

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Fizyoloji Anabilim Dalı

**ERKEN POSTİSKEMİK DÖNEMLERDE
"KAN BEYİN BARIYERİ" PERMEABİLİTE
DEĞİŞİMLERİ ve POLİAMİNLERİN GEÇİŞİ**

T 71333

Doktora Tezi

Dr A. Sarper Diler (M. D.)

Danışman: Prof Dr Y. Ziya Ziylan

İstanbul 1998

TEŞEKKÜR

Teze başlamam, devam etmem ve bitirmem de olduğu kadar otonom olarak çalışabilme ve makale yazabilmemde beni yetiştiren, yabancı çalışma arkadaşlarına beni lanse eden, İsveç ve Fransa'daki çalışmalarım için beni yüreklendiren;

Prof Dr Y. Ziya Ziylan'a,

Kötü bir günümde bana Tıbbi Biyoloji ABD kapılarını açan, her zaman söylediği "altın bilezik" moleküler biyoloji metodlarını öğrenmemde emeği olan, örnek bir Anabilim Dalı başkanı;

Prof Dr Mahmut N. Çarın'e,

Kan Beyin Bariyeri hakkında ilk okuduğum literatürden bugüne kadar hem bilimsel, hem sosyal ablam;

Doç Dr Gülay Üzüm'e

Tıbbi Biyoloji ABD'na gelip Mixed lenfisit kültürü yapmaya başladığımız günden tezimin yazıldığı son ana kadar benim için belki de benden çok tedirgin olan ve hem tıbbi hem de sosyal sohbetlerinden büyük zevk aldığım

Doç Dr Mehmet Gürtekin ve Doç Dr Filiz Aydın'a

Tıbbi Biyoloji ABD'daki tüm mesai arkadaşlarıma,

Radyoaktivite ölçümleri için laboratuvarını bize açan **Dr Jeanne-Marie Lefauconnier** ve ünite direktörü **Dr Jean-Marle Bourre'a** (Fernand-Widal Hastanesi INSERM 26. Ünitesi, Paris, Fransa),

İskemi tekniklerini öğrendiğim ve verimli tıbbi tartışmalar yaptığım **Dr Anne Héron**, ekip şefi **Dr Ellsabeth Pinard** ve ünite direktörü **Dr Jack Seylaz'a** (CNRS 641. Ünitesi, Paris 7. Tıp Fakültesi, Paris, Fransa).

geceyarıları tezimi bilgisayara geçen **Dr Yalçın Seyhun'a** (Carl-OS)

tezimin yazılma aşamasında beni kompanse eden PCR ekibinden **Banu Benligölge'ye** (tailor)..

TEŞEKKÜR ediyorum...





Babam

Kemal Diler'e (1327-1990)

v'e

Ağabeyim

Eşref Alper Diler'e (1965-1991)



Sevgili eşim,

Nathalie'ye

ve

(mon) bichounnet'm

André Delikan'a



Anneme

ve

kardeşime

**S'io credesse che mia risposta fosse, a persona che mai tornasse al mondo.
Questa fiamma staria senza piu scozze. Ma perciocche giammai di questo
fondo, non tornovivo alcun, s'i'odo il vero, senza tema d'infamia ti
rispondo.**

**Let us go, long since on earth, to take possession; in cities, theaters,
gardans, parks, courts, behind the bars and in the air then. At lenght I
heard a ragged noise and mirth of thieves and murderes; there myself
espied, who straight "your life is granted" said and...**

KISALTMALAR

AIB: Aminoizobütirik asid

KBB: Kan Beyin Bariyeri

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

Kin: Kandan beyne tek yönlü geçiş sabitesi

rCBV: Bölgesel beyin kan hacmi

RS: Resikülasyon

4DO: Dört damar okluzyonu

PA: Poliamin

PUT: Putresin

SPMD: Spermidin

SPM: Spermin

DFMO: Difluorometil ornitin

ODC: Ornitin dekarboksilaz

PSS: Periferik Sinir Sistemi

SAMDC: S Adenozil metionin dekarboksilaz

İÇİNDEKİLER

- *Teşekkür
- *İthafar
- *Kısaltmalar

Giriş.....	1
Ön bilgi.....	1
*Kan Beyin Bariyerinin(KBB) kısa tarihsel gelişimi.....	1
*Beyinde anjiogenez.....	2
*Embriyonik KBB.....	3
*KBB morfolojisi.....	3
*Enzimatik bariyer.....	9
*Kan Beyin Bariyerinden madde geçişi.....	10
*KBB fonksiyonlarının bozulması-İskemi.....	11
*Poliaminler.....	15
Amaç.....	21
Materyal ve Metod.....	23
*Deney grupları.....	23
*Deneysel işlemler.....	24
KBB'den madde geçişinin ölçümü.....	26
*Kandan Beyne Tek Yönlü Geçiş Sabitesi ölçümleri (Kin).....	26
*Hesaplama.....	27
*Bölgesel Beyin Kan Hacmi (rCBV).....	28
* Radyoaktif maddeler.....	28
*İstatistiksel değerlendirme.....	29
Bulgular.....	30
*Fizyolojik Parametreler.....	30
*rCBV.....	32
*Kin AİB ve Kin PAler.....	37
Tartışma.....	51
*PAler ve KBB.....	51
*PAler ve İskemi.....	52
*İskemide PA'lerin KBB'den geçişi.....	54
*Olası PA taşıyıcıları.....	56
*Intraiskemik hafif hipertermi.....	58
Kaynaklar.....	60
Özet.....	75
Summary.....	76
Résumé.....	77
Özgeçmiş.....	78

GİRİŞ

ÖN BİLGİ

KAN BEYİN BARIYERİNİN KISA TARİHSEL GELİŞİMİ:

Yaklaşık 100 yıl kadar önce Paul Ehrlich, vasküler sisteme enjekte edilen boyaların organlara hızlı bir şekilde geçtiğini, ama beyne geçmediğini görmüştür(31). Ayrıca serebrospinal sıvıya (Beyin Omurilik Sıvısı: BOS) enjekte edilen boyaların da nöronal dokuya kolayca geçtiğini ancak nöronal dokudan tekrar kan damarlarına dönemediğini görmüştür. Bu gözlemler Kan Beyin Bariyeri fikrinin ilk defa ortaya atılmasında rol oynamıştır.

KBB'nin ultrastrüktürel yapısının saptanması ise elektron mikroskopunun kullanıldığı 1960'lı yıllara rastlamaktadır. Reese ve Karnovsky elektron mikroskobu ile beyin kapillerinin spesifik yapısını (108), bundan iki yıl sonra da Brightman ve Reese, histokimyasal olarak elektron mikroskobu ile endotel hücreler arasındaki sıkı bağlantıları göstermiştir (10).

Bu bilgilere dayanılarak 1970'lerde beyin kapillerlerinin ince yapısı ve buna bağlı olarak fonksiyonu araştırılmıştır (9, 10, 22). 1980'lerde alışmalar KBB transport kinetiği, izole beyin kapillerleri, hücre kültürleri üzerinde yoğunlaşmıştır (45, 74, 127). 1990'lı yıllarda ise KBB moleküler düzeyde incelenmeye konu olmuştur (6, 33, 128).

BEYİNDE ANJİOGENEZ:

Beyni kandaki değişimlerden koruma, selektif transport, kan ve beyindeki maddelerin metabolizma ve modifikasyonu gibi çeşitli fonksiyonlar üstlenen KBB, balık türlerinden köpekbalığı ve vatoz dışındaki bilinen tüm memeli ve çoğu vertebralı canlıların endotel hücrelerince oluşturulur (109). Endotel hücre orijininin,

1) nöroektoderm kaynaklı endotel n hücreleri (angioblastlar),

ya da

2) nöronal evre stimuluslarına cevap olarak diferansiye olup MSS'ne yerleşen ve MSS dışı kaynağı olan endotel hücreleri,

olduğu ileri sürülmektedir.

Yapılan alışmalar endotel hücre orijininin, vaskülarizasyon sırasında ektranronal kan damarlarından kaynaklandığı hipotezini desteklemektedir. Embriyonik beyin dokusunun başka bir türden embriyonun ektopik bölgesine transplante edilmesinin, burada anjiogeneze yol açma bulgusu ve nakledilen nöronal dokunun KBB özelliklerini göstermesi ile bu hipotez destek bulmaktadır (109).

Son yıllarda yapılan çalışmalar anjiogenezin asidik fibroblastik büyüme faktörüne çok benzeyen büyüme faktörleri ve anjiogenetik faktörlerle değiştirilebileceğini göstermiştir(6, 109).

EMBRYONİK KAN BEYİN BARIYERİ:

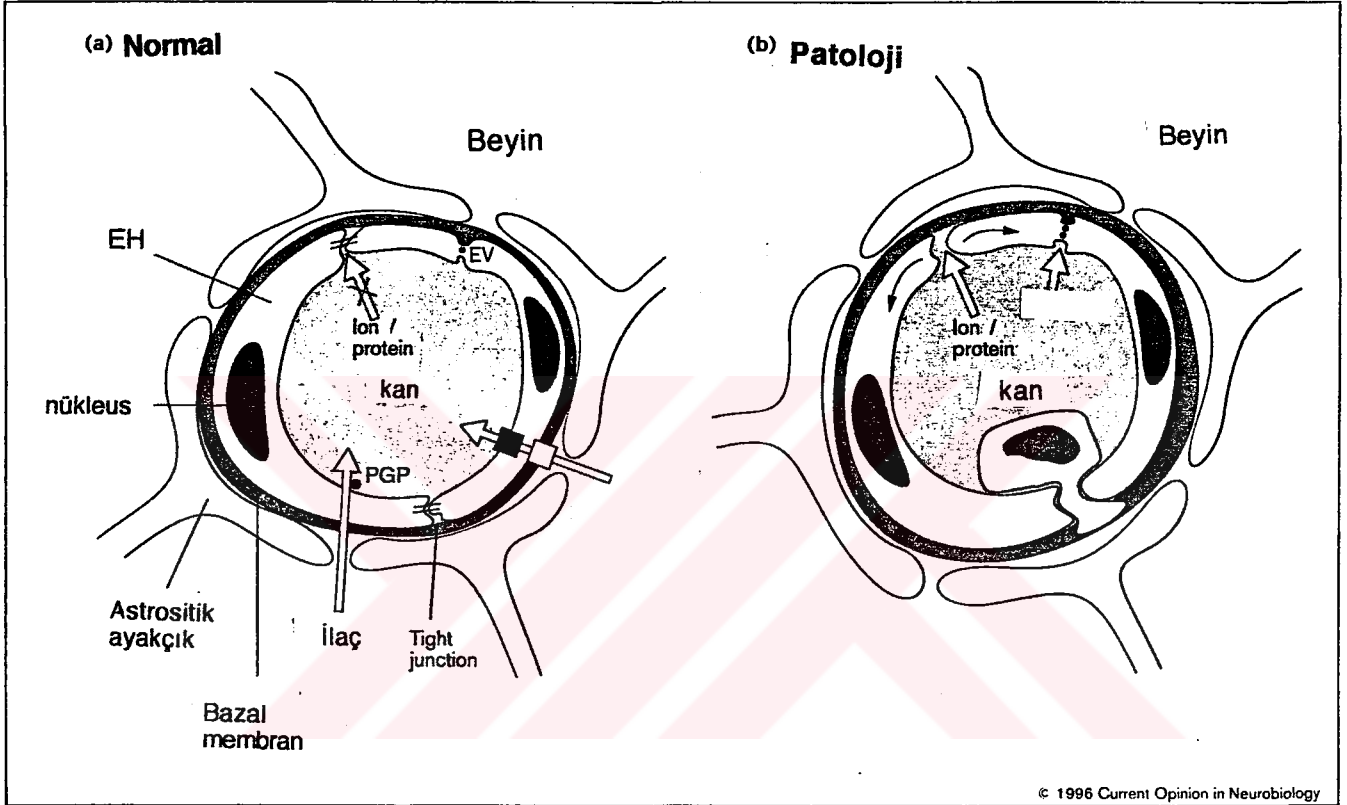
Çalışmalar KBB permeabilitesinin embriyonik dönemde oluşmaya başladığını göstermiştir (19, 60, 61, 88). Bu olay tavuklarda embriyonik 13. günde, sıçanlarda da embriyonik 15. günde gerçekleşmektedir (136). Bu bize KBB gelişiminin türe bağlı olduğunu göstermektedir. Ancak şu iki noktada araştırmacılar fikir birliğine varmışlardır:

- 1) Embriyonik 10. günden önce hangi tür canlı olursa olsun KBB oluşmamaktadır.
- 2) Herhangi bir türde KBB oluşması, bütün damarlarda aynı anda olmaktadır.

KAN BEYİN BARIYERİNİN MORFOLOJİSİ:

Beyin damarlarındaki endotel hücrelerinin, vücudun diğer organlarındakilerden farklı olarak, süreklilik göstermesi dışında, KBB morfolojisi önce elektron mikroskobu, daha sonra da freeze-fracture çalışmaları, izole beyin kapillerleri, hücre kültürleri ve moleküler biyoloji tekniklerinin devreye girmesi ile daha açık bir şekilde anlaşılmaya başlanmıştır. Bu morfolojik özellikler özetle (Şekil 1a);

- * Sürekli bir bazal membran yapısı,
- * Endotel hücrelerin sıkı bağlantılar (tight-junction: zonula occludentes) ile birleşmiş olması,
- * Hidrofilik non-elektrolitlere karşı düşük permeabilite,



Şekil 1 a-b Normal (a) ve Patolojik(b) durumlarda beyin endotelial hücreleri(128).

(a) Endotel hücreler tight junction (sıkı bağlantılar oluşturarak ion ve protein geçişine engel olur. P-Glikoproteinler (PGP) bariyerin luminal yüzeyinde bulunur ve istenmeyen ilaçların geçişini engeller. KBB'de endositotik vezikül nadirdir. Şk'de sürekli bazal membran, astroitik ayakçıklar görülmektedir.

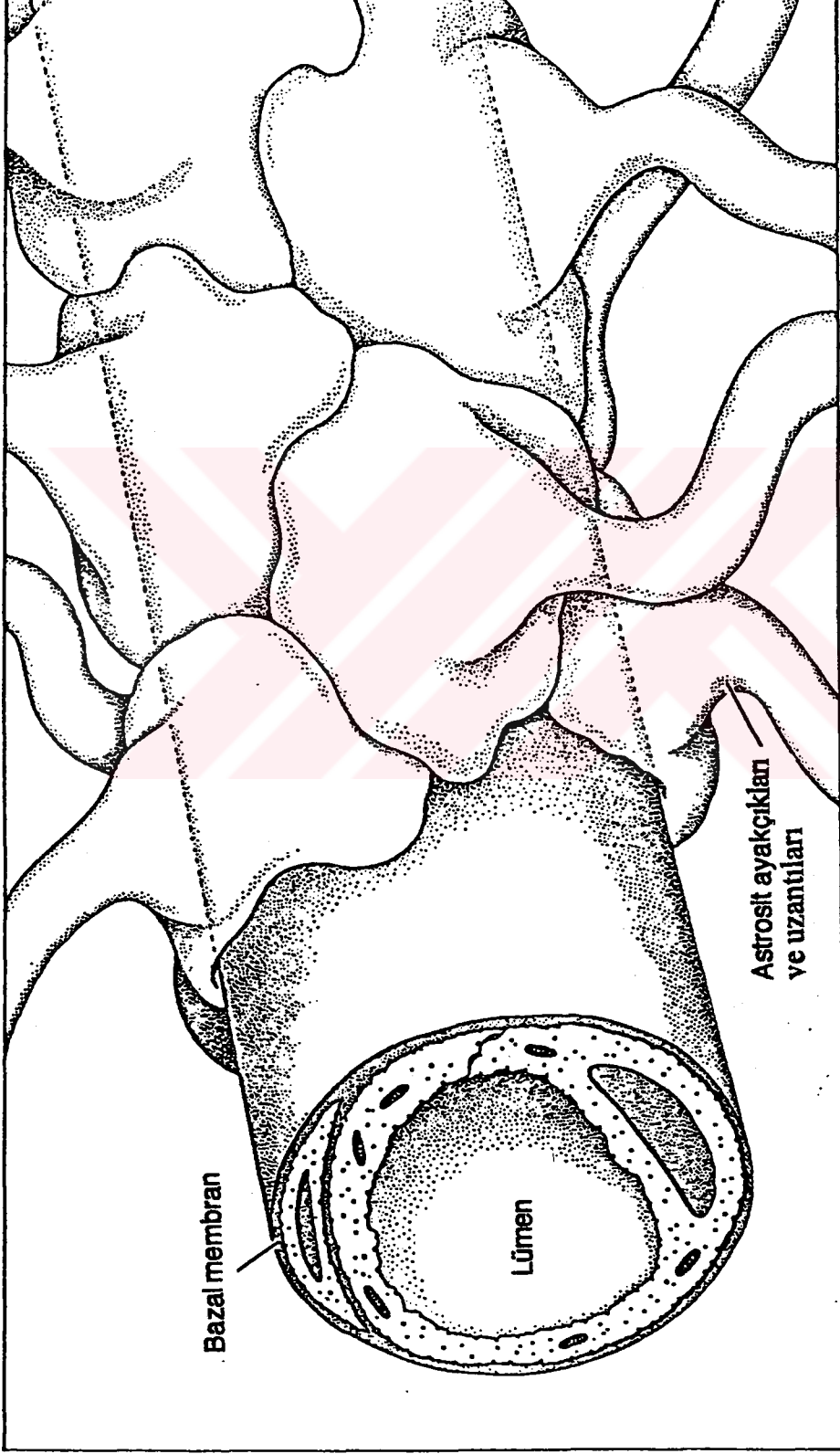
(b) Patolojik durumda bazal membran sürekliliği bozulur. Vezikül sayısı artar, ion ve proteinler beyne geçer.

- * Düşük iyonik permeabilite,
- * Çok düşük hidroluk konduktivite,
- * Yüksek elektriksel direnç,
- * Periferdeki endotel hücrelerinden fazla mitokondri içermesi,
- * Transendotelyal kanalların olmayışı,
- * Endotel hücre sitoplazmasında veziküllerin nadir olması,
- * Astrositer ayakçıkların bazal membranı sarması (Şekil 2),
- * Luminal yüzde istenmeyen maddelerin dışarı çıkarılmasını sağlayan p-glikoprotein(PGP) (Şekil 1a) yerleşmiş olması,
- * Luminal ve abluminal membranlarda farklı olabilen transport sistemlerinin bulunması,
- * Sıkı bağlantılarda okludin, singulin ve diğer proteinlerin yerleşmiş olması (Şekil3) olarak belirtilebilir.

Araştırmalar bu özellikleri ve kan ile beyin arasında madde transportunu sınırlayan veya seçici özellikler gösteren değişik geçirgenlik ve serbest akış özellikleri ile karakterize üç bariyeri ortaya çıkarmıştır (110, 127):

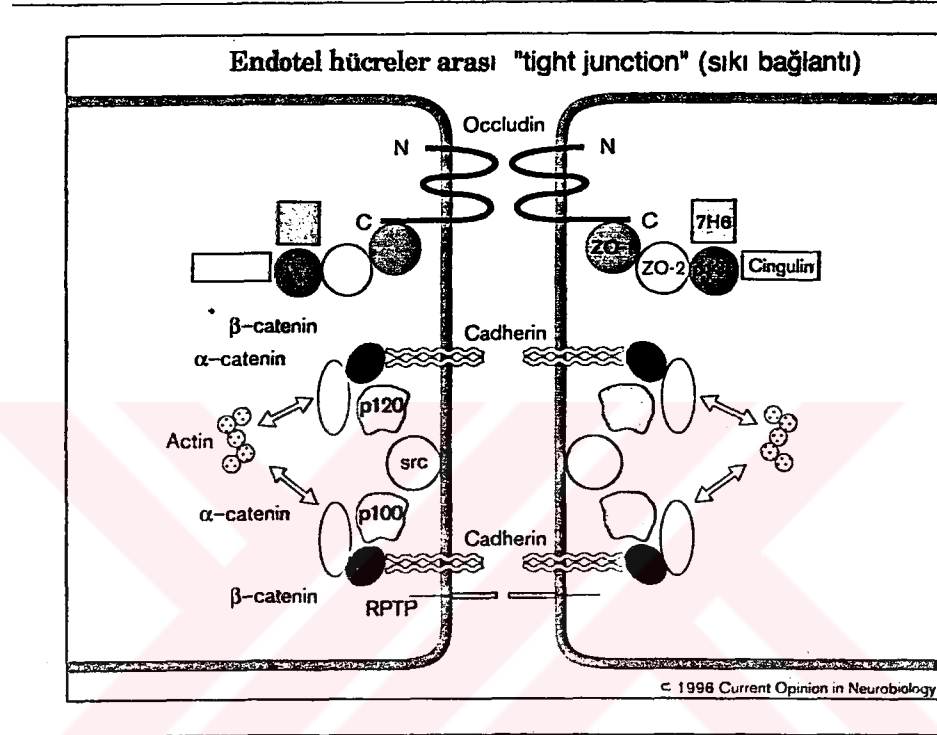
- a) Kan Beyin Bariyeri (Dolaşan kan ile ekstraselüler alan arasında),
- b) Kan Serebrospinal sıvı Bariyeri (Dolaşan kan ile Serebrospinal sıvı arasında),
- c) Parankimal hücre membran bariyeri (Ekstraselüler alan ile intraselüler alan arasında).

