

İSKEMİ SONRASI KAN BEYİN BARIYERİ PERMEABİLİTESİNİN KANTİTATİF OLARAK ÖLÇÜLMESİ *

Dr. Erol TAŞDEMİROĞLU **, Dr. Zeki ŞEKERCİ ***

** Visiting Scientist-Postdoctoral Fellow University of South Alabama, College of medicine, Department of physiology, Mobile, AL 36688, USA

*** Ankara Numune Hastanesi, Nöroşirürji Kliniği

Türk Nöroşirürji Dergisi 1 : 57-64, 1989

ÖZET : Tavşanlarda transorbital yaklaşımla distal internal karotid arter, a. serebri media ve azigos anterior serebral arter veya anterior kommunikan arterler 1 saat süreyle klipe edilerek fokal serebral iskemiyi oluşturuldu. Bir saatlik iskemiye takiben klipler alınarak bir saat süreyle reperfüzyon sağlandı. Serebral kan akımı, radyoaktif mikrosferler kullanılarak her üç deney periodunda da ölçüldü. Reperfüzyon periodunda enjekte edilen Evan's Blue'nin (30 mg/kg) ektravaze olmasıyla kan beyin bariyerinin permeabilitesi miktar (%) olarak ölçüldü.

Anahtar Kelimeler : Beyin iskemisi, Kan-beyin bariyeri permeabilitesi

SUMMARY : The distal internal carotid, middle cerebral artery and azygous anterior cerebral or anterior communicating arteries were isolated and clipped for one hour period by transorbital approach in anesthetized rabbits. Following to one hour focal cerebral ischemia clips were removed and the animals allowed to reperfusion and additional one hour. Cerebral blood flow measurements were obtained using the radioactive microspheres before, during and 15 minutes after ischemia. During reperfusion animals were received 30 mg/kg Evan's Blue intravenously in 10 ml saline solution. The blood-brain-barrier disruption has been quantitatively measured by the mean of Evan's blue-protein complex extravasation.

Key Words : Blood-brain-barrier permeability, brain ischemia

GİRİŞ

Normalde intakt olan kan-beyin bariyerinin permeabl hale gelmesi sonucu oluşan vazojenik serebral ödem, serebral iskemik oklüziv hastalıklarda başlıca ölüm nedenidir (10). Geçici serebral iskemiyi sonrasındaki iskemik serebral dokunun reperfüzyonu nöronal fonksiyonun düzelmesini sağlayabildiği gibi, kan-beyin bariyerinin permeabl hale gelerek albümin gibi büyük moleküllerin de ektravaze olmasına ve vazojenik serebral ödemi arttırarak serebral iskemiyi agregasyonununa da neden olabilmektedir (5). Kan-beyin bariyerinin permeabl hale gelmesi serebral iskemiden başka kafa travmaları, santral sinir sistemi enfeksiyonları, hipertansiyon, epilepsi ve subaraknoid kanama gibi patolojik durumlarda görülebilir (6).

Normalde intakt olan kan-beyin bariyerinin permeabilite kazanması 2 aşamada oluşmaktadır (7). Bu olay üç değişik mekanizmayla izah edilmeye çalışmıştır. Bunlar; 1 - Normalde aralarında intersellüler mesafe bulunmayan serebral vasküler endotel hücrelerinin birbirlerinden ayrılarak büyük molekül-

lerin geçişine izin vermesi, 2 - Normalde söz konusu olmayan transendotelial pinositik transportun ortaya çıkması, ve 3 - iskemik infarktüs sonucu serebral vasküler endotelin harabiyeti olarak sıralanabilir.

Bir çok deneysel araştırma kan-beyin bariyerinin permeabl hale gelmesinde serbest oksijen radikallerinin rolü olduğunu ortaya koymuştur (1).

Kan-beyin bariyerinin permeabilite kazanmasındaki fizyopatolojik olayların daha iyi değerlendirilmesi ve bu permeabilitenin kantitatif (%) olarak ölçülebilmesini sağlamak amacıyla yazarlar bir deneysel model geliştirmişlerdir (16).

