

# Intraserebral Fötal Santral Sinir Sistemi Greftlerinde Kan Beyin Bariyeri ve Endotelial Bazal Laminanın Gelişim Basamaklarının Mikroanatomik İncelemesi

## A Microanatomical Evaluation of the Blood Brain Barrier and Endothelial Basal Laminae in Intracerebral Foetal Central Nervous System Grafts

### ÖZ

**AMAÇ:** Santral sinir sisteminin dejeneratif hastalıklarında ve travmalarında nöronal greftler ve kök hücre kullanımı deneysel ve klinik alanlarda giderek artan uygulama alanları bulmaktadır. Kök hücre veya nöral doku transplantasyonunu takiben doku çevresinde bozulmuş olan kan beyin bariyerinin yeniden kurulması, transplante edilen dokunun fonksiyonlarını sürdürmesi için şarttır. Bu çalışmada kan beyin bariyerinin kuruluş aşamaları ve özel olarak endotelial bazal laminanın gelişim evreleri mikroanatomik olarak incelenmiştir.

**YÖNTEMLER:** Çalışma için 46 albino rat kullanılmıştır. Ratların korpus kallosumuna rat embriyolarından elde edilen fötal santral sinir sistemi dokularından hazırlanmış hücre süspansiyon grefti sterotaksik yöntemle uygulanmış ve ratlar belli aralıklarla sakrifiye edilerek ışık ve elektronmikroskopik olarak incelenmiştir.

**BULGULAR:** Yapılan immunhistokimyasal boyamalarla kan beyin bariyerindeki endotelial sıkı bağlantılar ve HRP sızdırmazlığı 20. Gün civarında tamamlandığı halde bazal laminanın yaklaşık 28. Gün civarında kesintisiz hal aldığı ve 30. Günde de normal kalınlığına ulaştığı görüldü.

**SONUÇ:** Kan beyin bariyerinin bir komponenti olan endotelial bazal laminanın fonksiyonları ve gelişimi üzerinde yapılmış çok az çalışma vardır. Bariyerinin morfolojik olarak en geç gelişen kısmı bazal laminadır. Oluşumu sırasında, başlarda kesintili bir morfoloji gösterirken gelişimini tamamladıkça kesintisiz hal almakta ve en sonunda da normal kalınlığına ulaşmaktadır.

**ANAHTAR SÖZCÜKLER:** kan beyin bariyeri, santral sinir sistemi grefti, nöral greftleme, bazal lamina, endotelial sıkı bağlantılar

### ABSTRACT

**OBJECTIVE:** Neural grafting or stem cell transplantation to the central nervous system has become popular in clinical and experimental studies. After the transplantation, restoration of the blood brain barrier is necessary for graft survival. In our study the function and microanatomic structure of the blood brain barrier were evaluated.

**METHODS:** Forty-six albino rats were utilized in this study. Cell suspension grafts prepared from rat fetuses were given into the corpus callosum of albino rats. Then rats were sacrificed on certain days and light microscopy and electron microscopic evaluations were performed.

**RESULTS:** Although endothelial tight junctions and HRP impermeability were seen at day 20, thickness of basal laminae did not reach the original level. Basal laminae thickness reached normal levels at day 30.

**CONCLUSION:** The results of this study demonstrated that basal laminae are morphologically the latest generating part of the blood brain barrier complex. Contribution of the basal laminae to the impermeability of the blood brain barrier is not clear at the moment. More studies are required to disclose the function of basal laminae.

**KEY WORDS:** Blood brain barrier, basal laminae, cell suspension graft, neural grafting, tight junctions

Atilla AKBAY<sup>1</sup>

Nejat AKALAN<sup>2</sup>

Türkan ERBENGI<sup>3</sup>

Aykut ERBENGI<sup>4</sup>

1,2,4 Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Nöroşirürji Anabilim Dalı, Ankara

3 İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Histoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Geliş Tarihi: 26.01.2005

Kabul Tarihi: 02.02.2005

Yazışma adresi:

**Atilla AKBAY**

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Nöroşirürji Anabilim Dalı, 06500