Beyinde bütün bölgelerde KBB bulunmamaktadır. KBB bulunmayan bu bölgeler; area postrema, pineal bez, alt komisural organ, subfornikal organ, median eminens, arka hipofiz ve supraoptik lamina olarak sayılabilir. Bunun önemi periferik değişikliklerin beyin tarafından rahatça saptanabilmesidir. Bu bölgeler şekil 4'de gösterilmiştir.



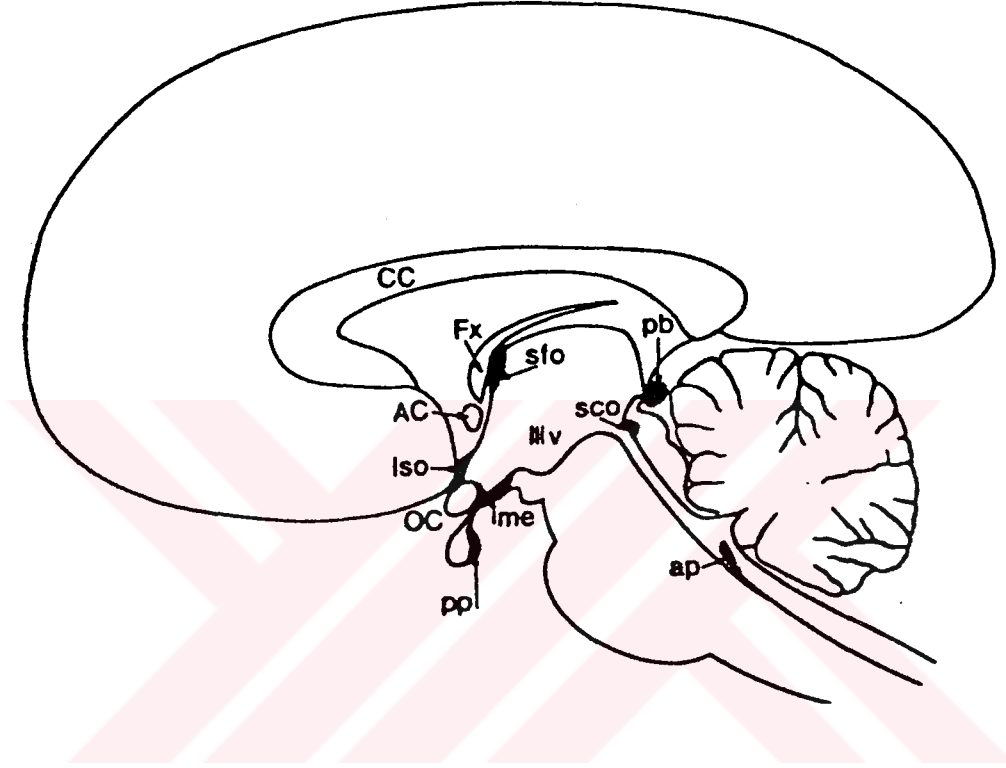
Şekil 2 Kapillerin şematik uzaysal yapısı ve astrosit ayakçıkların kapiller damar ile ilişkisi (6).

Birinci embriyonel haftada oluşan astrositik ayakçık ve uzantıların beyin kapiller damarlarına sıkı bir şekilde yapıştığı bilinmektedir. Bu sıkı ilişkinin Kan Beyin Bariyeri oluşmasında indükleyici rol oynadığı düşünülmektedir.



Şekil 3 Endotelial hücreler arası sıkı bağlantı ve protein arşitektürü(128).

Endotelial hücreler arası sıkı bağlantıları oluşturan protein yapısı ve oluşma mekanizması görülmektedir. 7H6 antijen ve cinguline, periferik sıkı bağlantı proteinleridir. Cadherine ise, Ca^{+2} a bağlı adezyon olayından sorumludur. Ancak fonksiyon görebilmesi için α -catenine proteini varlığına ihtiyaç gösterir.



Şekil 4 Sirkumventriküler organların anatomik lokalizasyonları (6)

Siyah zonlar sirkuventriküler organları göstermektedir. ap: area postrema, pb: pineal bez, sco: alt komissural organ, sfo: subfornikal organ, me: median eminens, pp: arka hipofiz, Iso: supraoptik lam,

Diğer anatomik bölgeler; CC: korpus kallozum, Fx: forniks, AC: ön komissür, IIIv: 3. ventrikül, OC: optik kiazma,

ENZİMATİK BARIYER

9

Yukarıda belirtilen bu bariyer sistemleri dışında, merkezi sinir sisteminde nöronal iç ortamı dengeleyen ve serebral endotel hücrelerin sitoplazmalarına yerleşik enzimatik bariyer bulunur. Özellikle birtakım nörotransmitterler kapiller endotelyal hücresinin luminal yüzeyinden sitoplazmaya girince, sitoplazmada mevcut çeşitli enzimler ile tutularak parçalanır ya da farklı inaktif formlarına çevrilerek beyne geçişi engellenir.

İzole beyin kapillerleri ve kültür ortamında yapılan çalışmalarda endotel hücre membran ve sitoplazmasında bulunan enzimler ve reseptörler tanımlanmıştır. Bunlar arasında (9, 32);

- * Na⁺-K⁺ ATPaz,
- * Adenilat siklaz,
- * Gunilat siklaz,
- * Glikoz transportörü ve geni,
- * Serotonin reseptörü,
- * Gama-glutamil transpeptidaz,
- * Alkali fosfataz,
- * MAO,
- * Butiril kolinesteraz,
- * Asetil kolinesteraz

sayılabilir.

Beyin endotel hücreleri ayrıca, vazoaktif potansiyele sahip nörotransmitter maddeleri sentezleyip, depo edebilir. Serotonin, GABA ve adrenalin sentezinde rol alan enzimlerin beyin mikrodamarlarında varlığı özel histokimyasal tekniklerle gösterilmiştir(33).

KAN BEYİN BARIYERİNDEN MADDE GEÇİŞİ

Son yıllardaki *in vivo* araştırmalar, KBB'nin kapiller endotel hücre membranında, insülin ve transferrin reseptörlerinin de bulunduğunu ve bunların dolaşımdaki peptidlerin transportuna aracılık ettiklerini göstermiştir. Beyinde insülin sentezi olmadığından bu transportun önemi açıktır (92).

Beyin dokusu dışındaki organların interstisyel boşluğuna serbestçe girebilen peptidler ve küçük moleküller, beyne ancak KBB'de lokalize olan spesifik transport sistemleriyle girebilirler. Transport sistemleri KBB'nin çoğunlukla luminal yüzünde bulunur; kandan endotelial hücre sitoplazmasına doğru beyinden kana geçişe izin veren sistemler ise KBB'nin abluminal yüzeyinde bulunurlar.

KBB'inde bilinen transport şekilleri (Basit diffüzyon, kolaylaştırılmış diffüzyon, aktif transport, vesiküler transport) ile beyne madde transportu gerçekleştirilir. Ancak KBB'den transport olayında şu özellikler de çok önemlidir:

- * Maddelerin lipide çözünürlükleri,
- * Maddelerin diffüzyon yetenekleri,
- * Maddelerin molekül ağırlıkları,
- * Maddelerin elektrik yükleri,

KBB'den iyonların taşınması oldukça yavaştır. Na⁺ 'a karşı geçirgenlik KBB'de pratik olarak olmamasına karşın, koroid pleksustan BOS içine doğru pompalanır. K⁺ için transportör abluminal yüzdedir. Suyun geçişi osmotik ve hidrostatik basınca bağlı olarak diffüzyonla gerçekleşir. Glikoz kolaylaştırılmış diffüzyonla beyne girer. Glikozun stereospesifikliği nedeni ile D-Glikoz beyne girdiği halde L-Glikoz giremez. Şimdiye kadar klonlanan glikoz transportörlerinden üç tanesi (GLUT1, GLUT3 ve GLUT5) nin beyinde fonksiyon gördüğü bulunmuştur(93).

Aminoasitlerin transportu taşıyıcı sistemlerle gerçekleşir (76, 92).

Bilinen üç taşıyıcı sistem;

L-Sistemi : Büyük bazik aminoasitler ve nötral aminoasitler için,

ABC Sistemi : Küçük nötral aminoasitler için,

A Sistemi : Esansiyel aminoasitler için

gösterilmiştir.

KAN BEYİN BARIYERİ FONKSİYONLARININ BOZULMASI-İSKEMİ

Oldukça hassas bir dinamik denge ile beyin homeostazisini sağlayan KBB bazı patolojik durumlarda geçici ya da kalıcı olarak aktivitesini kaybedebilir.

Kalıcı olarak KBB'ni bozan faktörler arasında donma lezyonları, radyasyon, tümörler, ağır metal zehirlenmeleri gösterilebilir.

Hipertansiyon, konvülsiyonlar, hiperkapni, osmotik dengesizlik KBB'ni geçici olarak hasarlayan faktörler olarak bilinmektedir.

Beyin iskemisi de KBB'ni hasarlayan bir patolojik durumdur (113) (Şekil 6). Genelde, iskemi KBB'ini geçici olarak hasarlasa da, iskeminin süresi, şiddeti ve şekli kalıcı KBB hasarına da yol açabilir (85).

Beyin iskemisi, beyni besleyen damarlardan biri, birkaçı ya da tümündeki patolojik bir olay nedeni ile beyin kanlanmasının bozulmasıdır.

Beyin iskemisi sıçanlarda çok değişik şekillerde oluşturulabilirse de (66, 81) genel olarak iki grup altında toplanabilir:(Tablo 1)

- 1) Fokal Beyin İskemisi,
- 2) Global Beyin İskemisi

Fokal beyin iskemisinin, orta serebral arterin (MCA) değişik lokalizasyonlarda oklüzyonu, spontan hipertansif sıçanlarda(SHR) stroke modeli,

Tablo 1.

Serebral İskemi Modelleri

1) Sıçanlarda global serebral iskemi

¥Önbeyin iskemisi iki damar oklüzyon modeli

*Geçici bilateral ana karotis oklüzyonu ve hipotansiyon

¥Önbeyin iskemisi dört damar oklüzyon modeli

*Geçici bilateral ana karotis oklüzyonu ve sürekli bilateral vertebral arter oklüzyonu

¥¥Artan BOS basınçlı iskemi modelleri

*Bihemisferal önbeyin kompresyon iskemisi

**Ünihemisferal ön beyin iskemisi

¥¥¥Diğer modeller

*Boyun turnikesi ile ön beyin iskemisi

**Dekapitasyon ile ön beyin iskemisi

2) Sıçanlarda fokal serebral iskemi

¥Orta Serebral Arterin değişik lokalizasyonlarda oklüzyonu

¥Spontan Hipertensif sıçanlarda stroke

¥¥Serebral emboli ve trombozlar

*Kan pıhtı embolizasyonu

**Mikrosfer embolizasyonu

***Fotokimyasal fokal serebral tromboz

****Araşidonat ile oluşturulan tromboz

fotokimyasal fokal serebral tromboz gibi çeşitleri vardır. Fokal beyin iskemisinin diğer grup ve alt grupları Tablo 1'de görülmektedir.

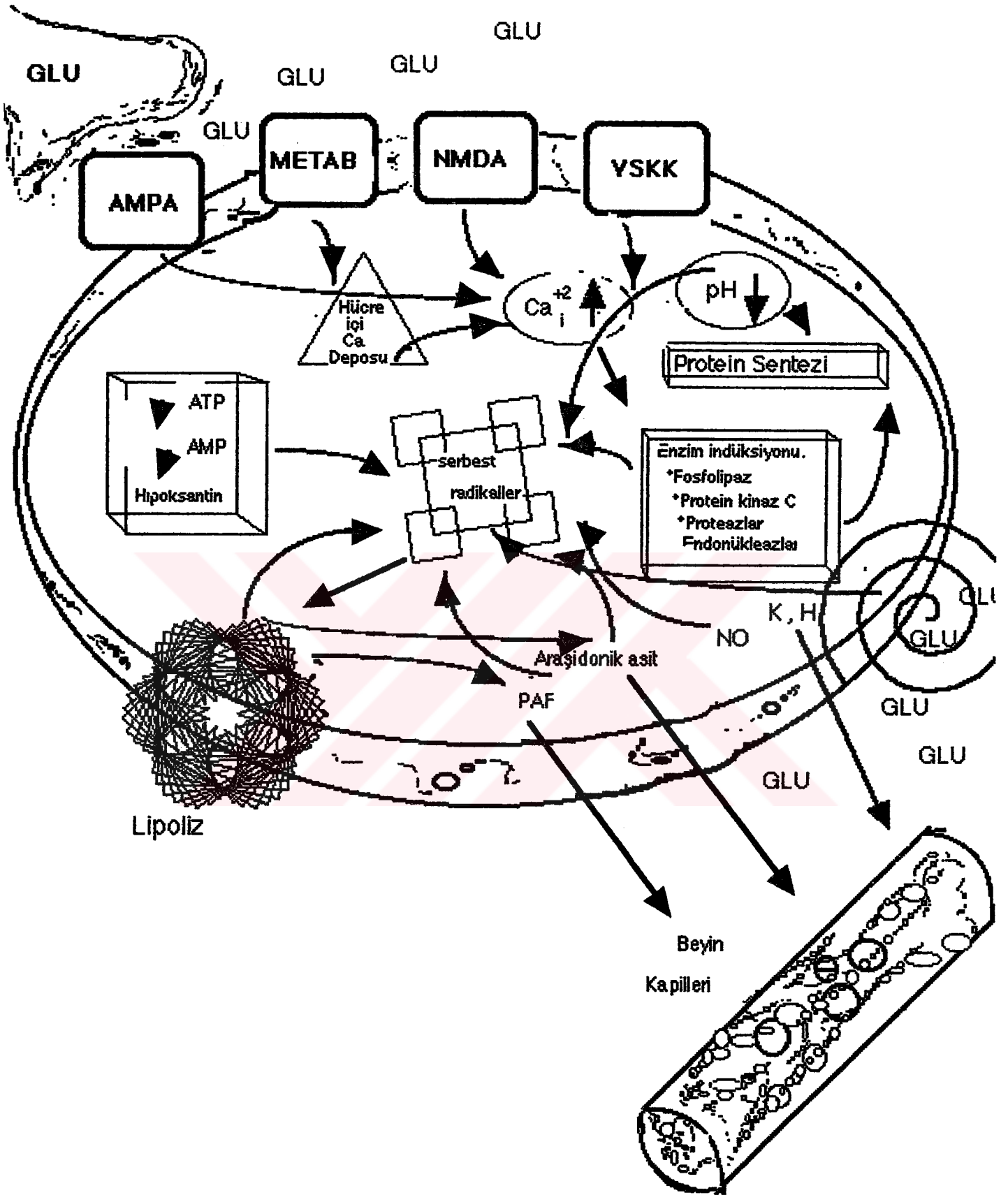
Global serebral iskemi ise iki damar (A.carotis communisler) oklüzyonu ve sıçandan kan alınarak hipotansiyon oluşturulan model, dört damar (A.carotis çifti ve A.vertebralis çifti) oklüzyonu modeli, artan BOS basınçlı model ve diğerleri olmak üzere belirtilebilir.

Bu modeller içerisinde dört damar tıkanarak yapılan model, global beyin iskemi modelleri arasında en çok kullanılan modellerden biridir (102). Bunun nedeni, bu modelde her iki vertebral arter kalıcı olarak tıkanırken, karotis arterlerini geçici olarak kapatıp daha sonra açarak beyin yeniden kanlanmasına (reperfüzyon: resirkülasyon) ve reperfüzyon hasarını da incelemeye olanak sağlamasıdır (30, 103, 104, 105, 106).

Beyin iskemisi ve reperfüzyonda iskemik nöronal hasar, ilk üç saatte akut nöronal değişime, 3 ila 24 saat arası maturasyonel hücre hasarına, 2 ile 7 gün arası da gecikmiş nöronal ölüme sebebiyet verir.

Beyin iskemisinde, sadece iskemik dönemin değil, iskemiden sonraki resirkülasyon döneminin de beyinde hasarı yapabileceği bilinmektedir. İskemi ve reperfüzyonun oluşturduğu olaylar zinciri şu şekilde özetlenebilir (Şekil 5):

- ** Beyin kan akımının azalması / kesilmesi (iskemik dönem),
- ** Beyin kan akımının aşırı artışı (reperfüzyon ilk dönem),
- ve bütün bunların sonucunda ;
- beyin enerji metabolizmasının iflası(54, 55, 75),
- Sodyum, Klorür ve Kalsiyum salımının artışı(25),
- Eksitator aminoasitlerin (EAA) re-uptake'nin bozulması(5,15),
- Anoksik depolarizasyon ile EAA'lerin ekstraselüler ortama salınmaları(5,16),



Şekil 5. İskemide meydana gelen olayların şematik gösterimi

- EAA'lerin ion kanallarını etkilemesi ;NMDA reseptörleri (Şekil 6), AMPA reseptörleri (137),

- Metabotrofik reseptörlerin aktivasyonu ile Ca^{++} 'un fosfolipaz C(PLC) ve inosital-trifosfazaz(IP_3) aracılığı ile hücre içine girişi(75,84),

- Artan Ca^{++} 'un proteoliz, DNA fragmantasyonu ve lipolize yol açması(79),
Lipoliz sonucu;

- Platelet aktive edici faktör(PAF)(75),

- Araşidonik asit ve metabolitlerinin oluşması, bunun sonucunda da

- serbest oksijen radikalleri (48,56),

- NO(75),

- glutamat oluşumunda artış(55).

Bu olaylar birbirlerini tetikleyerek kısır döngü şeklinde süregelir.

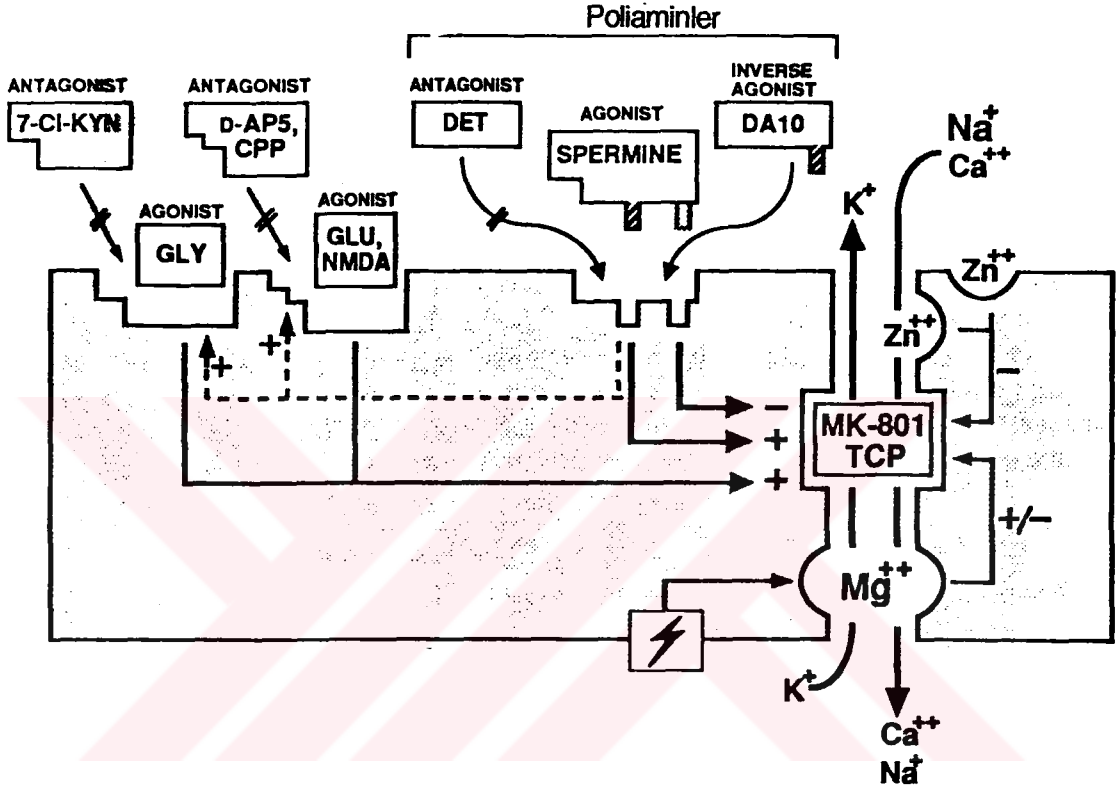
Sonuçta nöronal ve vasküler yapı zarar görür.

