

## YENİDOĞAN RAT BEYNİNDE GELİŞİM DÖNEMİNDE YÜKSEK YERÇEKİMİNE BAĞLI ZONULA OCCLUDENS (TIGHT JUNCTION) YAPISAL DEĞİŞİKLİKLERİNİN İNCELENMESİ

A STUDY ON THE STRUCTURAL CHANGES OF ZONULA OCCLUDENS (TIGHT JUNCTION) BY HYPERGRAVITY DURING DEVELOPMENTAL PERIOD OF NEWBORN RAT BRAIN

<sup>1</sup>M. İbrahim TUĞLU <sup>2</sup>Enis CEZAYIRLI <sup>2</sup>Tuncay VAROL Ertuğrul TATLISUMAK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Seda VATANSEVER

<sup>1</sup>Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Manisa, TÜRKİYE

<sup>2</sup>Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Manisa, TÜRKİYE

**Anahtar Sözcükler:** hipergravite, rotasyon, zonula occludens, kan-beyin bariyeri, rat

**Key Words:** hypergravity, centrifugation, zonula occludens, blood-brain barrier, rat

### ÖZET

Uzayda yaşam ve yüksek yerçekiminin osteoporosis gibi hastalıklarda kullanılma olasılığı, hem düşük (mikrogravite), hem de yüksek yerçekimi (hipergravite) etkisinin ve kullanılan mekanizmaların aydınlatılması için birçok çalışmaya konu olmaktadır. Beyinde tight junction (TJ) denilen zonula occludens'ler kan beyin bariyerinin (KBB) oluşumu nedeni ile ayrı bir önem taşımaktadır. Bu çalışmada hipergravitenin (2G) ve rotasyonun yenidoğan Wistar albino ratlarda merkezi sinir sisteminin KBB'ni oluşturan zonula occludens (TJ) üzerine etkisi araştırıldı.

Çalışmada 90 adet yenidoğan Wistar albino rat kullanıldı. Yavru ratlar kontrol, rotasyon (G) ve hipergravite (2G) olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Bir grup kontrol olarak ayrılırken, bir grup yerçekimi ivmesine eşit rotasyona (G), diğer grup ise yerçekimi ivmesinin yaklaşık 2 katı (2G) ve günde 6 saat süreyle rotasyona maruz bırakıldı. Her grupta 6 yavru rat olacak şekilde postnatal 3., 7., 15., 21. ve 28.günlerde yavrular eter anestezisi altında %10 formalin perfüzyonu ile fikse edilip, dekapite edildi ve beyinleri çıkarıldı. Parafin kesitlere immunohistokimyasal olarak zonula occludens ZO-1 ve occludin boyamaları uygulandı. Sonuçlar ışık mikroskopunda değerlendirildi.

ZO-1 ve occludin proteinlerinin gelişim sürecine paralel olarak ortaya çıktıkları ancak, rotasyon ile 2G düzeyinde ve uygulanan süre içinde, ışık mikroskopik düzeyde yapılan incelemede proteinlerin ortaya çıkması ve dağılımı açısından kontrol grubuna göre bir fark olmadığı saptandı.

### SUMMARY

The realization of a long lasting dream of living in outer space and the potential use of hypergravity for the treatment of ailments such as osteoporosis prompted extensive research on the effects of microgravity and hypergravity on the organisms and to shed light to the mechanisms associated with these. Zonula occludens, ZO also known as tight junctions in the brain are particularly important since they have a role in the formation of blood-brain barrier (BBB). In this study we examined the effects of hypergravity (2G) and rotation on zonula occludens. (TJ).

Ninety newborn Wistar albino rats are used in the study. Rotation group were subjected to centrifugation that is equivalent to the gravitational force (G) while hypergravity group underwent centrifugation that was twice as much as the gravity for 6 hours a day. Under ether anesthesia, rats in each subgroup were perfused with 10% formalin, decapitated and the brains were removed. Paraffin sections were immunohistochemically stained with ZO-1 and occludin dyes and examined under a light microscope. ZO-1 and occludin proteins appeared normally during the course of the development. Light microscopic examination did not reveal any differences between the control group and rotation hypergravity groups with regard to the appearance or the distribution of these proteins.

Yazışma adresi: İbrahim TUĞLU, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi

Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Uncubozköy, Manisa - TÜRKİYE

Makalenin geliş tarihi : 11.05.2004 ; kabul tarihi:02.02.2005

## GİRİŞ

Gravite yeryüzünde yaşayan canlıların tamamını etkileyen 1G lik etkisiyle hem gelişim hem de üreme fizyolojisinde rol oynayan farkında olmadığımız bir faktördür. Özellikle gelişimin ilk aşamalarında oldukça etkin olan değişen yerçekimi etkisi, hamileliğin ortalarına doğru ve postnatal yaşamda giderek azalmaktadır (1, 6, 7, 9, 11). Bir adaptasyon gelişimi olduğu düşünülmektedir (31). Hipergravite etkisi sadece direk yolla olmayıp, kan akımı ve metabolik değişikliklere bağlı indirekt değişikliklere de yol açmaktadır. Sinir sistemi üzerine yer çekiminde azalmanın (mikrogravite) nöronal aktivitede azalmaya ve hipergravitenin ise nöronal aktivitede artmaya neden olduğu düşünülmektedir (20).