Sıhhiye-Ankara

E-posta: akbayatilland@yahoo.com

## GİRİŞ

Parkinson, Alzheimer gibi dejeneratif hastalıkların tedavisinde veya santral sinir sisteminde destrüksiyona yol açan travma veya iskemik hastalık sekellerinin düzeltilmesine yönelik olarak kök hücre transplantasyonları ve doku greftlerinin kullanımı deneysel ve klinik alanlarda giderek artan sayılarda uygulanmaya başlamıştır (4,8,14). Yaklaşık son 20 yıldır nöral doku greftlerine santral sinir sisteminin yanıtı ve greftin konak tarafından kabulü veya reddi üzerinde etkili olan faktörler incelenmiştir. Elde edilen verilerin ışığı altında, greftin konak dokuyla bütünleşmesinin, greft içi ve çevresinde kan beyin bariyerinin tam olarak ortaya çıkması ve fonksiyonlarını yerine getirmesi ile tamamlanmış olduğu kabul edilmektedir (2, 22). Kan beyin bariyeri; endotelial sıkı bağlantılar (endotelial tight junctions), bazal lamina ve astrositik ayaklı yapılardan (astrocytic foot processes) oluşan kompleks bir bariyerdir. Bu bariyer intravasküler ve ekstrasvasküler alanlar arasında tam bir yalıtımı sağlar. Santral sinir sistemi hücrelerinin gerçek fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için bu bariyere gereksinim vardır. Bugüne kadar endotelial sıkı bağlantılar ve astrositik ayaklı çıkıntılar üzerinde ayrıntılı çalışmalar yapılmıştır ancak bazal laminanın yapısı ve gelişim basamaklarını tam olarak tanımlayan bir çalışma yoktur. Bazal lamina endotel etrafında devamlılık gösteren yapısı nedeniyle kan beyin bariyerinin geçirgenliğinde önemli fonksiyonlara sahip olabilir.

Bu çalışmamızda ratların korpus kallosumuna yerleştirilen embriyonik kaynaklı hücre süspansiyon greftlerinin içerisinde ve çevresinde kan beyin bariyerinin oluşumu ve bugüne kadar yapılan çalışmalarda çok az üzerinde durulan bir konu olan bazal lamina'nın gelişim basamaklarını ışık ve elektronmikroskopisi yardımıyla inceledik.

## GEREÇLER ve YÖNTEM

Deneylerde Hacettepe Üniversitesi Deney hayvanları laboratuvarlarında yetiştirilmiş, yaklaşık ağırlıkları 250 gr olan albino ratlar kullanıldı. Fötal greftler gestasyonel yaşı 14-16 gün olan embriyolardan elde edildi.

a) *Fötal beyin dokusu diseksiyonu ve hücre süspansiyonlarının hazırlanması*

Fötal greftler Schmidt ve arkadaşları tarafından daha önce tanımlanan yolla elde edildi (20). Bu amaçla 14-16. gestasyonel günde, uterus vertikal çapı 12-16mm olan gebe ratlar kullanıldı. İntraperitoneal Ketamin/Ksilazin anestezisi (90/10

mg/kg) altında ve steril şartlarda sezaryen insizyonu yardımıyla fötüsler uterus içerisinden çıkartılıp dekapite edildi. Elde edilen materyal daha sonraki işleme kadar Hank's buffered saline solüsyonu (HBSS) içerisine konuldu. Toplanan materyalden, cerrahi mikroskop altında beyin disseke edilerek üzerindeki dura, araknoid, pia mater ve damarlarından temizlendi. Ön beyin en az cerrahi travma oluşturacak şekilde çıkartılarak soğuk HBSS içerisine konuldu. Herbir gebe rattan elde edilen 7-8 embriyonun ön beyin dokuları HBSS içerisinde toplanarak en geç 30 dakika içerisinde bistüri ile küçük parçalara ayrıldı ve beyin başına 30µL olacak şekilde önceden hazırlanmış tripsin solüsyonu içeren steril Eppendorf tüpü içinde 37 °C'da 20 dakika boyunca enkübe edildi. Daha sonra tüp içerisinde bulunan tripsin solüsyonu steril enjektörle çekilip yerine HBSS konularak dokular yıkandı. Yıkama işlemi 4 kez tekrarlandı. En son beyin başına 10 µL HBSS konularak steril pastör pipeti ile tritüraj yapıldı. Yaklaşık 20-25 tritüraj sonrası hücreler birbirinden ayrılarak beyaz bir sıvı elde edildi. Süspansiyondan yapılan hücre sayımında 2000-3000 hücre/µL yoğunlukta olduğu saptandı. Hücre süspansiyonu kullanılmaya kadar oda ısısında tutuldu ve her 30 dakikada bir 2-3 kez tritüre edilerek hücrelerin çökmesi engellendi.

### b) *Greftleme*

Erişkin erkek ratlar uygun dozdaki ketamin ksilazin anestezisi altında uyutuldu, standart alan temizliğini takiben sterotaksik çerçeveye yerleştirildi. Vertikal orta hat insizyonu yapıldı ve bregmanın 2mm anterioru ve orta hattın 2mm lateralinden bir burr hole açıldı. Steril şartlarda hazırlanan hücre süspansiyon grefti 10µL, 28G' lik steril Hamilton enjektörüne çekilerek mikromanipulator yardımıyla korteks yüzeyinden 3mm derine ve yaklaşık 3µL/dakika hızla verildi. İşlem, orta hattın karşı tarafında da aynı koordinatlara tekrarlandı. İşlemleri takiben cilt 3/0 ipek ile tek tabaka kapatıldı, insizyon üzerine antibiyotikli pomat sürüldü.