Bunlardan başka, beyin iskemisinin ve reperfüzyonun neden olduğu beyin ısisının da öneminin altı çizilmelidir. Beyin ısisının artması, nöronal dokunun iskemiye karşı olan direncini azalttığı, beyin kan akımını etkilediği, uyarılmış potansiyellerde ve manyetik rezonans görüntüleme yöntemleri ile de saptanabilen değişikliklere yol açtığı bildirilmiştir(17, 28, 77, 80).

POLİAMİNLER(PA)

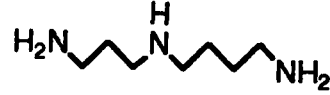
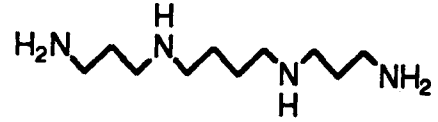
Natürel alfatik di-, tri-, tetraminlerin (-ki jenerik olarak PA olarak adlandırılırlar-) yapıları Şekil 7a'da gösterilmiştir.

PA terimi Putresin(PUT) 1-4 butenediamin, Spermidin(SPMD) : N-3-amino propil 1-4 butenediamin ve Spermin(SPE) : N,N'-bis-3-aminopropil 1-4 butenediamin için kullanılır. İlk kez 1677'de van Leuwenhook tarafından mikroskopta, semendeki kristaloid yapılara işaret edilerek varlıklarından söz

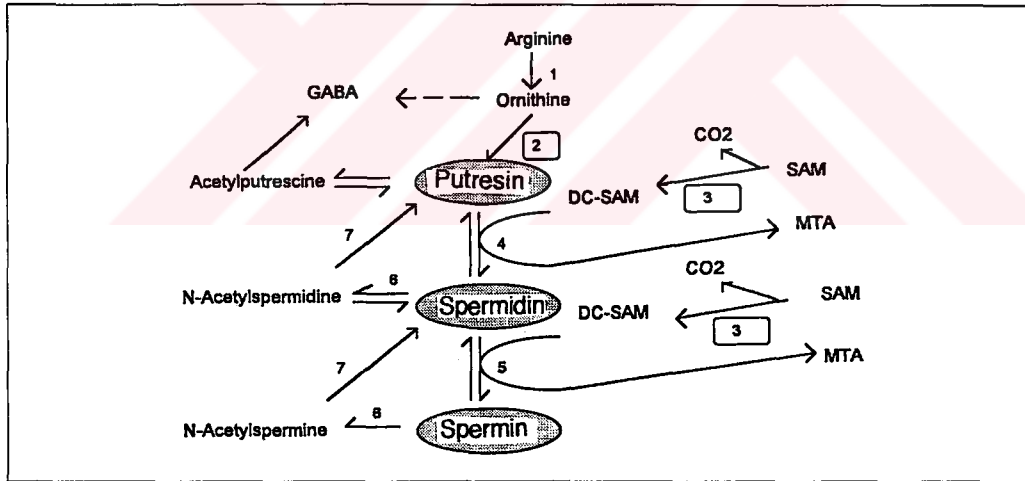


Şekil 6 NMDA reseptör-ionofofor kompleksinin şematik modeli (137).

Şekilde poliaminlerin agonist ve antagonist olarak etki edebileceği bölgeler ve bu bölgelerin kanallar üzerine olan etkisi gösterilmiştir.

Putresin**Spermidin****Spermin**

Şekil a



Şekil b

Şekil 7 a-b . Poliaminlerin yapısı (a) ve Poliaminlerin biosentez dönüşüm ve metabolizması (b) 1-Arginaz, 2-ornitin dekarboksilaz, 3-S-Adenozil dekarboksilaz, 4-Spermidin sentaz, 5-Spermin sentaz 6-SPMD /SPM n asetiltransferaz, 7-Poliamin oksidaz., SAM: S-Adenozil metionin, DC-SAM: Dekarboksile S-Adenozil metionin, MTA:Meti tioadenozin.

edilmiştir. Bununla beraber PA üzerine odaklanan çalışmalar son 20 yılda yoğunlaşmıştır.

PA'ler olarak isimlendirilen biojenik aminlerin "önemli" kabul edilmesi şu ana nedenlere dayandırılmaktadır(38, 49, 122):

1) PA'ler bütün hücrelerde bulunurlar. Prokaryotlar normalde Putresin ve Spermidin'e sahip iken, ökaryotlar bu PA'lere ek olarak Spermin'e sahiptirler. Archobakteria, algler ve bazı yüksek bitkiler PUT, SPMD ve SPM 'in homolog analoglarını içerirler. Poliaminlerin "ubik" (vazgeçilmez) olarak adlandırılmalarının nedeni, onların bütün hücrelerde bulunmalarının yanısıra, evrimin hem ilk evrelerinde hem de evrim boyunca varlıklarını sürdürmelerinden kaynaklanmaktadır.

2) PA'lerin inaktive edilmesi ya da boşaltılması, proliferasyonu önlediği gibi, büyüme hızını da yavaşlatır, hatta durmasına yol açar. Proliferasyonun durması ise bir süre sonra o canlı hücre ya da organizmanın ölümü ile sonlanacaktır.

3) PA'ler(rutin olarak) ihtiyaca yönelik olarak sentez edilirler. Hücrel konsantrasyonları çok hassas olarak düzenlenir.

Hızlı proliferasyon olan hücrelerde hem PA konsantrasyonları hem de sentez hızları diğer hücrelere göre daha yüksektir.

Fizyolojik pH'da PA'lerin amino grupları protonlanmaktadır. Strüktürel açıdan bakıldığında PA'ler pozitif yükleri alifatik karbon zinciri boyunca dağılan moleküllerdir. İnorganik polikasyonlar (Mg^{+2} ve Ca^{+2} noktasal yüklerdir) PA'lerin pozitif yükü negatif yüklü moleküllerle ion-çifti oluşturur. Bu bağlanmanın enerjisi elektrik yüküyle orantılı olarak artar (PUT<SPMD<SPM). PA'lerin fonksiyonlarının çoğu DNA, RNA, protein ve membranın negatif yüklü molekülleri ile kurulan bağlantılar ile gerçekleşir.

Elektrostatik olarak bağlı ve serbest PA'ler dinamik bir denge içindedirler. Elektrostatik interaksiyonun yanısıra PA'ler aminoasit ve proteinlerle

de kovalent bağlar kurar, ancak bu PA'lerin çok küçük bir fraksiyonunu temsil eder (130).

Organizmada PA üretemeyen tek hücre tipi nüleusu olmayan hücrelerdir. Onlar da PA'leri depolama ve diğer dokulara taşıma gibi görevlerde bulunurlar.

PA'ler hakkında bilinmesi gereken en önemli şeylerden biri de biosentez ve yıkımıdır(Şekil 7b).

Ornitin, putresinin yegane prekürsörüdür ve dekarboksilasyon ile argininden oluşur. SPMD ve SPM'in oluşumu için gerekli olan aminopropil üretimine yönelik olarak metionin ATP ile reaksiyona girer ve S-Adenosilmetionin oluşur. S-Adenosilmetionin putresine aminopropil grubunu vererek SPMD, SPMD'e aminopropil grubunu vererek SPM oluşumunu sağlar.

PA N¹-asetiltransferaz ve PA oksidaz enzimleri SPM ----> SPMD ve SPMD ----> PUT oluşumunu sağlarlar. Bu, hücresel PA döngüsü için gereklidir(119).

Doğada hız sınırlayıcı enzimler iki özellikleri ile tanınırlar:

- 1) Düşük aktivite,
- 2) Çok yüksek yarılanma hızı.

Ornitin dekarboksilasyonu ile PA oluşumunu Ornitin Dekarboksilaz adlı bir enzim katalize eder. Yarılanma ömrü doğada bulunanların en hızlısı olup yaklaşık 10 dakika kadardır.

İkinci dekarboksilasyonu SPMD'den S-Adenosilmetionini dekarbosile hale getiren S -Adenosilmetionin dekarboksilaz(SAMDC) ki bu enzim aminopropil ortamı sağlayarak SPMD ve SPM oluşumunu sağlar.

Her iki enzim PA biosentez ve degravasyonunun hız sınırlayıcı enzimleridir.

PA döngüsü aslında çok karmaşıktır. Birçok PA inaktif formu ve birçok enzimin görev aldığı bu döngü, basit bir şekle indirgenmiştir (Şekil 7b).

PA'lerin hem biosentezi hem de degradasyonu hücrelerin ihtiyaçlarına göre düzenlenmektedir. Bu nedenle gelişmekte olan MSS'de yüksek konsantrasyonlarda PA bulunması şaşırtıcı bulunmaz. Ancak erişkin MSS'de heterojen olarak yüksek miktarlarda PA varlığının önemi henüz yeterince aydınlatılamamıştır.

Normal fizyolojik durumların dışında bazı patolojik durumlarda da PA sentez ve konsantrasyonları incelenmiştir:

- konvülsiyonlarda (3,78),
- elektriksel stimülasyonlarda (90,140),
- geçici hipoglisemide (73,82,96),
- kimyasal ve mekanik hasar ve travmada (1),
- neurotoksinlerle zehirlenmede (1,72),
- iskemi ve resirkülasyonda (23, 24, 70, 95.111).

Sonuçlar bir çalışmadan diğerine farklılıklar gösterse de bütün bu olaylarda PA sentezinin tetiklendiği bildirilmiştir.

Serebral iskemi ve reperfüzyon SPMD ve SPM seviyelerinde pek bir değişime yol açmazken PUT sentezi ve konsantrasyonunun arttığı gösterilmiştir. PA biosentezinin ve özellikle de PUT'in artışı hücrel hasara bağlanmıştır(24, 70, 95). Ancak, bir grup araştırmacı da PA biosentezindeki artışın SPMD ve SPM'e yansımayıp sadece PUT ile sınırlı kalışını PUT ile SPMD arasındaki bir blokajdan kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir(41).

AMAC

Normalde KBB sadece kanda dolaşan maddelerin beyne girişine engel olmakla (bariyer fonksiyonu) kalmaz, beyin için esansiyel maddelerin (besinler,ön maddeler) beyne girişini de kolaylaştırır ve istenmeyen maddelerin beyinden kana doğru elimine edilmelerini (taşıyıcı fonksiyonu) sağlar. Görüleceği üzere dinamik olan KBB'nin iki önemli fonksiyonu vardır.

İskemide bu iki önemli fonksiyonun incelenmesi ilginç sonuçlar ortaya çıkarmıştır. ^{125}I -AMT(3-iodo-metil-L-tirozin) -ki büyük nötral aminoasit transport sistemine afinitesi vardır- ve ^{14}C sükroz KBB'nin sırasıyla taşıyıcı ve bariyer fonksiyonlarını incelemek için kullanılmıştır(139). Sonuçlar her iki maddenin beyne transportunun aynı durumda farklılık göstermesi nedeni ile (^{14}C sükroz uptake > ^{125}I -AMT uptake) KBB'ni herhangi bir durumda incelerken sadece sağlam ya da geçirgen(yıkılmış,bozuk) şeklinde nitelendirmenin ötesinde belirtilen iki fonksiyonun ayrıntılı olarak incelenmesi gerektiğini ortaya koymuştur.

Yapılan çalışmalar, hasarlı beyne eksojen olarak PA'ler verildiğinde santral nöronların hasara karşı korunduğunu göstermiştir(39)

Bu çalışmalar çok önemli bir soruyu da beraberinde getirmiştir. PAler normalde KBB' den çok sınırlı bir şekilde beyine geçmelerine rağmen (29), iskemide transportlarını nasıl olmaktadır?. Bu ancak PA' lerin iskemide kan beyin engelini normalden farklı bir şekilde geçmeleri ile mümkün olabilir.

Her ne kadar iskemi sırasında(70) ve resirkülasyonda(70, 97) PA biosentezinin hızlı bir indüksiyonu söz konusu ise de iskemiden sonraki kısa süre içerisinde bütün PA'lerin ekstrasellüler konsantrasyonları düşük bulunmuştur(14). Bu eksojen PA'lerin iskemik beyin lezyonlarında kullanılması için bir temel neden teşkil etmiştir.

Erken postiskemik zamanlarda düşük ekstrasellüler PA düzeyleri, yukarıdaki bulgular ve bunlara ek olarak MSS'de oluşan herhangi bir hasara karşı PA cevabının "eksik" oluşu (36, 37) eksojen PA'lerin beyin hasarlarında denenmesine temel oluşturmuşlardır.

Bu çalışmanın amacı da iskemiden sonraki kısa zaman içerisinde eksojen olarak verilen PA'lerin beyne geçişlerinde herhangi bir değişimin olup olmadığını incelemektir. Bu çalışmada eksojen olarak iki PA kullandık: PUT ve SPMD. Her iki PA'in ön beyin iskemisini takip eden erken resirkülasyon zamanlarında beyindeki konsantrasyonlarını ölçerek KBB'den geçiş sabitelerini hesapladık.

Ayrıca normal koşullarda beyne geçmeyen α - aminoizobütirik asit kullanarak, iskemi sonrası ortaya çıkan KBB geçirgenliğindeki geçirgenlik değişmelerini araştırdık.

Beyin ısısındaki hafif değişimlerin iskemi periodlarına karşı beyin rezistansını etkilediği bilindiğinden intraiskemik hafif hiperterminin (39°C) 20 dakikalık 4 DO iskemisinden sonraki 60. dakikada SPMD nin beyne geçişinde olası değişimleri de ayrıca bir deney grubu oluşturarak inceledik.

MATERYAL VE METOD

Deneylerimiz erkek Sprague-Dawley sıçanlar üzerinde yapıldı. Sıçanlardan ağırlıkları 250 ila 280 gram olanları deneye alındı. Bunun nedeni, 280 gram üzerinde iskeminin tam oluşmasının zorluğu, 250 gram altında ise operasyon alanının darlığı nedeni ile vertebral arter koterizasyonu sırasında medulla spinalisin hasar görme riski olmasıydı.

Deney grupları şu şekilde oluşturuldu:

A-Kontrol Grubu:(n:8)

B-İskemi ve Resirkülasyon grubu.

Bu grup hayvanlar PUT ve SPMD permeabilitesini ayrı ayrı ölçmek üzere iki alt gruba ayrıldı.

1-Putresin

2-Spermidin

Bu alt gruplardaki sıçanlarda iskemiden sonraki resirkülasyon süresine bağlı olarak PUT ve SPMD için 10dk, 30dk.ve 60dk resirkülasyonda, permeabilite ölçümlerinin yapıldığı özel gruplara ayrıldı.

Putresin için,

Grup1a-10dk RS (n:8)

Grup1b-30dk RS(n:7)

Grup1c-60dk RS(n:8)

Spermidin için,:

Grup2a-10dk RS(n:8)

Grup2b-30dk RS(n:7)

Grup2c-60dk RS(n:8)

Bu grupların dışında hem beyin kan akımını hemde KBB permeabilitesini etkileyen hipertermik koşullardaki PUT ve SPMD geçişi, iskemi esnasında beyin ısısı 39⁰ C'ye yükseltilen özel bir grupta ölçüldü.(n:8)

KBB permeabilitesinin intravenöz traser tekniği ile ölçülüp hesaplanmasında kullanılan beyin kan hacminin bölgesel olarak ölçülmesi içinde, beşer sıçandan oluşan kontrol ve deney grupları olmak üzere iki grup daha oluşturuldu.(n:25)

DENEYSEL İŞLEMLER

Sıçanlar deneye alınmadan hayvanlığımızda en az iki gün dinlendirilerek, yol stresi ile oluşabilecek anestezi sorunlarının önüne geçilmeye çalışıldı. Bu süre içerisinde dinlendirilmiş çeşme suyu ve hazır kuru sıçan yiyeceği ile beslendi.

Deneyisel işlemler iki ayrı günde yapılan operasyonlarla gerçekleştirildi.Sıçanlarda beyin iskemisi oluşturmak için, fizyolojik parametreleri pek etkilemeyen Pulsinelli ve Brierly'nin global ön beyin iskemisi modeli

seçildi(102). Bu model beyne çıkan her iki vertebral arterin tamamen, her iki karotisin de geçici olarak kapanması esasına dayanmaktadır. Modelin seçilme nedeni ise geçici olarak kapatılan karotis arterlerinin istenilen süre sonra açılıp beynin tekrar kanlanması yani reperfüzyona(resirkülasyon:RS) olarak tanınmasıdır.

İlk gün sıçanlar haloten ile anestezi altına alındı. Haloten başlangıçta %2 oranında iken kademeli olarak %1.5 sonra da %0.8'e indirildi. Anestezi bu aşamadan itibaren intraperitoneal olarak uygulanan 300 mg/kg kloral hidrat ile sürdürüldü. Sıçan ameliyat masasına prone pozisyonda (yüz üstü) yatırılıp parmak ile promientia occipitalis çıkıntısı kafatasında palpe edildi ve bunun 0.5cm altından longitudinal 0.4-0.6cm uzunluğunda bir kesi yapıldı. Servikal kaslar künt disseksiyonla ayrılıp 1 ve 2. vertebral kemikler açığa çıkarıldı. Daha sonra ameliyat mikroskopunda x1.5 ve x4'lük büyütme ile foramenler görüldü. Dental bir drill ile 32.000 devirde bu foramenler genişletildi. Her iki foramenden bipolar elektokoagülatör uçları sokularak bu foramenlerin içerisinden geçen her iki vertebral arter koagüle edildi ve böylece vertebral arter bu foramenden itibaren koparılmış oldu. Koagülasyonun iyi yapıldığı foramenden dışarıya kanama olmaması ile doğrulandı.

Sıçanın başı daha sonra stereotaksik alete yerleştirildi. Kafatası üzerine orta hatta longitudinal 1.5cm uzunluğunda bir insizyon yapıldı. Jel lidokain damlatılarak sıçanın daha sonra acı çekmesi önlendi. Dental drill ile vida şekilli elektrodlar her iki parietal bölgeye yerleştirildi ve dental sement ile fikse edildi. Bu elektrodlardan, ikinci gün yapılan deney süresince sürekli EEG kaydı için yararlanıldı. Sıçanlar daha sonra hayvan odasına alındı ve bir gün sonraki işlemlere kadar ilk günkü koşullarda korundu.

İkinci gün, heparinlenmiş ve %0.9 NaCl ile dolu üç polietilen kateter iki femoral arter ve bir femoral vene takıldı. Femoral arterlerden ilki sürekli arteryel kan basıncı kaydı, ikincisi ise kan gazlarının analizi için arteryel kan örneklerinin

alınmasında kullanıldı. Femoral vene takılan kateter ise gerekli ilaçların verilmesi amacıyla kullanıldı. Ayrıca karotis arterlerini açığa çıkarmak için mentumun 1-1.5cm altında 1.5cm uzunluğunda longitudinal kesi yapıldı. Çevre dokuları ve vagus korunarak karotis arterleri açığa çıkarıldı. Geçici iskemi oluşturmak için kullanılan atravmatik klipsler sayesinde, bu arterler 20 dakikalık bir süre ile kapatıldı. Bu arada operasyon bölgesi 35 ° C 'de Laktatlı Ringer ile nemlendirildi. 20 dakikalık geçici iskemiye takiben sıçanlar 10, 30 ve 60 dakikalık resirkülasyon periyodlarına bırakıldı.

Karotis arterlerinin kapatılmasından itibaren deney süresince bir poligraf (Nihon Kohden-DK) ile hem EEG hem de kan basıncı kaydı yapıldı. Ayrıca bu süre içerisinde kan gazları analizi için de kan örnekleri alındı.

Tüm hayvanlarda rektal bir prob ile vücut ısısı, temporal kasa yerleştirdiğimiz bir prob ile de beyin ısısı ölçüldü. Bir masa lambası kullanarak vücut ısısının 36-37 °C 'de sabit tutulması sağlandı. Hipertermik grupta iskemi sırasındaki beyin ısısı özel masa lambası ile 39°C 'ye getirildi.

