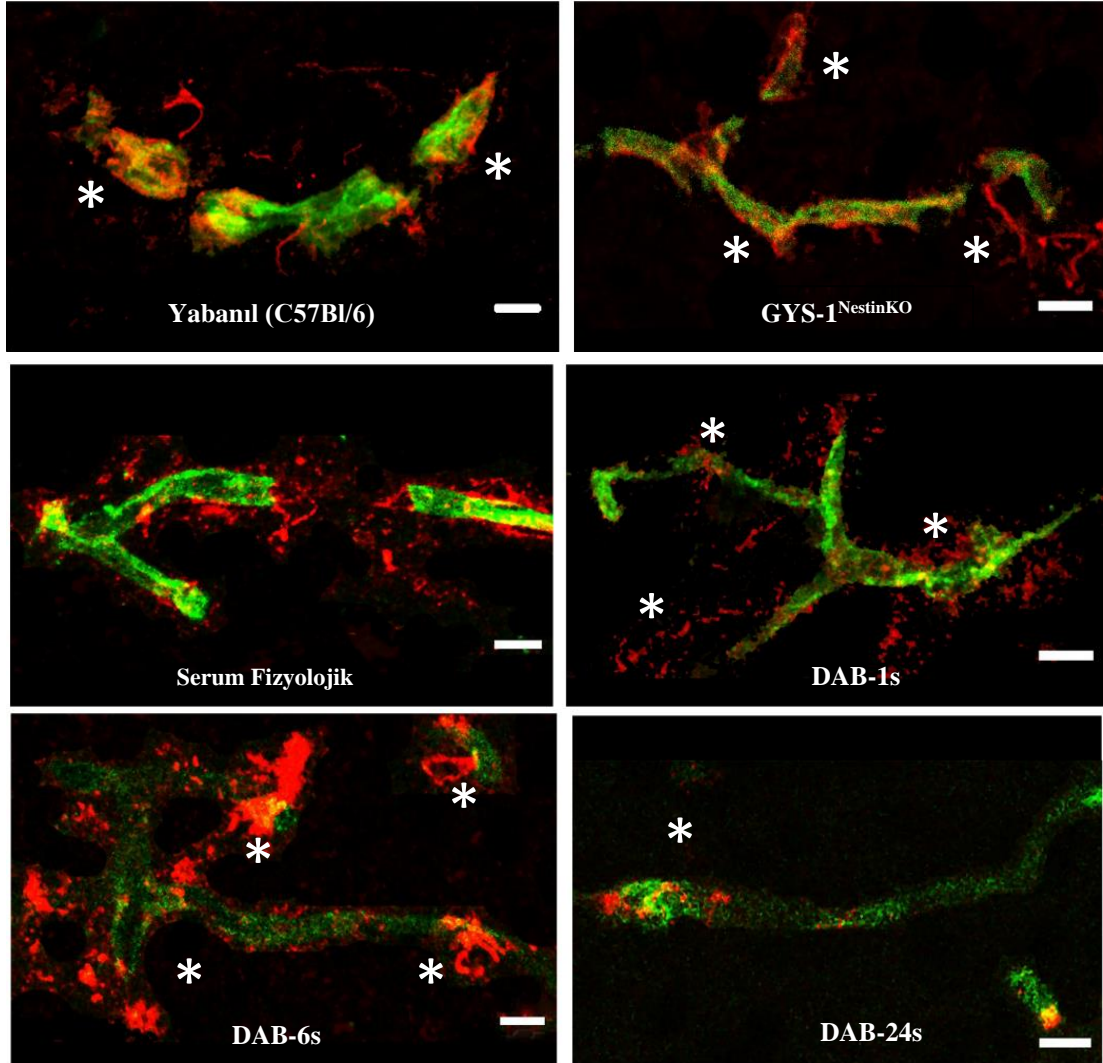
Şekil 4.51. DAB ve serum fizyolojik isv enjekte edilen Swiss albino farelerde Platelet ilişkili büyüme faktör reseptörü-beta (PDGFR- β) ifade eden perisitlerin mikrodamar duvarından ayrılma oranları. Damar duvarından ayrılmış olarak bulunan perisitlerin sayısı toplam PDGFR- β pozitif perisitlerin sayısına oranlanmış ve yüzde olarak ifade edilmiştir. 6. saat itibariyle en yüksek oranda PDGFR- β pozitif perisit damar duvarından ayrılmış bulunmaktadır. * $p < 0,05$, 'Kruskal-Wallis' testi.

Bu incelemelerin sonucunda glikojen metabolizmasının bozulması ile özellikle PDGFR- β ifade eden perisitlerin etkilendiği düşünülmüştür. Benzer durumlarda KBB'nde fonksiyonel ve histopatolojik değişiklikler olduğu daha önce literatürde gösterildiği için (79, 225) perisitler için bilinen diğer belirteçlerle incelemelerin de yapılması ihtiyacı doğmuştur. Bu amaçla öncelikle nörogliovasküler seviyedeki immunohistokimyasal incelemelerimizde glikojenin (GYS-1^{NestinKO}) üretilmediği fareler yabanıl kontroller ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.52). PDGFR- β ifade eden hücrelerde saptananın aksine NG2 ifade eden perisitlerin mikrodamar duvarı üzerinde bulunduğu, kasılmanın gerçekleştiği bölgelerde perisit uzantılarının NG2 ifade ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.52).



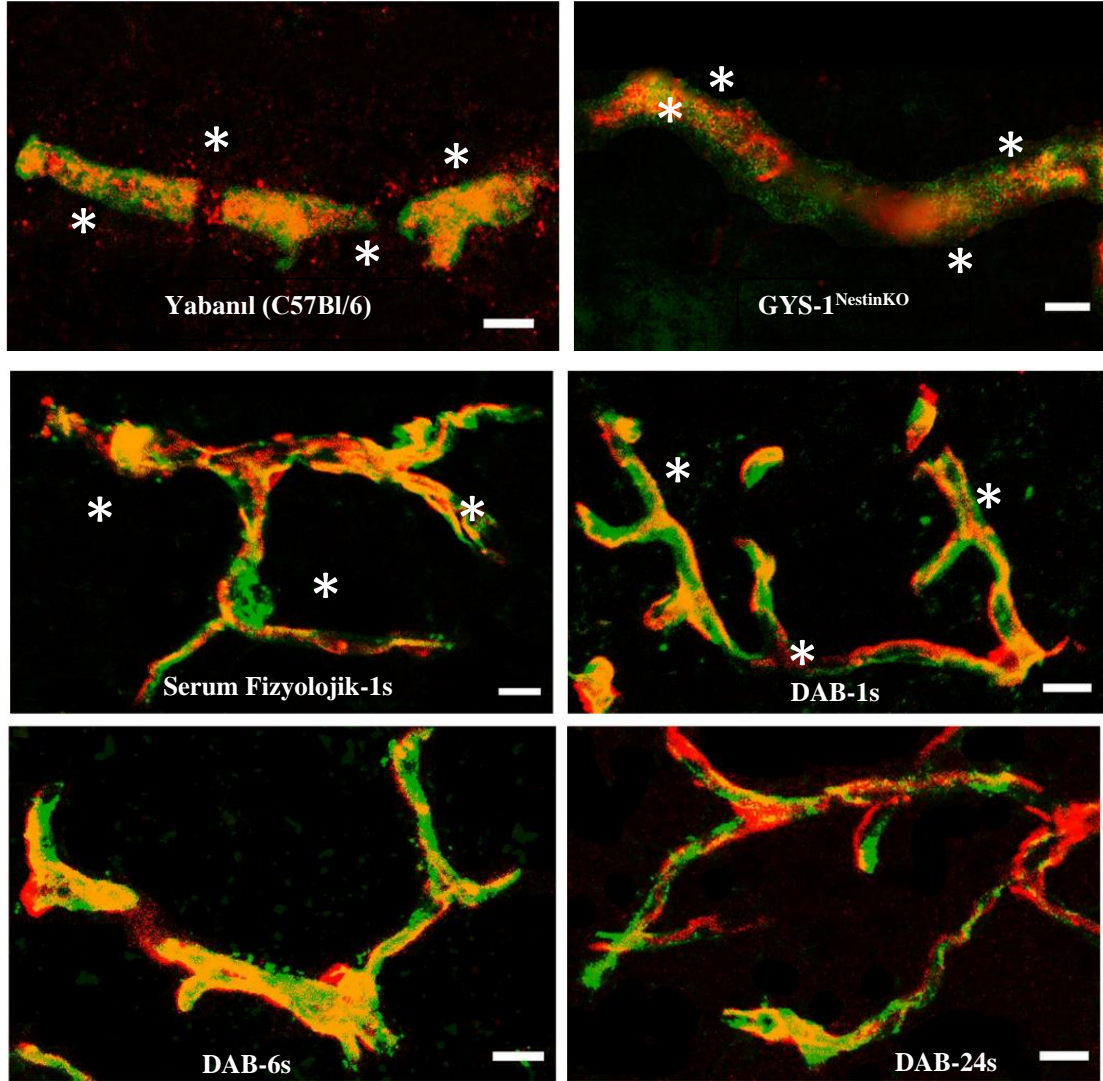
Şekil 4.52. Yabanıl C57BL/6 ve GYS-1^{NestinKO} farelerin korteksleri perisit işaretleyici olarak 'neural-gliyal antigen' (NG2) (kırmızı) antikoruna ile immüno Floresan ve mikrodamarlar lektin (yeşil) ile işaretlenmiştir. Ölçek: 10 µm. Mikrodamar segmentleri yüksek oranda NG2 ifade etmektedir. Kutular büyütülmüş ve iki görüntü üst üste çakıştırılmıştır (alt, sarı). *NG2 pozitif perisitleri göstermektedir ve bu perisitler çoğunlukla mikrodamar duvarı üzerinde bulunmaktadır. Ölçek: üst ve alt sırada 10 µm, orta sırada 20 µm.

Genetik modele uygun biçimde isv DAB enjeksiyonu ile farmakolojik olarak glikojen fosforilaz inhibisyonu gerçekleştirilen beyinler serum fizyolojik enjekte edilmiş kontroller ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.53). DAB isv enjeksiyonunun 1. saatinden itibaren 6. saate kadar NG2 ifade eden perisit uzantılarının mikrodamar duvarından ayrı bulunmadığı, kasılmanın gerçekleştiği bölgelerde de perisit uzantılarının NG2 ifade ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.53).



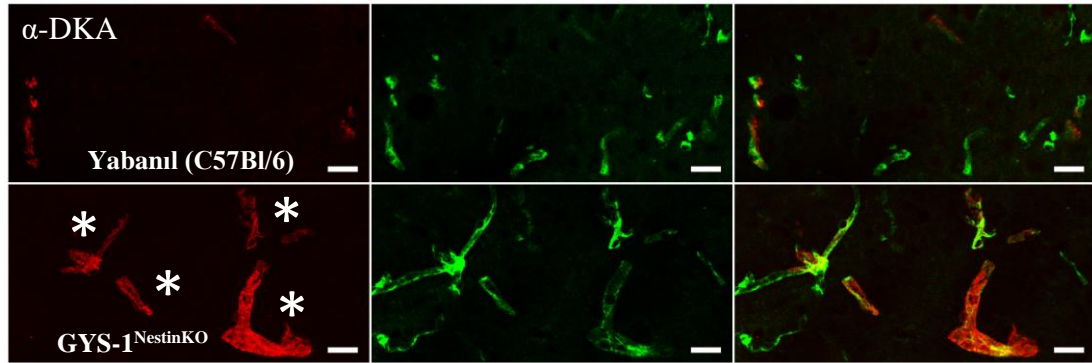
Şekil 4.53. Yabanıl C57BL/6 (sol üst), GYS-1^{NestinKO} (sağ üst) ve Swiss albino farelerde serum fizyolojik isv enjeksiyonundan 1 saat sonra (sol orta), DAB isv enjeksiyonundan 1 saat (sağ orta), 6 saat (sol alt) ve 24 saat (sağ alt) sonra farelerin beyin korteksleri perisit işaretleyici olarak ‘neural-gliyal antigen’ (NG2) antikoruna (kırmızı) ile immünofloresan ve mikrodamarlar lektini (yeşil) ile işaretlenmiştir. Birlikte işaretlenen yerler sarı renkle gösterilmiştir. Mikrodamar segmentleri yüksek oranda NG2 ifade etmektedir. *NG2 pozitif perisitler ile işaretlenmiştir ve bu perisitler mikrodamar duvarı üzerinde bulunmaktadır. Ölçek: 10 µm.

Ayrıca perisit ilişkili immunohistokimyasal incelemelerimizde literatürde kabul görmüş başka bir perisit işaretleyicisi olan CD13 (aminopeptidaz N) pozitif perisitler glikojenin üretilmediği fareler ($GYS-1^{NestinKO}$) ve yabancı kontroller ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.54).



Şekil 4.54. Yabancı C57BL/6 (sol üst), $GYS-1^{NestinKO}$ (sağ üst) ve Swiss albino farelerde serum fizyolojik isv enjeksiyonundan 1 saat sonra (sol orta), DAB isv enjeksiyonundan 1 saat (sağ orta), 6 saat (sol alt) ve 24 saat (sağ alt) sonra farelerin beyin korteksleri perisit işaretleyici olarak ‘aminopeptidaz N’ (CD13) (kırmızı) ile immünofloresan ve mikrodamarlar lektin (yeşil) ile işaretlenmiştir. Birlikte işaretlenen yerler sarı renkle gösterilmiştir. CD13 pozitif perisitler (*) ile işaretlenmiştir ve bu perisitler mikrodamar duvarı üzerinde bulunmaktadır. Ölçek: 10 μ m.

PDGFR- β ifade edenlerin aksine ve NG2 ifadesine benzer şekilde CD13 ifade eden perisit uzantılarının mikrodamar duvarından ayrı bulunmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.54). DAB isv enjeksiyonundan sonra 1. saatten itibaren 6. saate kadar CD13 ifade eden perisit uzantılarının mikrodamar duvarı üzerinde bulunduğu, kasılmanın gerçekleştiği bölgelerde perisit uzantılarının NG2 ile de uyumlu olarak CD13 ifade ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.54). Bununla birlikte DAB isv enjeksiyonundan 24 saat sonra CD13 ifade eden perisitlerin azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.54). Bu bulgular göz önünde bulundurulduğunda mikrodamarlarda glikojen metabolizmasının büyük öneme sahip olduğu, PDGFR- β ilişkili sinyal değişikliklerinin iskemi sonrası doku perfüzyonunun sağlanamamasına neden olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenlerle iskemide perisitlerin kasılmasında önemli rol oynadığı ve doku perfüzyonunu doğrudan etkilediği düşünülen kasılma proteinlerinden alfa-düz kas aktini (α -DKA) (2, 9) glikojenin ($GYS-1^{NestinKO}$) üretilmediği ve yabancı kontrol farelerde incelenmiştir (Şekil 4.55).

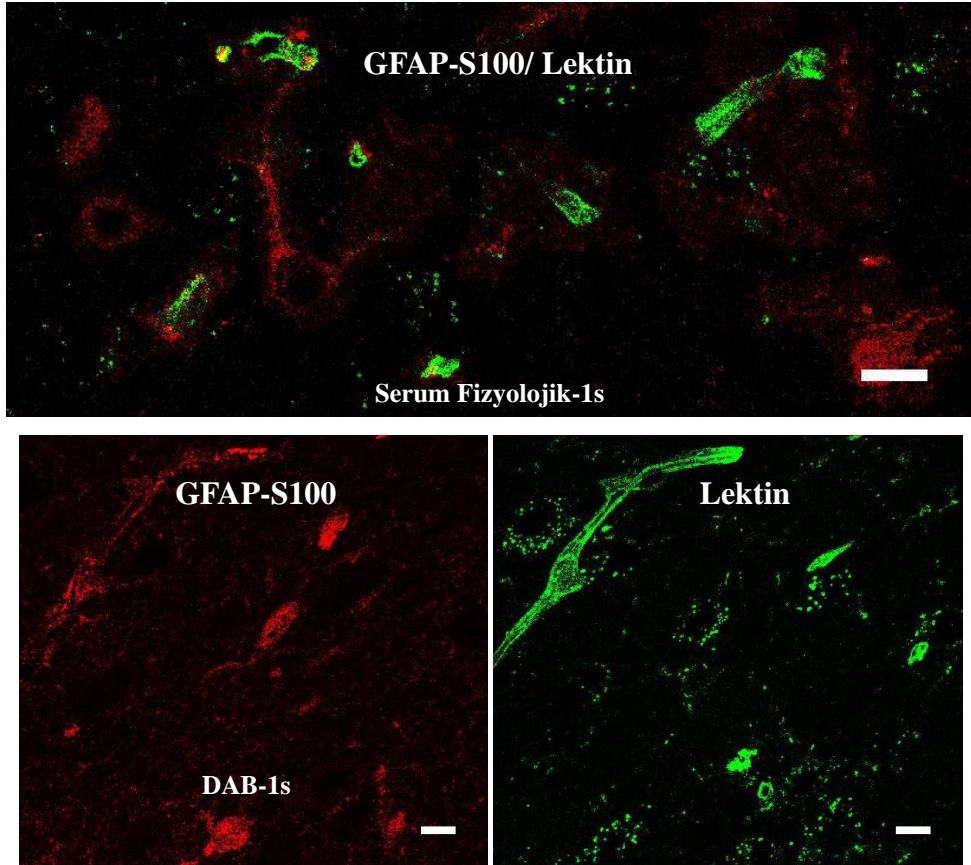


Şekil 4.55. Yabancı C57BL/6 (üst) $GYS-1^{NestinKO}$ (alt) farelerin beyin kesitleri alfa-düz kas aktini (α -DKA) (kırmızı) ile immüno Floresan ve mikrodamarlar lektin (yeşil) ile işaretlenmiştir. Birlikte işaretlenen yerler sarı renkle gösterilmiştir. Alfa-düz kas aktini (α -DKA) yoğun olarak ifade eden kapiller segmentler ve perisitler yıldızlar (*) ile işaretlenmiştir. Ölçek: 10 μ m.

Ön bulgu olarak $GYS-1^{NestinKO}$ transgeniklerin kontrollere göre mikrodamarlarında daha fazla alfa-düz kas aktini (α -DKA) ifade ettiği gözlemlenmiştir. Bu durum muhtemelen perisitlerin özellikle iskemi gibi patolojik koşullarda kasılabilmesi için zemin hazırlamaktadır.