Toplam 50 albino erkek rata yukarıda anlatılan greftleme işlemi yapıldı. Postoperatif dönemde 4 rat ilk 24 saat içerisinde öldü. Yapılan otopsilerde kanama, abse vb. intraserebral bir patoloji saptanmadı. Ölen ratların üçüne işlemler sırasında uyandıkları için ek doz anestezik madde uygulanmış olduğundan, ölümlerin anestezik maddeye bağlı olabileceği düşünüldü. Transplantasyon yapılmış 46 rat 4 gruba ayrıldı. (Tablo 1)de ratların gruplara dağılımı gösterilmiştir.

**Tablo I:** Ratların gruplara dağılımı ve günlere göre incelemeye alınan rat sayıları

Günler	1	2	3	7	10	11	13	15	17	18	20	21	23	26	28	30
İncelenen Rat Sayısı	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Grup No	1. Grup			2. Grup			3. Grup			4. Grup						

### c) Perfüzyon ve Kesitlerin alınması

HRP histokimyasal incelemesi yapılacak ratlara daha önce belirtilen dozlarda ketamin ksilazin anestezisi verilip, sağ femoral ven kateterize edildi ve 150 mg/kg dozda HRP süspansiyonu (Sigma Tıp IV) verilerek 30 dakika dolaşımda kalması sağlandı.

Perfüzyon amacıyla anestezisi altındaki ratlara torakotomi yapılarak 18G venöz kateter kalp apeksinden girilip aorta'ya yerleştirildi. Takiben sağ auricula kesildi ve kateter içerisinden 500mm. H<sub>2</sub>O basıncı altında 0,1M fosfat buffer solusyonu (PBS) verilerek, sağ auricula dan berrak sıvı gelinceye kadar perfüzyon yapıldı (yaklaşık 200-250 cc). Ardından aynı basınçta %1,25 gluteraldehit ve %1 paraformaldehit karışımından 200cc. verilerek doku fiksasyonu yapıldı. Dolaşımdaki fazla fiksator solusyonu PBS verilerek yıkandı. Bu işlemlerden sonra ratlar dekapite edilerek kraniektomi yapıldı ve serebrum çıkartıldı. Serebral doku üzerindeki dura ve araknoid temizlenerek 0,1M PBS içerisinde +4°C'da bir gece bekletildi.

HRP incelemesi yapılacak ratların perfüze edilmiş ve fiksasyonu yapılmış olan serebrumları Oxford Vibratom'a yerleştirildi, vibrasyon sıklığı 6-7, bıçak hızı 4-5 olacak şekilde 50mM'lik kesitler alındı. Hücre sayımı ve diğer boyamalar için 50mM'lik frozen kesitler alındı.

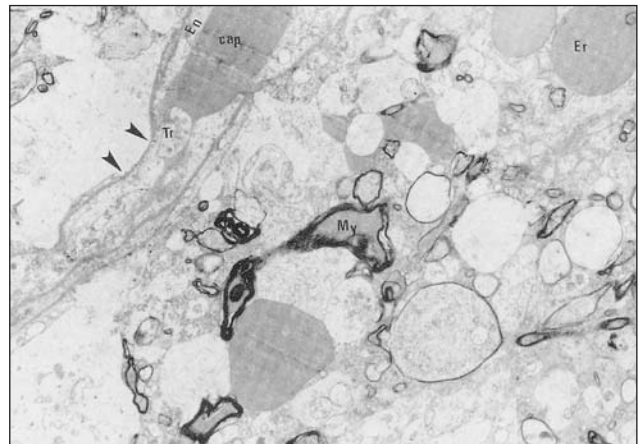
### d) Histolojik İnceleme

Alınan kesitlerde nissl, retikülün ve HE boyamaları ile genel histolojik yapı, HRP histolojisi (tetrametilbenzidin yöntemi) yardımıyla kan beyin bariyerinin sızdırmazlığı, elektron mikroskopi çalışmalarıyla kan beyin bariyerinin ultrastrüktürel yapısı araştırıldı. Hücre sayımlarında korpus kallozumun tam olarak görülebildiği bir kesitte nukleusu seçilebilen hücreler sayılarak yapıldı.

## BULGULAR

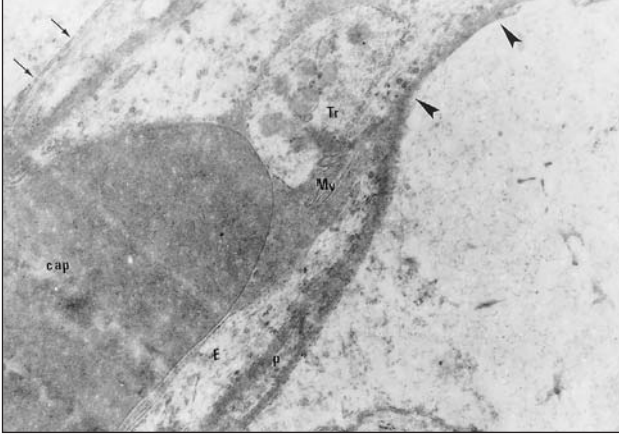
Transplantasyon sonrası 24 ve 48.saatlerde alınan kesitlerde greft dokusunun korpus kallozum içerisinde çevreye dağılmaksızın bir hacim oluşturduğu görülmekteydi. Aynı bölgenin HRP ile histokimyasal boyamalarında greft ve çevre beyin dokusunda bariyerin bozulduğu ve damar dışı