KAN BEYİN BARIYERİNDEN MADDE GEÇİŞİNİN ÖLÇÜMÜ

TEK YÖNLÜ KANDAN - BEYNE GEÇİŞ SABİTESİ ÖLÇÜMLERİ

Tek yönlü, kandan beyne transfer sabitesi (Kin) hem ³H AIB hem de ¹⁴C PA'ler (PUTve SPMD) için ölçüldü. Beşer mikrolitre PA'ler (PUT ya da SPMD) deney bitiminden, 1 dakika, pratik olarak kandan beyne hiç geçmediği kabul edilen AIB ise 10 dakika önce femoral ven kateterinden 20 ul olarak enjekte edildi.

Ölçüm için plazma ve doku örnekler Ziylan ve ark.(141) tarafından belirtildiği şekilde radyoaktivite sayımına hazırlandı. Kısa olarak belirtecek olursak;

Plazmadaki final konsantrasyonları saptamak amacı ile deney süreleri sonunda kan örnekleri toplandı. Resirkülasyon süresinin bitimini takiben giyotin aleti ile dekapitasyon yapıldı. Beyin çok çabuk olarak kafatasından çıkarıldı ve dört anatomik farklı bölgeden(korteks,striatum,hipocampus,serebellum) yaklaşık 2mm x 2mm boyutlarında doku örnekleri alındı. Bu parçaların net ağırlıkları saptandı. Üzerlerine 1'er ml. Soluene-350 (Packard Inst. IL, Downer's Grove, USA) eklenerek bir çalkalayıcıda 37°C'de bir gece bekletilerek eritildi. Bunu takiben 10 ml. sintilasyon sıvısı (Toluene, Packard Inst. IL, Downer's Grove, USA.) tüm doku ve plazma örneklerine eklendi. +4°C 'de bir gece bekletilen örneklerin, sintilasyon spektrofotometresinde(Intertechnique SL-3000) sayımı yapıldı ve hesaplamaya geçildi.

HESAPLAMA

Tek yönlü, kandan beyne geçiş sabitesi (K_{in}), kontrol ve deney gruplarında ^{14}C Poliamin ve ^3H AIB'nin beyin dokusu ve plazmadaki hata payı düzeltilmiş radyoaktivitesinden, orijinal olarak Ohno ve ark. geliştirdiği formülün (87) Ziylan ve ark (141) değiştirerek kullandığı aşağıdaki şekli ile hesaplandı . Bu eşitlik geçiş sabitesi kullanılan maddenin beyne geçişinin plazmadaki konsantrasyonu ile bilinen bir oranda olması ve geriye doğru akım olmaması kabul edildiğinde şu şekilde ifade edilir:

$$K_{in} : C_{br} / \int_0^T C_{pl} dt \quad (1)$$

K_{in}: Tek yönlü kandan - beyne geçiş sabitesi

C_{br}: Beyindeki radyoaktivite konsantrasyonu ($dpm\ g^{-1}$)

C_{pl}: Plazmadaki " " " ($dpm\ ml^{-1}$)

Cpl dt: 10 dk, 30 dk, 60 dakikalık plazma konsantrasyon eğrilerinden elde edilir.

Tek yönlü kandan - beyne geçiş sabitesi hem birim alandaki serebrovasküler permeabiliteye (PA) hem de kan akımına (F) bağlı olduğundan vasküler permeabilite

$$PA: F \ln(1-Kin/F) \quad (2)$$

olarak ifade edilir.

AIB gibi çok düşük permeabiliteli maddeler için $PA \ll F$ kabul edilir. Bu durumda Kin, PA değerine yaklaşır ve (2) no' lu eşitlik plazma klirensi olarak ifade edilebilir ($ml \ g^{-1} \ dk^{-1}$).

Cbr total radyoaktiviteden intravasküler miktar ($dpm \ g^{-1}$ beyin / $dpm \ ml^{-1}$ plazma) çıkarılarak elde edilebileceği için (1) no'lu eşitlik, Ziylan ve ark tarafından şu şekilde değiştirilerek kullanılmıştır.

$$Kin: Cbr(T) - VCpl(T) / \int_0^T Cpl dt \quad (3)$$

T: Deney süresi (dk)

V: bölgesel beyin kan hacmi ($dpm \ g^{-1}$ beyin / $dpm \ ml^{-1}$ plazma)

BÖLGESEL BEYİN KAN HACMİ (rCBV) nin ÖLÇÜLMESİ

Hem kontrol grubunda hem de herbir deney grubunda beyin dokusu içerisinde bulunan kılcak damarlarında kalan radyoaktif işaretli maddelerin sonuca etki etmesini önlemek amacı ile bölgesel kan hacmi hesaplanarak, beyin dokusundaki net radyoaktif maddenin Cbr(net) miktarı saptanır. Bu amaçla kandan beyne geçmeyen ve yalnızca damar içinde kalan radyoaktif işaretli dextran kullanıldı. ^{14}C Dextran'ın intravenöz injeksiyonundan 5 dakika sonra, sıçanlar dekapite edildi. ^{14}C Dextran alanı ($dpm \ g^{-1}$ beyin / $dpm \ ml^{-1}$ plazma) olarak hesaplandı.

RADYOAKTİF MADDELER

3H AIB (sp. akt. 33.5 Ci / mmol , Mol.Ağırlık 103), New England Nuclear, Boston, MA,USA'den, ^{14}C Putresin: [1,4- ^{14}C] Putresin dihidroklorid (sp. akt. 108 mCi /mmol, Mol Ağırlık:165), ^{14}C Spermidin: (N-(3-aminopropil)-[1,4- ^{14}C] tetrametilen- 1-4 diamin (sp. akt. 108 mCi / mmol, Mol Ağırlık: 258),

Amersham Int., England'den ve ^{14}C Dextran (sp. akt. 0.58mCi / g, Mol.Ağırlık 50 000), New England Nuclear, Boston, MA, USA'den satın alındı..

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Tüm gruplardan elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde; verilere ANOVA (tek yönlü) uygulandı. Bunu takiben Tukey testi yapıldı ve değerler ortalama \pm SD olarak ifade edildi. İstatistiksel anlamlılık $p<0.05$ olarak alındı.



BULGULAR

FİZYOLOJİK PARAMETRELER

Sekiz sıçanda, EEG karotisler kapandığında iskemi oluştuğunu gösteren düz hat çizmedi. Bu nedenle bu hayvanlar deneye alınmadılar. Sıçanların femoral arterine bağlı bir kateter aracılığı ile sürekli olarak kaydedilen kan basıncı, kontrol grubunda ortalama 114 ± 7 mmHg idi ve bu değer deneylerin başlangıcında deney gruplarındaki sıçanların MABP'leri (112 ± 6.1 mmHg) ile bir farklılık göstermedi (Tablo 2).

Atravmatik klipsler takılır takılmaz oluşan global ön beyin iskemisi oluşmasını takiben, kan basıncında ani bir artış gözlemlendi. Artış miktarı ortalama 30mmHg olarak saptandı. Kan basıncı ortalama değerleri 30 dakikalık resirkülasyonda kontrol değerlerinden 26 ± 13 mmHg fazla bulundu. Buna karşılık 60 dakikalık resirkülasyonda ölçülen MABP, kontrol grubundaki hayvanlardakine yakın bulundu.

FİZYOLOJİK PARAMETRELER

	<u>kontrol</u>	<u>10 dk RS</u>	<u>30 dk RS</u>	<u>60 dk RS</u>	<u>39°C - 60 dk RS</u>
Ort. Art.Kan Basıncı - mmHg (MABP)	<u>114,25 ± 7,2</u>	<u>134 ± 8,6</u>	<u>125,8 ± 12,1</u>	<u>116,6 ± 9,9</u>	<u>117,2 ± 8,3</u>
Kan glikozu mg/dl	<u>128 ± 11,3</u>	<u>172,1 ± 12</u>	<u>161 ± 10</u>	<u>147 ± 9,4</u>	<u>138 ± 8,6</u>
pH	<u>7,4 ± 0,15</u>	<u>7,41 ± 0,038</u>	<u>7,404 ± 0,05</u>	<u>7,415 ± 0,22</u>	<u>7,411 ± 0,1</u>
PaO ₂	<u>90,2 ± 5,2</u>	<u>90,8 ± 6,45</u>	<u>88,7 ± 7,6</u>	<u>89,3 ± 6</u>	<u>88,9 ± 7,2</u>
PaCO ₂	<u>35,5 ± 3,7</u>	<u>35 ± 2,2</u>	<u>36,4 ± 3,2</u>	<u>35,7 ± 3</u>	<u>35,6 ± 2,8</u>

Tablo 2. Kontrol grubunda, 10, 30, 60 dakikalık resirkülasyon ve intraskemik hipertermi sonrası 60 dakikalık resirkülasyonda fizyolojik parametreler. Değerler ort ± SD olarak belirtilmiştir. Tek yönlü ANOVA' yı takiben Tukey testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık p<0.05 (•)olarak alınmıştır.

Tüm deney grubu sıçanlarda ölçülen kan şekeri resirkülasyon başlamadan önce 128.6 ± 12 mg/dl, olarak saptandı. Resirkülasyon süresi uzadıkça nisbi bir azalma gözlemlendi (Tablo 2).

Deney gruplarında yapılan kan gazları analizinde en düşük pH değeri 7.40 ± 0.02 ile 30 dakikalık resirkülasyon grubunda bulunurken, en yüksek pH değeri ise 7.41 ± 0.23 ile 60 dakikalık resirkülasyon grubunda saptandı. Ancak bütün bu değerler 7.40 ± 0.01 'lik kontrol grubundan anlamlı bir farklılık göstermedi. Benzer şekilde PaO_2 ve $PaCO_2$ kontrol grubunda sırasıyla 90.3 ± 5.6 ve 35.5 ± 3.1 olarak bulundu ve bu değerlerle diğer gruplarda saptanan değerler arasında anlamlı bir farklılık görülmedi (Tablo 2).

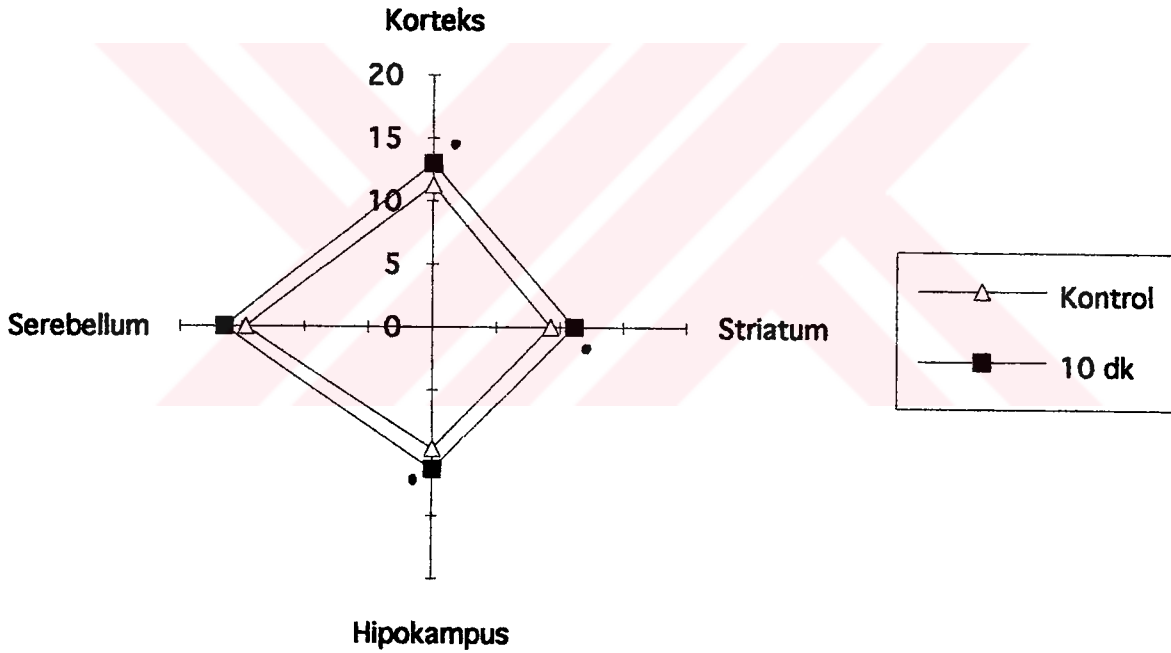
Rektal bir prob ile ölçülen vücut ısısı, deney sırasında izlenen diğer parametrelere etki etmemesi için, eksternal ısıtıcı bir lamba ile $35-37^\circ C$ arasında sabit tutuldu.

Temporal kas içerisine yerleştirdiğimiz proplar ile ölçülen beyin ısısı iskeminin başlaması ile $32-33^\circ C$ 'lere indi. Resirkülasyonun başlaması ile kademeli olarak yükselen ısı 60 dakikalık resirkülasyonda $36^\circ C$ olarak ölçüldü.

BÖLGESEL BEYİN KAN HACMİ (rCBV):

DeneySEL olarak çalışılan tüm beyin bölgelerinde kontrol beyin kan hacmi, bölgelere göre %0.9'dan %1.4'e ulaşan bir farklılık gösterdi (Şekil 8-10). En düşük kan hacmi %0.9 ile striatumda ve en yüksek kan hacmi ise %1.4 ile serebellumda ölçüldü. Bulunan bu değerler, beyin dokusunda ölçülen radyoaktif PA ve AIB değerlerinden düşürülerek beyin dokusuna geçen PA ve AIB'nin net miktarının hesaplanmasında kullanıldı.

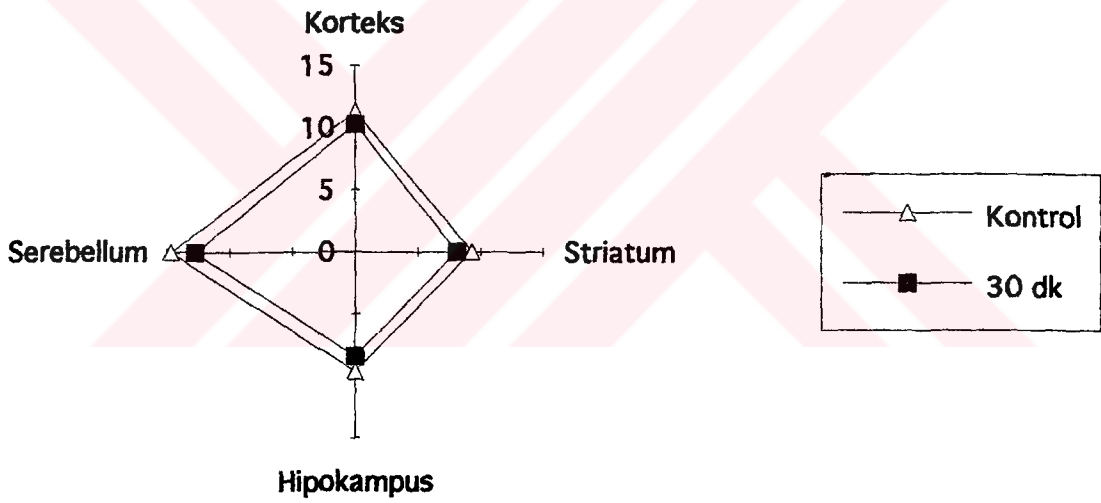
Bölgesel Beyin Kan Hacmi (rCBV)



Şekil 8. Bölgesel beyin kan hacmi (rCBV).

Kontrol ve 20 dk'lık geçici ön beyin iskemisini takibeden 10 dk'lık resirkülasyon döneminde gösterilmiştir. rCBV $\mu\text{l kan} / \text{g}^{-1}$ beyin olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Ort. \pm SD olarak verilmiş, anlamlılık $p < 0.05$ olarak alınmıştır.

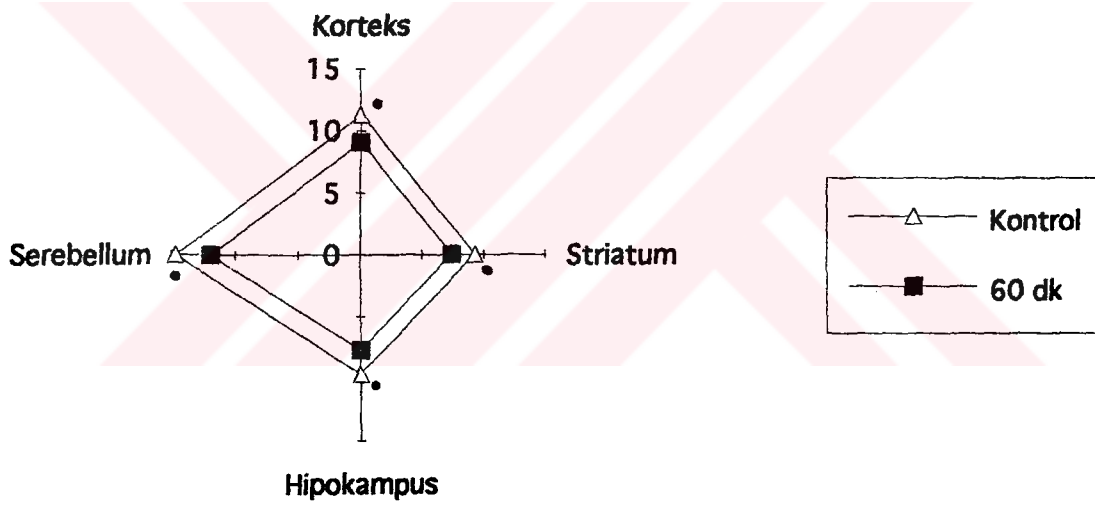
Bölgesel Beyin Kan Hacmi (rCBV)



Şekil 9. Bölgesel beyin kan hacmi (rCBV).

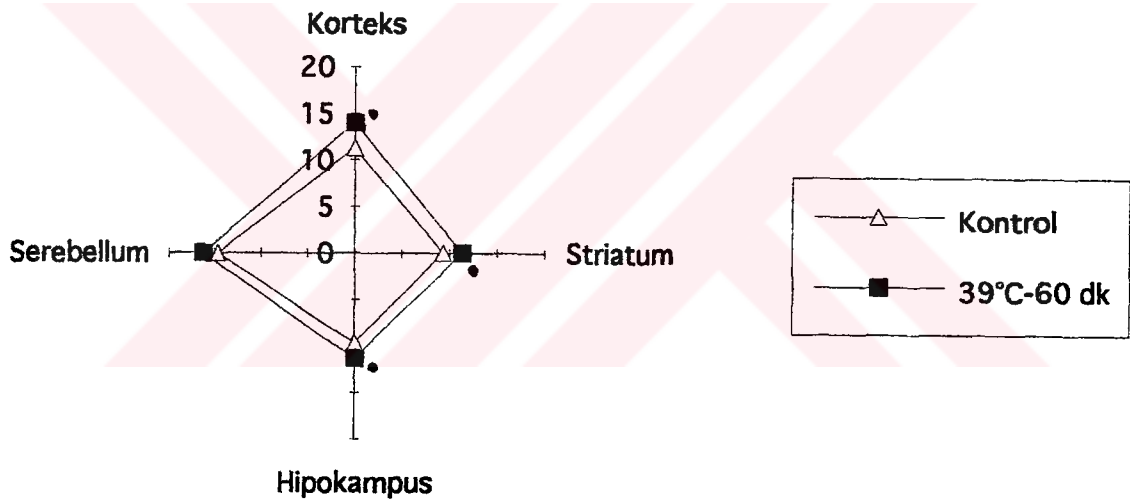
Kontrol ve 20 dk'lık geçici ön beyin iskemisini takibeden 30 dk'lık resirkülasyon döneminde gösterilmiştir. rCBV $\mu\text{l kan / g}^{-1}$ beyin olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Ort. \pm SD olarak verilmiş, anlamlılık $p < 0.05$ olarak alınmıştır.

Bölgesel Beyin Kan Hacmi (rCBV)



Şekil 10. Bölgesel beyin kan hacmi (rCBV). Kontrol ve 20 dk'lık geçici ön beyin iskemisini takibeden 60 dk'lık resirkülasyon döneminde gösterilmiştir. rCBV $\mu\text{l kan} / \text{g}^{-1} \text{beyin}$ olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Ort. \pm SD olarak verilmiş, anlamlılık $p < 0.05$ olarak alınmıştır.

Bölgesel Beyin Kan Hacmi (rCBV)



Şekil 11. Bölgesel beyin kan hacmi (rCBV).

Kontrol ve 39°C'de - 20 dk'lık geçici ön beyin iskemisini takibeden 60 dk'lık resirkülasyon döneminde gösterilmiştir. rCBV $\mu\text{l kan} / \text{g}^{-1} \text{ beyin}$ olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Ort. \pm SD olarak verilmiş, anlamlılık $p < 0.05$ olarak alınmıştır.

On dakikalık resirkülasyon sonunda, tüm beyin bölgelerinde, kan hacminde bir artış saptandı. Buna karşılık 30 ve 60 dakikalarda ise kan hacmi, kademeli olarak normale doğru bir düşüş gösterdi (Şekil 8).