Endotel ve epitel hücrelerinin önemli bir özelliği hücreler arası bölgede zonula occludens tight junction (TJ) oluşturarak bir bariyer görevi üstlenmeleridir. Bu bariyer normal fizyolojinin ve devamlılığının sağlanmasının yanı sıra, beyinde oluşan ödem ve enflamasyonda da önemli rol oynar. Bu nedenle beyinde bariyerin geçirgenliği diğer organlardakine göre oldukça azdır. Hem TJ oluşumu hem de sürdürülen geçirgenlik bu oluşumu sağlayan proteinlerin yapısal durumuna bağlıdır. ZO-1, ZO-2, cingulin, 7H6 antijeni, ve simplekin bilinen proteinler olup, occludin ve claudine integral membran proteini olmasıyla diğerlerinden ayrılır. Bu proteinlerin birbirleri ile ilişkisi sonucu hücre yan membranının apikal kısmında TJ oluşturulur. ATP varlığı ve hücre iskeletiyle aktin bağlantısı fonksiyonun oluşması için gereklidir. Gelişim sürecinde diğer membran bağlantılarının bu oluşumu etkiledikleri düşünülmektedir (16, 47).

Kan beyin bariyeri, (KBB) merkezi sinir sisteminde kapiller endotel hücreleri arasındaki zonula occludens tipi hücrelerarası bağlantıların varlığı sonucu oluşur. Merkezi sinir sisteminin çok sınırlı bazı alanlarında (KBB) bulunmaz. Bu alanların çoğu beyindeki ventriküller civarında yerleşmiştir (organum circumventriculare): eminentia mediana hypothalami, corpus pineale, glandula hypophyseos, organum subfornicale, organum vasculosum lamina terminalis, area postrema (42, 46). (KBB) üç önemli fonksiyonu bulunmaktadır: 1-Dolaşımda bulunan bazı moleküllerin geçişini engelleyerek, bu maddelerin zararlı etkilerinden merkezi sinir sistemini korur. 2-Özelleşmiş taşıma sistemleri sayesinde maddelerin seçici taşınmasını sağlar. 3-Kan veya beyin kaynaklı maddelerin metabolizması veya modifikasyonunu sağlar (46).

(KBB) embriyonik yaşamda gelişmeye başlar (17), ancak doğumda henüz tam olarak gelişimi tamamlanmamıştır (46). Doğum sonrası dönemde bu gelişim devam etmektedir ve postnatal dönemin ilk haftalarında anatomik ve fonksiyonel olarak gelişim tamamlanır (46). Sıçanlarda KBB postnatal 3 ve 4. haftalarda tamamen olgun halini almasına rağmen yaklaşık 2. haftada fonksi-

yon görmeye başladığı, boya geçişinin durması ile gösterilmiştir. Çeşitli faktörler etkisiyle kan-beyin bariyeri yıkılabilmektedir. Bunlardan iskemi, infeksiyon ve metastatik tümörler en önemli olanlarıdır (46).

Hipergraviteye bağlı etkiler içinde heat-shock proteinlerinde artma, Fos indüksiyonu gibi stres artışı bulguları ve TJ ların açılmasına bağlı KBB bozuklukları gösterilmiştir (39). Özellikle pilotlarda hipergraviteye bağlı baygınlık ve ödem oluşumu bu şekilde açıklanmaktadır. Hipergravite ortamında merkezi sinir sisteminde ve özellikle beyinde iskemi meydana geldiği ve bunun rotasyondan bağımsız olduğu literatürde gösterilmiştir (1, 11, 13, 29, 36, 43, 45). Ayrıca hipergravitenin teratojenik etkisi olduğu saptanmıştır (8). Bunların yanı sıra otonom ve immun sistem gibi sistemlerin tam olarak açıklanamamış etkilerine bağlı olarak da özellikle metabolizmayı bozabilen değişiklikler görülebilmektedir (2, 5).