oksidasyon reaksiyonunun olduğu görüldü. İlk 10 günlük dönemi kapsayan 1.grupta hücre sayıları ortalaması 154,6±59,67 bulundu. Ortalamayı yükselten değerler ilk iki güne ait yüksek hücre sayılarıydı. İlk 48 saatlik döneme ait hücre sayımlarının ortalaması 232,5±44,25 bulundu. Üçüncü günde ışık mikroskopisinde greft çevresinde makrofaj infiltrasyonu görülmüyordu. Dördüncü günde yapılan EM incelemesinde endotelial sıkı kenetlenmeler (tight junctions) ve bazal lamina hiç görülmüyordu. X20.000 büyütmede transendotelial veziküller ve eksternal plazmalemmal katlantılar dikkati çekiyordu (Şekil 1,2). Yedinci günde retikülün boyaması ile greft çevresinden içine doğru uzanan yeni kapiller damar yapıları görüldü. Onuncu günde yapılan HRP histokimyasal incelemesinde greft çevresinde hala damar dışına sızıntıların olduğu görülmekteydi. Onüçüncü günde yapılan HRP histokimyasal incelemelerinde sızıntıların belirgin olarak azaldığı ama hala yer yer odaklar şeklinde bulunduğu göze çarpıyordu (Şekil 3). Onyedinci günde yapılan HRP histokimyasal incelemelerinde kan beyin bariyerinin birkaç küçük alan dışında hemen hemen tamamlandığı görüldü. Yirmibirinci günde normal doku ile karşılaştırmalı olarak yapılan EM incelemelerinde endotelial sıkı bağlantıların tamamlandığı, bazal laminanın devamlılık göstermekle beraber normalden daha ince olduğu bazı alanlarda da perisitler tarafından devamlılığının bozulduğu gözlenmekteydi (Şekil 4). HRP sızıntısı olmamasına ve endotelial sıkı bağlantıların görülmesine rağmen bazal laminanın

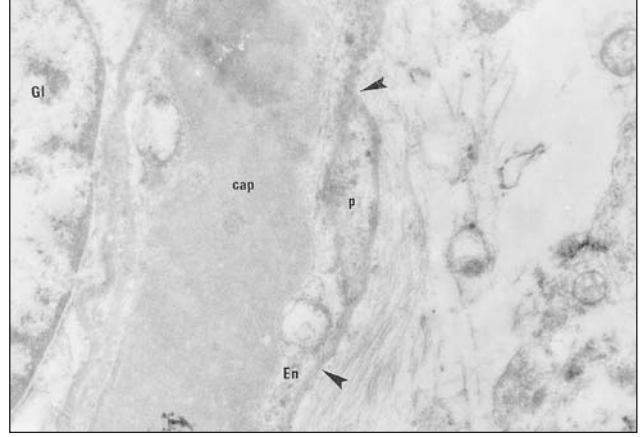


**Şekil 1:** Transplantasyon sonrası 4. günde X2.500 büyütme bir kapillerin elektron mikroskopi görüntüsü. En: Endotelial hücre, Tr: Trombosit, My: miyelinli sinir lifi, Er: eritrosit, Cap: Kapiller damar lümeni. Bazal laminanın kesintiye uğradığı alan ok uçları ile gösterilmiştir.





**Şekil 2:** Bir önceki şekilde yer alan bazal laminanın kesintiye uğradığı alanın X10.000 büyütmedeki görüntüsünde endotel hücrelerinin birleşme bölgelerinde mikrovilluslar (Mv) şeklinde lümeneye uzanan katlanmalar, endotel hücresi dışında yer alan bir perisit (P), ve bazal laminanın hiç izlenemediği alanlar (ok uçları) ile yeni oluşma çizgileri (ince oklar) izleniyor. Cap: kapiller damar lümeni, Tr: Trombosit, E: Endotel hücresi.



**Şekil 4:** Transplantasyon sonrası 21. günde bir kapiller damarı uzamına kesilmiş olarak gösteren elektronmikrografi. Endotelin (En) bazal laminası (ok uçları) içerisinde bir perisit (P) görülmekte. Gl: glial hücre nükleusu. Bazal laminanın devamlılık kazanmış olmasına rağmen halen normal kalınlığına ulaşamadığı izleniyor. (X10.000)



**Şekil 3:** Transplantasyon sonrası 13. günde HRP histokimyasında greft içerisinde kan beyin bariyerinin sızdırmazlık özelliklerini kazanmış damarlar ( kalın oklar) ve halen sızdırcılığı olan, bariyer yapısı tamamlanmamış alanlar (ok uçları). (HRP Mesulam tekniği, nötral red boyası, X100).