Bu değerler, kortekste 30.dakika resirkülasyonda %8'lik bir düşüş oranıyla en yüksek olarak saptandı ki bu $12 \text{ dpm g}^{-1} \text{ beyin} / \text{dpm ml}^{-1} \text{ plazma}$ denk düşmektedir (Şekil 9). Altmışıncı dakika resirkülasyon zamanındaki düşüş oranı ise tüm beyin bölgelerinde birbirine çok yakın oranlarda (%16-20) bulundu (Şekil 10).

KANDAN BEYNE TEK YÖNLÜ GEÇİŞ SABİTESİ (Kin) :

AIB İÇİN KANDAN BEYİNE TEK YÖNLÜ GEÇİŞ SABİTESİ- (Kin AIB)

Normalde KBB'den geçmeyen α -aminobütirik asit (AIB) için ölçülen Kin, KBB'nin sağlam olup olmadığı hakkında bilgi vermektedir. Zaten bu nedenle tüm deney grubu hayvanlarda PA'e ek olarak AIB için de tek yönlü kandan beyne geçiş sabitesi hesaplandı (Şekil 12-15). Kontrol grubunda AIB için geçiş sabitesi 1.19 ± 0.12 ile $2.27 \pm 0.35 \text{ ml/g/dk } 10^3$ arasında hesaplandı (Şekil 12). Resirkülasyonun 10.dakikasında AIB için Kin değerleri kortekste %31 ve hipokampusta %48 oranında artmış bulundu. Bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Buna karşın hem 30 ve hem de 60.dakika RS'da AIB için Kin değerlerinde bir artış gözlenmedi ve hemen hemen kontrol değerlerine eşit bulundu (Şekil 13-14).

POLİAMİNLER İÇİN KANDAN BEYNE TEK YÖNLÜ GEÇİŞ SABİTESİ (Kin PUT ve SPMD)

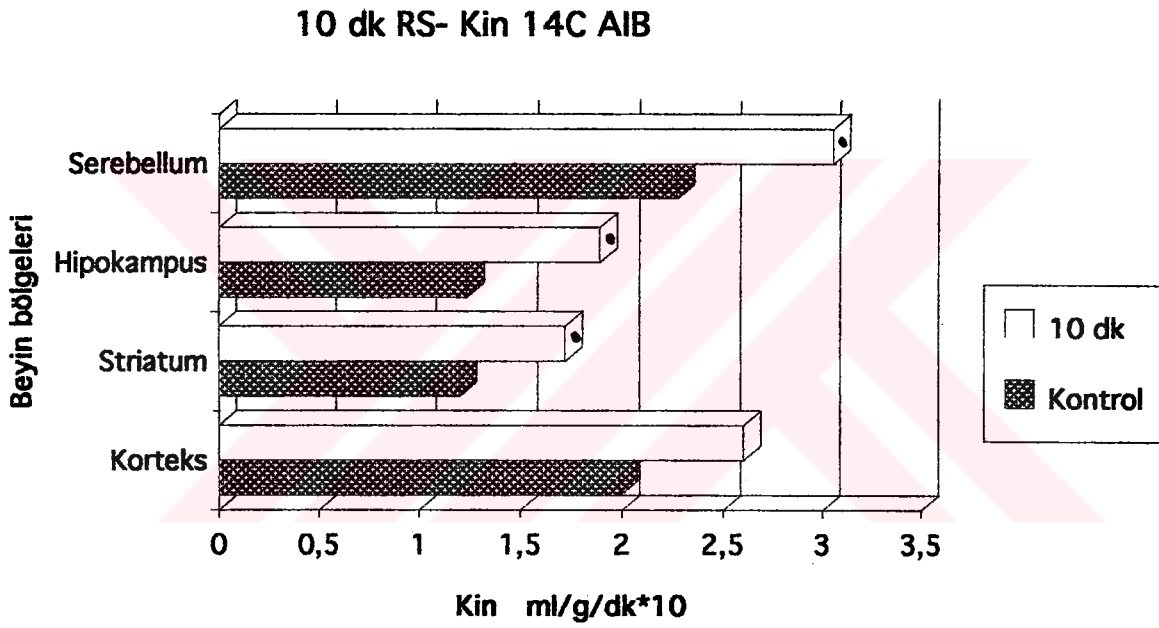
Putresin için Kin, aynı bölgeler kıyaslandığında spermidine oranla daima daha yüksek bulundu. Kontrol grubunda PUT için Kin değerleri, $2.9 \pm 0.47 \text{ ml/g/dk } 10^3$ (striatum) ile $5.75 \pm 0.89 \text{ } 10^3 \text{ ml/g/dk}$ (serebellum) arasında değişti (Şekil 16-18).

Putresin için Kin değerlerinde 10. dakika resirkülasyonda tüm beyin bölgelerinde %41 ile %66 oranında artış gözlemlendi. Kin en düşük olarak hipokampusta ($5.07 \pm 0.66 \text{ ml/g/dk } 10^3$) ölçüldü ancak en yüksek artış oranı bu bölgede izlendi.

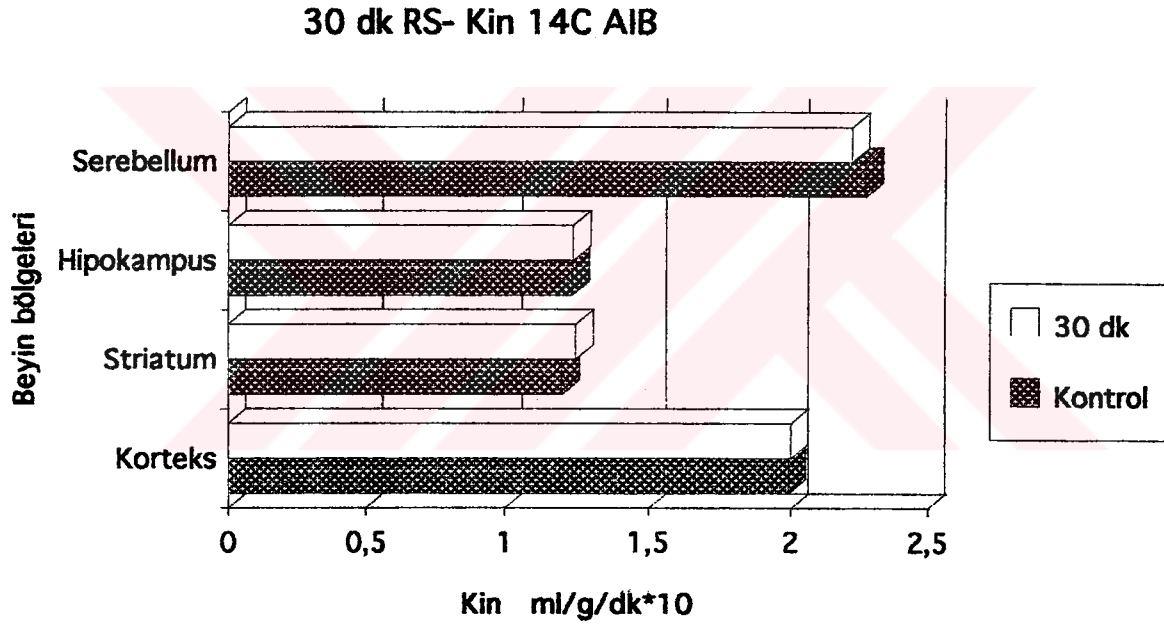
Resirkülasyonun 30.dakikasında da, çalışılan tüm beyin bölgelerinde poliaminler için Kin %50-69 arasında bir artış gösterdi (Şekil 17). Bu artışta en düşük değer $8.35 \pm 0.75 \text{ ml / g /dk } 10^3$ ile korteks bölgesinde rastlandı. Kin 'deki artış oranları striatum ve hipokampusta ise birbirine çok yakın değerlerde bulundu(% 67-69). Kin'de poliaminler için saptanan bu artışlar, çalışılan tüm bölgelerde istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Resirkülasyonun 60.dakikasında kandan beyne PUT için tek yönlü geçiş artmaya devam etti. Artış oranları, çalışılan bölgeye bağlı olmak üzere % 83 - % 117 arasında değişti. Hipokampusta yine en yüksek Kin artış oranı izlendi ve bu değer $6.64 \pm 0.67 \text{ ml/g/dk.} 10^3$ olarak hesaplandı (Şekil 18).

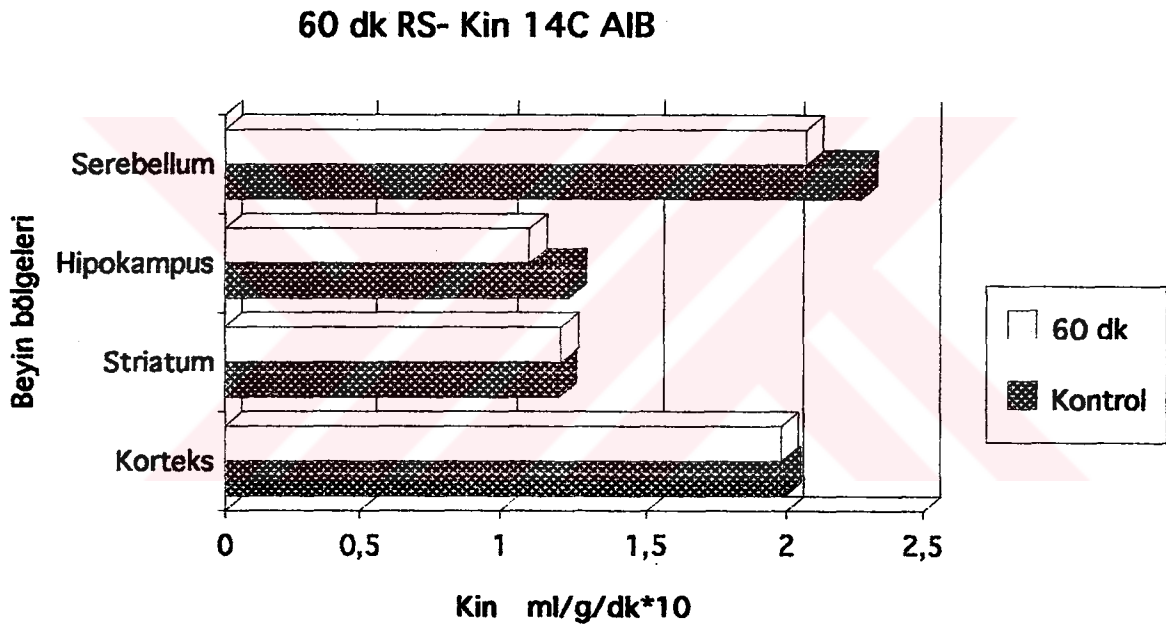
Spermidin için ölçülen Kin değerleride PUT'e benzer bir değişim gösterdi (Şekil 19). Resirkülasyonun 10.dakikasında korteks $2.95 \pm 0.34 \text{ ml/g/dk } 10^3$ ile % 45 'lik maksimal bir artış gözlemlendi. Çalışılan diğer beyin bölgelerinde ise Spermidin için Kin % 33 ile % 38 'lik artışlar gösterdi. Ancak bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.



Şekil 12. AIB için Kandan Beyne tek yönlü geçiş sabitesi (Kin) Kontrol ve 20 dk'lık geçici ön beyin iskemisini takibeden 10 dk'lık resirkülasyon dönemi gösterilmiştir. Kin: ml / g / dk 10^3 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Ort. \pm SD olarak verilmiş, tek yönlü ANOVA'yı takiben Tukey testi ile anlamlılık $p < 0.05$ olarak alınmıştır. (•)

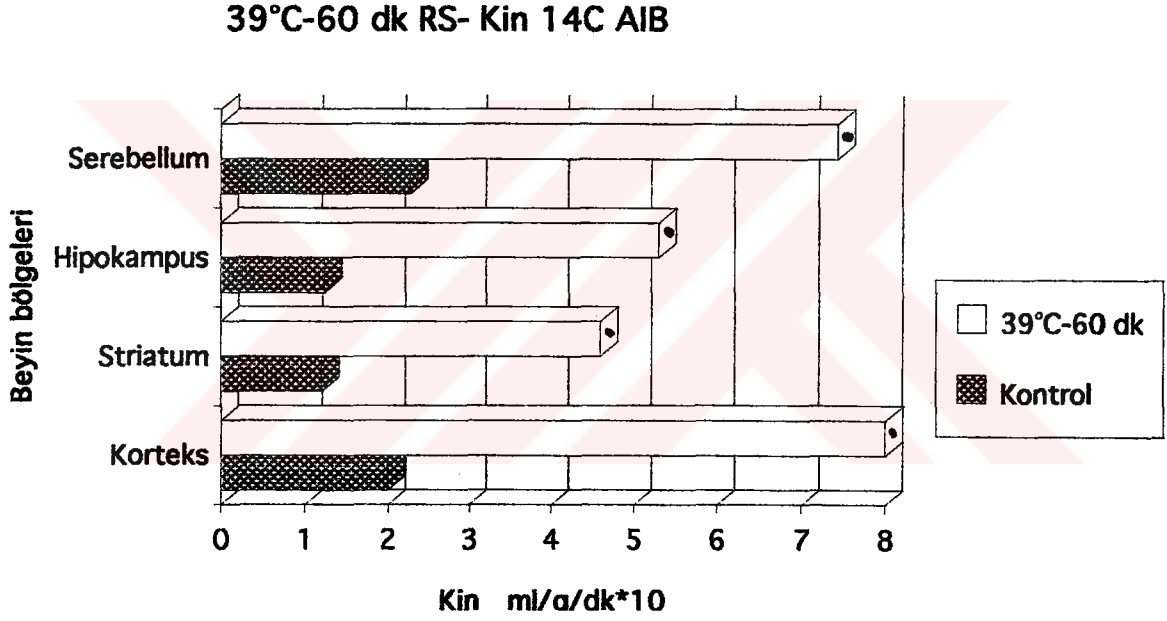


Şekil 13. AIB için Kandan Beyne tek yönlü geçiş sabitesi (Kin) Kontrol ve 20 dk'lık geçici ön beyin iskemisini takibeden 30 dk'lık resirkülasyon dönemi gösterilmiştir. Kin: ml / g / dk 10^3 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Ort. \pm SD olarak verilmiş, tek yönlü ANOVA'yı takiben Tukey testi ile anlamlılık $p < 0.05$ olarak alınmıştır. (•)



Şekil 14. AIB için Kandan Beyne tek yönlü geçiş sabitesi (Kin)

Kontrol ve 20 dk'lık geçici ön beyin iskemisini takibeden 60 dk'lık resirkülasyon dönemi gösterilmiştir. Kin: ml / g / dk 10^3 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Ort.±SD olarak verilmiş, tek yönlü ANOVA'yı takiben Tukey testi ile anlamlılık $p < 0.05$ olarak alınmıştır. (•)

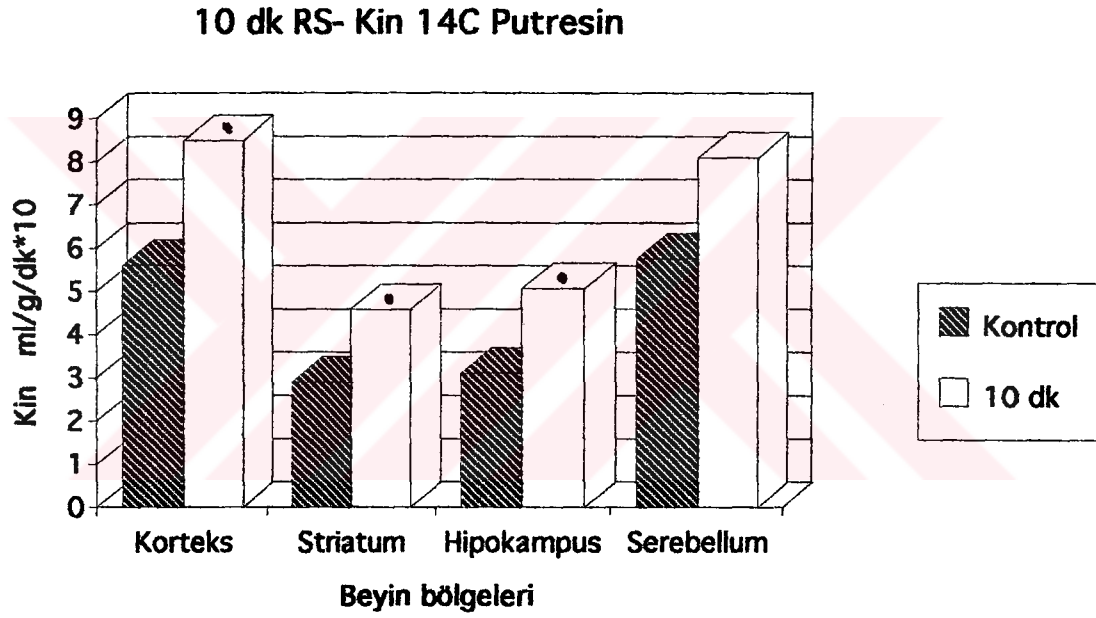


Şekil 15. AIB için Kandan Beyne tek yönlü geçiş sabitesi (Kin) Kontrol ve 39°C'de - 20 dk'lık geçici ön beyin iskemisini takibeden 60 dk'lık resirkülasyon dönemi gösterilmiştir. Kin: ml / g / dk 10³ olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Ort.±SD olarak verilmiş, tek yönlü ANOVA'yı takiben Tukey testi ile anlamlılık p<0.05 olarak alınmıştır. (•)

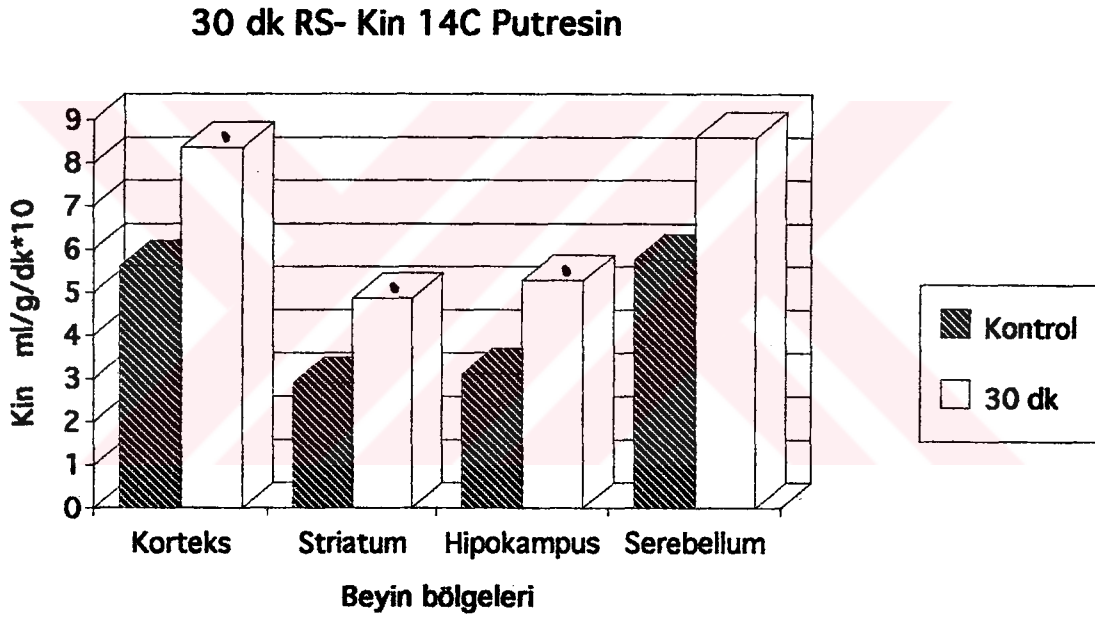
Resirkülasyonun 30.dakikasinda Kin değerleri striatum için 1.5 ± 0.12 ml/g/dk 10^3 olarak saptandı ve % 27 'lik bir artış ile en düşük değeri oluşturdu. Kortekste ise % 44 'lük artış ile en yüksek Kin değerleri ölçüldü (Şekil 20).

Altmışıncı dakikada Kin değerleri 30.dakikaya göre daha yüksek oranda bir artış gösterdi. Diğer resirkülasyon zamanlarındaki Kin değerlerinde ölçülen en yüksek artış kortekste değil hipokampusta gözlendi ve 2.75 ± 0.3 ml/g/dk 10^3 olarak hesaplandı.