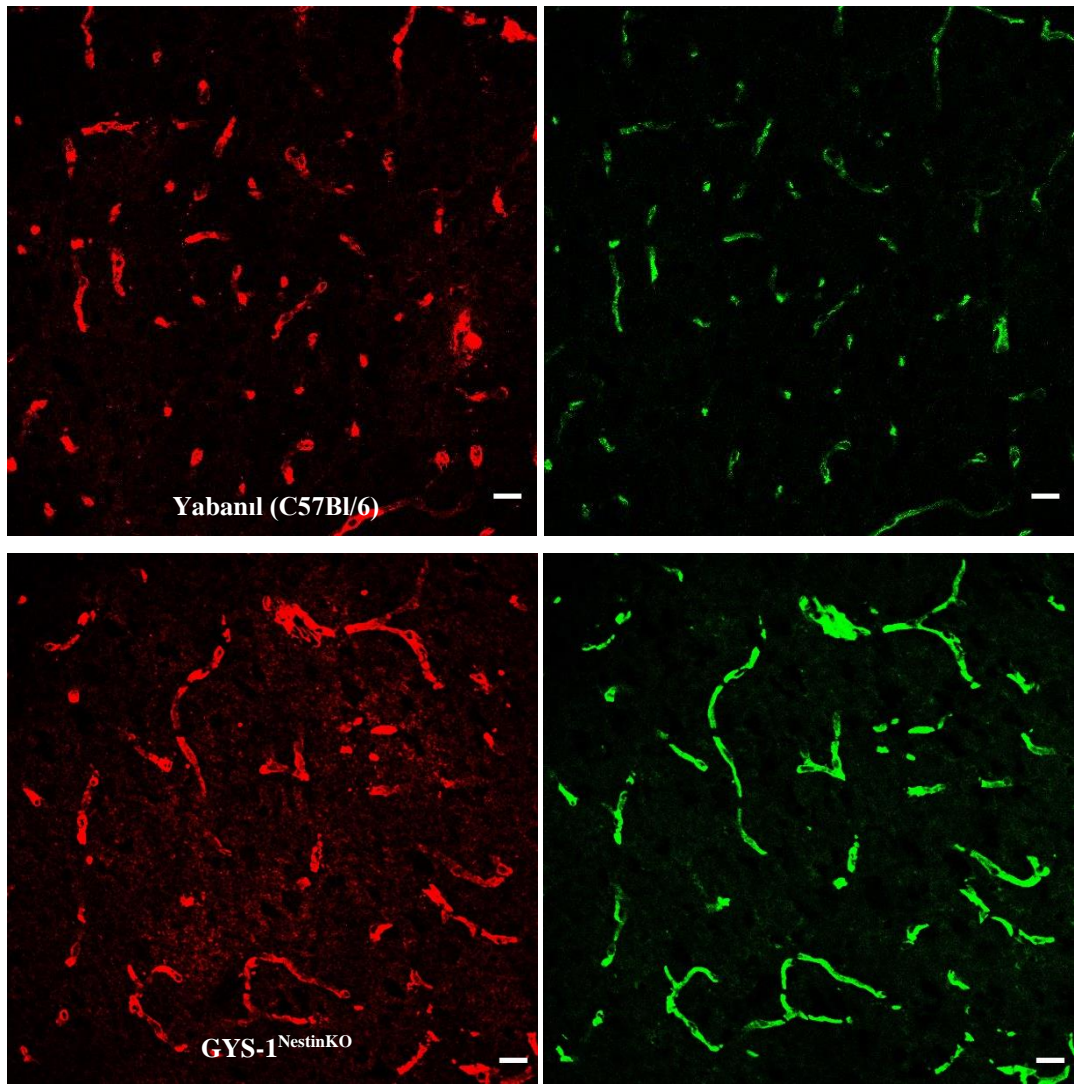
4.6.2. Beyinde Peri-Mikrovasküler Glikojenin Nörovasküler Ünite Elemanlarından Astrostillere Etkileri

Beyindeki astrositler glikojenin ana deposudur (13) ve bu nedenle isv DAB ve kontrol olarak da serum fizyolojik enjekte edilmiş farelerde astrositlere özgü GFAP ile S100 ifadesi incelenmiştir. GYS-1^{NestinKO} farelerde GFAP işaretlemesi literatürde yapıldığından ve herhangi bir farklılık bulunmadığından (24) GFAP işaretlemesi transgenik fare beyinlerinde yapılmamıştır. DAB isv enjeksiyonu sonrası değişiklikler araştırılmıştır. S100 bir alarm proteindir ve astrositlerde bulunur. GFAP ve S100'e karşı antikorlar birlikte incelenmiştir. Bu incelemelerde isv DAB enjeksiyonu sonrası damar duvarında artan GFAP pozitif astrosit uzantıları ve S100 işaretli sitoplazmik işaretlenmeler dikkati çekmiştir (Şekil 4.56).



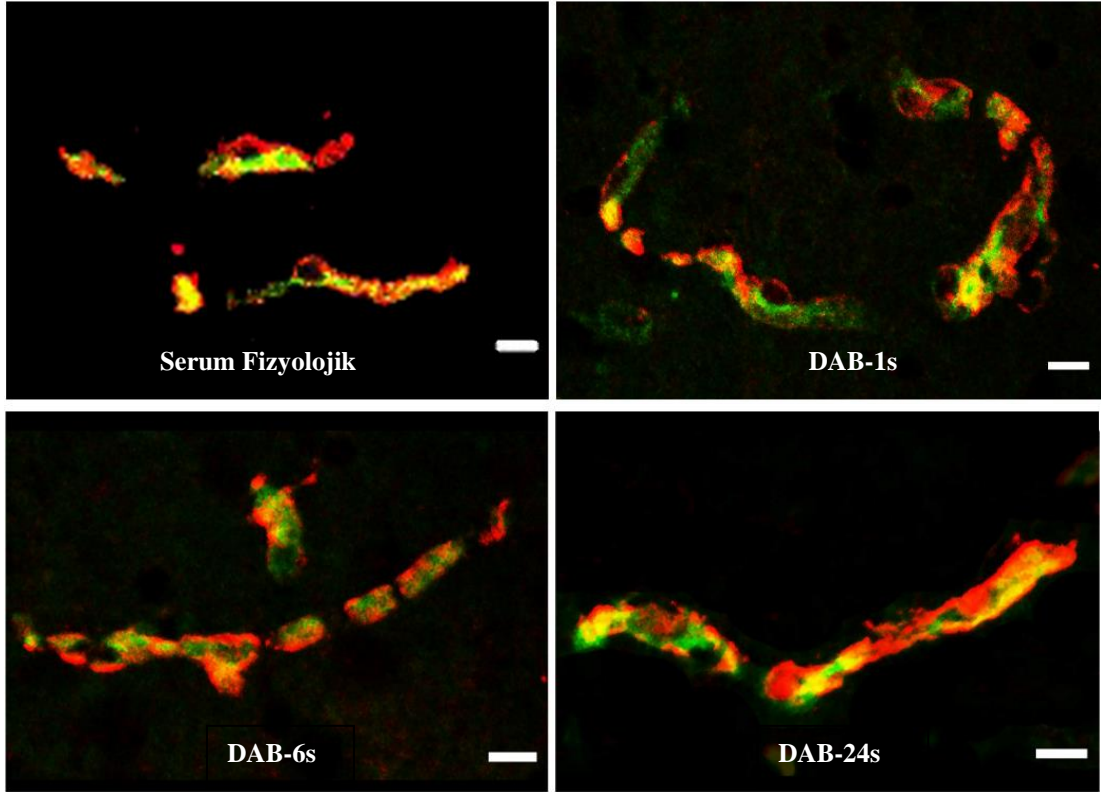
Şekil 4.56. Swiss albino farelerde serum fizyolojik (üst) ve DAB (alt) isv enjeksiyonundan 1 saat sonra beyinler astrosit işaretleyici GFAP ve S100 kokteyli (kırmızı) ile immünofloresan ve mikrodamarlar lektin (yeşil) ile işaretlenmiştir. DAB isv enjeksiyonu sonrası GFAP ve S100 işaretlemesinde artış gözlenmiştir. GFAP işaretlenmesindeki artış özellikle mikrodamar duvarında izlenmiştir. Ölçek: 10 μ m.

Sonrasında KBB ve nörogliovasküler ünite için önemli rol oynadığı bilinen (79) astrosit son ayakları incelenmiştir. Bu hedefe yönelik hem KBB'nin su taşıyıcısı AQP4 hem de temel glukoz taşıyıcısı GLUT-1 işaretlemeleri öncelikle kronik olarak beyinde glikojen metabolizması bozulmuş GYS-1^{NestinKO} fareler ve yabancı kontrollerde incelenmiştir. Normal yabancı kontrollerde (Şekil 4.57) ve GYS-1^{NestinKO} farelerde AQP4 işaretlenmiş, benzer işaretlenme şekilleri gözlenmiştir (Şekil 4.57). Buna rağmen GYS-1^{NestinKO} farelerde AQP4 lokalizasyonunda yer yer işaretlenmede bozulmalar izlenmiştir (Şekil 4.57).



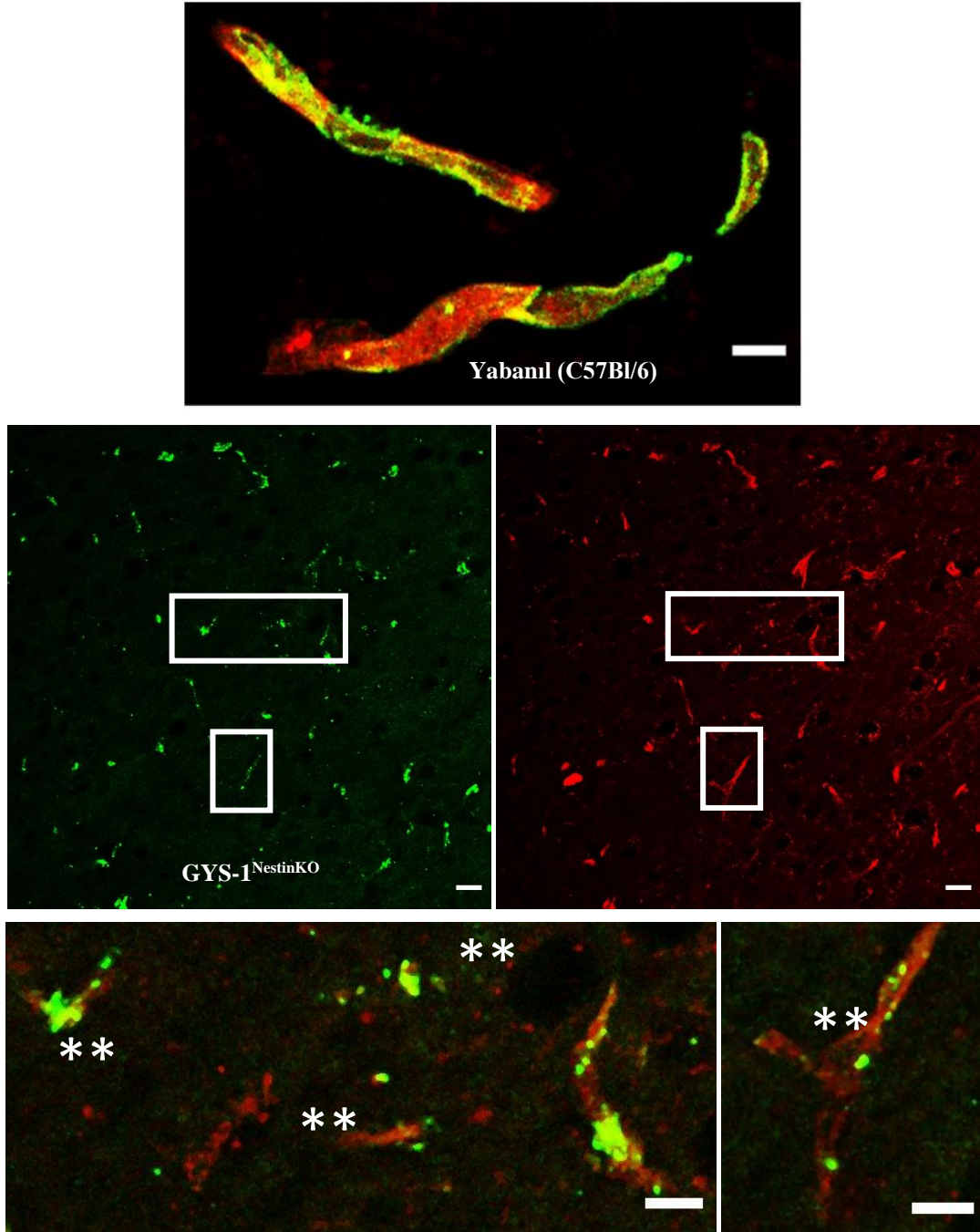
Şekil 4.57. Yabancı C57BL/6 ve GYS-1^{NestinKO} farelerin beyin kesitleri astrosit son ayaklarını işaretleyen AQP4 (kırmızı) ile immüno Floresan ve mikrodamarlar lektin (yeşil) ile işaretlenmiştir. Ölçek: 20 μ m.

Daha sonrasında DAB ve serum fizyolojik isv enjeksiyonu gerçekleştirilen beyinlerin kesitlerinde AQP4 işaretlenmiş ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. GYS-1^{NestinKO} farelerdekine benzer AQP4 lokalizasyonunda yer yer işaretlenmede bozukluklar da izlenmiştir (Şekil 4.58).

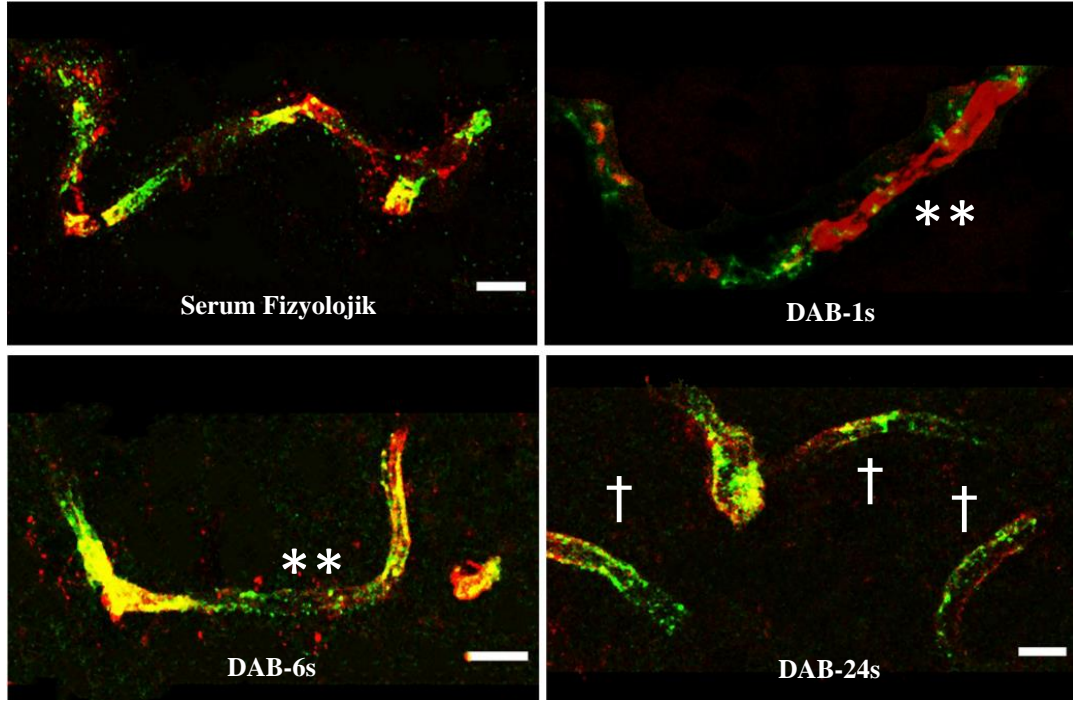


Şekil 4.58. Swiss albino farelerde serum fizyolojik isv enjeksiyonundan 1 saat sonra (sol üst), DAB isv enjeksiyonundan 1 saat (sağ üst), 6 saat (sol alt) ve 24 saat (sağ alt) sonra beyinler astrosit son ayaklarını işaretleyen AQP4 (kırmızı) ile immünofloresan ve mikrodamarlar lektin (yeşil) ile işaretlenmiştir ve iki görüntü üst üste çakıştırılmıştır (alt). Birlikte işaretlenen yerler sarı renkle gösterilmiştir. Ölçek: 10 µm.

Hem GYS-1^{NestinKO} (Şekil 4.57) hem DAB isv (Şekil 4.58) enjekte edilmiş farelerin beyinlerinde AQP4 ifadesinde yabancı kontrollere (Şekil 4.57) göre yaygın değişiklik izlenmemiştir. GYS-1^{NestinKO} farelerde ve DAB enjeksiyonunun 1. saatinde AQP4 ifadesi hafif düzeyde azalmış ve işaretlenme bozukluğu göstermiştir. DAB enjeksiyonunun 6. saatinde AQP4 (Şekil 4.58) yapılanması düzelmeye başlamış ve 24. saatte kontrollere benzemiştir. Literatürde PDGF-BB mutasyon taşıyan farelerde AQP4 lokalizasyonunda bozulma gösterilmiştir (132). Bu durum glikojenin AQP4 üzerindeki bu etkilerini de destekler niteliktedir.



Şekil 4.59. GYS-1^{NestinKO} farelerin beyin kesitleri astrosit son ayaklarını ve endoteli işaretleyen GLUT1 (yeşil) antikoruna ile immüno Floresan ve mikrodamarlar lektin (kırmızı) ile işaretlenmiştir. Kutular büyütülmüş ve iki görüntü üst üste karşılaştırılmıştır (alt). Azalan GLUT-1 ifadesi ** ile gösterilmiştir. Birlikte işaretlenen yerler sarı renkle gösterilmiştir. Ölçek: Üstte 20 µm, altta 10 µm.



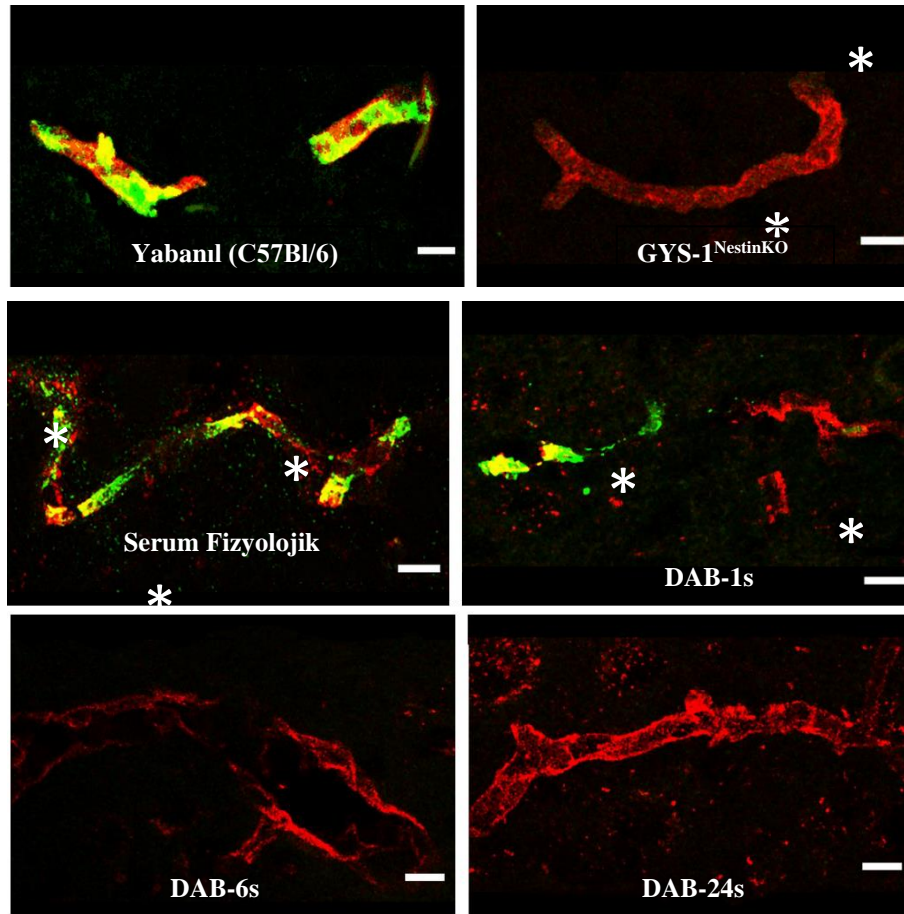
Şekil 4.60. Swiss albino farelerde serum fizyolojik isv enjeksiyonundan 1 saat sonra (sol üst), DAB isv enjeksiyonundan 1 saat (sağ üst), 6 saat (sol alt) ve 24 saat (sağ alt) sonra beyinler astrosit son ayaklarını ve endoteli işaretleyen GLUT1 (yeşil) antikorunu ile immünofloresan ve mikrodamarlar lektin (kırmızı) ile işaretlenmiştir ve iki görüntü üst üste çakıştırılmıştır (alt). Birlikte işaretlenen yerler sarı renkle gösterilmiştir. Azalan GLUT-1 ifadesi ** ile, normale dönen GLUT-1 ifadesi ise † ile gösterilmiştir. Ölçek: 10 µm.

AQP4 ifadesinde yaygın değişiklik izlenmemesine karşın GLUT-1 işaretlenmesi hem GYS-1^{NestinKO} (Şekil 4.59) hem de DAB isv (Şekil 4.60) enjekte edilmiş farelerin beyinlerinde yabancı kontrollere (Şekil 4.59) göre ciddi düzeyde etkilenmiştir. DAB enjeksiyonunun 1. saatinde GLUT-1 ifadesi azalırken 6. saatte düzelme göstermiştir. DAB enjeksiyonunun 24. saatinde GLUT-1 işaretlemesinde yer yer azalma izlense de yaygın olarak düzeldiği gözlenmiştir (Şekil 4.60).