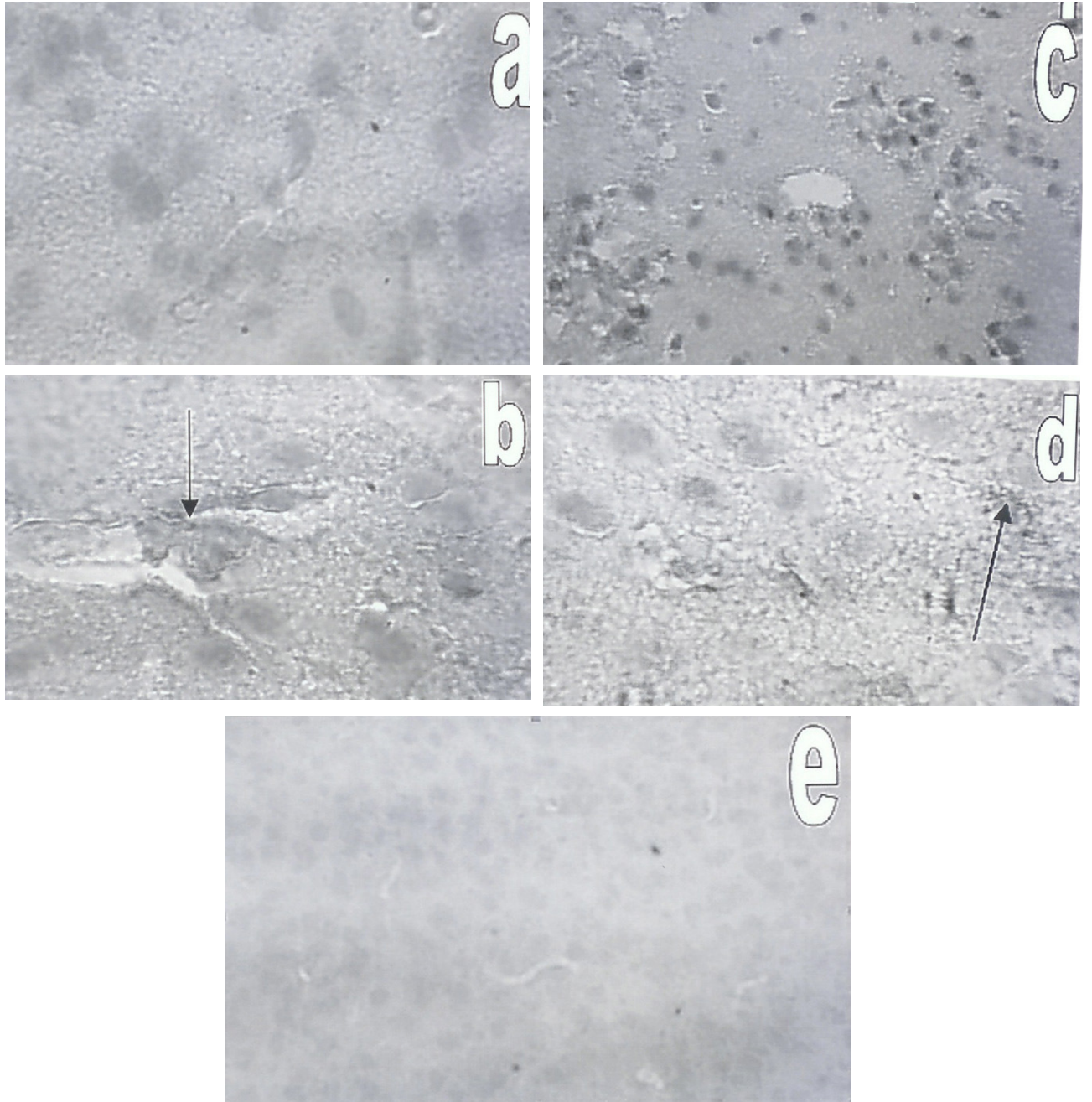
Bu amaçla, yapılan deneysel çalışmada sıçan beyinde özellikle gelişimin kritik sürecinde hem hücre davranışının hem de KBB nin hipergravite etkisi ile olası değişiklikleri araştırılmıştır.

## MATERYAL VE METOD

Deney düzeneği olarak hızı ayarlanabilir rotasyon aleti kullanıldı. Cihazın kollarının uzunluğu 144 cm. di ve uçlarında deney hayvanlarının konulduğu kafesler bulunuyordu. Rotasyon (G) grubu için 25 devir/dakika, hipergravite (2G) grubu için 36 devir/dakika dönme hızı uygulandı. Buna göre rotasyon grubu için oluşturulan merkezkaç ivmesi 9.82 m/sn<sup>2</sup>, hipergravite grubu için oluşturulan merkezkaç ivmesi ise 20.86 m/sn<sup>2</sup> (=2.08 G) olarak hesaplandı.