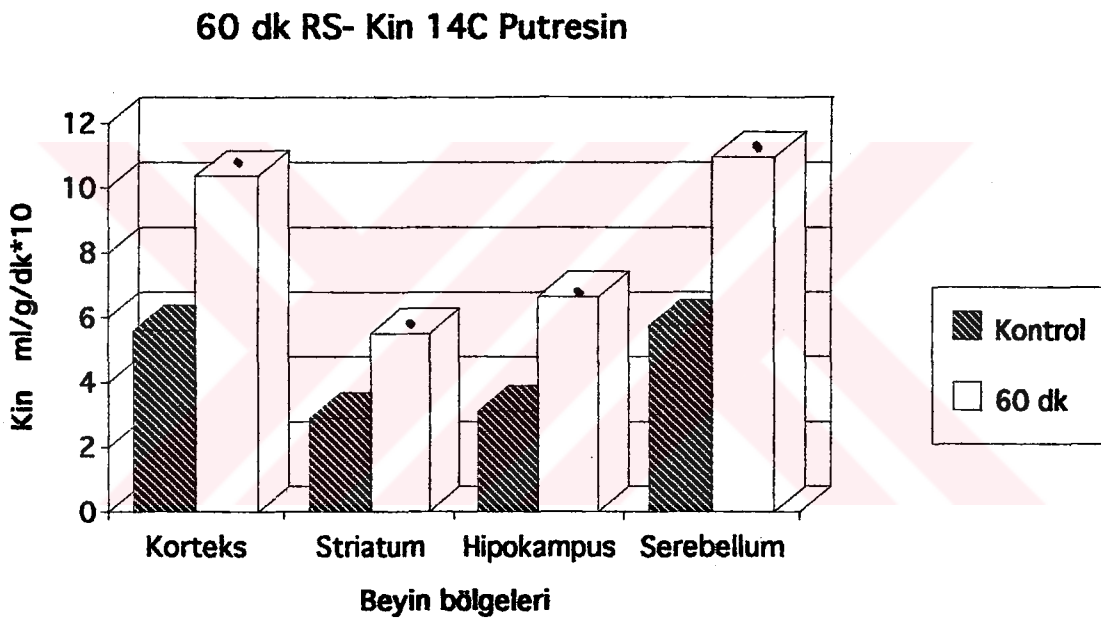
Oysa 60. dakika resirkülasyon zamanı intra iskemik hipertermiyi takip eden durumda SPMD ve AIB için Kin değerlerinde dikkati çeken bir artış gözlendi (Şekil 22). Striatumda SPMD için Kin 4.9 ± 0.7 ml/g/dk 10^3 ve AIB için Kin 4.6 ± 1.0 ml/g/dk 10^3 olarak hesaplandı. Doğal ısılı 60 dk RS grubu ile karşılaştırıldığında SPMD için % 123, AIB için % 306 oranında artış saptandı. Bu artış diğer bölgelere göre en yüksek artış oranları idi.



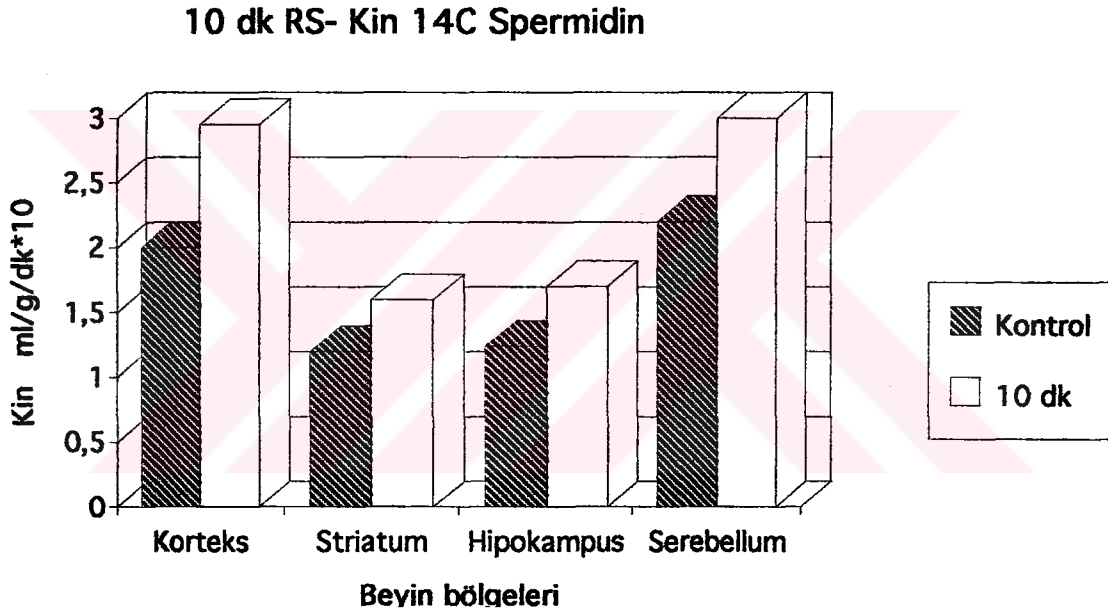
Şekil 16. Putresin için Kandan Beyne tek yönlü geçiş sabitesi (Kin) Kontrol ve 20 dk'lık geçici ön beyin iskemisini takibeden 10 dk'lık resirkülasyon dönemi gösterilmiştir. Kin: ml / g / dk 10^3 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Ort.±SD olarak verilmiş, tek yönlü ANOVA'yı takiben Tukey testi ile anlamlılık $p<0.05$ olarak alınmıştır. (•)



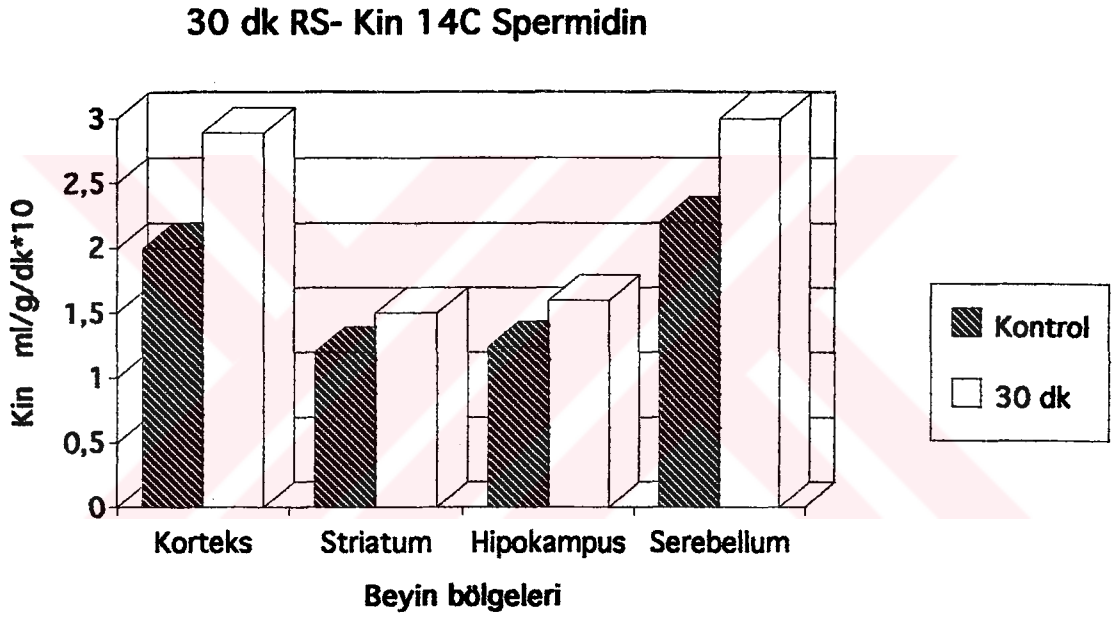
Şekil 17. Putresin için Kandan Beyne tek yönlü geçiş sabitesi (Kin) Kontrol ve 20 dk'lık geçici ön beyin iskemisini takibeden 30 dk'lık resirkülasyon dönemi gösterilmiştir. Kin: ml / g / dk 10^3 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Ort. \pm SD olarak verilmiş, tek yönlü ANOVA'yı takiben Tukey testi ile anlamlılık $p < 0.05$ olarak alınmıştır. (*)



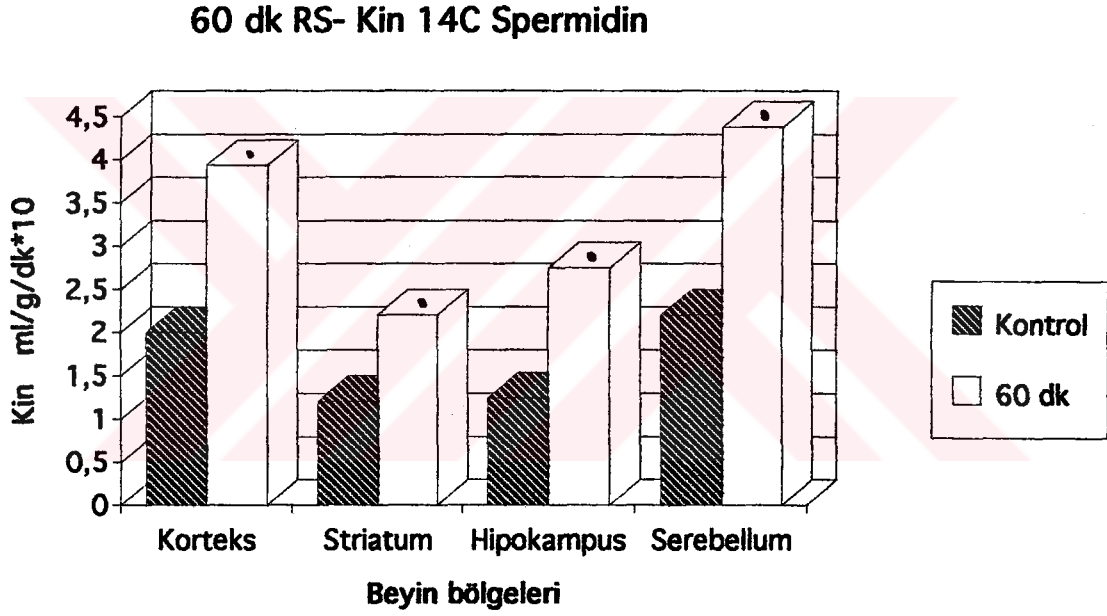
Şekil 18. Putresin için Kandan Beyne tek yönlü geçiş sabitesi (Kin) Kontrol ve 20 dk'lık geçici ön beyin iskemisini takibeden 60 dk'lık resirkülasyon dönemi gösterilmiştir. Kin: ml / g / dk 10^3 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Ort. \pm SD olarak verilmiş, tek yönlü ANOVA'yı takiben Tukey testi ile anlamlılık $p < 0.05$ olarak alınmıştır. (*)



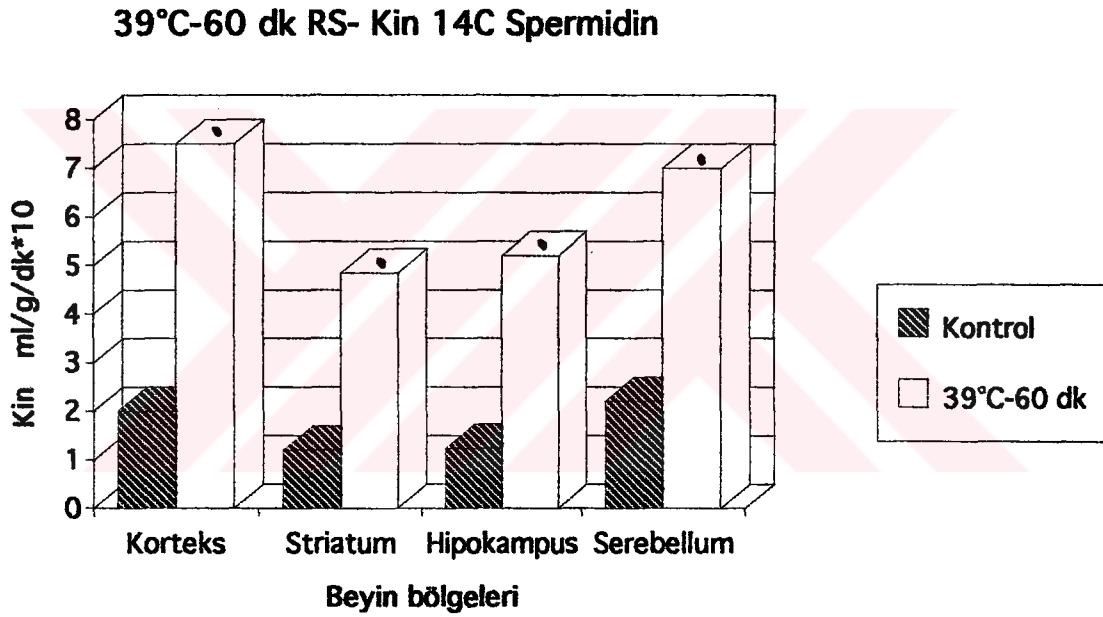
Şekil 19. Spermidin için Kandan Beyne tek yönlü geçiş sabitesi (Kin) Kontrol ve 20 dk'lık geçici ön beyin iskemisini takibeden 10 dk'lık resirkülasyon dönemi gösterilmiştir. Kin: ml / g / dk 10³ olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Ort.±SD olarak verilmiş, tek yönlü ANOVA'yı takiben Tukey testi ile anlamlılık p<0.05 olarak alınmıştır. ()



Şekil 20. Spermidin için Kandan Beyne tek yönlü geçiş sabitesi (Kin) Kontrol ve 20 dk'lık geçici ön beyin iskemisini takibeden 30 dk'lık resirkülasyon dönemi gösterilmiştir. Kin: ml / g / dk 10^3 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Ort. \pm SD olarak verilmiş, tek yönlü ANOVA'yı takiben Tukey testi ile anlamlılık $p < 0.05$ olarak alınmıştır. (•)



Şekil 21. Spermidin için Kandan Beyne tek yönlü geçiş sabitesi (Kin) Kontrol ve 20 dk'lık geçici ön beyin iskemisini takibeden 60 dk'lık resirkülasyon dönemi gösterilmiştir. Kin: ml / g / dk 10^3 olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Ort. \pm SD olarak verilmiş, tek yönlü ANOVA'yı takiben Tukey testi ile anlamlılık $p < 0.05$ olarak alınmıştır. (*)



Şekil 22. Spermidin için Kandan Beyne tek yönlü geçiş sabitesi (Kin) Kontrol ve - 39°C - 20 dk'lık geçici ön beyin iskemisini takibeden 60 dk'lık resirkülasyon dönemi gösterilmiştir. Kin: ml / g / dk 10³ olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Ort.±SD olarak verilmiş, tek yönlü ANOVA'yı takiben Tukey testi ile anlamlılık p<0.05 olarak alınmıştır. (•)

TARTIŞMA

POLİAMİNLER ve KAN BEYİN BARIYERİ

Beyinde oluşan değişik patolojik durumlarda, KBB ile PA'ler arasındaki ilişki bir çok çalışmaya konu olmuştur (39, 40, 41, 96, 97). Sıçan beyinde kriyojenik lezyon uygulanarak KBB'nin yıkıldığı Evans Mavisi ve Fluorosein kullanılarak gösterilmiş olduğu çalışmada tüm doku homojenatında ve izole mikrodamar fraksiyonlarında PA düzeylerinin yüksek olduğu bulunmuştur (67). Araştırmacılar KBB yıkımından PA biosentezi ve ornitin dekarboksilaz (ODC) enzim aktivitesindeki artışın sorumlusu olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca KBB'nin yıkılmasının irreversibl olarak ODC enzimini inhibe eden difluorometilornitin (DFMO) kullanılarak suprese edilebildiğini göstermişlerdir (94, 98). Bunun gibi, KBB yıkımının DFMO ile engellenebildiği, horseradishperoxidase (HRP) pozitif veziküllerin ve mikrovillusların yokluğu ile gösterilmiş olup PUT'in tekrar verilmesi

ile yeniden KBB yıkımına yol açtığı izlenmiştir(67, 134). KBB'nin hiperosmolar eriyiklerin enjeksiyonu ile yıkılmasında da yukarıda belirtilenlere benzer sonuçlar elde edilmiştir(68, 69).

Bir başka çalışmada da hepatik ensefalopati oluşturulan deney hayvanlarında(ki burada da KBB yıkımı oluşmaktadır), DFMO'nin KBB yıkımını deksametazona göre daha çok azalttığı gözlenmiştir (114,117).

Beyin iskemisi oluşturulan sıçanlarda, DFMO'nun postiskemik beyin ödemi, KBB yıkımını ve beyinde oluşan iskemik infarkt hacmini azalttığı gösterilmiştir (70, 83). Yine PA'lerin sorumlu olduğu ileri sürülen geç dönem radyasyonun omurilikte ve beyinde yaptığı hasarın ve KBB yıkımının DFMO kullanılmasıyla azaldığı, MSS'in nispeten radyasyona tolerans kazandığı ortaya konmuştur. DFMO, PA düzeylerini azaltmış ve beyaz madde infarktına yol açan vazojenik ödemini önlemiş; dolayısı ile KBB bütünlüğünü korumaya yönelik bir rol oynamıştır (46).

POLİAMİNLER ve İSKEMİ

Poliamin ve KBB lezyonları dışında beyin diğer patolojik durumlarında da PA'lerin beyinde zararlı etkilerini gösteren deliller bulunmaktadır(Bkz. giriş bölümü).

Postiskemik PUT artışı iskeminin hem süresi ile hem de nöronal nekrozun yoğunluğu ile doğru orantılı olduğu bulunmuştur. Postiskemik dönemdeki dramatik PUT artışı ve ODC aktivitesindeki yükselmenin , vazojenik ödemin gelişmesinden ve nöronal ölümden sorumlu olduğu ileri sürülmüştür(96, 97).

PAler, Ca^{+2} un hücre içine girişinde hiperaktivasyona yol açmaktadır (34). Bu da, içerisinde H_2O_2 oluşumu, nörotransmitter salınması, lipoliz, protein fosforilasyonu, proteoliz (ki membran ve vasküler disfonksiyona yol açar), ödem,

hücresel proteinlerin degradasyonuna yol açan olaylara sebep olması dolayısıyla, Ca^{+2} sonuçta hücre ölümüne sebep olabilir (35) (Şekil 5).

PA'lerin iskemide ekstrasellüler alana salınması (42) muhtemelen NMDA reseptörünü aktive eder, bu da yukarıda belirtilen olayları tetikleyerek hücre ölümüne sebep olabilir. NMDA reseptörleri ve PA'lerin bağlanma bölgeleri Şk 6'da gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen PA'lerin bu yıkıcı etkileri yanında bir grup araştırma sonuçları da PA'lerin koruyucu rollerini ortaya koymaktadır. Bu çalışmalara göre PUT yüksek konsantrasyonlarda NMDA reseptör kompleksinde inhibitör rol oynar. SPMD düşük konsantrasyonlarda bu reseptörü aktive edemez (126). Nitekim 3 saate kadar olan erken RS zamanlarında ekstrasellüler PA düzeylerinin çok düşük olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle SPMD'nin NMDA reseptörlerini aktive etmesi zordur (137).

Son yıllarda poliaminlerle ilgili olarak yapılan araştırmalar, PA'lerin çok sayıdaki hücrenin yapı ve fonksiyonunu kontrol ettiğini ortaya koymuştur. Bunlar;

- * hücresel Ca^{++} 'u düzenlediği, Ca^{++} ATPase'ı inhibe ettiği, endoplazmik retikulumdan Ca^{++} akışını durdurduğu (112, 115, 130),

- * kalmodulin ile etkileşip Ca^{+2} bağlanmasını önlediği (119, 120),

- * fosfolipidlere bağlanarak lipid peroksidasyonunu regüle ettiği (121, 131),

- * NMDA reseptörüne antagonist bağlanmayı arttırabileceği (SPMD ve SPM için) (62, 126, 137, 138) (Şekil 6),

- * membranları stabilize ettiği (18),

- * nükleik asitleri stabilize ettiği (99, 118),

- * bir defans/survi programını başlattığı (41),

şeklinde özetlenebilir.

Erken postiskemik zamanlarda düşük ekstrasellüler PA düzeyleri, yukarıdaki bulgular ve bunlara ek olarak MSS'de oluşan herhangi bir hasara karşı PA cevabının "eksik" oluşu (41) (PSS'indeki "tam" PA cevabına karşın ki; bu bir akson hasarında nöronun survisi için şarttır!) eksojen PA'lerin beyin hasarlarında denenmesine temel oluşturmuşlardır.

Beyin iskemisinden hemen sonra verilen tekrarlı PA tedavisi ile santral nöronların dejenerasyondan korunduğu görülmüştür(39). İskemide önemli rolü olan glutamat nörotoksisitesinde de PA koruyuculuğunu destekler tarzda sonuçlar elde edilmiştir(37).