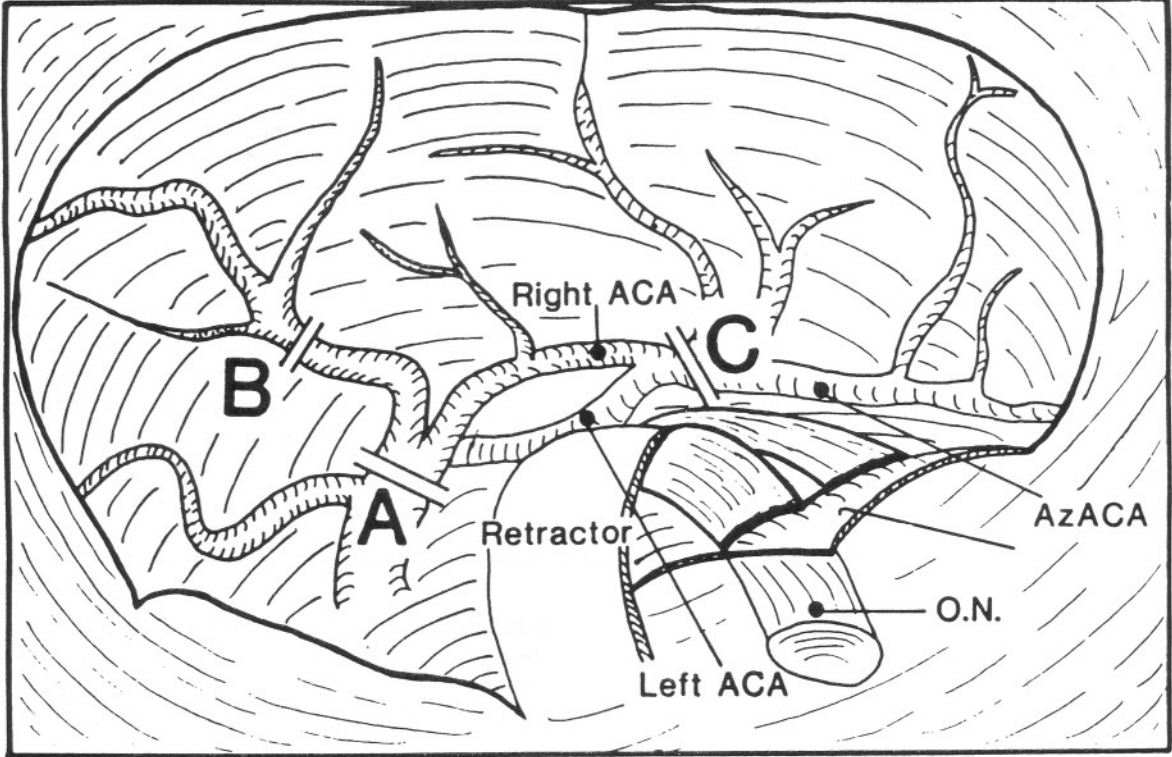
MATERYAL VE METOD;

Bu çalışma için 20 adet beyaz, her iki cinsten ağırlıkları 2.5-3.5 olan Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. Hayvanlarda 30 mg/kg ketamin i.m., 25 mg/kg klorpromazin i.m. ile premedikasyonu takiben 10 mg/kg/saat pentotal ile genel anestezi sağlandı. Trakeotomiden entübe edilen hayvanlar 0.2 mg/kg pavulon ile kürrize edilip respiratöre bağlandı. Deney boyunca respiratörle normal oda havası solutuldu.

* ICP and Brain, Injury, 7 th international Symposium'unda tebliğ edilmiştir. Ann Arbor, Michigan, ABD 20 Haziran 1988.

Kan basıncının kaydedilebilmesi, kan gazlarının ve serebral kan akımının ölçümünde kullanılacak arteriel kan numunelerinin alınabilmesi için femoral arter kateterize edildi. Bunu takiben hayvanlara 100 IU/kg heparin i.v. olarak verildi. Serebral kan akımının ölçümünde gerekli olan radyoaktif mikrosferlerin genel arteriel dolaşıma homojen olarak dağılabilmesi için sol lateral torakotomi yoluyla sol artium da kateterize edildi. Daha sonra klasik trans

orbital yaklaşımla (14) gözküresi dekompresye edilerek enükleasyon sağlandı. Hemostazı takiben temporal adale sfrenoid kanattan disseke edilerek optik foramenin postero-medialı kas dokusundan temizlendi. Temporal adale rezeke edildi. Bu safhadan sonra girişimde disseksiyon mikroskobu (Olympus x15) kullanıldı. Elektrikli drill yardımıyla optik foramenin postero-medialini ve posterior kısmını içine alacak şekilde 2x1 cm'lik kraniotomi flebi çıkarıldı. Dura (Y) şeklinde açıldı ve asıldı (Şekil-1). Bu safhada kontrol



Şekil : 1 Tavşanda transorbital yaklaşımla 3 ana serebral arterin ve klipe edildikleri noktaların şematik resmi (A=Distal internal karotid arter, B=A. Serebri media, C=Azigos anterior serebral arter)