4.6.3. Beyinde Peri-Mikrovasküler Glikojenin Endotelyal Sıkı Bileşke Proteinlerine Etkileri

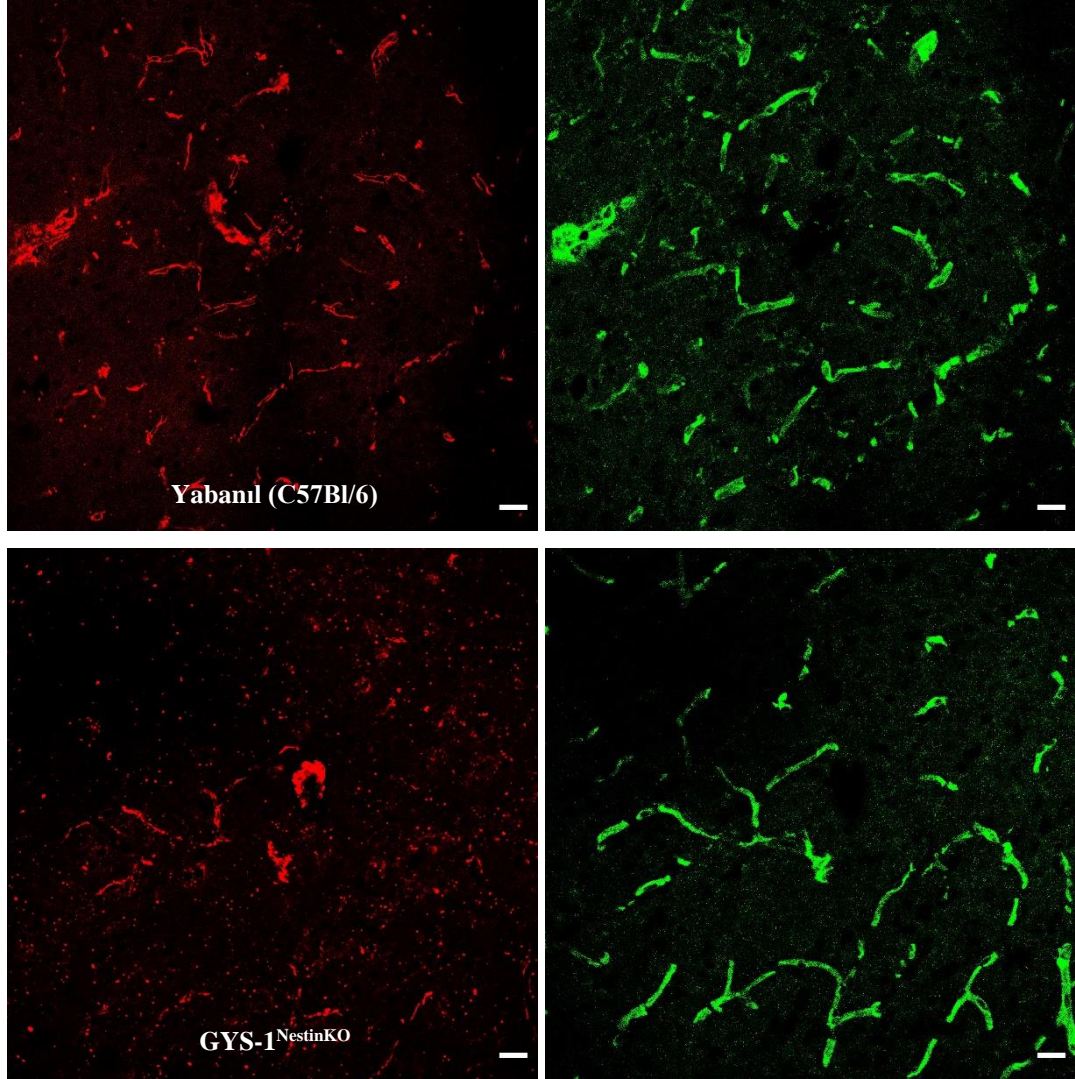
Nörogliovasküler düzeyde glikojen kullanımı hem perisit hem de astrosit son ayaklarındaki KBB ilişkili proteinleri yaygın olarak etkilemiştir. Bu durumda KBB'ni oluşturan endotelyal sıkı bileşke durumu da araştırılmıştır. Öncelikle GYS-

$1^{NestinKO}$ ve yabancı farelerde sıkı bileşke proteinleri kladin-5 ve ZO-1 ifadeleri incelenmiştir. Gerçekleştirilen kladin-5 immünofloresan çalışmalarında GYS- $1^{NestinKO}$ transgeniklerin ciddi düzeyde kladin-5 eksikliği gösterdiği anlaşılmıştır (Şekil 4.64). Daha sonrasında DAB ve serum fizyolojik isv enjeksiyonu gerçekleştirilen beyinlerin kesitlerinde anti-kladın-5 antikorunu ile immünohistokimyasal işaretleme yapılmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. GYS- $1^{NestinKO}$ farelerdekine benzer şekilde DAB enjekte edilmiş beyinler ciddi düzeyde kladın-5 eksikliği göstermiştir (Şekil 4.61). DAB enjeksiyonunu 24 saat takiben de kladın-5 ifadesinde değişiklik gözlenmemiştir.



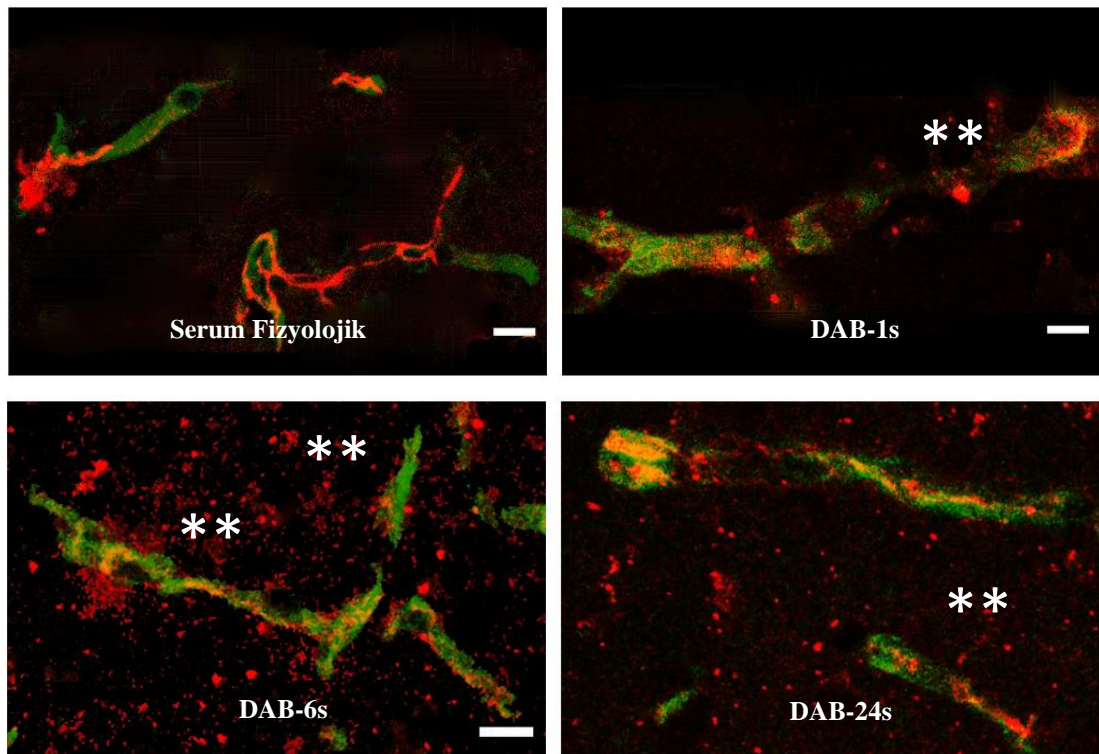
Şekil 4.61. Yabancı C57BL/6 (sol üst), GYS- $1^{NestinKO}$ (sağ üst) ve Swiss albino farelerde serum fizyolojik isv enjeksiyonundan 1 saat sonra (sol orta), DAB isv enjeksiyonundan 1 saat (sağ orta), 6 saat (sol alt) ve 24 saat (sağ alt) sonra farelerin beyin korteksleri endotel sıkı bileşke işaretleme olarak anti-kladın-5 (yeşil) antikorunu ile immünofloresan ve mikrodamarlar lektin (kırmızı) ile işaretleştir. Birlikte işaretlenen yerler sarı renkle gösterilmiştir. GYS- $1^{NestinKO}$ transgenik ve DAB isv enjekte edilen farelerde kladın-5 işaretlenmesinin azaldığı (yeşil) saptanmıştır. Azalan kladın-5 ifadesi * ile gösterilmiştir. Ölçek: 10 μ m.

Hem GYS-1^{NestinKO} transgenikler ile hem de isv DAB sonrası farelerin beyinlerinde endotelial kludin-5 proteininin ciddi düzeyde azaldığı saptanmıştır. ZO-1 proteini sırasıyla yabancı kontrollerde ve GYS-1^{NestinKO} farelerde anti-ZO-1 antikoruna ve lektin işaretlemesi ile incelenmiştir (Şekil 4.62).



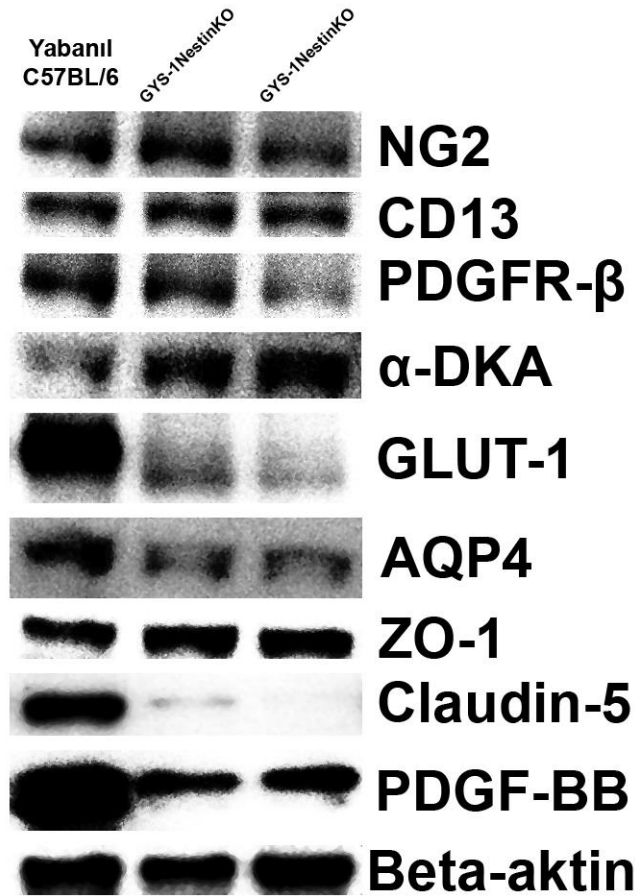
Şekil 4.62. Yabancı C57BL/6 ve GYS-1^{NestinKO} farelerin beyin kesitleri endotel sıkı bileşke işaretleyici olarak anti-ZO-1 (kırmızı, üst sol) antikoruna ile immünofloresan ve mikrodamarlar lektin (yeşil) ile işaretlenmiştir. Birlikte işaretlenen yerler sarı renkle gösterilmiştir. Ölçek: 20 µm.

İmmünofloresan işaretlemeler sonrasında GYS-1^{NestinKO} transgenikler benzer düzeyde ZO-1 ifade etmektedirler; ancak immünofloresan yöntem ile belirlenebildiği kadarıyla hücresel lokalizasyonunda bozulmalar da dikkati çekmiştir (Şekil 4.62). Bunun üzerine DAB ve serum fizyolojik isv enjekte edilmiş beyinlerde ZO-1 işaretlemeleri incelenmiştir (Şekil 4.63). DAB enjeksiyonunun erken döneminde benzer işaretlenme gözlenirken enjeksiyonun 6. saatinde ZO-1 önemli bir oranda damar duvarı dışında da izlenmiştir. Bu durum 24. saat itibariyle serum fizyolojik enjekte edilen gruptakilere yaklaşmıştır (Şekil 4.63).



Şekil 4.63. Swiss albino farelerde serum fizyolojik isv enjeksiyonundan 1 saat sonra (sol üst), DAB isv enjeksiyonundan 1 saat (sağ üst), 6 saat (sol alt) ve 24 saat (sağ alt) sonra beyinler anti-ZO-1 (kırmızı) antikoru ile immünofloresan ve mikrodamarlar lektin (yeşil) ile işaretlenmiştir ve iki görüntü üst üste çakıştırılmıştır (alt). Birlikte işaretlenen yerler sarı renktedir. İmmünofloresan yöntem ile belirlenebildiği kadarıyla DAB enjeksiyonunun 1. saatinde benzer ZO-1 işaretlenmesi gözlenirken enjeksiyonun 6. saatinde ZO-1 önemli bir oranda damar duvarı dışında da izlenmiştir, ** ile işaretlenmiştir. Bu durum 24. saat itibariyle serum fizyolojik enjekte edilen gruptakilere yaklaşmıştır. Ölçek: 10 µm.

Glikojenin nörogliovasküler düzeyde perisitler, astrositler ve endotelyal sıkı bileşke proteinleri için etkileri histopatolojik olarak incelendikten sonra gözlenen değişiklikler üzerine PDGF-BB/PDGFR- β ilişkisinin ve bu proteinlerin ifade düzeylerinin değerlendirilmesi istenmiştir. Bu amaçla ıslak transfer koşullarında gerçekleştirilen Western blotlama (n=3, 2 tekrar) ile perisit için NG2 (250 kDA), CD13 (150 kDA), PDGFR- β (160 kDA) ve α -DKA (42 kDA), astrosit için GLUT-1 (45-55 kDA) ve AQP4 (35 kDA), endotelyal sıkı bileşke için ZO-1 (220 kDA), klaudin-5 (14 kDA) ve PDGF-BB/PDGFR- β ilişkisi için PDGF-BB (28 kDA) görüntülenmiştir (Şekil 4.64).



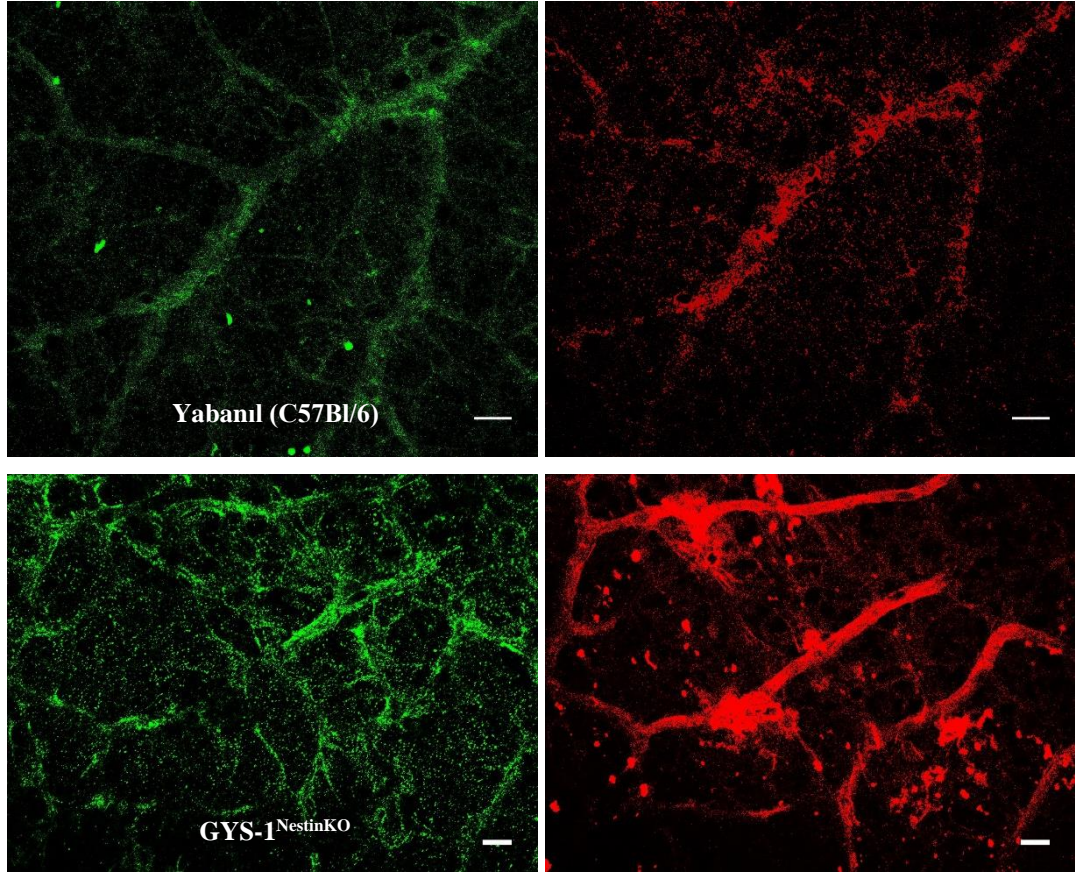
Şekil 4.64. GYS-1^{NestinKO} transgenik ve kontrol farelerin beyin dokularında ıslak transfer koşullarında gerçekleştirilen Western blotlamada perisit, astrosit, endotelyal sıkı bileşke ve PDGF-BB/PDGFR- β sinyal yolağı ilişkili proteinlerin gösterimi. GYS-1^{NestinKO} transgenik farelerin beyinlerinde PDGFR- β , GLUT-1, klaudin-5 ifadesi ciddi oranda azalmıştır. AQP4 ifadesi de düşmüştür. α -DKA ifadesi ise artmıştır. Beta-aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Her bir kuyuya 50 μ g protein yüklenmiştir.

Bu Western blotlama ile GYS-1^{NestinKO} transgeniklerin bütün beyinlerinde (n=3, 2 tekrar) PDGFR- β azalmış, α -DKA artmış ve NG2 ve CD13 göreceli benzer düzeylerde olduğu gösterilmiştir. Ayrıca GLUT-1 ve AQP4 proteinlerinin belirgin olarak azaldığı saptanmıştır. Görüntülenen bu Western blotta azalan GLUT-1'in muhtemelen glikozile, büyük molekül ağırlığa sahip olan ve endotel yüzeyinde bulunan form olduğu düşünülmektedir. Literatürde GLUT-1 glikozilasyonunun glikojen metabolizması ile ilişkisi adipositlerde belirtilmiş (94) olsa da bu incelemeler ile literatürde ilk kez beyin dokusunda da gösterilmiştir. GYS-1^{NestinKO} transgeniklerin ve DAB enjekte edilmiş farelerin beyinlerinde ciddi düzeyde klaudin-5 eksikliği gösterdiği anlaşılmıştır. DAB enjeksiyonunu 24 saat takiben bile klaudin-5 ifadesinde düzelmeye gözlenmemiştir. Bu durum klaudin-5 üretimi ve hücre içi döngüsünün bozulması ile ilişkilendirilebilir. Buna rağmen ZO-1 korunmuştur ancak immüno Floresan yöntem ile belirlenebildiği kadarıyla dokudaki yerinde bozulmalar gözlenmiştir. Bu iki proteinin benzer değişimi literatürde bir çalışmada gösterilmiştir (117). Bununla birlikte GYS-1^{NestinKO} farelerin beyinlerinde PDGF-BB düzeyi kontrollere göre azalmıştır. Elde edilen bantlarda optik yoğunluk ölçümlerinin literatürde belirtildiği şekilde yapılması planlanmıştır (214).