İSKEMİDE POLİAMİNLERİN KAN BEYİN BARIYERİNDEN GEÇİŞLERİ

Hidrofilik maddelerin, eğer beyin için "olmazsa olmaz" durumları var ise, beyne spesifik taşıyıcı sistemler ile alındığı bilinmektedir(87, 92). PA'ler de suda eriyen maddeler olup normalde beyne girmemeleri beklenir. PA'lerin periferik kullanımının beyne iskemiden koruması, PA'lerin veziküler taşıma ile beyne geçişiyle açıklanamamaktadır(97). Çünkü sadece fiksasyon prosedürü bile vezikül sayısını anlamlı olarak değiştirebilmektedir. Bu durumda PA'ler kandan beyne nasıl geçmektedirler?

Bu konuda ilk çalışma Kremzner tarafından yapılmış olup fizyolojik şartlarda ¹⁴C PUT veriminden sonra beyinde çok düşük bir radyoaktivite saptanmıştır(71).

Beyin kesitlerinde PUT için taşıyıcı sistemlerin varlığını gösterme amacıyla yapılan çalışmalar ise başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Beyin uptake indeksi(BUI) tekniği ile de PA'lerin beyne çok az geçebildiği belirlenmiştir(123). Biz de daha önceki bir araştırmamızda, ayrıntılı sonuç veren ve bu çalışmada da

kullandığımız intravenöz teknikle ölçülen kandan beyne tek yönlü transfer sabitesi ile benzer sonuçlara ulaşılmıştır(29).

Bu çalışmada elde ettiğimiz veriler ise PA'lerin ve AIB'nin, 20 dakikalık 4DO nu takip eden 10 dk RS zamanında; nonspesifik olarak beyne geçtiğini, buna karşın 30 ve 60 dk RS zamanlarında hem putresinin hem de spermidinin beyne geçerken AIB'nin beyne geçmediğini göstermiştir (17, 18, 20, 21).

On dakikalık RS zamanında KBB geçirgenliğindeki artışı, iskemi sonrası reaktif hiperemi fazına uymasıyla açıklamak olasıdır. Nitekim çeşitli araştırmalar bu fazın en erken 4-5.dakikalarda başlayıp 16.dakikaya dek sürdüğünü göstermiştir(133). Reaktif hiperemi fazı KBB geçirgenliğini arttırmakta, hem ödem oluşumuna(4) hem de küçük molekül ve ionların bariyerden geçişine neden olmaktadır. 4DO global beyin iskemisini takibeden 15 ve 60. dakikalarda lösine karşı KBB'nin bifazik açıldığı gösterilmiştir(57).

KBB de gözlenen geçirgenlik artışının bir diğer nedeni, beyin iskemisi sırasında otoregülasyon kaybolduğundan, arteriyel kan basıncındaki 30 mmHg'lık bir değişime yol açması ve KBB'i fizyolojik koşullarda olduğundan daha fazla etkilemesi, olarak düşünülebilir.

Deneilerimizde 30 ve 60 dk.RS zamanlarında saptamış olduğumuz AIB geçişinin olmayışı, yani diğer bir deyişle KBB'nin intakt oluşu önceki çalışmalara uygunluk göstermektedir.

Ancak bulgularımız 30 ve 60. RS zamanlarında kandan beyne AIB geçişinin pratik olarak oluşmadığını gösterirken, PA'lerin "tercihli" olarak geçtiğini ortaya koymuştur. Bu da RS zamanlarının postiskemik reperfüzyon dönemine denk düşmektedir (133). PA'lerin postiskemik hipoperfüzyon dönemindeki bu tercihli geçişi dikkatimizi olası PA taşıyıcısına çevirdi.

OLASI PA TAŞIYICILARI

KBB'den bir maddenin geçişi, genel olarak onun lipide çözünülebilirliğine -oktanol/su karışım sabitesine (110) bağlıdır. PA'ler polikatyonik polar maddeler olup suda yüksek çözünürlüğe sahiptir ve normalde beyne girmemesi beklenir. Oysa çalışmalar PA'lerin beyne giremeyişinin "mutlak" olmadığını göstermiştir (29, 71, 123). Bu da PA'lere spesifik taşıyıcı var mı? sorusunu gündeme getirmiştir.

In vivo ve in vitro yapılan deneyler bazı hücre soyları ve sistemlerde PA taşınımının ilk ipuçlarını vermiştir(121). PA transportu akciğer hariç olmak üzere enerji ve temperatüre bağımlı olup, satüre edilebilir. Birçok hücre soyundaki transportör tek iken, multipl transportöre sahip hücreler de bildirilmiştir(120). Şimdiye değin PAlerin KBB düzeyinde invivo bir taşıyıcısı belirlenememiştir.

Bundan önceki bir çalışmamızda PA'lerin gelişmekte olan sıçan beyinlerine geçişini iv. teknikle gösterdik. KBB'nin gelişim evresinde immatür olabileceği şüphesi ile Takasato'nun in-situ beyin perfüzyonu tekniğini kullandık (132). Bu teknik ile radyoaktif işaretli PA'lere ek olarak radyoaktif işaretli PA'leri de kullanarak bir saturasyon ettik. Bu durumda meydana gelen PA taşınmasındaki azalma bize in vivo olarak ilk kez PA transportör varlığını ileri sürme imkanı vermiştir (Diler ve ark., Yayına hazırlanıyor).

PA'lere çok ihtiyacı olan prostat ve tümör hücreleri ile normal olup ta proliferasyonda olan hücrelerin de, PA ihtiyaçlarına paralel olarak daha fazla PA aldıkları belirlenmiştir(59, 121). In vitro olarak düşük-afiniteli PA alımı (uptake) beyin sinaptosomlarında, yüksek-afiniteli PA alımı ise sağlam nöron, glia hücrelerinde ve beyin sinaptosomlarında gösterilmiştir (50). Beyin PA alımı iskemi gibi nöronal hasar yaratan bir ortamda önem kazanır. İntrasellüler PA'lerin boşaltılması onların tekrar uptake'ini birkaç misli arttırır(53).

İskemi ve RS PA biyosentezinde bir artışa yol açarsa da intrasellüler PA düzeylerinde ne gibi değişimler olabileceği konusunda bugün için bir fikir sahibi değiliz. Oysa PA uptake'nin özellikle intrasellüler PA düzeyleri tarafından belirlendiği ileri sürülmüştür(2, 119). Poliamin havuzlarının ayırımı(21) ve PA düzey tayinleri ile daha aydınlatıcı değerlendirmeler yapılabilir.

Çalışmamızda PUT için Kin değerleri, SPMD için Kin değerinden (hem kontrol hem de deney gruplarında) daima yüksek düzeyde bulunmuştur. Vasküler endotelin luminal tarafı negatif bir yük taşır. Oysa PA'ler pozitif yüklü polikasyonlardır ve negatif yüklü membran bölümlerine hızla bağlanırlar. SPMD, PUT'e göre bir fazla pozitif yüke sahiptir, bu da onun muhtemelen membrana daha sıkıca bağlanmasına dolayısı ile beyne SPMD geçişinde nisbeten azalmaya neden olacaktır. Buna ek olarak sialik asidin ve membran potansiyelinin de olası rolü ileri sürülmüştür(64, 65) .

İskemi denince akla ilk gelen, enerjinin tükenmesi ve iyonik homeostasinin kaybıdır ki resirkülasyonda bu olaylar hızla kompanse edilmeye çalışılır (107, 124, 125, 135).

İskemide de protein sentez eksikliği dikkat çekerken (54, 75) bazı spesifik genler (Heat Shock Protein, ODC ..) tercihli olarak eksprese edilir (11, 47, 51, 58, 86, 101). MSS'de hasar yaratan bir olayı takiben eksojen verilen PA'ler ya da artan endojen PA'ler hızla nükleik asitlere bağlanıp, tercihli genlerin sentezine yol açabilirler. Ancak çalışmamız erken postiskemik dönemin 1 saate varan kısmını kapsadığından, bu süre içinde yeni bir taşıyıcı protein sentezinin olanaklı olması beklenemez.

Gelişmekte olan sıçanlarda ilk kez gösterdiğimiz taşıyıcı varlığına ilişkin kanıtlar ve Byers'in, PA transport proteinlerinin çok duyarlı ve stabil olduğunu göstermesi (13), KBB düzeyinde var olduğunu düşündüğümüz PA

taşıyıcılarının reaktive olmasının veya üzerlerindeki olası bir inhibisyonun kalkmasının (desinhibisyon) daha olanaklı olduğunu düşündürmektedir.

PA transportunu iskemiye yönelik bir adaptasyon mekanizması olup olmadığı ilerdeki çalışmalar ile ortaya çıkacaktır. Bu çalışmalar erken postiskemik dönemde selektif gen ekspresyonunu ve PAlerin değişik nötrofilik faktörlerle, hormonlarla ilişkisini incelemek ve taşıyıcının karakterini tanımlamak yolunda olacaktır.

İNTRAİSKEMİK HAFİF HİPERTERMİ

İskemi sırasında ısının hafif derecede yüksek olması, daha sonraki dönemlerde metabolik iyileşmenin zorlaşmasına yol açar. Bu da iskemik beyin hasarını arttırır. İntraiskemik hipertermi, striatum, hipokampus, neokorteksin yüzeyel katmanları ve talamus nükleuslarında hızlı bir iskemik hücre hasarına yol açar(27). Çalışmamızda AIB kullanarak saptadığımız bariyer fonksiyonu, intraiskemik hipertermi nedeni ile hasarlanmıştır. Bu bulgu global serebral iskemide hafif hiperterminin sadece nöronal değil, vasküler hasarın da kritik determinantı olduğunu doğrular(12, 28). Bir protein traseri ile ölçülen KBB permeabilitesinin, global ön beyin iskemisini takip eden RS zamanlarında, arttığı tespit edilmiştir (26).

Çalışmamızda intraiskemik hiperterminin KBB'nin taşıyıcı fonksiyonlarını da değiştirdiğini gözledik. 20 dakikalık geçici ön beyin iskemisini takip eden 60 dakikalık RS zamanında görülen spesifik SPMD transportu, intraiskemik hipertermi ile non-spesifik bir karakter kazandı. Bu bize iskemi sırasındaki beyin ısısı artışının KBB tüm fonksiyonlarını etkilediğini gösterdi. Hipertermik grupta kandan beyine tek yönlü SPMD geçiş sabitesi, 5 ve 10. RS zamanlarındaki geçiş karakterine benzemesine rağmen, oranları daha yüksek bulundu. Hipertermik gruptaki KBB'nin non-spesifik olarak geçirgen olması, beyne

girmesi istenmeyen ve normal koşullarda KBB'nin bariyer fonksiyonu tarafından engellenen zararlı maddelerin de beyne girmesine yol açar ki, bu da iskemi sonrası iyileşmeyi güçleştirir. Bu nedenle biz beyin iskemisi çalışmalarında, beyin ısısının gözardı edilmesinin hatalı sonuçlara yol açabileceğini düşünöyoruz.



KAYNAKLAR

1. Agnati LF, Fuxe K, Davalli P, Zini I, Corti A, Zoli M (1985) Striatal ornithine decarboxylase activity neurotoxic and mechanical lesions of the mesostriatal dopamine system of the male rat. *Acta Physiol Scand* 125: 173-175.
2. Antrup H, Seiler N (1980) On the turnover of polyamines spermidine and spermine in mouse brain and other organs. *Neurochem Res* 5: 123-143.
3. Arai A, Baudry M, Staubli U, Lynch G, Gall C (1990) Induction of ornithine decarboxylase by subseizure stimulate of the hippocampus in vivo. *Mol Brain Res* 7: 167-169.
4. Avery S, Crockard HA, Russel RR (1984) Evolution and resolution of oedema following severe temporary cerebral ischemia in the gerbil. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 47: 604-61.
5. Benveniste H, (1991) The excitotoxin hypothesis in relation to cerebral ischemia. *Cerebrovasc Brain Metabo Rev* 3: 213-245.
6. Betz AL, Goldstein GW, Katzman R (1994) Blood-Brain-Cerebrospinal Barriers. In *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical aspects* (Siegel GJ ed) Raven Press, New York pp 681-699.

7. Blasberg RG, Fenstermacher JD, Patlak CS (1983a) Transport of α -Aminobutyric acid across brain capillary and cellular membranes. *J Cereb Blood Flow Metab* 3: 8-32.
8. Blasberg RG, Patlak CS, Fenstermacher JD (1983b) Selection of the experimental conditions for the accurate flow determination of Blood Brain transfer constants from single time experiments: a theoretical analysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 3: 215-225.
9. Bradbury MW (1979) *The concept of a blood-brain barrier*. Wiley and Sons.
10. Brightman MW, Reese TS (1969) Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol.*,40: 207-217.
11. Burdon RH, Cutmore MM (1982) Human heat shock gene expression and the modulation of plasma membrane Na-K ATPase activity. *FEBS* 140: 45-48.
12. Busto RJ, Dietrich WD, Globus MYT, Valdés I, Scheinberg P, Ginsberg MD (1987) Small differences in intraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 7: 729-738.
13. Byers TL, Pegg AE (1988) The regulation of polyamine transport in mammalian cell model. *Int Symp. Polyamines in Biochemical and Clinical Research, Sorrento, Italy*, Abstr p 64
14. Carter C, Carboni S, Fage D, Voltz C, Poignet H, Scatton B (1993) Release of spermidine from the parietal cortex following middle cerebral artery in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 13: S458.
15. Choi D (1988) Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11: 465-469.
16. Choi D, Rothman SM (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Ann Rev Neurosci* 13: 171-182.

17. Chopp M, Knight R, Tidwell CD, Helpert JA, Brown E, Welch KMA (1989) The metabolic effects of mild hyperthermia on global cerebral ischemia and recirculation in the cat: comparison to normothermia and hypothermia. *J Cereb Blood Flow Metab* 9: 141-148.
18. Cohen SS (1971) Introduction to the polyamines. Prentice-Hall, Engelwood Cliffs, New Jersey.
19. Cornford EM, Braun LD, Oldendorf WH, Comparison of lipid mediated BBB permeability in neonates and adults (1982) *Am J Physiol* 243:161-168.
20. Crone C, Olesen SP (1986) Electrical resistance of brain microvascular endothelium, *Brain Res*, 241,: 49-55.
21. Davis RH (1990) Management of polyamine pools and the regulation of ornithine decarboxylase activity; *J Cell Biochem* 44: 199-205.
22. Davson H (1973) Ontogeny of the BBB. In Boreus L (ed) *Fetal Pharmacology*, Raven Press, NY, pp 75-88.
23. Dempsey RJ, Roy MW, Meyer K, Tai HH, Olson JW (1985) Polyamine and prostaglandin markers in focal cerebral ischemia. *Neurosurg* 7: 635-640.
24. Dempsey RJ, Roy MW, Cohen DE, Combs D (1988) Polyamine inhibition preserves somatosensory evoked potential activity after transient cerebral ischemia. *Neurol Res* 10: 141-145.
25. Dienel GA (1984) Regional accumulation of calcium in postischemic rat brain. *J Neurochem* 43: 913-925.
26. Dietrich WD, Busto R, Halley M, Valdés I (1990) The importance of brain temperature in alterations of the blood brain barrier following cerebral ischemia. *J Neuropathol Exp Neurol* 49: 486-497.
27. Dietrich WD, Halley M, Valdés I, Busto R (1991) Interrelationships between increased vascular permeability and acute neuronal damage following temperature-controlled brain ischemia in rats. *Acta Neuropathol* 81: 615-625.

28. Dietrich WD (1992) The importance of brain temperature in cerebral injury. *J Neurotrauma* 9: S475-485.
29. Diler AS, Lefauconnier JM, Bernard G, Ziylan YZ, Bourre JM (1993) Transport of a polyamine: spermidine across the blood brain barrier of adult and 6-day-old rats. *J Neurochem* 61: S50B.
30. Dobbin J, Crockard HA, Russel RR (1989) Transient blood brain barrier permeability following profound temporary global ischemia: An experimental study using ¹⁴C-AIB. *J Cereb Blood Flow Metab* 9: 71-78.
31. Ehrlich P (1885) *Das Sauerstoff des Organismus. Eine Farbenanalytische Studie.* Hirschwald, Berlin.
32. Fenstermacher JD, Rapoport SI (1984) Blood brain barrier. In *Handbook of physiology- The cardiovascular system* (Geiger ed) 4, American Physiological Society, pp 969-1000.
33. Ferenc J (1996) Endothelial cells of the brain and other organ systems: some similarities and differences. In *Progress in Neurobiology* Vol. 48 pp 255-273. Elsevier Sci, Great Britain.
34. Flores HE (1990) Polyamines and plant stress. In *stress response in plants: adaptation and acclimation mechanisms* (Alscher RC, Cumming JR eds) Wiley Liss, New York pp 217-239.
35. Fukushima Y (1990) Membrane destruction by polyamines. *Biomed Res* 11: 345-352.
36. Gilad GM, Gilad VH (1983) Early rapid and transient increase in ornithine decarboxylase activity within sympathetic neurons after axonal injury. *Exp Neurol* 81: 158-166.
37. Gilad GM, Gilad VH (1989a) Treatment with polyamines can prevent monosodium glutamate neurotoxicity rat retina. *Life Sci* 44: 1963-1969.

38. Gilad GM, Dornay M, Gilad VH (1989b) Polyamines induce precocious development in rats: Possible interactions with growth factors. *Int J Dev Neurosci* 7: 641-653.
39. Gilad GM, Gilad VH (1991a) Polyamines can protect against ischemia induced nerve cell death in gerbil forebrain. *Exp Neurol* 111: 349-355.
40. Gilad GM, Gilad VH (1991b) Polyamine uptake, binding and release in rat brain. *Eur J Pharmacol* 193: 41-46.
41. Gilad GM, Gilad VH (1992) Polyamines in neurotrauma-ubiquitous molecules in search of a function. *Biochem Pharmacol* 44: 401-407.
42. Gilad GM, Casero RA, Busto RJ, Globus MYT (1993a) Polyamines in rat brain extracellular space after ischemia. *Mol Chem Neuropathol* 18: 27-33.
43. Gilad GM, Gilad VH, Wyatt RJ (1993b) Accumulation of exogenous polyamines in gerbil brain after ischemia. *Mol Chem Neuropathol* 18: 197-210.
44. Ginsberg MD, Busto RJ (1989) Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* 20: 1627-1642.
45. Goldstein G, Betz L (1986) La barrière qui protège le cerveau, *Pour la Science*, Nov. pp;84-94.
46. Gutin PH, Mcdermott MW, Ross G, Chan PH, Chen SF, Levin KJ, Babun O, Marton LJ (1990) Polyamine accumulation and vasogenic oedema in the genesis of late radiation injury of the central nervous system. *Acta Neurochirurg* 51: S372-374.
47. Haefelin TN, Wiessner C, Vogel P, Back T, Hossmann KA (1994) Differential expression of the immediate early genes c-fos, c-jun, jun B and NGF-IB in the rat brain following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 14: 206-216.
48. Haliwell B, Gutteridge JMC (1985) Oxygen radicals and the nervous system. *Trends Neurosci* 8: 22-26.

49. Halliday CA, Shaw GG (1976) The distribution and metabolism of putrescine, spermidine injected into cerebral ventricles of rabbits. *J neurochem* 26: 1199-1205.
50. Harman RJ, Shaw GG (1981) High affinity uptake of spermidine by slices of the rat cerebral cortex. 36: 1609-1615.
51. Hashimoto Y, Kawatsura H, Shiga Y, Furukawa S, Shigeo T (1992) Significance of nerve growth factor content levels after transient forebrain ischemia in gerbils. *Neurosci Lett* 139: 145-146.
52. Heby O, Andersson G (1980) Polyamines and the cell cycle. In *Polyamines in biomedical research* (Gaugas JM ed) John Wiley, Chichester pp 17-34.
53. Heston WDW, Uy L, Fair WR, Coray DF (1985) Cytotoxic activity of azridinyl putrescine enhanced by polyamine depletion with α -difluoromethylornithine. *Biochem Pharmac* 34: 2409-2410.
54. Hossman KA (1993) Disturbances of cerebral protein synthesis and ischemic cell death. In *Progress in Brain research* (Kogure K, Hossman KA, Siesjo BK eds) Elsevier pp 161-177.
55. Hossman KA (1994) Glutamate mediated injury in focal cerebral ischemia. The excitotoxin hypothesis revised. *Brain Pathol* 4: 23-36.
56. Ikeda YL, Long DM (1990) The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. *Neurosurgery* 27: 1-11.
57. Ito U, Ohno K, Nakamura R, Saganuma F, Inaba Y (1979) Brain edema during ischemia and after and restoration of blood flow-measurement of water, sodium, potassium content and plasma protein permeability. *Stroke* 10: 542-547.
58. Jacowitz M, Kiessling M, Pulsinelli WA (1986) Selective gene expression in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 6: 263-272.
59. Janne J, Raina A (1966) Further observations on the biosynthesis of polyamines in regenerating rat liver. *Acta Chem Scand* 20: 1174-1176.