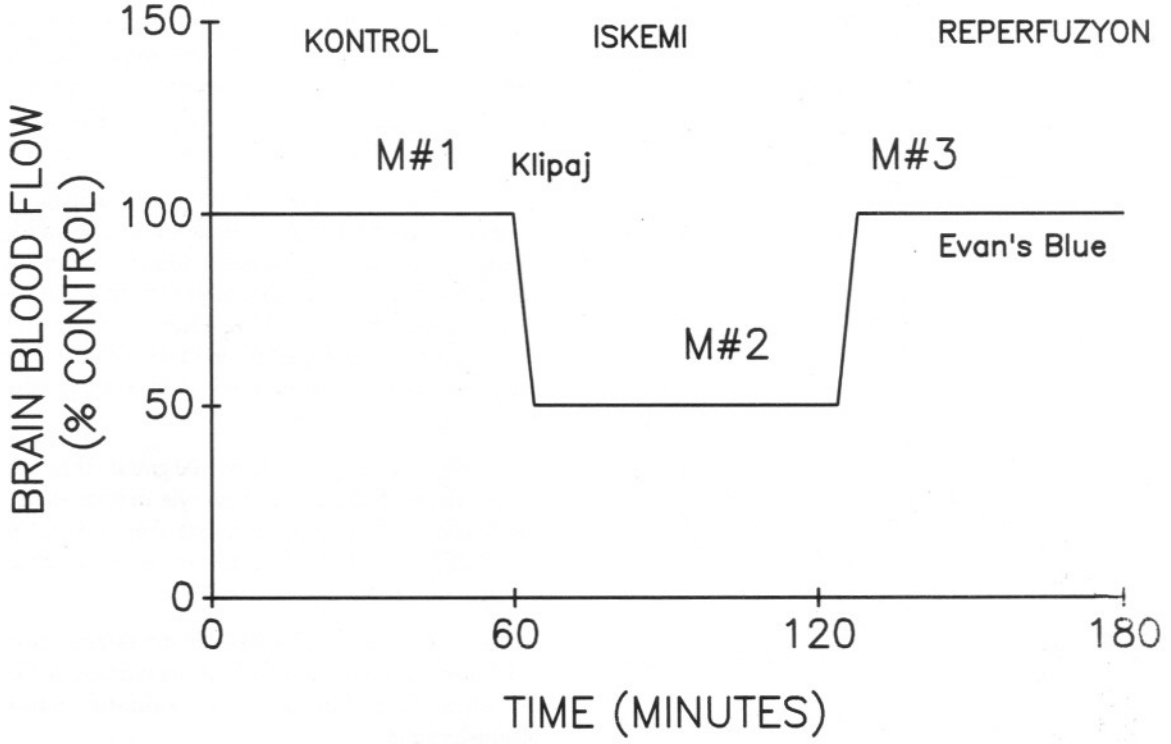
serebral kan akımı ölçümü için ilk radioaktif mikrosfer (Ce 141) intra-atrial kateter yoluyla enjekte edildi. (Şekil-2) Daha sonra distal a. karotid interna, proksimal a. serebri media, ve proksimal a. serebri anterior ekspoz edilerek disseksiyonla serbestleştirildi. Genelde % 80 oranında tavşanlarda sağ ve sol a. serebri anterior birleşerek azigos anterior serebral arteri meydana getirirler. Ancak % 20 oranında gerçek anterior kommunikan artere rastlanılır (7).

A serebri media'nın başladığı bölgede kısa sürede yeterli derecede iske mi oluşturabilmek için bu arterin klipajına ilave anterior sirkülasyondan gelen kollateral kan akımı ve karşı hemisferden gelen kollateral kan akımını minimuma indirmek gayesiyle; sırasıyla distal a. karotid interna ve azigos anterior serebral arter veya anterior kommunikan arter de kli-

pe edildi. Üç ana arterin klipajını takiben oluşturulan iskeminin 40'ıncı dakikasında serebral kan akımının ölçümü için ikinci kez radioaktif mikrosfer (Sc 46) enjekte edildi.

Bir saatlik iske mi sonucunda üç arterdeki klipler kaldırılarak iskemik serebral hemisferin reperfüzyonu sağlandı. Reperfüzyon periodunun 15'inci dakikasında tekrar serebral kan akımının ölçümü için 3'üncü ve son radioaktif mikrosfer enjeksiyonu (Sr 85) uygulandı. Son mikrosfer enjeksiyonunu takiben 30 mg/kg Evan's Blue 10 cc izotonik serum içinde çözüldükten sonra i.v. olarak enjekte edildi. Evan's Blue bu konsantrasyonda tamamen albümine bağlanır (13).

Evan's Blue enjeksiyonunu takiben 1 saat sonra hayvanlar yüksek doz pentobarbital (65 mg/kg) ile öldürülerek beyinleri ve böbrekleri çıkartıldı. Beyinler



Şekil : 2 Tüm deney periodlarının şematik olarak gösterilmesi

% 10'luk formolle 48 saat süreyle tespit edildikten sonra dondurularak 50 mikronluk ve 500 mikronluk kesitler elde edildi. Kesitler apikalden (verteks) bazale (Kafa kaidesine) doğru rostral (apikal), medial ve bazal olmak üzere üç makroskopik anatomik segmente bölündü. 50 mikronluk kesitler kan-beyin bariyerinin permeabilitesini ölçmek için, 500 mikronluk kesitlerse serebral kan akımının hesaplanması için kullanıldı.

Serebral kan akımının ölçümü;

Serebral kan akımı referans organ (böbrekler) tekniğiyle hesaplandı (9). Üç ayrı cins radyoaktif mikrosfer (Ce 141, Sc 46, Sr 85) kullanılarak iskemi öncesi, iskemi ve reperfüzyon periodlarında serebral kan akımı hesaplandı. İnta-atrial olarak enjekte edilen radyoaktif mikrosferin (1 cc=10 mci) sistemik arteriel sirkülasyona homojen olarak dağılıp dağılmadığını kontrol için mikrosfer enjeksiyonuyla aynı anda infüzyon pompası kullanılarak femoral arterden arteriel kan numunesi alındı. Arteriel kan numunesinin alınması her mikrosfer enjeksiyonunu takiben tekrarlandı. Daha sonra doku örnekleri (beyin, referans organ böbrek) ve arteriel kan numunelerinin radyo-

aktiviteleri kullanılan her bir mikrosfer için ayrı ayrı gamma Counter'de ölçülerek serebral ve böbrek kan akımı değerleri aşağıdaki formül yardımıyla her üç deney periodu için de hesaplandı.

$$Q_t = R_t \times Q_{ref} / R_{ref}$$

Q_t : Doku örneği (beyin, böbrek vs.) kan akımı gr/ml/dak.

R_t : Dokunun radyoaktivitesi

Q_{ref} : Arteriel kan numunesinin damardan çekiliş hızı (cc/dak) R_{ref} : Arteriel kan örneğinin radyoaktivitesi.