4.7. Retinada Peri-Mikrovasküler Glikojenin Nörovasküler Ünite Elemanları Üzerine Etkileri

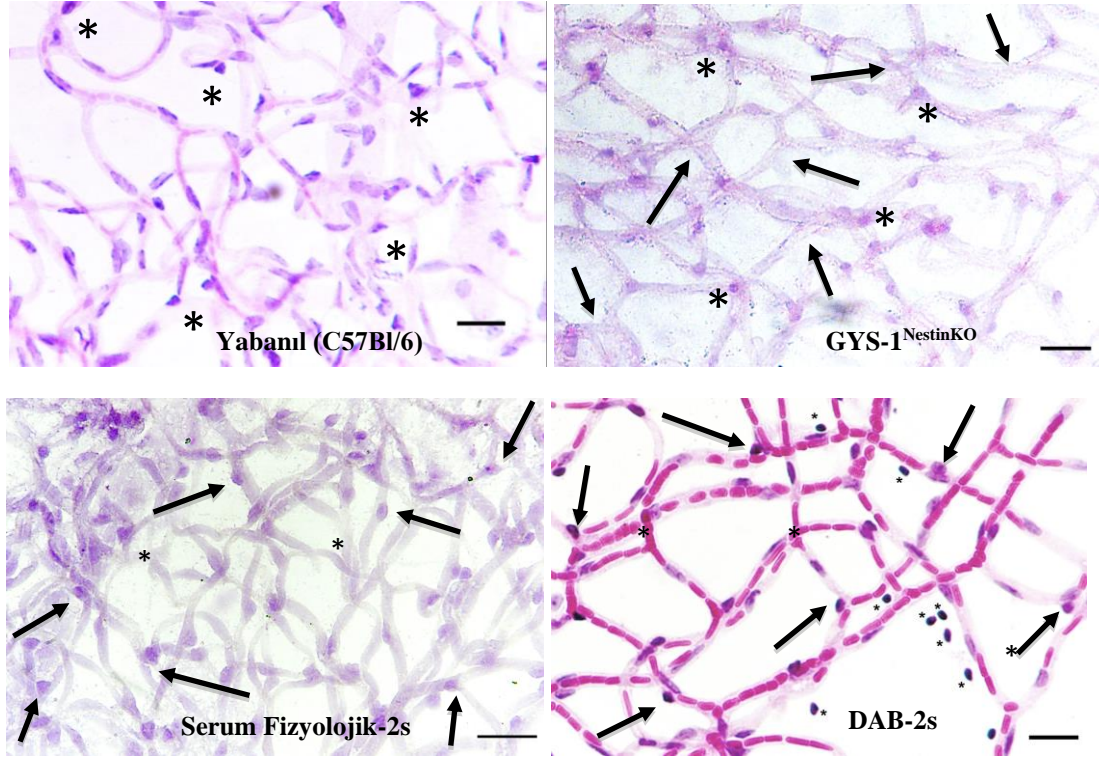
4.7.1. Retinada Peri-Mikrovasküler Glikojenin Nörogliovasküler Ünite Elemanlarından Perisitlere Etkileri

Nörogliovasküler düzeyde glikojen kullanımının retinal mikrodamarların kasılmasıyla ilişkisi ortaya konulduktan sonra beyinde olduğu gibi perisitlere özgü PDGFR- β proteini incelenmiştir. Yabanıl kontrollerde ve GYS-1^{NestinKO} farelerde PDGFR- β immünohistokimyasal olarak işaretlenmiştir (Şekil 4.63). Beyindeki aksine GYS-1^{NestinKO} farelerde retinal PDGFR- β immüno Floresan işaretlemesi yabanıl kontrollere benzer olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.65).



Şekil 4.65. Yabanıl C57BL/6 ve GYS-1^{NestinKO} farelerin bütün retinası perisit işaretleyici olarak PDGFR- β (yeşil) ile immünofloresan immünohistokimya ve mikrodamarlar lektin (kırmızı) ile işaretlenmiştir. PDGFR- β sinyalinin yabanıl kontrollere benzer yoğunlukta olması dikkati çekmiştir. Ölçek: 20 μ m.

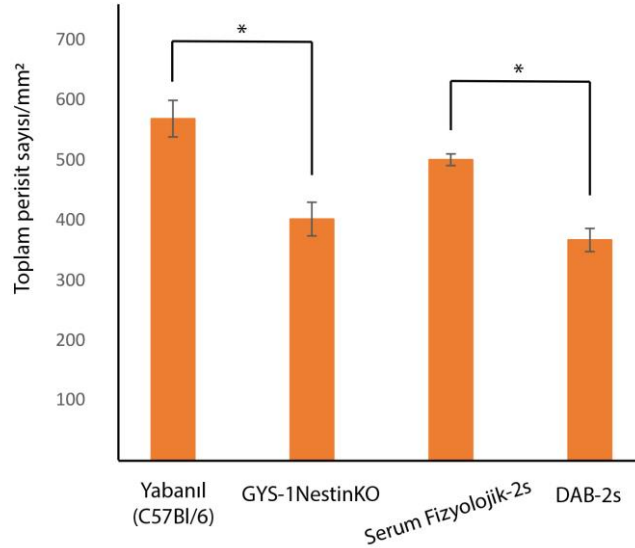
Retinada beyinden farklı olarak tripsin ile retinal sindirme yöntemi sayesinde damarsal ağ diğer hücreler olmadan histopatolojik olarak elde edilebilir (215). Bu yöntem laboratuvarımızda ilk kez kullanılmış olup yine bu sayede yabanıl (C57BL/6) kontroller ve GYS-1^{NestinKO} ile intravitreal serum fizyolojik ve DAB enjekte edilmiş retinalarda damarsal ağ ve özellikle perisitler incelenmiştir (Şekil 4.66).



Şekil 4.66. Yabanıl (C57BL/6) kontrol (üst sol), GYS-1^{NestinKO} (üst sağ) fare, intravitreal serum fizyolojik (alt sol) ve DAB enjekte edilmiş (alt sağ) retinaların damar ağları tripsin ile sindirme yöntemiyle elde edilmiş ve PAS-Hematoksilen ile işaretlenmiştir. Retinalarda perisitler oklar, perisit bulunmayan mikrodamar segmentleri ve mikrodamar duvarından ayrılan perisitler yıldızlar (*) ile işaretlenmiştir. GYS-1^{NestinKO} retinasında perisitlerde ve mikrodamar yoğunluğunda azalma dikkati çekmiştir. Serum fizyolojik intravitreal enjeksiyon ile damar duvarından ayrılan perisitler bulunmasına rağmen DAB enjeksiyonu ile çok daha fazla sayıda damar duvarından ayrılmış perisit gözlenmiştir. Bununla birlikte DAB enjeksiyonu sonrası eritrositlerin mikrodamar içerisinde fazlaca bulunmaları dikkati çekmiştir. Ölçek: 20 µm.

Tripsin ile retinal sindirme yöntemi sayesinde perisitlerin çekirdekleri, damarlara göre buldukları konumlar daha kolay bir biçimde incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda yansız bir değerlendirme yapabilmek için 40X'lik büyütme altında 6-10 alanda perisit sayımı yapılmıştır (n=3). GYS-1^{NestinKO} retinasında (401,73±27,95) yabanıl kontrollere göre (568,58±30,39) anlamlı düzeyde daha az sayıda perisit bulunmaktadır (n=3, p=0,025). DAB enjekte edilen retinalarda (366,87±19,25) da benzer şekilde serum fizyolojik enjekte edilenlere göre (500,31±9,68) anlamlı olarak daha az sayıda perisit izlenmiştir (n=3, p=0,025). Bununla birlikte DAB enjekte edilen retinalarda damar duvarından ayrılan perisitler bulunmuştur ve bu perisitlerin çekirdekleri de piknotik görünüme sahiptir (Şekil

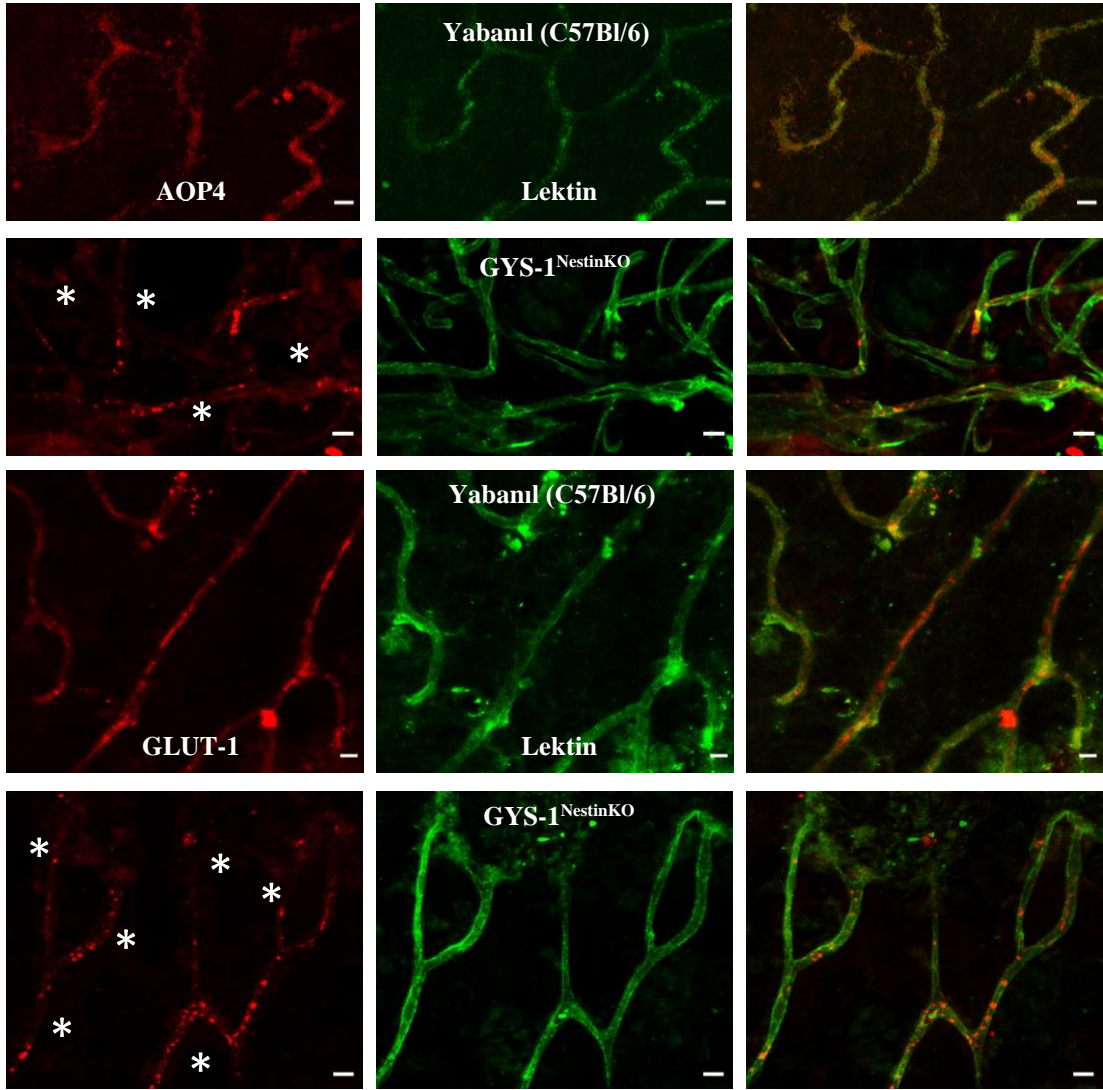
4.66, yıldızlar). Ayrıca kapiller yatak içerisinde çok sayıda eritrosit de göze çarpmaktadır (Şekil 4.66, oklar). Perisit sayılarına ait grafik Şekil 4.67’ de gösterilmiştir.



Şekil 4.67. Yabanıl (C57BL/6) kontrol, GYS-1^{NestinKO}, intravitreal serum fizyolojik ve DAB enjekte edilmiş, tripsin ile retinal sindirme yöntemiyle damar ağları elde edilmiş retinalarda toplam perisit sayımı. 40X’lik büyütme altında 6-10 alanda yapılmıştır ve mm² de olacak şekilde gösterilmiştir. *p<0.05, ‘Kruskal-Wallis’ testi.

4.7.2. Retinada Peri-mikrovasküler Glikojenin Nörogliovasküler Ünite Elemanlarından Astrositler ve Müller Hücrelerine Etkileri

Retinada Müller hücreleri glikojenin ana deposudur (35, 36). Müller hücrelerinin ve astrositlerin son ayakları incelemek için KRB’nin su taşıyıcısı AQP4 ve temel glukoz taşıyıcısı GLUT-1 öncelikle beyinde glikojen metabolizması bozulmuş genetik olarak azalmış olan GYS-1^{NestinKO} transgenik ve yabanıl kontrol farelerde immüno Floresan yöntemlerle incelenmiştir. Yabanıl kontrollerde ve GYS-1^{NestinKO} farelerin retinalarında mikrodamar çevresinde daha az AQP4 işaretlemesi gözlenmiştir (Şekil 4.68). GYS-1^{NestinKO} transgeniklerin retinalarında GLUT-1 işaretlenmesi yabanıl kontrollere göre AQP4 ifadesinde azalmaya eşlik edecek şekilde ve belirgin düzeyde azalmıştır (Şekil 4.68).

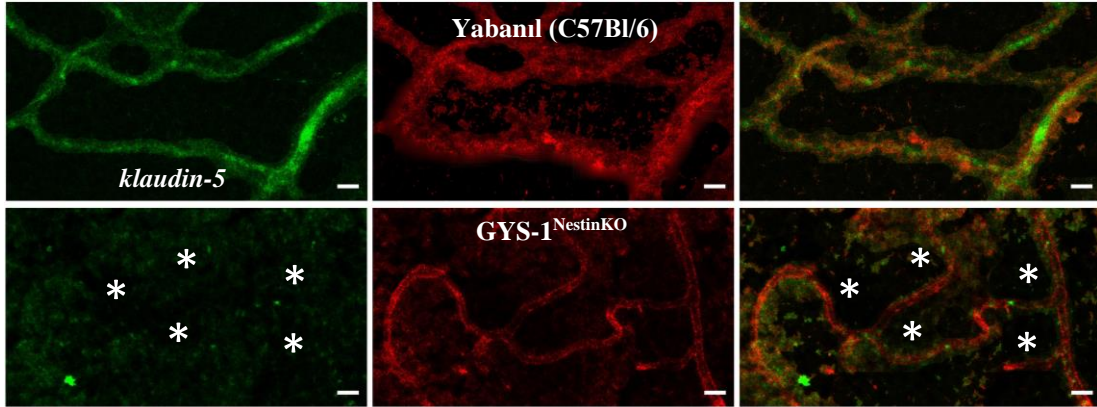


Şekil 4.68. Yabanıl C57BL/6 (1. ve 3. sıra) ve GYS-1^{NestinKO} (2. ve 4. sıra) farelerin bütün retinaları Müller hücrelerinin ve astrositlerin son ayaklarına özgül anti-AQP4 antikorunu (kırmızı) ve Müller hücrelerinin, astrositlerin son ayaklarına ve endotele özgül GLUT-1 antikorunu (kırmızı) ile immüno Floresan olarak ve mikrodamarlar lektin (yeşil) ile işaretlenmiştir. Birlikte işaretlenen yerler sarı renkle görülmektedir. GYS-1^{NestinKO} retinasında mikrodamar duvarında azalan AQP4 ve GLUT-1 ifadesi (*) ile gösterilmiştir. Ölçek: 10 µm.

4.7.3. Retinada Peri-Mikrovasküler Glikojenin Endotelyal Sıkı Bileşke Proteinlerine Etkileri

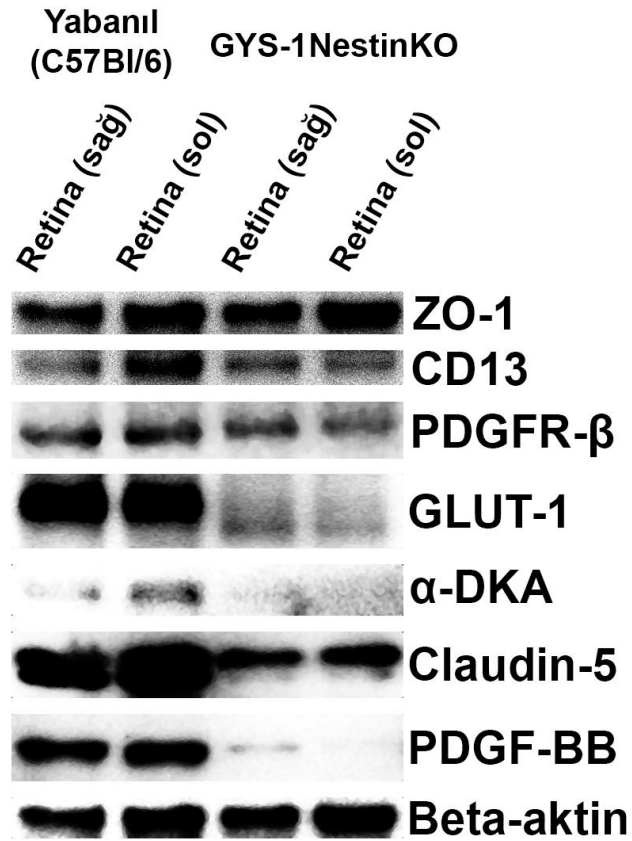
Retinada peri-mikrovasküler düzeydeki glikojen hem perisit hem de Müller hücreleri ve astrosit son ayaklarındaki KRB ilişkili proteinleri yaygın olarak etkilemiştir, endotelyal sıkı bileşke proteinleri retinada da araştırılmıştır. GYS-

$1^{NestinKO}$ ve yabancı farelerin retinalarında sıkı bileşke proteinleri kladin-5 ifadesi incelenmiştir. Anti-kladın-5 antikorı ile yapılan immünofloresan çalışmalarında GYS-1 NestinKO transgeniklerin retinada da ciddi düzeyde kladın-5 eksikliği gösterdiği anlaşılmıştır (Şekil 4.69).



Şekil 4.69. Yabancı C57BL/6 (üst) ve GYS-1 NestinKO (alt) farelerin bütün retinaları anti-kladın-5 (yeşil) antikorı ile immünofloresan ve mikrodamarlar lektin (kırmızı) ile işaretlenmiştir. Birlikte işaretlenen yerler sarı olarak gözlenmektedir. Azalan kladın-5 ifadesi yıldız (*) ile gösterilmiştir. Ölçek: 10 μ m.

Glikojenin nöroglıovasküler düzeyde perisitler, Müller hücreleri ve astrosit son ayakları ve endotelyal sıkı bileşke proteinleri için etkileri histopatolojik olarak incelendikten sonra gözlenen değişiklikler üzerine PDGF-BB/PDGFR- β ilişkisinin ve bu proteinlerin ifade düzeylerinin değerlendirilmesi istenmiştir. Bu amaçla ıslak transfer koşullarında gerçekleştirilen Western blotlama (n=2, 2 tekrar) ile perisit için CD13 (150 kDA) ve PDGFR- β (160 kDA), astrosit için GLUT-1 (45-55 kDA), endotelyal sıkı bileşke için ZO-1 (220 kDA) ve kladın-5 (14 kDA) ile PDGF-BB/PDGFR- β ilişkisi için PDGF-BB (28 kDA) görüntülenmiştir (Şekil 4.70).



Şekil 4.70. GYS-1^{NestinKO} transgenik ve kontrol farelerin soğuk HBSS içerisinde stereomikroskop altında elde edilmiş retinalarında ıslak transfer koşullarında gerçekleştirilen Western blotlamada perisit, Müller hücreleri ve astrosit son ayakları, endotelial sıkı bileşke ve PDGF-BB/PDGFR-β sinyal yolağı ilişkili proteinlerin gösterimi. Beta-aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Her bir kuyuya 10 µg protein yüklenmiştir.

Bu Western blotlama ile ön bulgu olarak GYS-1^{NestinKO} transgenik farelerin retinalarında (n=2) PDGFR-β, CD13, GLUT-1, kladin-5 düzeyinin azalmış olduğu gösterilmiştir. Buna rağmen ZO-1 korunmuştur ve AQP4 düzeyinin karşılaştırılabilmesi için daha yüksek miktarda proteinin yüklenmesi gerekmektedir. Bununla birlikte endotelial PDGF-BB düzeyi kontrollere göre azalmıştır. Hem AQP4 düzeyinin incelenebilmesi hem de elde edilen bantlarda optik yoğunluk ölçümlerinin literatürde belirtildiği şekilde yapılması planlanmıştır (214).