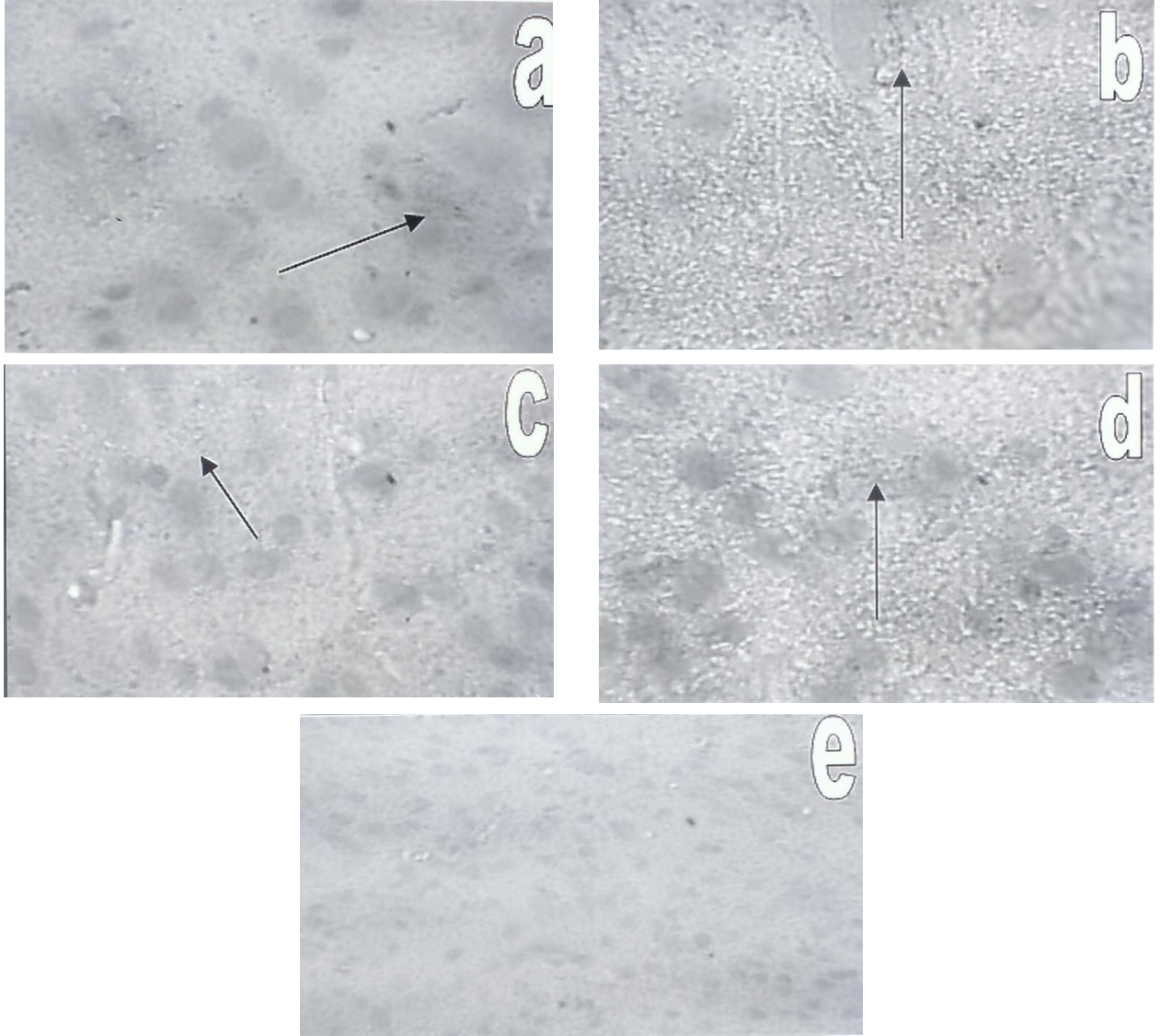
Çalışmada 90 adet yenidoğan wistar albino rat yavrusu kullanıldı. Yavru ratlar kontrol, rotasyon (G) ve hipergravite (2G) olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Bir grup kontrol olarak ayrılırken, bir grup yerçekimi ivmesine eşit rotasyona (G), diğer grup ise yerçekimi ivmesinin yaklaşık 2 katı olacak şekilde (2G) saat yönünde ve günde 6 saat süreyle rotasyona maruz bırakıldı. Her grupta 6 yavru rat olacak şekilde postnatal 3., 7., 15., 21. ve 28.günlerde yavrular eter anestezi altında %10 formalin perfüzyonu ile fikse edilip, dekapite edildi ve beyin ile medulla spinalisleri çıkarıldı. Alınan örneklerden rutin parafin blok takibi sonrası 8µ luk kesitler alındı. Kesitler immunohistokimyasal inceleme için ise polilizinli lama alındılar.

KBB için zonula occludens proteinlerinden occludin'in varlığını göstermek amacıyla anti-occludin (polyclonal rabbit anti-occludin, ZYMED) ve ZO-1 varlığını göstermek amacıyla anti-ZO-1 (polyclonal rabbit anti-ZO-1, ZYMED) ile immunohistokimya yapıldı. Sonuçlar ışık mikroskopunda (Olympus BX40F-3 stereo ışık mikroskop) değerlendirildi.