Kan Beyin-Bariyerinin Permeabilitesini Ölçümü;

50 mikronluk slaytlar hem normal ışık mikroskopunda, hem de mikrospektroflorometrik mikroskopta bakılarak değerlendirildi.

Verilen Evan's Blue tamamen albümine bağlandığı için ekstravaze olan albümin çıplak gözle bakıldığında dokuyu mavi renge boyar. Maviye boyanan doku iskeminin olduğu ve buna bağlı olarak kan beyin bariyerinin permeabl hale geldiğini gösterir. 50 mikronluk slaytlar mikrospektroflorometrik mikros-

koba yerleştirildikten sonra mikroskobun ışık kaynağında bu 50 mikronluk doku kesitlerine dalga boyu 530-560 nanometre olan ışınlar gönderilir. Bu dalga boyundaki ışın Evan's Blue protein kompleksiyle karşılaşınca bu kompleksi uyarır. Uyarılan Evan's Blue protein kompleksiye 580 nanometre dalga boyunda ışın yayar (4). Bu dalga boyundaki ışında florometri ile ölçülerek ekstravaze olan albümin Evan's Blue kompleksi miktar olarak ölçülür. İskemik hemisferin ekstravaze olan Evan's Blue miktarı intakt hemisferin ekstravaze olan Evan's Blue miktarına oranlanarak ekstravaze olan Evan's Blue protein kompleksi miktarı (%) olarak hesaplanır.

Sonuçlar;

Üç Majör serebral arterin 1 saat süreyle klipajı sonucu elde edilen fokal iskemide iskemik hemisferin kan akımı miktarı iskemik periyotta normalin % 40'ına kadar düşmüştür. (Şekil : 3 ve 4). Ayrıca reperfüzyon süresince serebral kan akımı klipaj öncesi değerlerini aşmış olup dokuda post-iskemik erken serebral hiperemi gözlenmiştir. (Şekil : 3 ve 4).

Bu deneysel model kullanılarak serebral iske mi sonucu permeabilite kazanan kan beyin bariyerinin protein gibi büyük moleküllere karşı geçirgenliği % miktar olarak ölçülmüştür (Şekil : 5). Özellikle rost-ral (apital) segmentte protein ekstravazasyonunun az olması bu segmentin iske mi sırasında da iyi kollateral sirkülasyonu olduğuna bağlanmıştır. Deney süresince her üç periyotta da arteriel kan basıncı önemli derecede değişmemiştir (Şekil : 6).

Ayrıca deney süresince her üç zaman periyodunda da böbrek kan akımının önemli ölçüde değişmesi hem radyoaktif mikrosferlerin homojen olarak dağıldığını hem de elde edilen doku kan akımı ölçümlerinin güvenilir olduğunu göstermiştir (Şekil : 7).

İskemik hemisferde kan beyin bariyerinin bozulması sonucunda ekstravaze olan albümin Evan's Blue kompleksinin nöronlar tarafından alındığı (Şekil : 8), halbuki intakt hemisferde ise Evan's Blue protein kompleksinin serebral kapillerle hapsediği, yani ekstravaze olmadığı gösterilmiştir (Şekil : 9).

TARTIŞMA

Albümine bağlanan Evan's Blue, 78 angström çapında bir molekül olup, normalde bir kaç angström olan serebral kapiller endotelial mesafeyi geçemez (13). Ancak normal kan beyin bariyerinden yoksun olan organlarda (area postrema, lamina terminalis, infundibulum, nörohipofiz vs.) Evan's Blue protein kompleksi ekstravaze olarak bu dokuları mavije boyar (8,12).