**Şekil 5:** Greft ekimini takiben 28. günde bariyer oluşumunun tamamlandığı ve kapiller damarlardan HRP sızmadığı görülmekte (ok uçları). (HRP Mesulam tekniği, nötral red boyası, X100).

ancak 28. günde yapılan normal doku ile karşılaştırmalı EM incelemelerinde normal kalınlığına ve devamlılığına ulaştığı görüldü (Şekil 5, 6).

Canlı hücre sayım ortalamalarının günlere ve gruplara göre dağılımı (Tablo 2) de verilmiştir. İlk on günlük dönem içerisinde ortalamayı çok yükselten ilk 48 saatlik hücre sayıları dışarıda bırakılarak yapılan istatistik (t-testi) çalışma, gruplar arasında canlı hücre sayıları açısından anlamlı fark olmadığını gösterdi ( $p>0,05$ ).

## TARTIŞMA

Normal kapiller damarların iç yüzlerini döşeyen endotel hücreleri arasında madde alışverişini sağlayabilecek genişlikte aralıklar bulunur. Beyinde ise normal kapiller yapısından farklı olarak endotel hücreleri birbirleri ile sıkıca kenetlenmiş durumdadır. Bu kenetlenmeler (tight junctions) kan ile serebral nöral ekstrasellüler sıvı arasında kontrolsüz madde alışverişini kısıtlar. Bu tip özelleşmiş endotel yapısı nedeniyle kandan ekstrasellüler sıvıya madde geçişi veya tam tersi,



**Şekil 6:** Transplantasyon sonrası 28. günde X20.000 büyütmede alınmış elektron mikrografında endotelial sıkı bağlantı kompleksi (ince oklar), ve bazal laminanın tam olarak geliştiği izleniyor. Daha önceki dönemlerde görülen interselüler aralık genişlemesinin olmadığı ve bazal laminanın normal kalınlığına ulaşmış olduğu dikkati çekiyor. E. Endotel, Ap: Astroitik ayaklı çıkıntı, Cap: Kapiller damar lümeni.

**Tablo II:** Canlı hücre sayılarının günlere ve deney gruplarına göre dağılımı.

Günler	İncelemeye Alınan Rat Sayısı	Canlı hücre Sayıları Ortalaması	Grup No	Grup Ortalaması
1	2	270 (±14,14)	1	154,6(±59,67)
2	2	195 (±7,07)		
3	3	130 (±17,32)		
7	3	113 (±15,27)		
10	3	116 (±11,54)		
11	3	133,3 (±5,77)	2	124,16(±9,0)
13	3	116,7 (±11,54)		
15	3	126,7 (±5,77)		
17	3	120 (±0)		
18	3	130 (±0)	3	127,22(±7,55)
20	3	120 (±10)		
21	3	131 (±2,89)		
23	3	131,7 (±2,87)	4	125,83(±9,73)
26	3	128,3 (±7,63)		
28	3	120 (±17,32)		
30	3	123,3 (±5,77)		

ekstrasellüler sıvıdan kana madde geçişleri ancak enerji harcanarak aktif transport sistemleriyle gerçekleşebilir. Bu nedenle beyin kapiller endotel hücreleri, normal endotel hücrelerinden birkaç kat fazla mitokondri içerir (10). Beyin kapiller endotel hücrelerinin etrafını saran bazal lamina endotel hücrelerinin kendi ürünüdür. Bazal lamina

içerisinde yer yer perisitlere rastlanmasına rağmen bunlar bazal laminanın bütünlüğünü bozamaz. Bazal laminanın dışında ise astroitik ayaklı çıkıntılar adı verilen (astrocytic foot processes) yapılar vardır. Ayaklı çıkıntılarının membran geçirgenliği ile doğrudan ilişkileri olmamasına karşın kan beyin bariyeri oluşturmak üzere endotel uyarıcı ve hücre içi iyon dengesini düzenleyici etkileri olduğu bilinmektedir (3,10,17,18).

Kan beyin bariyeri oluşumunda astrositlerden salınan bazı uyarıcı faktörlerin etkili olduğu ileri sürülmektedir. Ancak yapılan çalışmalarda, yalnızca bu uyarıcı faktörlerin yeterli olmadığı aynı zamanda çevresel faktörlerin de önemli olduğu vurgulanmıştır (11,12,16).