**Resim 1.** Occludin immunoreaktivitesi;

- a) Kontrol grubu 2. hafta, immunoreaktivite yok
- b) Kontrol grubu 3. hafta immunoreaktivite belirgin
- c) Hipergravite grubu 2. hafta immunoreaktivite yok
- d) Hipergravite grubu 3. hafta immunoreaktivite belirgin
- e) Negatif kontrol. (Polyclonal rabbit anti-occludin-ZYMED, x1000)



**Resim 2.** ZO-1 immunoreaktivitesi;

- a) Kontrol grubu 2. hafta, immunoreaktivite zayıf
- b) Kontrol grubu 3. hafta immunoreaktivite belirgin
- c) Hipergravite grubu 2. hafta immunoreaktivite zayıf
- d) Hipergravite grubu 3. hafta immunoreaktivite belirgin
- e) Negatif kontrol. (Polyclonal rabbit anti-ZO-1, ZYMED, x1000)

## BULGULAR

İmunohistokimyasal olarak yapılan TJ oluşumunu sağlayan proteinlerden occludin (Resim 1) ve ZO-1 (Resim 2) boyamalarından elde edilen sonuçlarda, occludin boyamasında 2.hafta zayıf, 3. hafta belirgin immunoreaktivite gözlenirken (Resim 1 c, d), ZO-1 boyamasında 2. hafta immunoreaktivite görülmemesine karşın (Resim 2 c) 3. hafta belirgin immunoreaktivite gözlemlendi (Resim 2 d). Özellikle damarsal yapıların etrafında immunoreaktivite belirgin olarak saptandı (Resim 1 b, d, Resim 2 b, d). Her iki protein boyaması sürekli bir çizgi halinde olup özellikle endotel hücrelerinin etrafında sıralandı

(Resim 1 d, Resim 2 d). Hem kontrol, hem de G ve 2G gruplarında immunoreaktivitenin derecesi ve zamanlaması bakımından fark saptanmadı (Resim 1, 2). Beyin parankimasında heterojen şekilde dağılmış nokta şeklinde boyamalar gözlemlendi ancak bunlar için de hem kontrol, hem de G ve 2G gruplarında bir farklılık göstermediği saptandı. Protein dağılımının gelişim sürecinde beklenen zamanlamaya uygun olarak ortaya çıktığı ve varlığını sürdürdüğü saptandı. Ancak her iki proteinin ortaya çıkış, dağılım ve lokalizasyon farklılığı görülmedi.

## TARTIŞMA

Çalışmamızda yenidoğan ratların merkezi sinir sistemi gelişimi üzerine rotasyon (=G) ve hipergravitenin (=2G) etkisini araştırdık. Buna göre anneleri ile birlikte kafes içinde günde 6 saat süreyle ve 4 hafta boyunca rotasyon ve hipergraviteye maruz bırakılan yenidoğan ratlarda TJ proteinlerinin ortaya çıkışında, dağılımında ve sürekliliğinde farklılık saptanmadı.

Literatürde özellikle hipergravitenin serebral iskemi ve buna bağlı KBB de yıkıma neden olduğu belirtilmektedir (1, 13, 18, 33, 36, 45). Çalışmamızda KBB oluşumunda önemli rol oynayan zonula occludens proteinlerinin varlığını gösterdik. Fakat iskeminin ve kan-beyin bariyerinin fonksiyonel oluşumunu koruyup korumadığını belirleyebilmek için kullandığımız yerçekimi şiddeti ve inceleme yöntemlerimizin yeterliliği düşünülerek, daha ileri çalışmalar gerektiğini düşündük.

Bir çalışmada zonula occludens proteinlerinin varlığının, doğrudan KBB nin geçirgenlik özelliği ile ilgili olmadığı düşünülmüş ise de (23), diğer çalışmalar ve genel kanı özellikle occludin varlığının KBB geçirgenliği ile ilgili olduğu yönündedir (15, 16, 47). Çalışmamızın sonucu olarak KBB nin böyle bir yıkımı protein düzeyinde bir değişikliğe neden olmasa da, varlığının gösterilmesi için boya diffüzyon yöntemi ile araştırılması gerekir. Burada önemli olan boya diffüzyon yöntemi ile gösterilen KBB nin yıkımında hem protein düzeyinde hem de ultrastrüktürel düzeyde değişikliğin olması için daha şiddetli bir etkinin olması gerektiğidir. Çalışmamızda ışık mikroskopik düzeyde bu tür bir değişiklik saptanmamıştır. Ancak klinik olarak deney sonrası oldukça bozulan hayvanların kısa sürede toparlanması ve adaptasyon göstermeleri, metabolik şartların çok belirgin bir etki yapmadığını düşündürmektedir. Diğer çalışmalarda hem rotasyona, hem metabolik şartlara, hem de hipergravite etkisine bağlı iskemi benzeri değişikliklerin olduğu daha ileri yöntemlerle gösterilmiştir (22, 34). Çalışmamızla arada oluşan farklar, deney düzeneğine, zamanlamaya, etkinin şiddetine ve süresine bağlı faktörlerden de kaynaklanmaktadır. Bu şartları sağlamaya yönelik çalışmalar sürdürülmektedir.