5. TARTIŞMA

Beynimiz vücut ağırlığımızın sadece %2'sini oluşturmasına rağmen, vücudumuzdaki oksijen tüketiminin %20'sinden sorumludur ve glukozun %25'ini kullanır (11). ATP, iyonik dengelerin ve uyarıcı sinaptik bağlantıların korunmasında kullanılır ve beyinde kullanılan toplam ATP'nin %45'ini oluşturmaktadır (11). İskemik inme gibi beyine gelen kan akımının azalması ve/veya kesilmesi durumlarında metabolik ihtiyaçları karşılayan enerji miktarında ani bir azalma gerçekleşmektedir (226, 227). Tromboembolik iskemik inmede geçerli tek tedavi seçeneği inmeden sonraki ilk 4,5 saat içinde doku plazminojen aktivatörü (tPA) ile veya mekanik trombektomi ile tıkalı damarın açılmasıdır (1). Tıkanan damar yeniden açılrsa yani rekanalizasyon sağlansa bile beyin parenkiminde reperfüzyon her zaman sağlanamamaktadır (56). Bu durum "no-reflow" fenomeni olarak adlandırılmaktadır ve mikrodamarlardaki perisitlerin kasılı kalmasına bağlı olduğu gözlenmiştir (2).

Doku perfüzyonunu olumsuz etkileyen bu mikrovasküler kasılmalarda rol oynayan mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu mekanizmaların aydınlatılmasında beyin yanı sıra retinanın da incelenmesi önemlidir. Retina beyinden sonra perisit oranının en yüksek olduğu dokudur (77, 228). Ayrıca MSS'nin bir uzantısı olması, ortak embriyolojik kökenden gelişmesi hem de beyni koruyan kafatası gibi bir kemik tabakası ile çevrelenmemesi, histopatolojik olarak inceleme kolaylığı sağlaması ve önemli düzeyde glikojen metabolizmasına ihtiyaç duyması nedeniyle büyük bir öneme sahiptir (4). Bilim insanları glikojenin; inme (13, 30, 68, 229), migren (204), bilişsel fonksiyon, hafıza kaybı (7, 24) ve birçok hastalığın patofizyolojisinde etkin olup olmadığı yönünde araştırmalar yapmışlardır (16, 226) ancak bu çalışmalarda nöroglivasküler ünite, KBB/KRB ve hücreli ilişkiler ile iskemik inmenin erken dönemindeki mikrodolaşım bozuklukları incelenmemiştir.

Son yıllarda artmış sayıdaki çalışmalara rağmen iskemi ile indüklenen perisit kasılmasının altında yatan mekanizmalar henüz tam olarak belirlenememiştir (2, 9, 60, 104, 230). Hem beyinde hem de retinadaki araştırmalarımız ve gözlemlerimiz kasılmanın *in vivo* koşullarda hemen değil gecikerek ortaya çıktığını göstermiştir (9). Beyindeki astrositler ve retinadaki başlıca glial hücreler olan Müller hücreleri glikojeni son ayaklarında sentezler, depolar ve yıkarlar (13, 35, 36). Bu son ayaklar

mikrodamarları sarar, perisitlerle yakın ilişki içindedir (78). Glia hücreleri, iskemiye ve enerji yokluğuna daha dayanıklıdır; hatta glukoz bulunmadığı durumlarda glikojeni hızla metabolize ederek piruvat ve laktat şeklinde nöronlara vererek enerji sağlayabilirler. Bu nedenle, kandan taşınan glukozun yeterli olmadığı iskemi gibi durumlarda peri-mikrovasküler glikojen, kasılmada rolü olan perisitlerin metabolizmasını sürdürmek için glukoz sağlayabilir. Bu durum iskemi gibi durumlarda mikrodamar kasılmalarının iskeminin başlamasından bir süre sonra olmasını açıklayabilir (2, 9, 11).

Glikojen metabolizması, glikojen sentezi ve glikojen yıkımının dengesiyle gerçekleşir. Bu iki süreç vücutta, glikojenolizi (örn., glukagon, kortizol, epinefrin, norepinefrin) uyaran hormonların eş zamanlı olarak glikojenezi inhibe etmesi şeklinde karşılıklı olarak düzenlenir (14). Beyin ve retinada glikojen miktar olarak diğer dokulara göre çok daha az bulunmaktadır (13, 35, 36) ve bu nedenle uzun yıllardır çok üzerinde durulmayan bir konu olarak kalmıştır. Glikojenin beyinde önemli rol oynadığı çeşitli kaynaklarda gösterilse de bölgesel farkların bulunması, miktar tayinindeki zorluklar, dokuda özgün olarak gösterilebilmesi bakımından araştırılması zor bir konu olduğu belirtilmiştir (231, 232). Tüm bu zorluklara rağmen buradan yola çıkarak, glikojen metabolizmasının etkileri özellikle glikojen fosforilaz enzimine yönelik spesifik inhibitörler kullanılarak incelenmiştir (222, 233). Buradan yola çıkılarak bu tez çalışmasında, hem beyine isv ve retinaya intravitreal olarak glikojen fosforilaz enzimini inhibe ederek glikojen kullanımını engelleyen 1,4-dideoksi-1,4-imino-d-arabinitol (DAB) uygulanmış, hem de MSS'nde glikojen sentaz-1 gen (*GYS-1*) ve protein ifadesi bulunmayan *GYS-1^{NestinKO}* fareler (24) kullanılmıştır. Bu iki yöntemde beyinde yaygın olarak hücre spesifik olmadan glikojen metabolizması bozulmuş ve etkileri nöroglivasküler düzeyde incelenmiştir.

Çalışmamızda peri-mikrovasküler glikojen kaynağı farmakolojik ve genetik olarak azaltıldığında iskemi ile indüklenene benzer şekilde mikrodamarlarda kasılmaların ortaya çıktığı saptanmıştır. Hatta bu farelerin iskemiye toleransının azaldığı, kasılmaların daha fazla sayıda olduğu dolayısıyla enfarkt hacminin de büyüdüğü bulunmuştur.

Daha önce retinada DAB enjeksiyonunun mikrodamar kasılmaları üzerindeki etkileri laboratuvarımızda sadece tek zaman aralığında ve dozda incelenmiştir (9). Bu

doktora tez çalışmasında ise farklı zaman aralıklarında ve dozda DAB enjeksiyonunun hem retinada hem de beyindeki etkileri araştırılmış, mikrodamar kasılmaları, KBB/KRB, nöroglivasküler ünite elemanları ve iskemik hasar üzerinde etkileri incelenmiştir. Fokal serebral iskemi ve iskemi/rekanalizasyon ve kalıcı retinal iskemi modelleri ile her iki doku mikrodamarlarında gerçekleşen kasılmaların ve beyinde infarkt hacminin arttığı gözlenmiştir. Literatürde başka bir glikojen fosforilaz inhibitörü (CP-316,819) ile yapılan iskemide ise glikojenin koruyucu olduğu gösterilmiştir (229). Bu durum bu inhibitörün iskemik koşullarda glikojen fosforilaz enzimini inhibe edememesinden kaynaklanmış olabilir. Diğer bir deyişle bu inhibitör doku iskemik olmadığı zaman dokuda bulunan toplam glikojeni arttırarak iskemi sırasında beyine destek olmuş olabilir. Bu inhibitörler arasındaki farmakolojik farklar üzerine yapılan çalışmalar sonucunda DAB en güvenilir bulunmuş ve dolayısıyla da bu amaçla en yaygın kullanılan ajan olmuştur (233). Literatürde DAB astrosit hücre kültürlerinde (19, 28, 222) ve birkaç '*in-vivo*' çalışmada kullanılmıştır (7, 204). Buna rağmen '*in-vivo*' çalışmalarda beyin ve retinada DAB'ın hangi hücrelerde ne düzeyde etkili olduğu karşılaştırmalı olarak incelenmemiştir.

Birbirinden farklı genlerden fakat yapısal olarak benzer olarak üretilen kas, karaciğer ve beyin olmak üzere 3 farklı izoformu bulunan glikojenden glukoz eldesinden sorumlu glikojen fosforilaz enzimi (234) ise glikojen sentaz-1 gibi bütün beyin boyunca glial hücrelerde, bazı nöronlarda, koroid pleksus ve ependimal hücrelerde ifade edilmektedir (235). Bununla birlikte PDGF-beta mutant farelerin mikrodamarlarıyla gerçekleştirilen mikroarray çalışmasında glikojen fosforilaz enziminin ifadesi kontrollere göre 50 kattan fazla değişmiştir (236). Bu da glikojen fosforilazın PDGF-BB ilişkili olarak mikrodamarlar için önemini göstermektedir.

Teorik olarak beyin ve retinada hem glikojen sentezinden sorumlu glikojen sentaz-1 enzimi nöronlarda da olmak üzere astrositler, ependimal hücreler, oligodendrositler ve koroid pleksus epitel hücrelerinde bulunmaktadır (15, 234). Glikojen sentaz-1 enzimi için etkili inhibitörler bulunmamaktadır; ancak glikojen sentaz kinaz-3 α - β (GSK-3 α - β) aktivitesiyle bu enzimin çalışması kontrol edilir. GSK-3 enzimi, başka bir kinaz ile aktive edilen proteinlerin inhibisyonundan sorumlu olması ve 100'den fazla proteinin düzenlenmesinden sorumlu olması (237)

nedeniyle uzun yıllardır araştırılmaktadır (238, 239). Başta Alzheimer hastalığı (240, 241) ve bipolar duygudurum bozukluk (242, 243) olmak üzere birçok MSS hastalığı (244-247) için önemi belirtilmekle birlikte GSK-3 inhibisyonu ile glikojen sentaz-1 aktivitesinin ve glukoz akışının adipositlerde arttığı gösterilmiştir (248). Ayrıca GSK-3 β inhibisyonunun beyin endotel hücrelerinde kludin-5 ve oklüdin yarı-ömürlerini uzatarak bariyer dengesini arttırdığı gösterilmiştir (249). Buna rağmen GYS-1^{NestinKO} farelerin beyinlerinde gerçekleştirilen incelemelerde GSK-3 ilişkili değişiklikler gözlenmemiştir (24). Bu durum literatürde bu farelerin gelişimsel olarak glikojen eksikliğine alışması ile açıklanmıştır (24).

GY-1^{NestinKO} farelerin yabanıl kontrollere göre her iki dokuda hem daha fazla mikrodamar kasılması gösterdiği hem de daha az kapiller yoğunluğa sahip olduğu bulunmuştur. Bu transgenikler ile DAB enjekte edilmiş farelerin beyin ve retinalarında mikrodamar kasılmaları benzer sayıda gözlenmiştir. Bu da glikojen kullanımının mikrodamar kasılmaları üzerinde önemini kanıtlar niteliktedir. Bununla birlikte retinada endotel başına daha fazla perisit olmasına karşın beyin ve retinadaki mikrodamar kasılmaları her fare grubunda karşılaştırıldığında beyinlerde mm² başına daha fazla mikrodamar kasılması gözlenmiştir. Bu durumun dokuların elde edilmesi sırasında yaşanan teknik sorunlarla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Beyin dokuları %4 PFA ile transkardiyak perfüzyon yoluyla fikse edilirken; retinalar, göz küreleriyle birlikte çıkarıldıktan sonra %4 PFA içine konularak fikse edilmiştir. Transkardiyak perfüzyonun beyin glikojenini azalttığı literatürde gösterilmiştir (5, 250) ancak bu kısa süre içinde azalan glikojenin mikrodamar kasılmalarına etkisi tam olarak da bilinmemektedir.

Mikrodamarlardaki kasılmalar ile perivasküler glikojen arasındaki ilişki histopatolojik olarak nöroglivasküler düzeyde de incelenmiştir. Literatürde glikojen miktarının incelenmesi için fiksasyon sırasında kayba uğramadan incelenebilmesi amacıyla mikrodalga fiksasyonu önerildiği görülmüştür (5, 250). Bu yöntemde, enerjisini (5,6,8,10 KW) kısa sürede (yaklaşık 1 saniye) belli bir noktada odaklayabilen endüstriyel bir mikrodalgaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu pahalı cihazın bu tez çalışmasında kullanılamaması nedeniyle glikojen tespit işlemi fare anestezi altındayken sıradan bir mikrodalga cihazıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 500W 30s boyuna uygulanan mikrodalga ile beyin tespit edilmeye çalışılmış (251) ancak

bunun sonucunda beyin dokusunun histolojik bütünlüğü korunmadığı için incelenmesi olanaksız olmuştur. Bu nedenle beyin dokularında glikojen düzeyi incelemeleri daha önce laboratuvarımızda yapıldığı gibi transkardiyal perfüzyonun hızlı yapılması ile gerçekleştirilmiştir (8). Ayrıca veriler niceliksel miktar tayini değil kontrollerle karşılaştırma şeklinde niteliksel olarak değerlendirildiği için mikrodalga ile muamale yapılmadan gerçekleştirilen incelemelerin bu deneyler için uygun olabileceği düşünülmüştür. Her iki dokuda glikojen, Periyodik asit Schiff (PAS) ve glikojene özgü ticari olmayan, yeni geliştirilen, özgül olduğu gösterilen (5) antikolar (ESG1A9 ve IV58B6) ile immüno Floresan olarak gösterilebilmiştir (252). DAB ile glikojenin kullanımı durdurulmuş ve fazla glikojen kasılmanın çevresinde gözlenmiştir. 2 saatlik iskemi sonucunda ise dokuya sağlanamayan kan akışı nedeniyle damar çevresinde bulunan glikojen hızlıca yıkılmış ve kasılmaya neden olmuştur. Mikrodalga fiksasyonu kullanılmadığı için glikojen miktar tayini yapılamamıştır. Bunun özellikle beyinde yapılabilmesi için mikrodalga ile doku fiksasyonu gerekmektedir (5, 250, 251). Mikrodamarlarda özellikle kasılma olan yerlerde PAS ve/veya immünohistokimyasal olarak gösterilen glikojen miktarında azalma olduğu bulunmuştur. Ancak glikojen fosforilaz inhibitörü (DAB) verildiğinde yani glikojenden glukoz elde edilmesi önlendiğinde kasılmaların artmasına rağmen PAS ve/veya immünohistokimyasal olarak gösterilen glikojende artış olmuştur. Bu da DAB'ın glikojenin kullanımı engelleyerek bu durumu ortaya çıkardığını düşündürmektedir.

Ayrıca iskemi sırasında lazer benekli kontrastlanma görüntülemeleri ile elde edilen verilerle kortikal perfüzyon haritası oluşturulmuş, kortikal kanlanma haritaları elde edilmiştir. GYS-1^{NestinKO} farelerde yabanıl kontrollere göre farklı bir kortikal kanlanma değişim haritası elde edilmiştir. Kortikal kan akışı iskeminin merkez bölgesinde yabanıl kontrollere göre anlamlı olarak daha az düşüş göstermiştir. Buna karşın penumbra kontrollerde olduğu gibi kanlanmada belirgin bir düşüş gözlenmemiştir. Ayrıca bu transgeniklerde kapiller yoğunluğun ve bağlantıların az olduğu gösterilmiştir. Bu da iskemi sırasında hasarlı dokuya çevreden gelebilecek kollateral kan akış desteğinin yabanıl kontrollere göre çok daha az olacağını düşündürmüştür. Bu durum iskemik infarkt hacminin artışıyla desteklenmiştir. Bununla birlikte literatürde gösterildiği üzere perisitlerin kaybı bazal kan akışının ve

nörovasküler kenetlenmenin kontrollere göre bozulmasıyla sonuçlanmıştır (230, 253, 254). Hem kapiller yoğunluğun ve PDGFR- β pozitif perisitlerin azlığı, hem de iskemi sırasında merkez bölgede düşüşün daha az oluşu bu transgeniklerde bazal kan akışının kontrollere göre nasıl olduğu sorusunu düşündürmektedir ve bu konuda çalışmalar planlanmıştır.

Hem MSS'nde glikojen üretimi genetik olarak bozuk olan GYS-1^{NestinKO} transgenik farelerin karakterizasyonu, hem mikrodamar kasılmalarının değerlendirilmesi ve niceliksel incelenmesi, hem de mikrodamarlardaki kasılmalar ile peri-nörogliovasküler glikojen arasındaki ilişkinin ortaya konması üzerine KBB/KRB'ni oluşturan hücresel elemanlar ve özellikle de farelerde mikrodamar kasılmalarıyla ilişkilendirilmiş perisitler (2) incelenmiştir. Hem transgeniklerde hem de DAB enjekte edilmiş dokularda kontrollere göre artmış sayıda mikrodamar kasılmalarının PDGFR- β pozitif perisitlerle ilgisi incelenmiştir. PDGFR- β ifade eden perisitlerde sayıca azalmaya eşlik eden damar duvarından ayrılma gözlenmiştir. Bu durumda literatürde daha önce elde edilen bulgulara göre PDGF-BB/PDGFR- β sinyal yolağının bozulduğu, bu şekilde KBB/KRB'lerinin etkilendiği, glikojen kullanımı ve üretimi bozuk olan dokuların her türlü hasara yatkın olduğu düşünülmüştür (79, 225). PDGFR- β pozitif perisitlerden farklı olarak da NG2 ve CD13 ifade eden perisitlerde anlamlı bir değişiklik izlenmemekle birlikte kasılma olan bölgelerde bu perisitlerin bulunduğu gözlenmiştir. Mikrodamar kasılmalarının nedenini ortaya koymak amacıyla alfa-düz kas aktini (α -DKA) de incelenmiştir (2, 255). Bir ön bulgu olarak transgeniklerde her iki dokunun mikrodamarlarında daha fazla α -DKA ifade edildiği gözlenmiştir. GYS-1^{NestinKO} transgeniklerin bütün beyinlerinde belirgin olarak azalmış PDGFR- β , artmış α -DKA ve göreceli benzer düzeyde NG2 ve CD13 düzeyleri de gösterilmiştir. Perisitlerin çeşitli mikrodamar işlevleri için birçok önemi olduğu ileri sürülmekle birlikte (256-260) PDGF-BB/PDGFR- β ilişkisinin KBB işlevleri için önemi literatürde gösterilmiştir (78, 225, 256). Deneysel çalışmalarda nörolojik hastalık modellerinde perisitlerin damar duvarından ayrıldığı ve hatta fenotipik değişiklikler gösterdiği bulunmuştur (81, 82, 261, 262). Beyinde perisitlerin PDGFR- β , NG2 ve CD13 proteinlerini farklı anatomik bölgelerde farklı mikrodamar segmentlerinde farklı düzeylerde ifade ettiklerini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (88, 89). Bu farklılıkların birbirinden

değişik işlevlere sahip perisitleri belirlediği düşünülse de yeterli bir kanıt bulunmamaktadır (77, 90). NG2 proteininin vasküler gelişim ve patolojik neovaskülarizasyon sırasında perisitlerde ifade edildiği gösterilmiştir (91, 92). Ayrıca NG2'nin perisitlerin tümör gelişimi sırasında bazal lamina bileşenlerinden kolajen tip 4'e bağlanması amacıyla kolajen tip 6 için reseptör olarak görev aldığı gösterilmiştir (93-96). Diğer bir taraftan perisit belirteci olarak yaygın kullanımına rağmen CD13 proteininin perisitler için işlevleri yeterince aydınlatılamamıştır (97, 98). Bu çalışmada gözlemlediğimiz PDGFR- β pozitif perisitlerde azalma, bu perisitlerin damar duvarından ayrılma ile perisitlerin fenotipleri ve/veya işlevleri arasındaki ilişkilerin ileri çalışmalarıyla incelenmesi planlanmıştır.