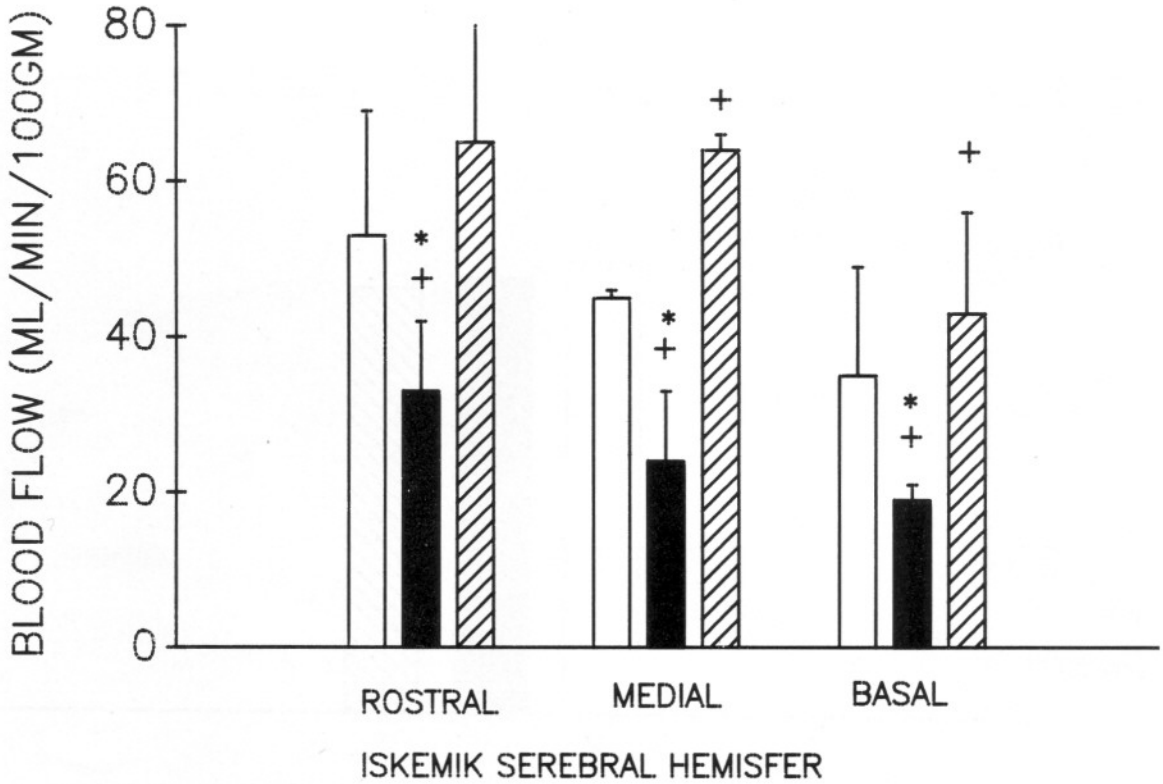
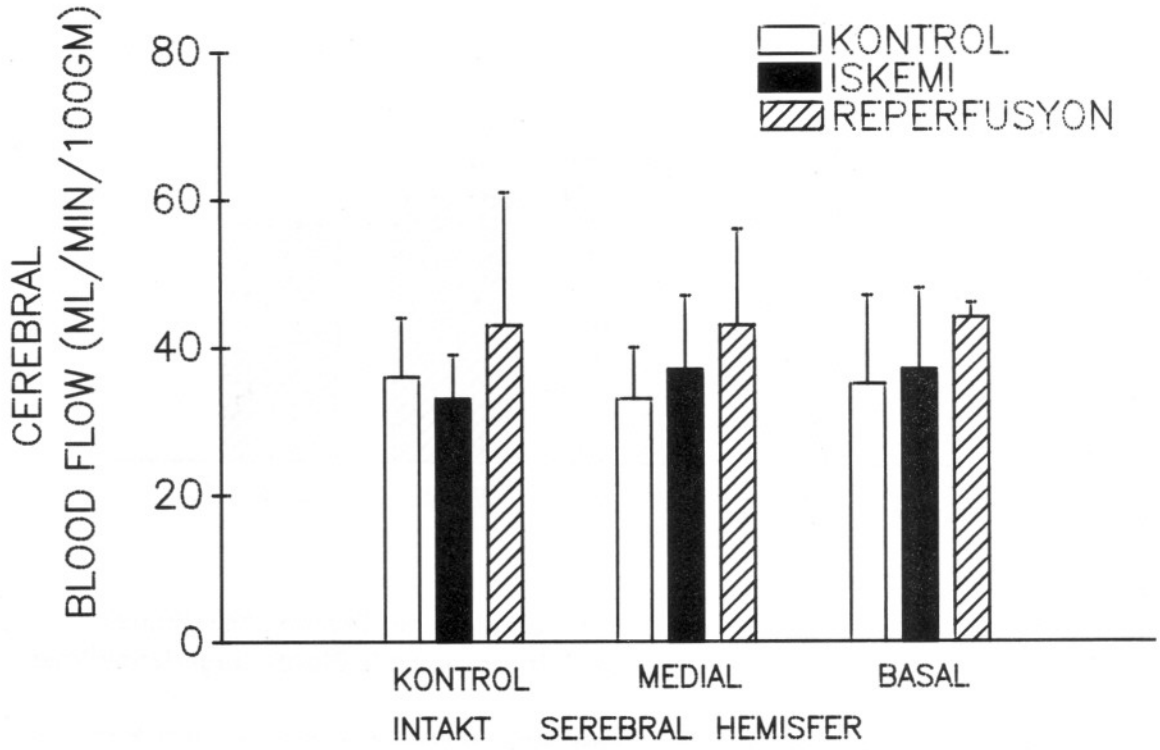
Bir saat süreyle 3 ana serebral arterin klipajı sonucu elde edilen fokal serebral iske mi kan beyin bariyerinin bozulmasına sebep olmuştur. Evvelce kullanılan deneysel modellerde minimum 4 saat süreyle a. serebri media'nın klipse edilmesi ve bunu takiben 2 saat süreyle reperfüzyon sağlandıktan sonra kan beyin bariyeri büyük moleküllere karşı permeabl hale gelmiştir (3, 11).

Ancak belirtildiği gibi, 12 ml/100 gr/dak'lık serebral kan akımı 2 saatten fazla süreyle devam ederse serebral infarktüse neden olmakta iken; 6-8 ml/100 gr/dak'lık miktar 30-60 dakika süreyle devam ettiği takdirde infarktüse neden olur (10).