Değişen gravitenin fizyolojik değişiklikler yaptığı, organizma enerji ihtiyacını değiştirdiği, özellikle kemik, vestibuler sistem, kardiyovasküler sistem, immun sistem ve kas fizyolojisinde değişikliklere neden olduğu bilinmektedir (10, 12, 19, 27, 32, 37). Hipergravite uygulamaları vücut kitlesinde azalmaya neden olmaktadır (48). Prolaktin hormonunun memelilerde zonula occludens formasyonunu stimüle ettiği ve bunu occludin ve/veya ZO-1 düzeyinin artışı ile sağladığı gösterilmiştir (38). Diğer yandan yine literatür bilgisi olarak hipergravitenin ratlarda maternal ve fetal prolaktin hormon düzeyinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (26). Bizim çalışmamızda hormon tayini yapma imkanımız olmamakla birlikte, zonula occludens proteinlerinden hem occludin, hem de ZO-1 immunoreaktivitesinde,

hem kontrol hem de deney gruplarında farklılık gözlenmemiş olması, kullanılan metoda ve özellikle de hipergravitenin postnatal dönemde uygulanmış olmasına bağlı olabilir. Böylece yenidoğan ratların olası prolaktin eksikliğinden minimal etkilenmiş olması beklenebilir.

Hücre davranışı açısından postnatal dönem bölünmenin 6. gün, göçün 15. gün ve farklılaşmanın 28. gün pik yaptığı kritik dönemlere ayrılır. Yerçekimi hücre bölünmesini ve aksonal büyümeyi etkileyerek, hücre davranışını da etkilemektedir (4, 28, 44). Hipergravitenin hem bitki hem de hayvan hücresinde gen değişikliklerine neden olduğu belirtilmiştir (21). Hipergraviteye bağlı olarak TNF alpha, bcl-2, p 53 gibi genlerin beyin değişik bölgelerinde arttığı saptanmıştır (34, 41). Yine hipergravite ile hipokampal aktivitenin ve değiştiği bildirilmektedir (24). Çalışmamızda bu üç kritik dönemi içeren şekilde deney planlaması yapılmış ancak zaman noktaları arasında bir farklılık saptanmamıştır. Protein tanımlanmasının zamanla ilişkisi literatürdeki hem protein hem de ultrastrüktürel çalışmalarla uyumludur. TJ varlığının ve yapısal durumunun incelenmesinde önemli bir faktörde EM incelemesidir. TJ'ı oluşturan proteinler sitoplazmik yüzeyde elektro-dense görünüm verirler. Özellikle KBB nin bozulduğu beyin alanlarında bu yapının değiştiği gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmaların varlığında reseptör aktivasyonuna bağlı olarak protein düzeyinde görülemeyen değişikliklerin yapısal olarak izlenmesi hatta immunoelektron mikroskobu yapılarak bu proteinlerle yapısal durumu ilişkilendirmek mümkün olabilmektedir. Embriyonik çalışmalardan anlaşılan, protein düzeyinde olsun EM incelemesinde olsun her ikisinin varlığı tam bir bariyer fonksiyonu anlamına gelmemekte, bu aşamadan sonra fonksiyon için belli bir olgunlaşmanın varlığı gerekmektedir (3). Bizim çalışmamızda da bu tür ilişkiyi kurmak ve yapısal durumu değerlendirmek için EM incelemelerine gerek vardır. Diğer çalışmalarla değerlendirildiğinde özellikle 28. gün sonuçlarında tam olarak oluşan TJ varlığı ve fonksiyonel olarak işlev gördüğünün bilinmesi ve çalışmadan çıkan protein dağılımı deneyimizde hipergravite ve rotasyona bağlı değişikliğin oluşmadığını desteklemektedir.

Sonuç olarak literatür bilgisi ışığında ve deney şartlarımız göz önüne alınarak, G ve 2G deney gruplarında, KBB ni oluşturan zonula occludens proteinlerinin ortaya çıkış zamanlarında, dağılımlarında ve sürekliliklerinde değişiklik olmadığı düşünülmüştür. Daha sağlıklı yorumlar yapmak için moleküler ve ultrastrüktürel yöntemleri içeren ileri çalışmalar yapmak gereklidir. Önemi gittikçe artan yerçekimi değişiklikleri ile insan fizyolojisi ve osetoporosis gibi patolojik durumların ilişkisi, mekanizmaların aydınlatılması ile bir çok bilinmeyi ortaya çıkaracaktır. Bu çalışmalardan alınan sonuçlar hem uzayda yaşam kalitesi hem de hastalıkların tedavisi için hipergravitenin alternatif olmasını sağlayacaktır.