Glikojen ile perisitler arasındaki bu etkileşimin gözlenmesi üzerine nöral koruma için büyük önem taşıyan, nörogliovasküler üniteye önemli rol oynayan, glikojenin ana deposu olarak görev alan astrositler ve Müller hücreleri de incelenmiştir. GYS-1^{NestinKO} farelerde astrositlere özgü GFAP işaretlemesi literatürde yapılmış ve herhangi bir farklılık bulunmamıştır (24). Bu nedenle isv DAB ve serum fizyolojik enjekte edilmiş farelerde astrositlere özgü GFAP ve S100 ifadesi incelenmiştir. DAB isv enjeksiyonu sonrası ön bulgu olarak damar duvarında artan GFAP pozitif astrosit uzantıları ve S100 işaretli sitoplazmik işaretlenmeler dikkati çekmiştir. Bununla birlikte astrosit ve Müller hücre son ayakları ile endotel üzerinde bulunan GLUT-1, her iki fare modelinde düzey olarak azalmıştır. DAB enjeksiyonu ile 1. saatte hızla azalan GLUT-1 ifadesi 6. saat itibarıyla artmaya başlamış ve 24. saatin sonunda kontrollere yaklaşmıştır. Bu durum GLUT-1 üretiminde ve hücre içi döngüsünde glikojenin önemini zamansal olarak göstermiştir. GLUT-1 proteini literatürden bilindiği üzere sırasıyla endotel ve astrosit üzerinde glikozile olan ve olmayan formlar ifade etmektedir (120). Görüntülenen GLUT-1 düzeyinde belirgin azalma görülürken yapılan Western blotlama ile glikozile, büyük molekül ağırlığa sahip olan ve endotel yüzeyinde bulunan GLUT-1 formunda azalmanın glikojen ile ilişkili olduğu çıkarımı yapılmıştır. Bununla ilgili ileri çalışmalar yapılması gereklidir. Bu durum GLUT-1 glikozilasyonunun glikojen metabolizması ile ilişkisi-literatürde daha önce adiposit kültürlerinde belirtilmiş olsa (123) da bu bulgular literatürde ilk kez beyin ve retina da gösterilmiştir. Diğer bir taraftan AQP4 ifadesi ise göreceli olarak korunmuş olmakla birlikte hafif düzeyde azalmış ve yapılanma

bozukluğu göstermiştir. Literatürde PDGF-BB mutasyonu taşıyan farelerde AQP4 lokalizasyonunda bozulma gösterilmiştir (132). Bu durum glikojenin AQP4 üzerindeki bu etkilerini de destekler niteliktedir.

KBB ve KRB'deki sıkı bileşke proteinleri de incelenmiştir. GYS-1^{NestinKO} ve yabancı farelerde sonrasında da DAB enjekte edilmiş beyin ve retinalarda klaudin-5 ve ZO-1 proteinleri incelenmiştir. GYS-1^{NestinKO} transgeniklerde ve DAB enjekte edilmiş dokularda klaudin-5 eksikliği bulunmuştur. DAB enjeksiyonunu 24 saat takiben bile klaudin-5 protein miktarında düzelme gözlenmemiştir. Bu durum klaudin-5 üretim döngüsünün bozulması ile ilişkilendirilebilir. İskemik inme sonrası erken dönemde klaudin-5'in endotelde yıkıldığı gösterilmiştir (263). Buna rağmen ZO-1 korunmuştur ancak immüno Floresan görüntülerde doku yapılanmasında bozulmalar olduğu gözlenmiştir. Bu iki proteinin benzer biçimdeki değişimi literatürde bir çalışmada gösterilmiştir (117). Bu çalışmada CD146-perisit-endotel ilişkisi incelenmiş bu adezyon molekülünün gelişimsel dönemde ilk önce immatür mikrodamarların endotelinde ifade edildiği gösterilmiştir (117). Damar duvarında artan perisitlerin, TGF- β 1 sentezleyerek endotelial CD146 düzeyinin azalmasına neden olduğu bulunmuştur (117). CD146, perisitlere özgü olarak silindiğinde perisitler mikrodamar duvarında daha az sayıda bulunmuşlardır (117). Bu sayede CD146'nın PDGFR- β ile koreseptör olarak işlev görerek perisitlerin mikrodamar duvarına tutunmasını sağladığı anlaşılmıştır (117). CD146'nın sadece endotelde silinmesiyle ise endotelial klaudin-5 düzeyi azalmış ve KBB bozulmuştur (117). Bununla birlikte klaudin-5 eksikliği literatürde iskemik inme (158) ile birlikte Alzheimer hastalığı (163), multipl skleroz (164), şizofreni (165) ve major depresyon (166) gibi çeşitli hastalık modellerinde incelenmiş ve önemi gösterilmiştir. Bariyer oluşumu, KBB/KRB gelişimi ve klaudin-5 seviyesinin korunması için endotel, perisit ve astrositlerden sinyal molekülleri salınmaktadır. Bunların arasında astrositlerde bulunan '*sonic-hedgehog (SHH)*' sinyal yolağı önemli bir rol oynamaktadır. Astrositlerden salınan SHH endotelial '*patched homolog 1*' reseptörüne bağlanarak klaudin-5, vasküloendotelial kadherin ('*VE-cadherin*') ve oklüdin üretiminin kontrol edilmesini sağlar (107). Küçük molekül ağırlığı (800 daltona kadar) olan maddelerin KBB/KRB'den geçişinde görev almaktadır (156). Beyin ve retinada klaudin-1, 3, 12 gibi diğer klaudin proteinlerinin ifade edildiği ancak klaudin-5' in

600 kat daha fazla olarak üretilerek bu dokularda en çok ifade edilen üyesi olduğu bilinmektedir (157). İskemik inme sonrası klaudin-5 azalmış (158) ve kronik dönemde de yerini klaudin-1 almıştır (159) ancak bu durumda KBB tam işlevsel olarak çalışmamaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda glikojen kullanımının ve üretiminin bozulduğu modellerimizde klaudin-5 dışında başka bir proteinin bu görevleri üstlenebileceği düşünülmüştür. Bu konunun araştırılması gerekmektedir. ZO-1 ise ZO ailesinin incelenen ilk üyesi olup MSS'nde yüksek düzeyde ifade edilmektedir (160). Diğer sıkı bileşke proteinleri ile hücre iskeletine F-aktin aracılığıyla bağlanarak endotelin ve mikrodamar bütünlüğünün sağlanmasında önemli rol oynamaktadır (160-162). Bu tez çalışmasında GYS-1^{NestinKO} ve DAB enjekte edilmiş beyin ve retinalarda ZO-1 ifadesi korunsada doku yapılımasında bozulmalar gözlenmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında hem beyin hem de retinada perimikrovasküler glikojen metabolizması genetik olarak bozuk olan GYS-1^{NestinKO} transgeniklerde hem de 1,4-dideoksi-1,4-imino-d-arabinitol (DAB) enjekte edilerek glikojen kullanımı engellenen farelerde mikrodamar çevresi özelinde çalışılmıştır. Mikrodamar kasılması, KBB/KRB, iskemi ile ilişkisi bakımından glikojen hem genetik hem de farmakolojik yöntemle erken dönemde zamansal olarak değerlendirilmiştir. Beyin ve retinada glikojen kullanımı mikrodamarlarda kasılmaların ortaya çıktığı, bunların iskemi ile arttığı ve bunların perisit ilişkili olduğu gösterilmiştir. Elde edilen tüm bu bulgular perimikrovasküler glikojenin mikrodamar kasılmaları, doku perfüzyonu, KBB/KRB kontrolü ve ilgili hücreler arası ilişkileri etkilerken öncelikle iskemik hasar olmak üzere birçok MSS hastalığına alt yapı oluşturabilecek bileşenlerde önemli rol oynadığını literatürde ilk olarak göstermektedir. Ayrıca bu araştırma sürecinde laboratuvarımıza retinal sindirme, kortikal kanlanma haritası gibi bazı yöntemler kazandırılmıştır, kortikal kan akışının deney boyunca ortalama değişiminin bölgesel olarak yansız değerlendirilmesi mümkün olmuştur. Glikojenin hem beyinde hem de retinada nöroglivasküler düzeyde etkilerinin ortaya konması nedeniyle bu tez çalışmasının literatüre önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Beyninde glikojen sentaz-1 (GYS-1) bulunmayan GYS-1^{NestinKO} ve GYS-1^{Heterozigot} farelerin retinalarında da GYS-1'in az olduğu saptanmıştır. Böylece bu farelerde beynin yanı sıra retinanın da kullanılarak glikojen eksikliğini modellemede kullanılabileceği gösterilmiştir.
- Glikojen bulunmayan (GYS-1^{NestinKO}) veya glikojen kullanımının Glikojen Fosforilaz inhibitörü 1,4-dideoksi-1,4-imino-d-arabinitol (DAB) isv enjeksiyonu ile engellendiği durumlar beyin ve retina mikrodamarlarında yabancı kontrollere göre daha fazla kasılmaya neden olur. DAB etkisini 30. dakikada göstermeye başlar ve etkisi 6. saat itibariyle azalmaktadır. Fokal serebral iskemi ve iskemi/rekanalizasyon modelleri ile retinal iskemi sonrasında mikrodamarlarda kasılmaların arttığı saptanmıştır. Kontrollere göre beyinde infarkt hacminin de arttığı gözlenmiştir.
- GYS-1^{NestinKO} transgeniklerde kapiller dallanmaların sayımı ile hem beyin hem de retinada kapiller yoğunluğun kontrollere göre az olduğu gösterilmiştir.
- Beyin ve retinada mikrodamar kasılmaları peri-mikrovasküler glikojen ile ilişkilidir. Dokuların fiksasyonu için hedeflenmiş mikrodalga kullanılsa da glikojen, hızlı transkardiyak perfüzyon ile çıkarılan beyin ve retinada PAS ve özgül antikorlar aracılığıyla gösterilebilir. Bu şekilde de iskeminin peri-mikrovasküler glikojeni azalttığı saptanmıştır.
- GYS-1^{NestinKO} ve isv DAB enjekte edilen beyin ve retinalarda PDGFR- β ifade eden perisitlerin sayıca azaldığı saptanmıştır. DAB enjekte edilen dokularda PDGFR- β ifade eden perisitlerin bir kısmının damar duvarından ayrıldığı gözlenmiştir. Ancak bir ön bulgu olarak NG2 ve CD13 ifade eden perisitlerde anlamlı bir değişiklik izlenmediği mikrodamar kasılmalarının olduğu yerlerde bunlarla işaretlenen perisitlerin bulunduğu gözlenmiştir.
- GYS-1^{NestinKO} farelerde ve DAB enjeksiyonu sonrası dokularda yabancı kontrollere göre ön bulgu olarak AQP4 benzer olarak işaretlenmiştir. GLUT-1 işaretlenmesi ise yabancı kontrollere göre farklılık göstermiştir. DAB enjeksiyonunun 1. saatinde GLUT-1 ifadesi azalırken 6. saatten itibaren 24.

saatte kontrollere benzer GLUT-1 işaretlemesi gözlenmiştir. Endotelyal sıkı bileşke proteinlerinden klaudin-5 ifadesinde yabancı kontrollere göre azalma olduğu, ZO-1 ifadesinin korunduğu, buna rağmen ZO-1 yapılanmasında immünohistokimyasal olarak bozulmalar olduğu ön bulgu olarak gözlenmiştir.

- GYS-1^{NestinKO} farelerde yabancı kontrollere göre iskemide farklı bir kortikal kanlanma değişim haritası elde edilmiştir. Kortikal kan akışı iki saat boyunca takip edilmiş ve iskeminin merkez bölgesinde yabancı kontrollere göre anlamlı olarak daha az düşüş göstermiştir. Buna karşın penumbra kanlanmada belirgin bir artış gözlenmiştir.
- GYS-1^{NestinKO} transgeniklerde kapiller yoğunluğun ve PDGFR- β pozitif perisitlerin azlığı ile iskemide merkez bölgede kortikal kanlanma düşüşünün daha az olması bu farelerde bazal kan akımının kontrollere göre nasıl olduğu sorusunu düşündürmektedir. Bu konuda çalışmalar planlanmıştır.
- İleri çalışmalarda glikojen sentaz-1 (GYS-1) ve/veya glikojen fosforilaz enzimlerinin sadece astrosite (GFAP-Cre), perisite (PDGFR- β -Cre) ve endotele (Tie2-Cre) özgü Cre-rekombinaz ifade eden transgenik fareler ve/veya virüsler aracılığıyla silindiği modeller kullanılarak glial son ayaklar, yakın ilişkideki perisitler ve endotel arasındaki metabolik mekanizmalara daha açıklık getirilebilir. Bu sayede endotel-perisit-astrozit ilişkileri daha iyi açıklanarak öncelikle mikrodamar fizyolojisi, sonrasında da ilgili hastalıkların patofizyolojisi daha iyi anlaşılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Davalos A, Guidetti D, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2008;359(13):1317-29.
2. Yemisci M, Gursoy-Ozdemir Y, Vural A, Can A, Topalkara K, Dalkara T. Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nat Med*. 2009;15(9):1031-7.
3. Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res*. 2005;97(6):512-23.
4. Jacobson M, Hirose G. Origin of the retina from both sides of the embryonic brain: a contribution to the problem of crossing at the optic chiasma. *Science*. 1978;202(4368):637-9.
5. Oe Y, Baba O, Ashida H, Nakamura KC, Hirase H. Glycogen distribution in the microwave-fixed mouse brain reveals heterogeneous astrocytic patterns. *Glia*. 2016;64(9):1532-45.
6. Brown AM, Sickmann HM, Fosgerau K, Lund TM, Schousboe A, Waagepetersen HS, et al. Astrocyte glycogen metabolism is required for neural activity during aglycemia or intense stimulation in mouse white matter. *J Neurosci Res*. 2005;79(1-2):74-80.
7. Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, Huntley GW, Walker RH, Magistretti PJ, et al. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell*. 2011;144(5):810-23.
8. Gurer G, Gursoy-Ozdemir Y, Erdemli E, Can A, Dalkara T. Astrocytes are more resistant to focal cerebral ischemia than neurons and die by a delayed necrosis. *Brain Pathol*. 2009;19(4):630-41.
9. Alarcon-Martinez L, Yilmaz-Ozcan S, Yemisci M, Schallek J, Kilic K, Villafranca-Baughman D, et al. Retinal ischemia induces alpha-SMA-mediated capillary pericyte contraction coincident with perivascular glycogen depletion. *Acta Neuropathol Commun*. 2019;7(1):134.
10. Cruz NF, Dienel GA. High glycogen levels in brains of rats with minimal environmental stimuli: implications for metabolic contributions of working astrocytes. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002;22(12):1476-89.
11. Attwell D, Laughlin SB. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001;21(10):1133-45.
12. Alle H, Roth A, Geiger JR. Energy-efficient action potentials in hippocampal mossy fibers. *Science*. 2009;325(5946):1405-8.
13. Swanson RA. Physiologic coupling of glial glycogen metabolism to neuronal activity in brain. *Can J Physiol Pharmacol*. 1992;70 Suppl:S138-44.
14. Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochem J*. 2012;441(3):763-87.
15. Inoue N, Matsukado Y, Goto S, Miyamoto E. Localization of glycogen synthase in brain. *J Neurochem*. 1988;50(2):400-5.
16. Magistretti PJ, Pellerin L. Cellular bases of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging: evidence for a prominent role of astrocytes. *Cereb Cortex*. 1996;6(1):50-61.
17. Shulman RG, Hyder F, Rothman DL. Lactate efflux and the neuroenergetic basis of brain function. *NMR Biomed*. 2001;14(7-8):389-96.
18. Pellerin L, Stolz M, Sorg O, Martin JL, Deschepper CF, Magistretti PJ. Regulation of energy metabolism by neurotransmitters in astrocytes in primary culture and in an immortalized cell line. *Glia*. 1997;21(1):74-83.
19. Walls AB, Heimbürger CM, Bouman SD, Schousboe A, Waagepetersen HS. Robust glycogen shunt activity in astrocytes: Effects of glutamatergic and adrenergic agents. *Neuroscience*. 2009;158(1):284-92.
20. Dringen R, Gebhardt R, Hamprecht B. Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Res*. 1993;623(2):208-14.
21. Dringen R, Hamprecht B. Differences in glycogen metabolism in astroglia-rich primary cultures and sorbitol-selected astroglial cultures derived from mouse brain. *Glia*. 1993;8(3):143-9.
22. Dringen R, Hamprecht B. Inhibition by 2-deoxyglucose and 1,5-gluconolactone of glycogen mobilization in astroglia-rich primary cultures. *J Neurochem*. 1993;60(4):1498-504.
23. Dringen R, Schmoll D, Cesar M, Hamprecht B. Incorporation of radioactivity from [14C]lactate into the glycogen of cultured mouse astroglial cells. Evidence for gluconeogenesis in brain cells. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1993;374(5):343-7.

24. Duran J, Saez I, Gruart A, Guinovart JJ, Delgado-Garcia JM. Impairment in long-term memory formation and learning-dependent synaptic plasticity in mice lacking glycogen synthase in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013;33(4):550-6.
25. DiNuzzo M, Mangia S, Maraviglia B, Giove F. Glycogenolysis in astrocytes supports blood-borne glucose channeling not glycogen-derived lactate shuttling to neurons: evidence from mathematical modeling. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010;30(12):1895-904.
26. DiNuzzo M, Maraviglia B, Giove F. Why does the brain (not) have glycogen? *Bioessays.* 2011;33(5):319-26.
27. Xu J, Song D, Xue Z, Gu L, Hertz L, Peng L. Requirement of glycogenolysis for uptake of increased extracellular K⁺ in astrocytes: potential implications for K⁺ homeostasis and glycogen usage in brain. *Neurochem Res.* 2013;38(3):472-85.
28. Sickmann HM, Walls AB, Schousboe A, Bouman SD, Waagepetersen HS. Functional significance of brain glycogen in sustaining glutamatergic neurotransmission. *J Neurochem.* 2009;109 Suppl 1:80-6.
29. Phatnani H, Maniatis T. Astrocytes in neurodegenerative disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(6).
30. Hossain MI, Roulston CL, Stapleton DI. Molecular basis of impaired glycogen metabolism during ischemic stroke and hypoxia. *PLoS One.* 2014;9(5):e97570.
31. Fern R. Ischemic tolerance in pre-myelinated white matter: the role of astrocyte glycogen in brain pathology. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2015;35(6):951-8.
32. Hurley JB, Lindsay KJ, Du J. Glucose, lactate, and shuttling of metabolites in vertebrate retinas. *J Neurosci Res.* 2015;93(7):1079-92.
33. Okawa H, Sampath AP, Laughlin SB, Fain GL. ATP consumption by mammalian rod photoreceptors in darkness and in light. *Curr Biol.* 2008;18(24):1917-21.
34. Coffe V, Carbajal RC, Salceda R. Glycogen metabolism in the rat retina. *J Neurochem.* 2004;88(4):885-90.
35. Perezleon JA, Osorio-Paz I, Francois L, Salceda R. Immunohistochemical localization of glycogen synthase and GSK3beta: control of glycogen content in retina. *Neurochem Res.* 2013;38(5):1063-9.
36. Pfeiffer-Guglielmi B, Francke M, Reichenbach A, Fleckenstein B, Jung G, Hamprecht B. Glycogen phosphorylase isozyme pattern in mammalian retinal Muller (glial) cells and in astrocytes of retina and optic nerve. *Glia.* 2005;49(1):84-95.
37. Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci.* 2002;22(1):183-92.
38. Anderson CM, Nedergaard M. Astrocyte-mediated control of cerebral microcirculation. *Trends Neurosci.* 2003;26(7):340-4; author reply 4-5.
39. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010;119(1):7-35.
40. Kacem K, Lacombe P, Seylaz J, Bonvento G. Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia.* 1998;23(1):1-10.
41. Simard M, Arcuino G, Takano T, Liu QS, Nedergaard M. Signaling at the gliovascular interface. *J Neurosci.* 2003;23(27):9254-62.
42. Mathiisen TM, Lehre KP, Danbolt NC, Ottersen OP. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia.* 2010;58(9):1094-103.
43. Dalkara T, Alarcon-Martinez L, Yemisci M. Pericytes in Ischemic Stroke. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1147:189-213.
44. Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 2001;65(1):1-105.
45. Iadecola C, Nedergaard M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci.* 2007;10(11):1369-76.
46. Belanger M, Allaman I, Magistretti PJ. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab.* 2011;14(6):724-38.
47. Barros LF, Courjaret R, Jakoby P, Loaiza A, Lohr C, Deitmer JW. Preferential transport and metabolism of glucose in Bergmann glia over Purkinje cells: a multiphoton study of cerebellar slices. *Glia.* 2009;57(9):962-70.

48. Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(22):10625-9.
49. Chatton JY, Magistretti PJ, Barros LF. Sodium signaling and astrocyte energy metabolism. *Glia*. 2016;64(10):1667-76.
50. Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, Serres S, Merle M, Costalat R, et al. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia*. 2007;55(12):1251-62.
51. Jolivet R, Magistretti PJ, Weber B. Deciphering neuron-glia compartmentalization in cortical energy metabolism. *Front Neuroenergetics*. 2009;1:4.
52. Paes KT, Wang E, Henze K, Vogel P, Read R, Suwanichkul A, et al. Frizzled 4 is required for retinal angiogenesis and maintenance of the blood-retina barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(9):6452-61.
53. Johnson W, Onuma O, Owolabi M, Sachdev S. Stroke: a global response is needed. *Bull World Health Organ*. 2016;94(9):634-A.
54. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*. 2012;380(9859):2095-128.
55. Murray CJL, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*. 2012;380(9859):2197-223.
56. <majno1967.pdf>.
57. De Silva DA, Liew G, Wong MC, Chang HM, Chen C, Wang JJ, et al. Retinal vascular caliber and extracranial carotid disease in patients with acute ischemic stroke: the Multi-Centre Retinal Stroke (MCRS) study. *Stroke*. 2009;40(12):3695-9.
58. Soares BP, Tong E, Hom J, Cheng SC, Bredno J, Boussel L, et al. Reperfusion is a more accurate predictor of follow-up infarct volume than recanalization: a proof of concept using CT in acute ischemic stroke patients. *Stroke*. 2010;41(1):e34-40.
59. Takahashi A, Park HK, Melgar MA, Alcocer L, Pinto J, Lenzi T, et al. Cerebral cortex blood flow and vascular smooth muscle contractility in a rat model of ischemia: a correlative laser Doppler flowmetric and scanning electron microscopic study. *Acta Neuropathol*. 1997;93(4):354-68.
60. Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, et al. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*. 2014;508(7494):55-60.
61. Fernandez-Klett F, Offenhauser N, Dirnagl U, Priller J, Lindauer U. Pericytes in capillaries are contractile in vivo, but arterioles mediate functional hyperemia in the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(51):22290-5.
62. Fernandez-Klett F, Potas JR, Hilpert D, Blazej K, Radke J, Huck J, et al. Early loss of pericytes and perivascular stromal cell-induced scar formation after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33(3):428-39.
63. Takeo S, Taguchi T, Tanonaka K, Miyake K, Horiguchi T, Takagi N, et al. Sustained damage to energy metabolism of brain regions after microsphere embolism in rats. *Stroke*. 1992;23(1):62-8.
64. Kajihara H, Tsutsumi E, Kinoshita A, Nakano J, Takagi K, Takeo S. Activated astrocytes with glycogen accumulation in ischemic penumbra during the early stage of brain infarction: immunohistochemical and electron microscopic studies. *Brain Res*. 2001;909(1-2):92-101.
65. Kudo M, Nagayama T. Light and electron microscopic study of lipid accumulation along margins of experimental cerebral infarcts in rats. *Stroke*. 1988;19(12):1544-9.
66. Schousboe A, Sickmann HM, Walls AB, Bak LK, Waagepetersen HS. Functional importance of the astrocytic glycogen-shunt and glycolysis for maintenance of an intact intra/extracellular glutamate gradient. *Neurotox Res*. 2010;18(1):94-9.
67. Lowry OH, Schulz DW, Passonneau JV. Effects of Adenylic Acid on the Kinetics of Muscle Phosphorylase A. *J Biol Chem*. 1964;239:1947-53.
68. Swanson RA, Sagar SM, Sharp FR. Regional brain glycogen stores and metabolism during complete global ischaemia. *Neurol Res*. 1989;11(1):24-8.
69. Choi IY, Seaquist ER, Gruetter R. Effect of hypoglycemia on brain glycogen metabolism in vivo. *J Neurosci Res*. 2003;72(1):25-32.
70. Gruetter R. Glycogen: the forgotten cerebral energy store. *J Neurosci Res*. 2003;74(2):179-83.
71. Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*. 2008;57(2):178-201.

72. Daneman R. The blood-brain barrier in health and disease. *Ann Neurol.* 2012;72(5):648-72.
73. Sims DE. The pericyte--a review. *Tissue Cell.* 1986;18(2):153-74.
74. Gerhardt H, Wolburg H, Redies C. N-cadherin mediates pericytic-endothelial interaction during brain angiogenesis in the chicken. *Dev Dyn.* 2000;218(3):472-9.
75. Majesky MW. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(6):1248-58.
76. Shepro D, Morel NM. Pericyte physiology. *FASEB J.* 1993;7(11):1031-8.
77. Armulik A, Genove G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell.* 2011;21(2):193-215.
78. Armulik A, Genove G, Mae M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature.* 2010;468(7323):557-61.
79. Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature.* 2010;468(7323):562-6.
80. Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature.* 2006;443(7112):700-4.
81. Ozen I, Deierborg T, Miharada K, Padel T, Englund E, Genove G, et al. Brain pericytes acquire a microglial phenotype after stroke. *Acta Neuropathol.* 2014;128(3):381-96.
82. Sakuma R, Kawahara M, Nakano-Doi A, Takahashi A, Tanaka Y, Narita A, et al. Brain pericytes serve as microglia-generating multipotent vascular stem cells following ischemic stroke. *J Neuroinflammation.* 2016;13(1):57.
83. Pfister F, Wang Y, Schreiter K, vom Hagen F, Altvater K, Hoffmann S, et al. Retinal overexpression of angiopoietin-2 mimics diabetic retinopathy and enhances vascular damages in hyperglycemia. *Acta Diabetol.* 2010;47(1):59-64.
84. Rangasamy S, Srinivasan R, Maestas J, McGuire PG, Das A. A potential role for angiopoietin 2 in the regulation of the blood-retinal barrier in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(6):3784-91.
85. Lee SW, Kim WJ, Jun HO, Choi YK, Kim KW. Angiopoietin-1 reduces vascular endothelial growth factor-induced brain endothelial permeability via upregulation of ZO-2. *Int J Mol Med.* 2009;23(2):279-84.
86. Siddiqui MR, Mayanil CS, Kim KS, Tomita T. Angiopoietin-1 Regulates Brain Endothelial Permeability through PTPN-2 Mediated Tyrosine Dephosphorylation of Occludin. *PLoS One.* 2015;10(6):e0130857.
87. Enge M, Bjarnegard M, Gerhardt H, Gustafsson E, Kalen M, Asker N, et al. Endothelium-specific platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy. *EMBO J.* 2002;21(16):4307-16.
88. Hartmann DA, Underly RG, Grant RI, Watson AN, Lindner V, Shih AY. Pericyte structure and distribution in the cerebral cortex revealed by high-resolution imaging of transgenic mice. *Neurophotonics.* 2015;2(4):041402.
89. He L, Vanlandewijck M, Raschperger E, Andaloussi Mae M, Jung B, Lebouvier T, et al. Analysis of the brain mural cell transcriptome. *Sci Rep.* 2016;6:35108.
90. Trost A, Lange S, Schroedel F, Bruckner D, Motloch KA, Bogner B, et al. Brain and Retinal Pericytes: Origin, Function and Role. *Front Cell Neurosci.* 2016;10:20.
91. Ozerdem U, Grako KA, Dahlin-Huppe K, Monosov E, Stallcup WB. NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis. *Dev Dyn.* 2001;222(2):218-27.
92. Ozerdem U, Monosov E, Stallcup WB. NG2 proteoglycan expression by pericytes in pathological microvasculature. *Microvasc Res.* 2002;63(1):129-34.
93. Stallcup WB, Huang FJ. A role for the NG2 proteoglycan in glioma progression. *Cell Adh Migr.* 2008;2(3):192-201.
94. Chekenya M, Krakstad C, Svendsen A, Netland IA, Staalesen V, Tysnes BB, et al. The progenitor cell marker NG2/MPG promotes chemoresistance by activation of integrin-dependent PI3K/Akt signaling. *Oncogene.* 2008;27(39):5182-94.
95. Joo NE, Watanabe T, Chen C, Chekenya M, Stallcup WB, Kapila YL. NG2, a novel proapoptotic receptor, opposes integrin alpha4 to mediate anoikis through PKCalpha-dependent suppression of FAK phosphorylation. *Cell Death Differ.* 2008;15(5):899-907.
96. Kadoya K, Fukushi J, Matsumoto Y, Yamaguchi Y, Stallcup WB. NG2 proteoglycan expression in mouse skin: altered postnatal skin development in the NG2 null mouse. *J Histochem Cytochem.* 2008;56(3):295-303.

97. Nikolakopoulou AM, Zhao Z, Montagne A, Zlokovic BV. Regional early and progressive loss of brain pericytes but not vascular smooth muscle cells in adult mice with disrupted platelet-derived growth factor receptor-beta signaling. *PLoS One*. 2017;12(4):e0176225.
98. Crouch EE, Doetsch F. FACS isolation of endothelial cells and pericytes from mouse brain microregions. *Nat Protoc*. 2018;13(4):738-51.
99. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(1):41-53.
100. Noell S, Wolburg-Buchholz K, Mack AF, Beedle AM, Satz JS, Campbell KP, et al. Evidence for a role of dystroglycan regulating the membrane architecture of astroglial endfeet. *Eur J Neurosci*. 2011;33(12):2179-86.
101. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P, Noell S, Mack AF. Structure and functions of aquaporin-4-based orthogonal arrays of particles. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2011;287:1-41.
102. Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, Macvicar BA, Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*. 2010;468(7321):232-43.
103. Gordon GR, Howarth C, MacVicar BA. Bidirectional control of arteriole diameter by astrocytes. *Exp Physiol*. 2011;96(4):393-9.
104. Mishra A, Reynolds JP, Chen Y, Gourine AV, Rusakov DA, Attwell D. Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles. *Nat Neurosci*. 2016;19(12):1619-27.
105. Janzer RC, Raff MC. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*. 1987;325(6101):253-7.
106. Prat A, Biernacki K, Wosik K, Antel JP. Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia*. 2001;36(2):145-55.
107. Alvarez JI, Dodelet-Devillers A, Kebir H, Ifergan I, Fabre PJ, Terouz S, et al. The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science*. 2011;334(6063):1727-31.
108. Lee S, Chen TT, Barber CL, Jordan MC, Murdock J, Desai S, et al. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell*. 2007;130(4):691-703.
109. Argaw AT, Gurfein BT, Zhang Y, Zameer A, John GR. VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(6):1977-82.
110. Argaw AT, Asp L, Zhang J, Navrazhina K, Pham T, Mariani JN, et al. Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *J Clin Invest*. 2012;122(7):2454-68.
111. Dohgu S, Yamauchi A, Takata F, Naito M, Tsuruo T, Higuchi S, et al. Transforming growth factor-beta1 upregulates the tight junction and P-glycoprotein of brain microvascular endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2004;24(3):491-7.
112. Siczekiewicz GJ, Herman IM. TGF- β 1 signaling controls retinal pericyte contractile protein expression. *Microvascular Research*. 2003;66(3):190-6.
113. Nguyen HL, Lee YJ, Shin J, Lee E, Park SO, McCarty JH, et al. TGF-beta signaling in endothelial cells, but not neuroepithelial cells, is essential for cerebral vascular development. *Lab Invest*. 2011;91(11):1554-63.
114. Allinson KR, Lee HS, Fruttiger M, McCarty JH, Arthur HM. Endothelial expression of TGFbeta type II receptor is required to maintain vascular integrity during postnatal development of the central nervous system. *PLoS One*. 2012;7(6):e39336.
115. Arnold TD, Niaudet C, Pang MF, Siegenthaler J, Gaengel K, Jung B, et al. Excessive vascular sprouting underlies cerebral hemorrhage in mice lacking alphaVbeta8-TGFbeta signaling in the brain. *Development*. 2014;141(23):4489-99.
116. Pozdzik AA, Giordano L, Li G, Antoine MH, Quellard N, Godet J, et al. Blocking TGF-beta Signaling Pathway Preserves Mitochondrial Proteostasis and Reduces Early Activation of PDGFRbeta+ Pericytes in Aristolochic Acid Induced Acute Kidney Injury in Wistar Male Rats. *PLoS One*. 2016;11(7):e0157288.
117. Chen J, Luo Y, Hui H, Cai T, Huang H, Yang F, et al. CD146 coordinates brain endothelial cell-pericyte communication for blood-brain barrier development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(36):E7622-E31.
118. Ma W, Silverman SM, Zhao L, Villasmil R, Campos MM, Amaral J, et al. Absence of TGFbeta signaling in retinal microglia induces retinal degeneration and exacerbates choroidal neovascularization. *Elife*. 2019;8.

119. Dermietzel R, Krause D, Kremer M, Wang C, Stevenson B. Pattern of glucose transporter (Glut 1) expression in embryonic brains is related to maturation of blood-brain barrier tightness. *Dev Dyn.* 1992;193(2):152-63.
120. Gerhart DZ, LeVasseur RJ, Broderius MA, Drewes LR. Glucose transporter localization in brain using light and electron immunocytochemistry. *J Neurosci Res.* 1989;22(4):464-72.
121. De Vivo DC, Trifiletti RR, Jacobson RI, Ronen GM, Behmand RA, Harik SI. Defective glucose transport across the blood-brain barrier as a cause of persistent hypoglycorrhachia, seizures, and developmental delay. *N Engl J Med.* 1991;325(10):703-9.
122. Braakman HMH, Engelen M, Nicolai J, Willemsen M. Stroke mimics add to the phenotypic spectrum of GLUT1 deficiency syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2018;89(6):668-70.
123. McMahan RJ, Frost SC. Glycogen: a carbohydrate source for GLUT-1 glycosylation during glucose deprivation of 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol.* 1996;270(4 Pt 1):E640-5.
124. Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, Ottersen OP. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci.* 1997;17(1):171-80.
125. Friedman B, Schachtrup C, Tsai PS, Shih AY, Akassoglou K, Kleinfeld D, et al. Acute vascular disruption and aquaporin 4 loss after stroke. *Stroke.* 2009;40(6):2182-90.
126. King LS, Kozono D, Agre P. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(9):687-98.
127. Nielsen S, Terris J, Andersen D, Ecelbarger C, Frokiaer J, Jonassen T, et al. Congestive heart failure in rats is associated with increased expression and targeting of aquaporin-2 water channel in collecting duct. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(10):5450-5.
128. Nicchia GP, Rossi A, Mola MG, Procino G, Frigeri A, Svelto M. Actin cytoskeleton remodeling governs aquaporin-4 localization in astrocytes. *Glia.* 2008;56(16):1755-66.
129. Gunnarson E, Song Y, Kowalewski JM, Brismar H, Brines M, Cerami A, et al. Erythropoietin modulation of astrocyte water permeability as a component of neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(5):1602-7.
130. Rao KV, Jayakumar AR, Reddy PV, Tong X, Curtis KM, Norenberg MD. Aquaporin-4 in manganese-treated cultured astrocytes. *Glia.* 2010;58(12):1490-9.
131. Rossi A, Moritz TJ, Ratelade J, Verkman AS. Super-resolution imaging of aquaporin-4 orthogonal arrays of particles in cell membranes. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 18):4405-12.
132. Munk AS, Wang W, Bechet NB, Eltanahy AM, Cheng AX, Sigurdsson B, et al. PDGF-B Is Required for Development of the Glymphatic System. *Cell Rep.* 2019;26(11):2955-69 e3.
133. Frydenlund DS, Bhardwaj A, Otsuka T, Mylonakou MN, Yasumura T, Davidson KG, et al. Temporary loss of perivascular aquaporin-4 in neocortex after transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(36):13532-6.
134. Steiner E, Enzmann GU, Lin S, Ghavampour S, Hannocks MJ, Zuber B, et al. Loss of astrocyte polarization upon transient focal brain ischemia as a possible mechanism to counteract early edema formation. *Glia.* 2012;60(11):1646-59.
135. Eid T, Lee TS, Thomas MJ, Amiry-Moghaddam M, Bjornsen LP, Spencer DD, et al. Loss of perivascular aquaporin 4 may underlie deficient water and K⁺ homeostasis in the human epileptogenic hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(4):1193-8.
136. Lee DJ, Hsu MS, Seldin MM, Arellano JL, Binder DK. Decreased expression of the glial water channel aquaporin-4 in the intrahippocampal kainic acid model of epileptogenesis. *Exp Neurol.* 2012;235(1):246-55.
137. Ren Z, Iliff JJ, Yang L, Yang J, Chen X, Chen MJ, et al. 'Hit & Run' model of closed-skull traumatic brain injury (TBI) reveals complex patterns of post-traumatic AQP4 dysregulation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013;33(6):834-45.
138. Yang J, Lunde LK, Nuntagij P, Oguchi T, Camassa LM, Nilsson LN, et al. Loss of astrocyte polarization in the tg-ArcSwe mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2011;27(4):711-22.
139. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res.* 2007;100(2):174-90.
140. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res.* 2007;100(2):158-73.
141. Yano K, Gale D, Massberg S, Cheruvu PK, Monahan-Earley R, Morgan ES, et al. Phenotypic heterogeneity is an evolutionarily conserved feature of the endothelium. *Blood.* 2007;109(2):613-5.

142. Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol.* 1967;34(1):207-17.
143. Brightman MW, Reese TS. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol.* 1969;40(3):648-77.
144. Westergaard E, Brightman MW. Transport of proteins across normal cerebral arterioles. *J Comp Neurol.* 1973;152(1):17-44.
145. Betz AL, Goldstein GW. Polarity of the blood-brain barrier: neutral amino acid transport into isolated brain capillaries. *Science.* 1978;202(4364):225-7.
146. Betz AL, Firth JA, Goldstein GW. Polarity of the blood-brain barrier: distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells. *Brain Res.* 1980;192(1):17-28.
147. Oldendorf WH, Cornford ME, Brown WJ. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann Neurol.* 1977;1(5):409-17.
148. Furuse M. Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(1):a002907.
149. Gupta IR, Ryan AK. Claudins: unlocking the code to tight junction function during embryogenesis and in disease. *Clin Genet.* 2010;77(4):314-25.
150. Tsukita S, Furuse M. Overcoming barriers in the study of tight junction functions: from occludin to claudin. *Genes Cells.* 1998;3(9):569-73.
151. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(4):285-93.
152. Van Itallie CM, Colegio OR, Anderson JM. The cytoplasmic tails of claudins can influence tight junction barrier properties through effects on protein stability. *J Membr Biol.* 2004;199(1):29-38.
153. Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schoneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, et al. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 24):4969-76.
154. Amasheh S, Schmidt T, Mahn M, Florian P, Mankertz J, Tavalali S, et al. Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell Tissue Res.* 2005;321(1):89-96.
155. Hou JQ, He J, Wang XL, Wen DG, Chen ZX. Effect of small interfering RNA targeting survivin gene on biological behaviour of bladder cancer. *Chin Med J (Engl).* 2006;119(20):1734-9.
156. Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, et al. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol.* 2003;161(3):653-60.
157. Daneman R, Zhou L, Agalliu D, Cahoy JD, Kaushal A, Barres BA. The mouse blood-brain barrier transcriptome: a new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PLoS One.* 2010;5(10):e13741.
158. Yang Y, Rosenberg GA. MMP-mediated disruption of claudin-5 in the blood-brain barrier of rat brain after cerebral ischemia. *Methods Mol Biol.* 2011;762:333-45.
159. Sladojevic N, Stamatovic SM, Johnson AM, Choi J, Hu A, Dithmer S, et al. Claudin-1-Dependent Destabilization of the Blood-Brain Barrier in Chronic Stroke. *J Neurosci.* 2019;39(4):743-57.
160. Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, et al. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell.* 2006;126(4):741-54.
161. Shen L, Turner JR. Actin depolymerization disrupts tight junctions via caveolae-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell.* 2005;16(9):3919-36.
162. Van Itallie CM, Fanning AS, Bridges A, Anderson JM. ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton. *Mol Biol Cell.* 2009;20(17):3930-40.
163. Keaney J, Walsh DM, O'Malley T, Hudson N, Crosbie DE, Loftus T, et al. Autoregulated paracellular clearance of amyloid-beta across the blood-brain barrier. *Sci Adv.* 2015;1(8):e1500472.
164. Mandel I, Paperna T, Glass-Marmor L, Volkowich A, Badarny S, Schwartz I, et al. Tight junction proteins expression and modulation in immune cells and multiple sclerosis. *J Cell Mol Med.* 2012;16(4):765-75.
165. Farrell M, Aherne S, O'Riordan S, O'Keefe E, Greene C, Campbell M. Blood-brain barrier dysfunction in a boxer with chronic traumatic encephalopathy and schizophrenia. *Clin Neuropathol.* 2019;38(2):51-8.