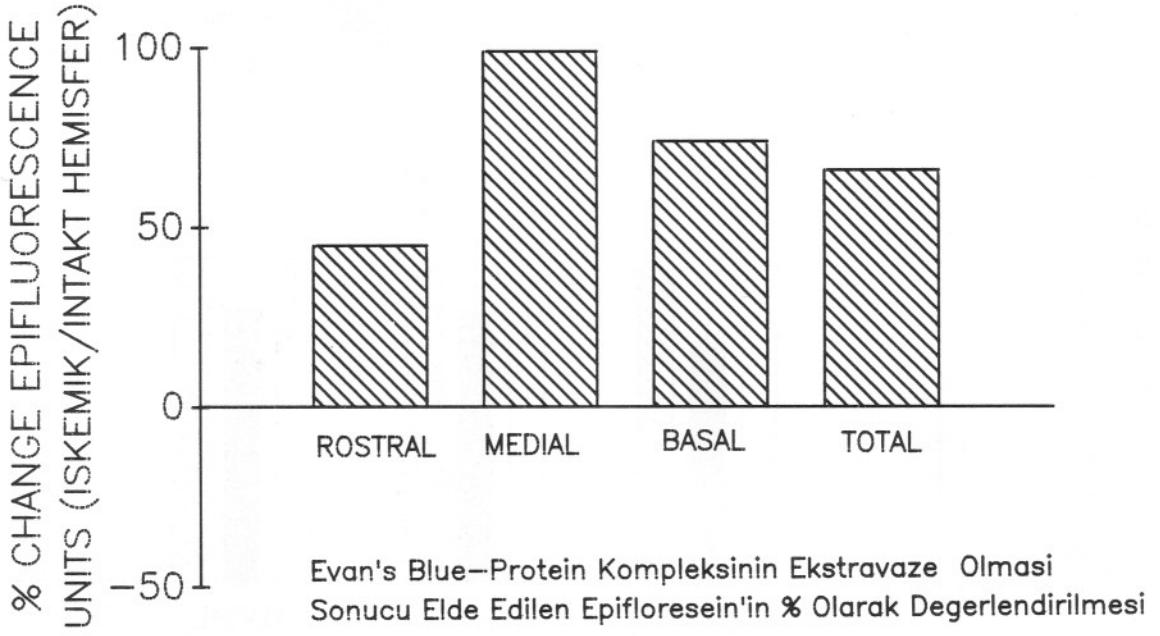
Laurent J.P. ve ark., köpeklerde intrakranial arteriel oklüzyonla serebral infarktüs oluşturmuş ve bunu ultraviyole floresansı ile kalitatif olarak ölçmüşlerdir (8).

Normalde intakt olan kan-beyin bariyerinin serebral iske mi sonrası büyük moleküllere karşı permeabl hale gelmesinde serbest oksijen radikallerinin önemli rolü olduğu gösterilmiştir (1).

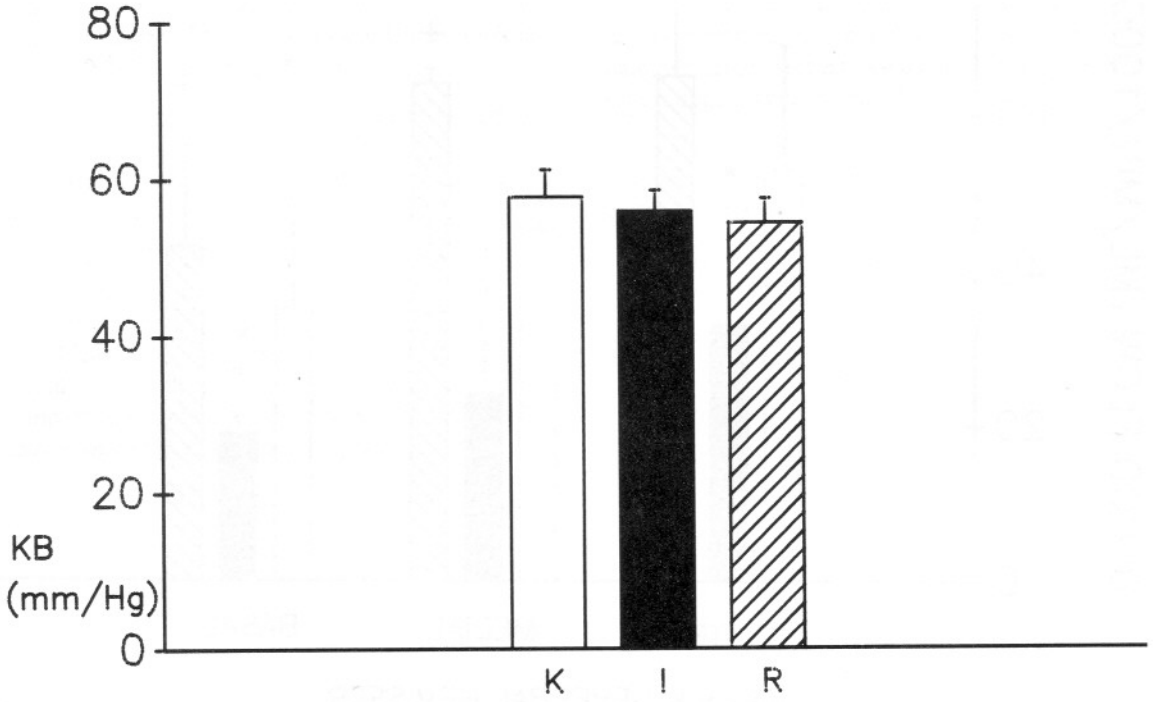
Bu model, çeşitli ilaçların iske mi sonrası bozulan kan-beyin bariyeri üzerindeki koruyucu etkilerini değerlendirilmede kullanılmıştır (2,15).