Nöral greftlerde beklenen fonksiyonların ortaya çıkması için kan beyin bariyerinin bütünlüğü önemlidir. Sistemik dolaşımdaki hormon ve peptidler ile hücrel ve humoral immünolojik unsurlar greft hücreleri üzerinde olumsuz etkilere yol açarak onların fonksiyonlarını bozmakta, hatta kimi zaman hücre ölümüne neden olmaktadır (15). Çalışmamızda ilk 48 saat içerisinde görülen hücre sayımlarındaki yüksek değerler (232,5±44,25) transplantasyonu takiben henüz kapasitelerini yitirmemiş hücrelerden kaynaklanmaktadır. Benzer sonuçlar adrenal medulla greftlerinin rat striatumuna verilmesini takiben de saptanmış ve hücrelerin erken dönemde diffüzyonla çevre dokulardan gelen oksijen ve glukoz ile bir süre daha fonksiyonlarını sürdürdüğü gösterilmiştir (9,21). Bu nedenle greft damarlanması ve kan beyin bariyerinin henüz oluşmadığı erken dönemde hücre sayımlarının greftin gerçek durumunu yansıtmadığı söylenebilir. 3. ve 4. günde yapılan ışık mikroskopi ve EM incelemelerinde greftin kendini besleyen damarların gelişmeye başladığı, ancak henüz kan beyin bariyerinin oluşmadığı görülüyordu. Bu dönemdeki hücre sayıları hızla düşerek bütünü yansıtır seviyelere gelmişti. Işık mikroskopisinde nekroz odaklarının olmaması greft vaskularizasyonunun kendine yeterli olabilecek seviyelere geldiğini göstermekteydi. Bu bulgular 1987'de Krum ve Rosenstein, 1994'de de Akalan ve Grady tarafından yapılmış greft angiogenesisine yönelik çalışmalarda vasküla-rizasyon zamanlarına uymaktadır (1,11,12). Yedinci gündeki ışık mikroskopi ve HRP ile yapılan incelemelerde çevre dokulardan greft içerisine doğru kapiller gelişimin olduğu ancak kan beyin bariyerinin sızdırmazlık

özelliğini henüz kazanamadığı görülüyordu. Kullanılan hücre süspansiyon greftleri orijinal damar yapılarını içermediğinden bu greftlerin beslenmesi çevredeki kapillerlerden greft içerisine doğru filizlenme yoluyla olmaktadır (1,12). Bu filizlenme başlamadan hemen önce çevre kapillerlerde regresyon olup, permeabilite artmakta ve kan beyin bariyeri bozulmaktadır. Regresyon ve permeabilitedeki artış tam olarak açıklanabilmiş bir fenomen değildir. Fakat greft içerisindeki hasar görmüş hücrelerden ortama salınan VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) gibi bazı mediatörlerin bunu tetiklediği ileri sürülmektedir (13,19).

İlk 48 saati takiben görülen hızlı hücre kaybının greft vaskülarizasyonundaki artışa rağmen görülmesi, hücrelerin beslenme yetersizliğinden çok kan beyin bariyerinin fonksiyon kaybıyla açıklanabilir. Daha önce yapılan araştırmalarda da nöronal dokuların fonksiyonlarını sürdürülebilmeleri için sağlam bir kan beyin bariyeri gerektiği, hatta bariyerin fonksiyonlarında kısa süreli bir kaybın bile hücrelerde önemli fonksiyon kayıpları veya duraksamaları ile seyrettiği gösterilmiştir (11,12,15,18). Onuncu günde yapılan HRP histokimyasal incelemesi ve EM incelemelerinde greft içerisinde yer yer kan beyin bariyeri yapısını tamamlamış kapillerlerin olduğu gözleniyordu. Bu dönemde hücre sayımlarında belirgin bir değişiklik görülmemesine rağmen hücrelerin fonksiyonel açıdan normal seviyelere ulaştıklarını söylemek oldukça güçtür. Rosenstein, greftlerin erken dönemde metabolik gereksinimlerini çevredeki kan ve ekstrasellüler sıvılardan karşıladığını öne sürmektedir (15). Bu hipotez destek alınacak olursa bu dönemde yeni kurulmakta olan kan beyin bariyerinin kısmen de olsa geçirgenliği düşürerek çevre dokulardan greft içerisine madde geçişini bir miktar engellediği ve henüz vaskülarizasyonu tamamlanmamış greft içerisine çevre ekstrasellüler sıvılardan gelecek bazı faktörlerin ulaşmasını engellediği ve bu nedenle hücre fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilediği ileri sürülebilir.

Birinci grup olarak kabul edilen ilk 10 günlük dönem dikkate alındığında, greft vaskülarizasyonunun bu dönem içerisinde büyük oranda tamamlandığı halde kan beyin bariyerinin henüz yeterli olgunluğa ulaşmadığı ve hücre sayısının ilk 2 günü takiben hızla azaldığı, daha sonraki günlerde de giderek azalıp bir plato çizme eğilimine girdiği görülmektedir. Bazal lamina bu dönem içerisinde devamlı bir yapı kazanmamıştır. Bazal laminanın

tam gelişmemiş olduğu dikkate alınacak olunursa kapillerlerin de matür hale gelmediği söylenebilir.