166. Menard C, Pfau ML, Hodes GE, Kana V, Wang VX, Bouchard S, et al. Social stress induces neurovascular pathology promoting depression. *Nat Neurosci.* 2017;20(12):1752-60.
167. Howard J, Blakeslee B, Laughlin SB. The intracellular pupil mechanism and photoreceptor signal: noise ratios in the fly *Lucilia cuprina*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1987;231(1265):415-35.
168. Niven JE, Laughlin SB. Energy limitation as a selective pressure on the evolution of sensory systems. *J Exp Biol.* 2008;211(Pt 11):1792-804.
169. Frey T, Antonetti DA. Alterations to the blood-retinal barrier in diabetes: cytokines and reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(5):1271-84.
170. Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res.* 2003;314(1):15-23.
171. Kim JH, Kim JH, Yu YS, Kim DH, Kim KW. Recruitment of pericytes and astrocytes is closely related to the formation of tight junction in developing retinal vessels. *J Neurosci Res.* 2009;87(3):653-9.
172. Bobbie MW, Roy S, Trudeau K, Munger SJ, Simon AM, Roy S. Reduced connexin 43 expression and its effect on the development of vascular lesions in retinas of diabetic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(7):3758-63.
173. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Madrid JF, Varela H, Valladares F, Acosta E, et al. Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol Histopathol.* 2009;24(7):909-69.
174. Antonelli-Orlidge A, Smith SR, D'Amore PA. Influence of pericytes on capillary endothelial cell growth. *Am Rev Respir Dis.* 1989;140(4):1129-31.
175. Antonelli-Orlidge A, Saunders KB, Smith SR, D'Amore PA. An activated form of transforming growth factor beta is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(12):4544-8.
176. Stewart PA, Tuor UI. Blood-eye barriers in the rat: correlation of ultrastructure with function. *J Comp Neurol.* 1994;340(4):566-76.
177. Murphy-Ullrich JE, Poczatek M. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000;11(1-2):59-69.
178. Garcia CM, Darland DC, Massingham LJ, D'Amore PA. Endothelial cell-astrocyte interactions and TGF beta are required for induction of blood-neural barrier properties. *Brain Res Dev Brain Res.* 2004;152(1):25-38.
179. Jain RK, Booth MF. What brings pericytes to tumor vessels? *J Clin Invest.* 2003;112(8):1134-6.
180. Ye X, Wang Y, Cahill H, Yu M, Badea TC, Smallwood PM, et al. Norrin, frizzled-4, and Lrp5 signaling in endothelial cells controls a genetic program for retinal vascularization. *Cell.* 2009;139(2):285-98.
181. Junge HJ, Yang S, Burton JB, Paes K, Shu X, French DM, et al. TSPAN12 regulates retinal vascular development by promoting Norrin- but not Wnt-induced FZD4/beta-catenin signaling. *Cell.* 2009;139(2):299-311.
182. Wang Y, Rattner A, Zhou Y, Williams J, Smallwood PM, Nathans J. Norrin/Frizzled4 signaling in retinal vascular development and blood brain barrier plasticity. *Cell.* 2012;151(6):1332-44.
183. Robitaille J, MacDonald ML, Kaykas A, Sheldahl LC, Zeisler J, Dube MP, et al. Mutant frizzled-4 disrupts retinal angiogenesis in familial exudative vitreoretinopathy. *Nat Genet.* 2002;32(2):326-30.
184. Jiao X, Ventruto V, Trese MT, Shastry BS, Hejtmancik JF. Autosomal recessive familial exudative vitreoretinopathy is associated with mutations in LRP5. *Am J Hum Genet.* 2004;75(5):878-84.
185. Toomes C, Bottomley HM, Scott S, Mackey DA, Craig JE, Appukuttan B, et al. Spectrum and frequency of FZD4 mutations in familial exudative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(7):2083-90.
186. Toomes C, Bottomley HM, Jackson RM, Towns KV, Scott S, Mackey DA, et al. Mutations in LRP5 or FZD4 underlie the common familial exudative vitreoretinopathy locus on chromosome 11q. *Am J Hum Genet.* 2004;74(4):721-30.
187. Poulter JA, Ali M, Gilmour DF, Rice A, Kondo H, Hayashi K, et al. Mutations in TSPAN12 cause autosomal-dominant familial exudative vitreoretinopathy. *Am J Hum Genet.* 2010;86(2):248-53.
188. Nikopoulos K, Venselaar H, Collin RW, Riveiro-Alvarez R, Boonstra FN, Hooymans JM, et al. Overview of the mutation spectrum in familial exudative vitreoretinopathy and Norrie disease

- with identification of 21 novel variants in FZD4, LRP5, and NDP. *Hum Mutat.* 2010;31(6):656-66.
189. Ye X, Wang Y, Nathans J. The Norrin/Frizzled4 signaling pathway in retinal vascular development and disease. *Trends Mol Med.* 2010;16(9):417-25.
 190. Rehm HL, Zhang DS, Brown MC, Burgess B, Halpin C, Berger W, et al. Vascular defects and sensorineural deafness in a mouse model of Norrie disease. *J Neurosci.* 2002;22(11):4286-92.
 191. Stahl A, Joyal JS, Chen J, Sapielha P, Juan AM, Hatton CJ, et al. SOCS3 is an endogenous inhibitor of pathologic angiogenesis. *Blood.* 2012;120(14):2925-9.
 192. Kuhnert F, Mancuso MR, Shamloo A, Wang HT, Choksi V, Florek M, et al. Essential regulation of CNS angiogenesis by the orphan G protein-coupled receptor GPR124. *Science.* 2010;330(6006):985-9.
 193. Anderson KD, Pan L, Yang XM, Hughes VC, Walls JR, Dominguez MG, et al. Angiogenic sprouting into neural tissue requires Gpr124, an orphan G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(7):2807-12.
 194. Cullen M, Elzarrad MK, Seaman S, Zudaire E, Stevens J, Yang MY, et al. GPR124, an orphan G protein-coupled receptor, is required for CNS-specific vascularization and establishment of the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(14):5759-64.
 195. Zhou Y, Nathans J. Gpr124 controls CNS angiogenesis and blood-brain barrier integrity by promoting ligand-specific canonical wnt signaling. *Dev Cell.* 2014;31(2):248-56.
 196. Posokhova E, Shukla A, Seaman S, Volate S, Hilton MB, Wu B, et al. GPR124 functions as a WNT7-specific coactivator of canonical beta-catenin signaling. *Cell Rep.* 2015;10(2):123-30.
 197. Vanhollebeke B, Stone OA, Bostaille N, Cho C, Zhou Y, Maquet E, et al. Tip cell-specific requirement for an atypical Gpr124- and Reck-dependent Wnt/beta-catenin pathway during brain angiogenesis. *Elife.* 2015;4.
 198. Luo Y, Xiao W, Zhu X, Mao Y, Liu X, Chen X, et al. Differential expression of claudins in retinas during normal development and the angiogenesis of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(10):7556-64.
 199. Muthusamy A, Lin CM, Shanmugam S, Lindner HM, Abcouwer SF, Antonetti DA. Ischemia-reperfusion injury induces occludin phosphorylation/ubiquitination and retinal vascular permeability in a VEGFR-2-dependent manner. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2014;34(3):522-31.
 200. Tsukita S, Furuse M. Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. *Curr Opin Cell Biol.* 2002;14(5):531-6.
 201. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol.* 2002;156(6):1099-111.
 202. Gong Y, Renigunta V, Zhou Y, Sunq A, Wang J, Yang J, et al. Biochemical and biophysical analyses of tight junction permeability made of claudin-16 and claudin-19 dimerization. *Mol Biol Cell.* 2015;26(24):4333-46.
 203. Xu H, Koch P, Chen M, Lau A, Reid DM, Forrester JV. A clinical grading system for retinal inflammation in the chronic model of experimental autoimmune uveoretinitis using digital fundus images. *Exp Eye Res.* 2008;87(4):319-26.
 204. Kilic K, Karatas H, Donmez-Demir B, Eren-Kocak E, Gursoy-Ozdemir Y, Can A, et al. Inadequate brain glycogen or sleep increases spreading depression susceptibility. *Ann Neurol.* 2018;83(1):61-73.
 205. Thored P, Wood J, Arvidsson A, Cammenga J, Kokaia Z, Lindvall O. Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke.* 2007;38(11):3032-9.
 206. Kawasaki H, Kosugi I, Sakao-Suzuki M, Meguro S, Tsutsui Y, Iwashita T. Intracerebroventricular and Intravascular Injection of Viral Particles and Fluorescent Microbeads into the Neonatal Brain. *J Vis Exp.* 2016(113).
 207. Gaudin A, Yemisci M, Eroglu H, Lepetre-Mouelhi S, Turkoglu OF, Donmez-Demir B, et al. Squalenoyl adenosine nanoparticles provide neuroprotection after stroke and spinal cord injury. *Nat Nanotechnol.* 2014;9(12):1054-62.
 208. Karatas H, Erdener SE, Gursoy-Ozdemir Y, Gurer G, Soylemezoglu F, Dunn AK, et al. Thrombotic distal middle cerebral artery occlusion produced by topical FeCl(3) application: a novel model suitable for intravital microscopy and thrombolysis studies. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011;31(6):1452-60.

209. Dunn AK, Bolay H, Moskowitz MA, Boas DA. Dynamic imaging of cerebral blood flow using laser speckle. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001;21(3):195-201.
210. Lazdam M, de la Horra A, Pitcher A, Mannie Z, Diesch J, Trevitt C, et al. Elevated blood pressure in offspring born premature to hypertensive pregnancy: is endothelial dysfunction the underlying vascular mechanism? *Hypertension.* 2010;56(1):159-65.
211. Tzeng YC, Willie CK, Atkinson G, Lucas SJ, Wong A, Ainslie PN. Cerebrovascular regulation during transient hypotension and hypertension in humans. *Hypertension.* 2010;56(2):268-73.
212. Feng M, DiPetrillo K. Non-invasive blood pressure measurement in mice. *Methods Mol Biol.* 2009;573:45-55.
213. Bulmer D. Dimedone as an aldehyde blocking reagent to facilitate the histochemical demonstration of glycogen. *Stain Technol.* 1959;34(2):95-8.
214. Jensen EC. The basics of western blotting. *Anat Rec (Hoboken).* 2012;295(3):369-71.
215. Chou JC, Rollins SD, Fawzi AA. Trypsin digest protocol to analyze the retinal vasculature of a mouse model. *J Vis Exp.* 2013(76):e50489.
216. Lubjuhn J, Gastens A, von Wilpert G, Bargiotas P, Herrmann O, Murkinati S, et al. Functional testing in a mouse stroke model induced by occlusion of the distal middle cerebral artery. *J Neurosci Methods.* 2009;184(1):95-103.
217. Dziennis S, Qin J, Shi L, Wang RK. Macro-to-micro cortical vascular imaging underlies regional differences in ischemic brain. *Sci Rep.* 2015;5:10051.
218. Swanson RA, Sharp FR. BW619C89, a glutamate release inhibitor, protects against focal cerebral ischemic damage. *Stroke.* 1994;25(1):225-6.
219. Stokum JA, Mehta RI, Ivanova S, Yu E, Gerzanich V, Simard JM. Heterogeneity of aquaporin-4 localization and expression after focal cerebral ischemia underlies differences in white versus grey matter swelling. *Acta Neuropathol Commun.* 2015;3:61.
220. Buttgerit A, Lelios I, Yu X, Vrohling M, Krakoski NR, Gautier EL, et al. Sall1 is a transcriptional regulator defining microglia identity and function. *Nat Immunol.* 2016;17(12):1397-406.
221. Walchli T, Mateos JM, Weinman O, Babic D, Regli L, Hoerstrup SP, et al. Quantitative assessment of angiogenesis, perfused blood vessels and endothelial tip cells in the postnatal mouse brain. *Nat Protoc.* 2015;10(1):53-74.
222. Walls AB, Sickmann HM, Brown A, Bouman SD, Ransom B, Schousboe A, et al. Characterization of 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol (DAB) as an inhibitor of brain glycogen shunt activity. *J Neurochem.* 2008;105(4):1462-70.
223. Paques M, Tadayoni R, Sercombe R, Laurent P, Genevois O, Gaudric A, et al. Structural and hemodynamic analysis of the mouse retinal microcirculation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(11):4960-7.
224. Taskiran-Sag A, Yemisci M, GURSOY-OZDEMIR Y, ERDENER SE, KARATAS H, YUCE D, et al. Improving Microcirculatory Reperfusion Reduces Parenchymal Oxygen Radical Formation and Provides Neuroprotection. *Stroke.* 2018;49(5):1267-75.
225. Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science.* 1997;277(5323):242-5.
226. Allaman I, Belanger M, Magistretti PJ. Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci.* 2011;34(2):76-87.
227. Magistretti PJ, Allaman I. A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging. *Neuron.* 2015;86(4):883-901.
228. <sims1986.pdf>.
229. Suh SW, Bergher JP, Anderson CM, Treadway JL, Fosgerau K, Swanson RA. Astrocyte glycogen sustains neuronal activity during hypoglycemia: studies with the glycogen phosphorylase inhibitor CP-316,819 ([R-R*,S*]-5-chloro-N-[2-hydroxy-3-(methoxymethylamino)-3-oxo-1-(phenylmethyl)propyl]-1H-indole-2-carboxamide). *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;321(1):45-50.
230. Kisler K, Nelson AR, Rege SV, Ramanathan A, Wang Y, Ahuja A, et al. Pericyte degeneration leads to neurovascular uncoupling and limits oxygen supply to brain. *Nat Neurosci.* 2017;20(3):406-16.
231. Wu L, Butler NJM, Swanson RA. Technical and Comparative Aspects of Brain Glycogen Metabolism. *Adv Neurobiol.* 2019;23:169-85.
232. Wu L, Wong CP, Swanson RA. Methodological considerations for studies of brain glycogen. *J Neurosci Res.* 2019;97(8):914-22.

233. Obel LF, Muller MS, Walls AB, Sickmann HM, Bak LK, Waagepetersen HS, et al. Brain glycogen-new perspectives on its metabolic function and regulation at the subcellular level. *Front Neuroenergetics*. 2012;4:3.
234. Newgard CB, Littman DR, van Genderen C, Smith M, Fletterick RJ. Human brain glycogen phosphorylase. Cloning, sequence analysis, chromosomal mapping, tissue expression, and comparison with the human liver and muscle isozymes. *J Biol Chem*. 1988;263(8):3850-7.
235. Psarra AM, Pfeiffer B, Giannakopoulou M, Sotiroidis TG, Stylianopoulou F, Hamprecht B. Immunocytochemical localization of glycogen phosphorylase kinase in rat brain sections and in glial and neuronal primary cultures. *J Neurocytol*. 1998;27(11):779-90.
236. Bondjers C, He L, Takemoto M, Norlin J, Asker N, Hellstrom M, et al. Microarray analysis of blood microvessels from PDGF-B and PDGF-Rbeta mutant mice identifies novel markers for brain pericytes. *FASEB J*. 2006;20(10):1703-5.
237. Linding R, Jensen LJ, Ostheimer GJ, van Vugt MA, Jorgensen C, Miron IM, et al. Systematic discovery of in vivo phosphorylation networks. *Cell*. 2007;129(7):1415-26.
238. Grimes CA, Jope RS. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol*. 2001;65(4):391-426.
239. Ali A, Hoeflich KP, Woodgett JR. Glycogen synthase kinase-3: properties, functions, and regulation. *Chem Rev*. 2001;101(8):2527-40.
240. Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH. Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett*. 1992;147(1):58-62.
241. Mandelkow EM, Drewes G, Biernat J, Gustke N, Van Lint J, Vandenheede JR, et al. Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett*. 1992;314(3):315-21.
242. Klein PS, Melton DA. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(16):8455-9.
243. Stambolic V, Ruel L, Woodgett JR. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol*. 1996;6(12):1664-8.
244. Mines MA, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3: a promising therapeutic target for fragile x syndrome. *Front Mol Neurosci*. 2011;4:35.
245. Mines MA, Beurel E, Jope RS. Regulation of cell survival mechanisms in Alzheimer's disease by glycogen synthase kinase-3. *Int J Alzheimers Dis*. 2011;2011:861072.
246. <Lithium prevents and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis..pdf>.
247. King TD, Bijur GN, Jope RS. Caspase-3 activation induced by inhibition of mitochondrial complex I is facilitated by glycogen synthase kinase-3beta and attenuated by lithium. *Brain Res*. 2001;919(1):106-14.
248. Orena SJ, Torchia AJ, Garofalo RS. Inhibition of glycogen-synthase kinase 3 stimulates glycogen synthase and glucose transport by distinct mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 2000;275(21):15765-72.
249. Ramirez SH, Fan S, Dykstra H, Rom S, Mercer A, Reichenbach NL, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta promotes tight junction stability in brain endothelial cells by half-life extension of occludin and claudin-5. *PLoS One*. 2013;8(2):e55972.
250. Kong J, Shepel PN, Holden CP, Mackiewicz M, Pack AI, Geiger JD. Brain glycogen decreases with increased periods of wakefulness: implications for homeostatic drive to sleep. *J Neurosci*. 2002;22(13):5581-7.
251. Gotoh H, Nomura T, Ono K. Glycogen serves as an energy source that maintains astrocyte cell proliferation in the neonatal telencephalon. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37(6):2294-307.
252. Louzao MC, Espina B, Vieytes MR, Vega FV, Rubiolo JA, Baba O, et al. "Fluorescent glycogen" formation with sensibility for in vivo and in vitro detection. *Glycoconj J*. 2008;25(6):503-10.
253. Berthiaume AA, Grant RI, McDowell KP, Underly RG, Hartmann DA, Levy M, et al. Dynamic Remodeling of Pericytes In Vivo Maintains Capillary Coverage in the Adult Mouse Brain. *Cell Rep*. 2018;22(1):8-16.
254. Nikolakopoulou AM, Montagne A, Kisler K, Dai Z, Wang Y, Huuskonen MT, et al. Pericyte loss leads to circulatory failure and pleiotrophin depletion causing neuron loss. *Nat Neurosci*. 2019;22(7):1089-98.

255. Alarcon-Martinez L, Yilmaz-Ozcan S, Yemisci M, Schallek J, Kilic K, Can A, et al. Capillary pericytes express alpha-smooth muscle actin, which requires prevention of filamentous-actin depolymerization for detection. *Elife*. 2018;7.
256. Bell RD, Winkler EA, Sagare AP, Singh I, LaRue B, Deane R, et al. Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron*. 2010;68(3):409-27.
257. Bell RD, Winkler EA, Singh I, Sagare AP, Deane R, Wu Z, et al. Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature*. 2012;485(7399):512-6.
258. Sagare AP, Bell RD, Zhao Z, Ma Q, Winkler EA, Ramanathan A, et al. Pericyte loss influences Alzheimer-like neurodegeneration in mice. *Nat Commun*. 2013;4:2932.
259. Winkler EA, Bell RD, Zlokovic BV. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat Neurosci*. 2011;14(11):1398-405.
260. Winkler EA, Sagare AP, Zlokovic BV. The pericyte: a forgotten cell type with important implications for Alzheimer's disease? *Brain Pathol*. 2014;24(4):371-86.
261. Dore-Duffy P, Owen C, Balabanov R, Murphy S, Beaumont T, Rafols JA. Pericyte migration from the vascular wall in response to traumatic brain injury. *Microvasc Res*. 2000;60(1):55-69.
262. Aguilera KY, Brekken RA. Recruitment and retention: factors that affect pericyte migration. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(2):299-309.
263. Liu J, Jin X, Liu KJ, Liu W. Matrix metalloproteinase-2-mediated occludin degradation and caveolin-1-mediated claudin-5 redistribution contribute to blood-brain barrier damage in early ischemic stroke stage. *J Neurosci*. 2012;32(9):3044-57.