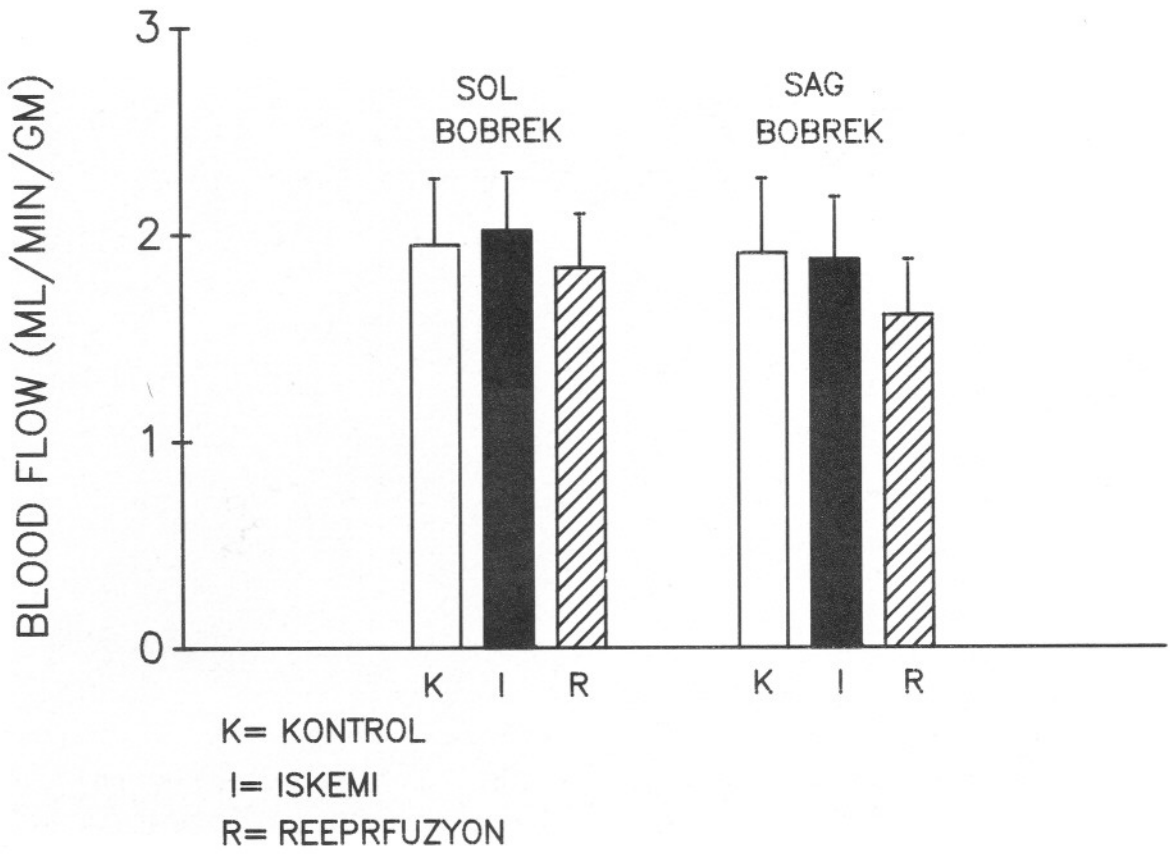
Şekil : 3 ve 4. İntakt ve iskemik serebral hemisferin deney süresince her üç zaman periodundaki kan akımı değerleri (ml/100 gr/dak) + işaretli kontrol dönemindeki kan akımının iskemik ve reperfüzyon dönemindeki değerlerden istatistiki olarak önemli farklı olduğunu * işareti ise deney periodları arasındaki kan akımı değerlerinin istatistiki olarak önemli derecede farklı olduğunu göstermektedir (p 0.05)



Şekil : 5 Ekstravaze olan Evan's Blue-protein kompleksinin % 10 olarak ölçümü. Değerlendirme iskemik ve intakt hemisferlerinin birbirine oranlanmasıyla yapılmıştır.