## KAYNAKLAR

1. Bagshaw RJ, Whinnery JE. Mammalian cardiovascular morphology and the maintenance of cerebral function at high Gz. *Aviat Space Environ Med* 1994 ; 65(7):666-9
2. Barone RP, Caren LD. The immune system: effects of hypergravity and hypogravity. *Aviat Space Environ Med.* 1984 ;55(11):1063-8. Review.
3. Cassella JP, Lawrenson JG, Firth JA. Development of endothelial paracellular clefts and their tight junctions in the pial microvessels of the rat. *J Neurocytol.* 1997 ; 26(8):567-75.
4. Chabbert C, Brugeaud A, Lennan G, Lehouelleur J, Sans A. Electrophysiological properties of the utricular primary transducer are modified during development under hypergravity. *Eur J Neurosci.* 2003 ;17(11):2497-500.
5. Clarac F, Vinay L, Cazalets Jr, Fady JC, Jamon M. Role of gravity in the development of posture and locomotion in the neonatal rat. *Brain Res Brain Res Rev.* 1998 ; 28(1-2):35-43. Review.
6. D'Amelio F, Wu LC, Fox RA, Daunton NG, Corcoran ML, Polyakov I. Hypergravity exposure decreases gamma-aminobutyric acid immunoreactivity in axon terminals contacting pyramidal cells in the rat somatosensory cortex: a quantitative immunocytochemical image analysis. *J Neurosci Res* 1998 15;53(2):135-42
7. Daunton NG, Tang F, Corcoran ML, Fox RA, Man SY. Chronic exposure to hypergravity affects thyrotropin-releasing hormone levels in rat brainstem and cerebellum. *Biol Signals Recept* 1998 ;7(6):337-44
8. Duke PJ, Montufar-Solis D, Daane E. Teratogenic effects of gravitational changes. *Adv Space Res.* 1994;14(8):281-7. Review.
9. Duprat AM, Husson D, Gualandris-Pariset L. Does gravity influence the early stage of the development of the nervous system in an amphibian? *Brain Res Brain Res Rev* 1998 ; 28(1-2):19-24
10. Economos AC, Miquel J, Ballard RC, Blunden M, Lindseth KA, Fleming J, Philpott DE, Oyama J. Effects of simulated increased gravity on the rate of aging of rats: implications for the rate of living theory of aging. *Arch Gerontol Geriatr.* 1982 ;1(4):349-63.
11. Florence G, Lemenn M, Desert S, Bourron F, Serra A, Bonnier R, Blanquie JP, Charbonne R, Seylaz J. Cerebral cortical blood flow in rabbits during parabolic flights (hypergravity and microgravity). *Eur J Appl Physiol* 1998 ; 77(5):469-78
12. Goldstein MA, Cheng J, Schroeter JP. The effects of increased gravity and microgravity on cardiac morphology. *Aviat Space Environ Med.* 1998 ; 69(6 Suppl):A12-6.
13. Guillaume A, Osmont D, Gaffie D, Sarron JC, Quandieu P. Effects of perfusion on the mechanical behavior of the brain exposed to hypergravity. *J Biomechanics* 1997 30(4):383-89
14. Heaps CL, Fischer MD, Hill RC. Female acceleration tolerance: effects of menstrual state and physical condition. *Aviat Space Environ Med* 1997 ; 68(6):525-30
15. Hirase T, Staddon JM, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S, Rubin LL. Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci* 1997 ;110(14):1603-13
16. Huber JD, Hau VS, Borg L, Campos CR, Egleton RD, Davis TP. Blood-brain tight junctions are altered during a 72-h exposure to lambda-carrageenan-induced inflammatory pain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 ; 283 (4): H1531-7.
17. Kniessel U, Risau W, Wolburg H. Development of blood-brain barrier tight junctions in the rat cortex. *Brain Res Dev Brain Res* 1996 ;96(1-2):229-40.
18. Kobayashi A, Miyamoto Y. In-flight cerebral oxygen status: continuous monitoring by near-infrared spectroscopy. *Aviat Space Environ Med* 2000 ;71(2):177-83
19. Krasnov IB, Alekseev EI, Loginov VI, Burkovskaia TE, Chel'naia NA. Repeated hypergravity: morphologic investigations of pituitary, thyroid, blood and bone marrow in rats. *Aviakosm Ekolog Med.* 1998;32(5):31-40.
20. Krasnov IB, Polyakov IV, Ilyina-Kakueva EI, Drobyshev VI. Morphology and histochemistry of spinal cord and soleus muscle in rats grown under hypergravity. *The Physiol* 1992 35(Suppl 1):216-7.
21. Lewis ML, Hughes-Fulford M. Regulation of heat shock protein message in Jurkat cells cultured under serum-starved and gravity-altered conditions. *J Cell Biochem.* 2000 ;77(1):127-34.
22. Li JS, Sun XQ, Wu XY, Rao ZR, Liu HL, Cao YZ. Expression of heat shock protein after +Gz exposure and its protective effects on +Gz-induced brain injury. *Space Med Med Eng.* 2002 ;15(6):391-6.
23. Lippoldt A, Jansson A, Kniessel U, Andbjør B, Andersson A, Wolburg H, Fuxe K, Haller H. Phorbol ester induced changes in tight and adherens junctions in the choroid plexus epithelium and in the ependyma. *Brain Res* 2000 ; 854(1-2):197-206.
24. Mandillo S, Del Signore A, Paggi P, Francia N, Santucci D, Mele A, Oliverio A. Effects of acute and repeated daily exposure to hypergravity on spatial learning in mice. *Neurosci Lett.* 2003 23;336(3):147-50.