Onbir – onyediyedi günler arası içeren 2. grupta yapılan incelemelerde kan beyin bariyerinin gelişmiş yapısını kazanmaya başladığı ve HRP histokimyasında kaçakların olmasına rağmen bunların belirgin oranda azaldığı görülmekteydi. Bu dönemde hücre sayısında günlük değişimler oldukça azalmıştı. Bu durumu, kan beyin bariyerinin özelliklerini tam olarak kazanmaya başlamasıyla birlikte greft hücrelerinin fonksiyonel açıdan stabil hale gelmesiyle açıklamak mümkündür (3,15,17).

Üçüncü grup olarak kabul edilen onsekiz-yirmibirinci günler arasındaki deneklerde kan beyin bariyerinin ana yapısının tamamlandığı gözlemlendi. Ancak EM incelemelerinde endoteller arası "sıkı bağlantıların" kurulmuş olmasına ve HRP histokimyasında sızıntı saptanmamış olmasına rağmen bazal laminanın tam olarak gelişmediği, yer yer kesintilerle seyrettiği gözleniyordu. Benzer durum vaskülarizasyonun hızlı olduğu dokularda, örneğin korion villus trofoblast kapillerlerinin gelişmesi sırasında da görülmektedir. Trofoblast kapiller endotel yapısı tamamlandıktan çok daha sonra bazal lamina yapısı da tamamlanarak normal kapiller haline gelir (6). Dusart ve ark. hücre süspansiyon greftlerinde kan beyin bariyeri yapısının 3 hafta içerisinde tamamlandığını ileri sürmektedir (5). Öte yandan Geist hücre süspansiyon greftleri ve blok greftlerle yaptığı bir çalışmada kan beyin bariyerinin tüm komponentleri ile birlikte yani endotelial sıkı bağlantılar, bazal lamina ve astrositik ayaklı çıkıntılarla tam olarak oluşmasının 4 haftadan uzun sürdüğünü bulmuştur. Bu çalışmanın eksik tarafı EM incelemesinin yapılmamış olmasıdır ve yazarlar bunu makalenin tartışma kısmında da belirtmişlerdir (7). Gerçekten de kan beyin bariyerinin histokimyasal olarak sızdırmazlığının gösterilmesi ve sıkı bağlantıların tamamlanmış olması bariyerin matür hale geldiğinin göstergesi değildir. Ancak bazal lamina yapısı da tamamlandıktan sonra kan beyin bariyerinin anatomik ve özelliklerine tam olarak kavuştuğundan söz edilebilir. Bazal laminanın devamlılığı en iyi gösteren araç da EM incelemeleridir.

Dördüncü grupta (21-30 günler arası) yapılan incelemelerde HRP histokimyasında ekstrasvasküler kaçak yoktu ve hücre sayılarında günlük değişim görülüyordu. EM incelemelerinde de bazal lamina bütünlüğünün 20 günde sağlanabildiği halde



normal kalınlığına ancak 28. günden sonra ulaşabildiği görüldü. Bizim gözlemlerimize göre endotelial bazal lamina kan beyin bariyerinin en son gelişen komponentidir. Elektron mikroskopik olarak devamlılığının saptanması ve normal kalınlığına ulaşması kan beyin bariyerinin tam olarak gelişip matur hale geldiğinin göstergesidir. Bu dönemde, hücre sayılarında değişim olmaması artık greftin santral sinir sistemine integrasyonunun tamamlandığını göstermektedir.

Gruplar arasında canlı hücre sayıları açısından istatistiksel fark görülmemesi önemli bazı noktaları işaret etmektedir. Daha önce pek çok çalışmada gösterildiği gibi kan beyin bariyerinin olmaması hücre fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilemekte hatta hücrenin ana fonksiyonlarını yerine getirmesini engellemektedir. Öte yandan, bu çalışmada görüldüğü gibi kan beyin bariyeri olmamasına rağmen nöral hücreler yaşamlarını sürdürebilmektedir. Bu, en azından ilk 1 aylık kısa dönemde, nöral hücrelerin bir süreliğine ana fonksiyonlarını yerine getirmese bile canlılıklarını sürdürebildiğini göstermektedir.

Sonuç olarak; kan beyin bariyeri nöronal doku greftlerinde hücre fonksiyonlarının sürdürülmesi için önemli bir yapıdır. Kan beyin bariyeri yalnızca moleküler bir bariyer olmayıp aynı zamanda anatomik bir yapıdır. Bu çalışmada yaptığımız EM gözlemlerine göre, bariyerin en geç tamamlanan kısmı bazal lamina olup 28. günden sonra kesintisiz hale gelmekte ve normal kalınlığına ulaşmaktadır. Bazal laminanın, kan beyin bariyerinin fonksiyonlarına katkısı üzerine yapılmış etraflı bir çalışma yoktur Fakat bazal laminanın gelişimi aşamasında önce ince bir hat halinde endotelin etrafını sarıp, günler içerisinde giderek kalınlaşması bariyerin fonksiyonları üzerinde önemli katkıları olduğunu destekler niteliktedir.