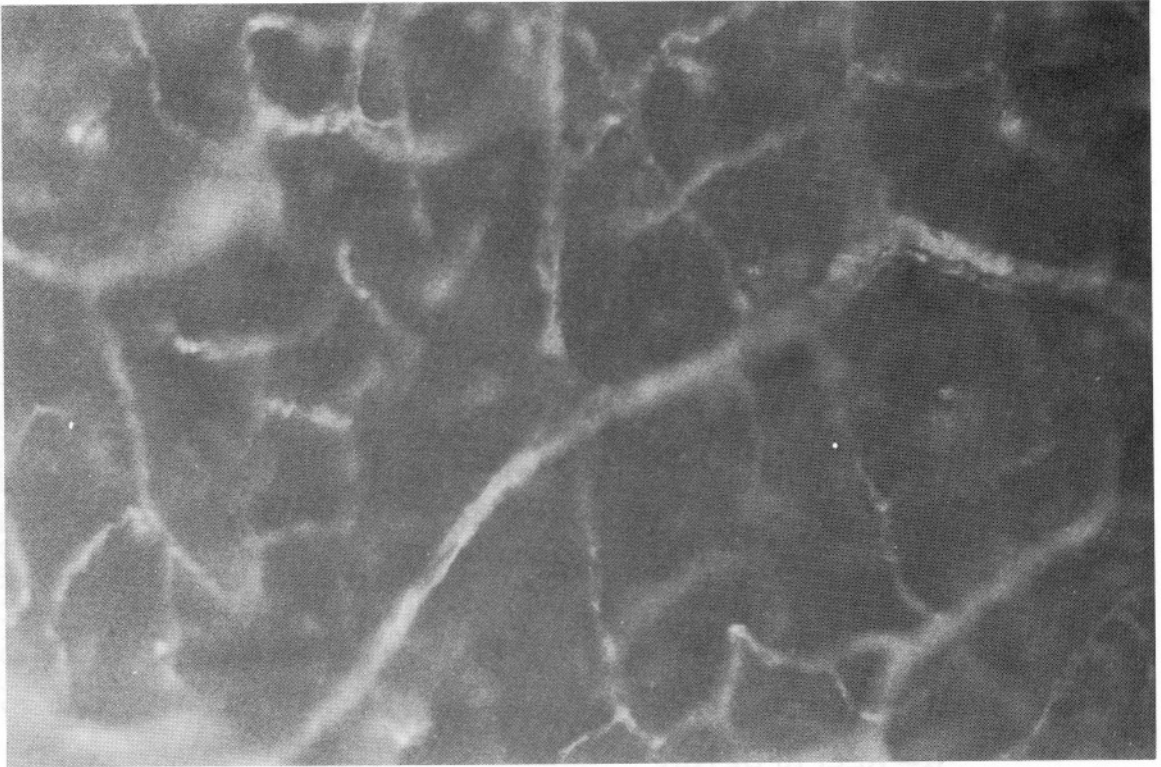
Şekil : 6 Deney süresince her 3 periyoddaki kan basıncı (mm/Hg)



Şekil : 7 Deney süresince her üç periyodaki böbrek kan akımı miktarları (ml/100 gr/dak).



Şekli : 8 İskemik serebral hemisferde ekstravaze olan Evan's Blue'nun nöronlar tarafından tutulması (225x)



Şekil : 9 İntakt serebral hemisferde Evan's Blue'nun serebral kapillerde hapsoldüğü ve ekstravaze olmadığı görülmektedir (225x).

KAYNAKLAR

1. Chan PH, Schidley JW, Fishman RA, Longer SM: Brain injury edema and vascular permeability changes induced by oxygen-derived free radicals. *Neurology*, 34:315-320, 1984.
2. Christenberry PD, Taşdemiroğlu E, Ardell JL, Chronister RB, Taylor AE: Ischemia-reperfusion injury in the rabbit brain: Effects of barbiturate and chlorpromazine anesthesia. *FASEB Journal*, II:A1520, 1988.
3. Garcia JH: Experimental ischemic stroke. *Stroke*, 15:5-4, 1984.
4. Gottesfeld Z, Garcia CJ, Chronister RB: Perinatal, not adult, hypothyroidism suppresses dopaminergic axon sprouting in the deafferented olfactory tubercle of the adult rat. *J Neurol Sci* 18:568-575, 1987.
5. Iannotti F, Hoff JT: Ischemic brain edema with and without reperfusion: an experimental study in gerbils. *Stroke*, 14:562-567, 1983.
6. Kontos HA: Oxygen radicals in cerebral vascular injury. *Circ Res*, 57:508-516, 1985.
7. Kuroiwa T, Ting P, Martinez H, et al: The biphasic opening of the Blood-Brain barrier to proteins following temporary middle cerebral artery occlusion. *Acta Neuropathol (Berl)*, 68:122-129, 1985.
8. Laurent JP, Lawner P, Simone FA, et al: Qualitative measurement of cerebral infarction using ultraviolet fluorescence. *Burg Neurol*, 17:320-324, 1982.
9. Lifson N: Use of microspheres to measure intraorgan distribution of blood flow in the splenic circulation. in Granger DN, Bulkeley GB, pp177-194, 1981.
10. Lord RSA (ed): *Surgery of occlusive cerebrovascular disease*, ST Louis, Toronto, Princeton, The C V Mosby Company, pp:67-84, 1986.
11. Olsson Y, Crowell RM, Klatzo I: The Blood-brain-Barrier to protein tracers in focal cerebral ischemia and infarction caused by occlusion of the middle cerebral artery. *Acta Neuropathol (Berl)*, 18:89-102, 1971.
12. Pollay M, Roberts PA: Blood-brain barrier: A definition of normal and altered function. *Neurosurgery*, 6:675-685, 1980.
13. Rappaport SI, Hori M, Klatzo I: Testing a hypothesis for osmotic opening of the blood brain barrier. *Am J Physiol*, 223:321-331, 1972.
14. Sundt TM, Jr, Waltz AG: Experimental cerebral infarction: Retro-orbital, extradural approach for occluding the middle cerebral artery. *Proc Mayo Clin*, 41:159-168, 1966.
15. Taşdemiroğlu E, Christenberry PD, Ardell JL, et al: Ischemia-reperfusion injury in the rabbit brain; Effect of superoxide dismutase. *FASEB Journal*, II:A1520, 1988.
16. Taşdemiroğlu E, Christenberry PD, Ardell JL, et al: Ischemia-reperfusion injury in the rabbit brain. in Hoff JT, Betl Al (eds): *ICP VII*, Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, in press 1989.
17. Yamamoto K, Yashimino T, Yanagihara T: Cerebral ischemia in rabbit: A new experimental model with immunohistochemical investigation. *J Cereb Blood Flow Met*, 5:529-586, 1985.