25. Masseguin C, Corcoran M, Carcenac C, Daunton NG, Guell A, Verkman AS, Gabrion J. Altered gravity downregulates aquaporin-1 protein expression in choroid plexus. *J Appl Physiol* 2000 ;88(3):843-50.
26. Megory E, Oyama J. Intrauterine fetal response to hypergravity by reduction of plasma prolactin levels in the rat. *Am J Obstet Gynecol* 1985 ;153(7):811-2.
27. Picquet F, Bouet V, Canu MH, Stevens L, Mounier Y, Lacour M, Falempin M. Contractile properties and myosin expression in rats born and reared in hypergravity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002 ;282(6):R1687-95.
28. Pippia P, Meloni MA, Cossu G, Cogoli-Greuter M, Cogoli A. Cellular adhesion in neoplastic and syngeneic normal cells under altered gravitational conditions. *J Gravit Physiol*. 1998 ;5(1):P165-6.
29. Ribotta MG, Sandillon F, Privat A. Influence of hypergravity on the development of monoaminergic systems in the rat spinal cord. *Dev Brain Res* 1998 ;111(2):147-157.
30. Roerig B, Feller MB. Neurotransmitters and gap junctions in developing neural circuits. *Brain Res Rev* 2000 Apr; 32(1):86-114.
31. Ronca AE. Mammalian development in space. *Adv Space Biol Med*. 2003; 9: 217-51.
32. Sanford GL, Harris-Hooker S, Lui J, Melhado-Gardner C, Pink Y, Wallace T, Bosah FN. Influence of changes in gravity on the response of lung and vascular cells to ischemia/reperfusion in vitro. *J Gravit Physiol*. 1999 ;6(1):P27-8.
33. Santucci D, Corazzi G, Fancia N, Antonelli A, Aloe L, Alleva E. Neurobehavioral effect of hypergravity conditions in the adult mouse. *Neuroreport* 2000 20;11(5):3353-6.
34. Shahed AR, Son M, Lee JC, Werchan PM. Expression of c-fos, c-jun and HSP70 mRNA in rat brain following high acceleration stress. *J Gravit Physiol*. 1996 ;3(1):49-56.
35. Shellenberge KE, Grindeland RE, Hymer WC. Rat anterior pituitary hormone cells: responses to variable gravity. *Aviat Space Environ Med* 1988; 69(6 suppl): 37-44.
36. Son M, Shahed AR, Werchan PM, Lee JC. C-fos and HSP70 gene expression in rat brains in high gravitation-induced cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 1995 ; 200:81-84.
37. Sonnenfeld G, Koebel DA, Davis S. Effects of hypergravity on immunologic function. *Microgravity Sci Technol*. 1995 ;7(4):323-6.
38. Stelwagen K, McFadden HA, Demmer J. Prolactin alone or in combination with glucocorticoids enhances tight junction formation and expression of the tight junction protein occludin in mammary cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1999 ;156(1-2):55-61.
39. Sun X, Wu X, Li X, Jiang S, Yao Y, Zhang L. [Effect of loss of consciousness induced by repeated lower body negative pressure on blood-brain barrier permeability in rats] *Space Med Med Eng (Beijing)*. 1997 ;10(6):409-12.
40. Sun XQ, Li JS, Wu XY. The expression of heat shock protein 70 in rat brain after +Gz exposure. *J Gravit Physiol*. 2002 ;9(1):P23-4.
41. Sun XQ, Zhang LF, Wu XY, Jiang SZ. Effects of repeated brain ischemia induced by rapid lower body negative pressure on brain water and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in rats. *Aviat Space Environ Med*. 2002 ;73(1):50-3.
42. Taner D. Fonksiyonel Nöroanatomi 2. Baskı, METU PRESS, Ankara, 1999
43. Trip LD, Chelette T, Savul S, Widman RA. Female exposure to high G: effects of simulated combat sorties on cerebral and arterial O<sub>2</sub> saturation. *Aviat Space Environ Med* 1998 ;69(9):869-74.
44. Tschopp A, Cogoli A. Hypergravity promotes cell proliferation. *Experientia*. 1983 15;39(12):1323-9.
45. Werchan PM, Schadt JC, Fanton JW, Laughlin MH. Total and regional cerebral blood flow during Recovery from G-LOC. . *Aviat Space Environ Med* 1996 ;67(8):751-58.
46. Williams PL, Bannister LH, Berry MM, Collins P, Dyson M, Dussek JE, Ferguson MWJ. Gray's Anatomy 38th Edition, Churchill Livingstone, London, 1995.
47. Witt KA, Marks KS, Hom S, Davis TP. Effects of hypoxia-reoxygenation on rat blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 ; 285 (6):H2820-31.
48. Wubbels RJ, de Jong HA. Vestibular-induced behaviour of rats born and raised in hypergravity. *Brain Res Bull*. 2000 15; 52 (5): 349-56.