#### KAYNAKLAR

1. Akalan N, Grady MS: Angiogenesis and the blood-brain barrier in intracerebral solid and cell suspension grafts. *Surg Neurol*, Dec: 42(6):517-22, 1994
2. Borlongan CV, Lind JG, Dillon-Carter O, Yu G, Hadman M, Cheng C, Carroll J, Hess DC: Bone marrow grafts restore cerebral blood flow and blood brain barrier in stroke rats. *Brain Res* 4;1010(1-2):108-16, 2004
3. Broadwell RD, Charlton HM, Ebert P, Hickey WF, Villegas JC, Wolf AL: Angiogenesis and the blood-brain barrier in solid and dissociated cell grafts within the CNS. *Prog Brain Res* 82:95-101, 1990
4. Chen J, Magavi SS, Macklis JD. Neurogenesis of corticospinal motor neurons extending spinal projections in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16;101(46):16357-16362, 2004.
5. Dusart I, Nothias F, Roudier F, Besson JM, Peschanski M: Vascularization of fetal cell suspension grafts in the excitotoxically lesioned adult rat thalamus. *Brain Res Dev Brain Res* 1;48(2):215-28, 1998
6. Erbençi T, Sevilen F, Sencer E, Bilir A, Demir R: An ultrastructural study on the placenta from intra-uterine and spontaneous and artificial ectopic tubal pregnancies. *Journal of Obstetrics and Gynaecology* 14:226-231, 1994
7. Geist MJ, Maris DO, Grady MS: Blood-brain barrier permeability is not altered by allograft or xenograft fetal neural cell suspension grafts. *Exp Neurol* 111(2):166-74, 1991
8. Hampton DW, Rhodes KE, Zhao C, Franklin RJ, Fawcett JW. The responses of oligodendrocyte precursor cells, astrocytes and microglia to a cortical stab injury, in the brain. *Neuroscience* 127(4):813-20, 2004
9. Herrera-Marschitz M, Stromberg I, Olsson D, Ungerstedt U, Olson L: Adrenal medullary implants in the dopamine-denervated rat striatum. II. Acute behavior as a function of graft amount and location and its modulation by neuroleptics. *Brain Res* 9;297(1):53-61, 1984
10. Johansson BB: The physiology of the blood-brain barrier. Porter JC. And Jezova D. (ed), *Circulating Regulatory Factors and Neuroendocrine Function*. New York: Plenum Press, 1990:25-39
11. Krum JM, Rosenstein JM. Patterns of angiogenesis in neural transplant models: I. Autonomic tissue transplants. *J Comp Neurol* 15;258(3):420-434, 1987
12. Krum JM, Rosenstein JM: Patterns of angiogenesis in neural transplant models: II. Fetal neocortical transplants. *J Comp Neurol* 15;271(3):331-45, 1988
13. Mani N, Khaibullina A, Krum JM, Rosenstein JM: Activation of receptor-mediated angiogenesis and signaling pathways after VEGF administration in fetal rat CNS explants. *J Cereb Blood Flow Metab* 23(12):1420-9, 2003
14. Romanko MJ, Rola R, Fike JR, Szele FG, Dizon ML, Felling RJ, Brazel CY, Levison SW: Roles of the mammalian subventricular zone in cell replacement after brain injury. *Prog Neurobiol* 74(2):77-99, 2004
15. Rosenstein JM: Neocortical transplants in the mammalian brain lack a blood-brain barrier to macromolecules. *Science* 13;235(4790):772-4, 1987
16. Rosenstein JM. Vascular and glial alterations after autonomic tissue grafts into the brain. *Ann N Y Acad Sci* 495:86-100, 1987
17. Rosenstein JM, Krum JM, Trapp BD: The astroglial response to autonomic tissue grafts. *Brain Res* 2;476(1):110-9, 1989
18. Rosenstein JM, Mani N, Silverman WF, Krum JM: Patterns of brain angiogenesis after vascular endothelial growth factor administration in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 9;95(12):7086-7091, 1998
19. Rosenstein JM, Krum JM: New roles for VEGF in nervous tissue--beyond blood vessels. *Exp Neurol* 187(2):246-253, 2004.
20. Schmidt RH, Bjorklund A, Stenevi U. Intracerebral grafting of dissociated CNS tissue suspensions: a new approach for neuronal transplantation to deep brain sites. *Brain Res* 10;218(1-2):347-356, 1981
21. Stromberg I, Herrera-Marschitz M, Hultgren L, Ungerstedt U, Olson L: Adrenal medullary implants in the dopamine-denervated rat striatum. I. Acute catecholamine levels in grafts and host caudate as determined by HPLC-electrochemistry and fluorescence histochemical image analysis. *Brain Res* 9;297(1):41-51, 1984
22. Villegas J: Time course of angiogenesis in solid pineal autografts. *Cell Tissue Res* 315(3):349-59, 2004