60. Johanson CE, Woodbury DM (1974) Changes in CSF flow and extracellular space in the developing brain. in Venedakis A, Werner N (eds). *Drugs and developing brain*, Plenum, NY, pp. 281-287.
61. Johanson CE (1980) Permeability and vascularity of the developing brain, *Brain Res*, 190: 3-16.
62. Johnson KM, Sacaan AI, Wang J (1992) Regulation of the receptor ionophore complex by polyamines and divalent cations. *Mol Neuropharmacol* 2: 103-105.
63. Karpiak SE, Tagliavia A, Wakade CG (1989) Animal models for the study of drugs in ischemic stroke. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 29: 403-414.
64. Kahn NA, Quemener V, Moulinox JPH (1991) Polyamine membrane transport regulation. *Cell Biol Int Rep* 15: 9-24.
65. Kahn NA, Quemener V, Sciler N, Moulinox JPH (1990) Characterization of spermidine transport and its inhibition with polyamine analogues in culture mammalian cells. *Exp Cell Biol* 5: 172-178.
66. Karpiak SE, Tagliavia A, Wakade CG (1989) Animal models for the study of drugs in ischemic stroke. *Ann Rev Pharmacol*. 29:403-414.
67. Koenig H, Golstone AD, Lu CY (1983) Blood brain barrier breakdown in brain edema following cold injury is mediated by microvascular polyamines. *Biochem Biophys Res Comm* 116: 1036-1048.
68. Koenig H, Golstone AD, Lu CY (1989a) Polyamines mediate the reversible opening of the blood brain barrier by the intracarotid infusion of hyperosmolal mannitol. *Brain Res* 483: 110-116.
69. Koenig H, Golstone AD, Lu CY, Trout JJ (1989b) Polyamines and CA^{+2} mediate hyperosmolal opening of the blood brain barrier; in vitro studies in isolated rat cerebral capillaries. *J Neurochem* 52: 1135-1142.

70. Koenig H, Golstone AD, Lu CY, Trout JJ (1990) Brain polyamines are controlled by NMDA receptors during ischemia and recirculation. *Stroke* 21: S98-102.
71. Kremzner LT (1970) Metabolism of polyamines in the nervous system. *Federation proceedings* 29: 1583-1588.
72. Lau C, Cameron A, Antolick A, Slotkin TA (1990) Trophic control of the ornithine decarboxylase/polyamine system in neonatal rat brain regions; lesions caused by 6-hydroxydopamine produce effects selective for cerebellum. *Develop Brain Res* 52: 167-173.
73. Lajtha A, Sershen H (1974) Substrate specificity of uptake of diamines in mouse brain slices. *Arch Biochem Biophys* 165: 539-547.
74. Laterra J, Goldstein GW (1993) Brain microvessels and microvascular cells in vitro. In *The Blood Brain Barrier* (Pardridge WM ed) Raven Press, New York.
75. Leaf A (1973) Cell swelling; a factor in ischemic tissue injury. *Circulation* 48: 455-458.
76. Lefauconnier JM (1988) Blood Brain aminoacid transport during development. In G. Huether Ed., *Amino acid availability and brain function in health and disease*. NATO ASI series, vol. 20, Springer Verlag Berlin Heidelberg, pp.403-409.
77. Lo EH, Steinberg GK (1992) Effects of hypo and hyperthermia on Evoked potentials, Magnetic Resonance Imaging, and Blood Flow in Focal Ischemia in Rabbits. *Stroke* 23: 889-893.
78. Martinez D, de Vera N, Artigas F (1991) Differential response of the rat brain polyamines to convulsant agents. *Life Sci* 48: 77-84.
79. Meyer FB (1989) Calcium, neuronal hyperexcitability and ischemic injury. *Brain Res Rev* 14: 227-243.

80. Minamisawa H, Nordstrom CH, Smith ML, Siesjo BK (1990) The influence of mild body and brain hypothermia on ischemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 10: 365-374.
81. Molinari GF, Laurent MD (1976) A classification of experimental models of brain ischemia. *Stroke*, 7:14-17
82. Moruzzi MS, Piccinini G, Tadilini B, Monti MG, Barbiroli B, Mezzetti G (1988) Effects of polyamines on protein kinase C activation process. In *Progress in polyamine research* (Zappia V, Pegg AE eds) Plenum, pp 469-480.
83. Muszynski CA, Robertson CS, Goodman JC, Henley CM (1993) DFMO reduces cortical infarct volume after middle cerebral artery occlusion in the rat . *J Cereb Blood Flow Metab* 13: 1033-1037.
84. Nahorski SR (1988) Inositol polyphosphates and neuronal calcium homeostasis. *Trends Neusci* 11: 444-448.
85. Nagahiro S, Goto S, Korematsu K, Sumi M, Takahashi M, Ushio Y (1994) Disruption of the blood-cerebrospinal fluid barrier by transient cerebral ischemia. *Brain Res* 633: 305-311.
86. Nowak TS, Osborne OC, Suga S (1993) Stress protein and protooncogene expression as indicators of neuronal pathophysiology after ischemia. In *Progress in brain research* (Kogure K, Hossmann KA, Siesjo BK eds) Elsevier pp 195-208.
87. Ohno K, Petitgrew KO, Rapoport SI (1978) Lower limits of cerebrovascular permeability to non-electrolytes in the conscious rat. *Am J Physiol* 253: H 299-307.
88. Olsson Y, Klatzo I, Sarander P (1968) Blood Brain Barrier to albumin in embryonic newborn and adult rats. *Acta Neuropathol (Berl)*10: 117-122.
89. Pajunen AEI, Hietala OA, Baruch Virransalo EL, Piha RS (1979) The effect of DL-alloglycine on polyamine and GABA metabolism in mouse brain. *J Neurochem* 32: 1401-1408.

90. Pajunen AEI, Hietala OA, Baruch Virransalo EL, Piha RS (1978) Ornithine decarboxylase and Adenosylhomocysteinylmethionine decarboxylase in mouse brain- effect of electrical stimulation. *J Neurochem* 30: 281-283.
91. Pappius HM, Wolfe LS (1976) Some further studies on vasogenic edema. In *Dynamics of brain edema* (Pappius HM, Feindel eds) Springer Verlag, Berlin pp 138-143.
92. Pardridge WM (1988) Recent advances in blood brain barrier transport. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 28: 25-39.
93. Pardridge WM, Ruben JB (1993) Molecular cloning and regulation of gene expression of blood brain barrier glucose transporter. In *Blood Brain Barrier* (Pardridge WM ed) Raven Press. Ltd., New York.
94. Paschen W, Rohn G, Hallmayer J, Mies G (1988) Polyamine metabolism in reversible cerebral ischemia of mongolian gerbils. *Metab Brain Disease* 3: 297-302.
95. Paschen W, Bengtsson F, Rohn G, Bonnekoh P, Siesjo BK, Hossmann KA (1991a) Cerebral polyamine metabolism in reversible hypoglycemia in rat: relationship to energy metabolites and calcium. *J Neurochem* 57: 204-215.
96. Paschen W (1992a) Polyamine metabolism in different pathological states of the brain. *Chem Neuropathol* 16: 241-271.
97. Paschen W (1992b) Polyamine metabolism in reversible cerebral ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 4: 59-88.
98. Paschen W, Widmann R, Weber C (1992c) Changes in regional polyamine profiles in rat brains after transient cerebral ischemia (single versus repetitive ischemia) evidence for release of polyamines from injured neurons. *Neurosci Lett* 135: 121-124.
99. Pegg A, McCann PP (1982) Polyamine metabolism and function. *Am J Physiol* 243: C212-221.

100. **Petito CK, Pulsinelli WA, Jacobsen G, Plum F (1982) Edema and vascular permeability in cerebral ischemia: comparison between ischemic neuronal damage and infarction. J Neuropathol Exp Neurol 41: 423-436.**
101. **Prehn JMH, Backhaus C, Kriegstein J (1993) Transforming growth factor b 1 prevents glutamate neurotoxicity in rat neocortical cultures and protects mouse neocortex from ischemic injury in vivo. J Cereb Blood Flow Metab 13: 521-525.**
102. **Pulsinelli WA, Brierley JB (1979) A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. Stroke 10: 267-272.**
103. **Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F (1982) Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. Ann Neurol 11: 491-498.**
104. **Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F (1982a) Temporal profile of bilateral hemispheric ischemia in a model of transient forebrain ischemia. Ann Neurol 11: 491-498.**
105. **Pulsinelli WA, Levy DE, Duffy TE (1982b) Regional cerebral blood flow and glucose metabolism following transient forebrain ischemia. Ann Neurol 11: 499-509**
106. **Pulsinelli WA (1985) Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. Prog Brain Res 63: 29-37.**
107. **Raichle ME (1983) The physiopathology of brain ischemia. Ann Neurol 13: 2-10.**
108. **Reese TS, Karnovsky MJ (1967) Fine structural localization of a Blood Brain Barrier to exogenous peroxidase. J Cell Biol.40: 648-677.**
109. **Risau W, Wolburg H (1990) Development of the Blood Brain Barrier. TINS, 13(5); 173-178.**
110. **Rapoport SI (1976) Blood Brain Barrier in Physiology and Medicine. Raven Press, New York.**

111. Rohn G, Kocher M, Oschlies U, Hossmann KA, Paschen W (1990) Putrescine content and structural defects in isolated fractions of rat brain after reversible cerebral ischemia. *Exp Neurol* 107: 249-255.
112. Rottenberg H, Marbach M (1990) Regulation of Ca transport in brain mitochondria . The mechanism of spermine enhancement of Ca uptake and retention. *Biochem Biophys Acta* 1016: 77-86.
113. Sage JI, Van Uitert RL, Duffy TE (1984) Early changes in blood brain barrier permeability to small molecules after transient cerebral ischemia. *Stroke* 15: 46-50.
114. Schmitz MP, Combs DJ, Dempsey RJ (1993) Difluoromethylornithine decreases ischemic brain edema and blood brain barrier breakdown. *Neurosurg* 33: 882-888.
115. Schuber F (1989) The influence of polyamines on membrane functions. *Biochem J* 260: 1-10.
116. Scott RH, Sutton K, Dolphin AC (1993) Interactions of polyamines with neuronal ion channels. *TINS* 16: 153-160.
117. Sears ES, McCandless DW, Chandler (1985) Disruption of the blood brain barrier in hyperammonemic coma and the pharmacologic effects of dexamethasone and DFMO. *J Neurosci Res* 14: 255-261.
118. Seiler N (1981) Polyamine metabolism and function in brain. *Neurochem Int* 3: 95-110.
119. Seiler N, Bolkenius FN (1985) Polyamine reutilization and turnover in brain. *Neurochem Res* 10: 529-544.
120. Seiler N, Dezeure F (1990) Polyamine transport in mammalian cells. *Int J Biochem* 22: 211-218.
121. Seiler N (1991) Pharmacological properties of the natural polyamines and their depletion by biosynthesis inhibitors as a therapeutic approach. *Prog Drug Res* 37: 107-159.

122. Shaw GG, Pateman AJ (1973) The regional distribution of the polyamines spermidine and spermine in brain. *J Neurochem* 20: 199-205.
123. Shin WW, Fong WF, Pang SF, Wong PCL (1985) Limited blood brain barrier transport of polyamines. *J Neurochem* 44: 1056-1059.
124. Siesjo BK (1981) Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1: 155-185.
125. Siesjo BK (1993) A new perspective on ischemic brain damage. In *Progress brain research* (Kogure K, Hossman KA, Siesjo BK eds) Elsevier pp 1-9.
126. Singh L, Oles R, Wooddruff G (1990) In vivo interaction of a polyamine with the NMDA receptor. *Eur J Pharmacol* 180: 391-392.
127. Smith Q (1989) Quantitation of blood brain barrier permeability. In *Implications of the Blood Brain Barrier and its manipulations* (Neuwelt EA ed) Plenum pp 85-118.
128. Staddon JM, Rubin LL (1996) Cell adhesion, cell junctions and the blood brain barrier. *Current Opinion Neurobiol* 6: 622-627.
129. Suzuki R, Yamaguchi T, Krino T, Orzi F, Klatzo I (1983) The effects of 5 min ischemian mongolian gerbils: blood brain barrier, cerebral blood flow and local cerebral glucose utilization changes. *Acta Neuropathol* 60: 207-216.
130. Tabor CW, Tabor H (1984) Polyamines. *Ann Rev Biochem* 53: 749-790.
131. Tadolini B (1988) Polyamine inhibition of lipoperoxidation. *Biochem J* 249: 33-36.
132. Takasato Y, Rapoport SI, Smith QR (1984) An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. *Am J Physiol* 247: H 484-493.
133. Todd NV, Picozzi P, Crockard HA, Russel RWR (1986a) Recirculation after cerebral ischemia. Simultaneous measurement of cerebral blood flow, brain edema,

cerebrovascular permeability and cortical EEG in the rat. *Acta Neurol Scand* 74: 269-278.

134. Trout JJ, Koenig H, Goldstone AD, Lu CY (1986) Blood brain barrier breakdown by cold injury; polyamine signals mediate acute stimulation of endocytosis, vesicular transport and microvillus formation in rat cerebral capillaries. *Lab Invest* 55: 622-631.

135. Watson BD, Ginsberg MD (1989) Ischemic injury in the brain- role of oxygen radical-mediated processes. *Ann N. Y. Acad Sci* 559: 269-275.

136. Woodbury DM(1974) Maturation of the BBB and blood CSF barriers. In Venedakis A, Weiner N (eds). *Drugs and the developing brain*, Plenum, NY, pp.259-280.

137. Williams K, Romano C, Dichter MA, Molinoff PB (1991) Modulation of the NMDA receptor by polyamines. *Life Sci* 48: 469-498.

138. Yoneda Y, Ogita K (1991) Neurochemical aspects of the N-Methyl-D-Aspartate receptor complex. *Neurosci Res* 10: 1-33.

139. Yoshizumi H, Fujibayashi Y, Kikuchi H (1993) A new approach to the integrity of dual blood brain barrier functions of global ischemic rats. *Stroke* 24: 279-285.

140. Zawia NH, Bondy SC (1990) Electrically stimulated rapid gene expression in the brain; ornithine decarboxylase and c-foc. *Mol Brain Res*.

141. Ziylan YZ, Robinson PJ, Rapoport SI (1983) Differential Blood Brain Barrier permeability to ¹⁴C Sucrose and ³H Inulin after osmotic opening in the rat. *Exp Neurol*, 79: 845-857.

142. Ziylan YZ, Gökhan N (1985) Water and electrolyte content of rabbit brain after opening the Blood Brain Barrier by acute hypertension. *Exp Neurol*.87: 198-205.

143. Ziylan YZ, Lefauconnier JM, Bernard G, Bourre JM (1988) Effects of dexamethasone on transport of α -aminoisobutyric acid and sucrose across the blood brain barrier. *J Neurochem* 51: 1338-1342.
144. Ziylan YZ, Atez N (1989) Age-related changes in regional patterns of Blood Brain Barrier breakdown during epileptiform seizures induced by pentylentetrazol. *Neurosci Lett*.96: 179-184.
145. Ziylan YZ, Üzüm G, Bernard G, Diler AS, Bourre JM (1993) Changes in the permeability of the blood brain barrier in acute hyperammonemia effect of dexamethasone. *Mol Chem Neuropathol* 20: 203-218.



ÖZET

Putresin(PUT) ve Spermidin(SPMD) adlı iki poliaminin(PA) erken postiskemik dönemlerde beyne girişini incelediğimiz bu çalışmada dört damar oklüzyonu (4 DO) ile oluşturduğumuz global ön beyin iskemisini takip eden 10, 30 ve 60. dakika resirkülasyon(RS) zamanlarında hem her iki PA hem de eş zamanlı olarak aminoizobütirik asid kullanarak bu maddelerin tek yönlü kandan beyne geçiş sabitelerini(Kin) 4 beyin bölgesi için (korteks, striatum, hipokampus, serebellum) hesapladık.

Sonuçlarımız PUT için Kin değerlerinin daima SPMD için olan Kin değerlerinden yüksek olduğunu gösterdi. 10 dakikalık RS zamanında PA ve AIB benzer bir artış kaydetti. Kortekste PUT ve SPMD için Kin sırasıyla 8.49 ± 0.62 ve 2.9 ± 0.3 ml/g/dk. 10^3 idi ve bu değerler diğer bölgelerle karşılaştırıldığında en yüksek değerlerdi.

Otuz ve 60. dakikalarda AIB'nin beyne geçemediği gözlenirken, her iki PA için bir geçiş gözlemlendi. 60 dakikalık RS zamanında, hipokampusta PUT için Kin 6.64 ± 0.67 ml/g/dk. 10^3 , SPMD için Kin 2.7 ± 0.3 ml/g/dk. 10^3 olarak saptandı. Bu Kin değerleri sırasıyla %117 ve %121'lik artışlara denk düştüler.

İntraiskemik hipertermi uygulanan grupta 60.dakika RS zamanında her iki PA ve AIB'de yüksek Kin değerleri elde edildi. SPMD için Kin artışı %300'ün üzerinde gerçekleşti.

Bu sonuçlar, bize geçici global ön beyin iskemisini takip eden 10. dakika RS zamanında non-spesifik bir geçiş olduğunu göstermektedir. RS'un 30 ve 60. dakikalarında ise ölçülen Kin değerleri PA'lerin spesifik olarak beyne geçebildiklerini ispatlamaktadır. Bu çalışma ayrıca kan-beyin bariyerinin hem bariyer hem de taşıyıcı fonksiyonlarının hafif hipertansiyon (10) bozulduğunu göstermektedir. Bu çalışmamız beyin iskemisi ile ilgili bütün çalışmaların, beyin ısısı gibi çok önemli bir parametrenin gözardı edilmemesi gerektiğinin altını çizmektedir.

SUMMARY

Transport of polyamines (PA); putrescine (PUT) and spermidine (SPMD) into rat brain at various very early post ischemic periods was studied. Rats underwent 20 min of four vessel occlusion followed by 10, 30 and 60 min of recirculation (RC) periods with natural brain temperature. Aminoisobutyric acid (AIB) and PAs were simultaneously administered to search dual functions of the blood brain barrier (BBB)-barrier and carrier functions respectively. Unidirectional blood-to brain transfer constant (Kin) was calculated for 3H AIB and 14C PAs in four brain regions-cortex, striatum, hippocampus, and cerebellum.

Kin for PUT had always higher values than Kin for SPMD. Kin for both PAs and AIB showed somewhat similar increases at 10 min RC. At this time in cortex Kins for PUT and SPMD were found to be 8.49 ± 0.62 and 2.9 ± 0.3 ml/g/min 10^3 respectively and were the maximum values amongst other regions.

Thirty and 60 min RC groups depicted passage for PAs but AIB was restricted from entering the brain. At 60 min RC time, hippocampus yielded Kin for PUT; 6.64 ± 0.62 ml/g/min 10^3 and Kin for SPMD 2.7 ± 0.3 ml/g/min 10^3 . These values correspond to increases of 117% and 121% respectively.

Intraischemic hyperthermia followed by 60 min RC period rendered elevated Kin values for both SPMD and AIB. Striatum showed highest increase of Kin for SPMD (306%).

These results suggest a non-specific passage of PAs into the brain at 10 min RC period where as, transport of PAs turn out to be specific at 30 and 60 min RC periods. As mild elevation of brain temperature hampered both functions of the BBB, we underline the crux of measuring brain temperature in all studies concerning cerebral ischemia.

RESUME

Le transport des polyamines (PA), putrescine (PUT) et spermidine (SPMD), a été étudié au niveau de la barrière hématoencéphalique (BHE) chez des rats à des temps variables postischémiques. Les rats ont subi une occlusion des quatre vaisseaux suivie de 10, 30 et 60 min de recirculation (RC) avec une température normale du cerveau. L'acide aminoisobutyrique (AIB) et les PAs ont été administrés simultanément pour rechercher la dualité de fonction de la BHE - fonctions de barrière et de transporteur respectivement. La constante du transport unidirectionnel du sang vers le cerveau (Kin) a été calculée pour 3H AIB and 14C PAs dans quatre régions du cerveau - cortex, striatum, hippocampe et cervelet.

Les valeurs du Kin de PUT ont toujours été supérieures à celles du Kin de SPMD. Les Kins des PAs et de l'AIB augmentent de façon à peu près similaire à 10 min de RC. A ce temps là, les Kins de PUT et de SPMD dans le cortex ont été de 8.49 ± 0.62 et de 2.9 ± 0.3 ml/g/min 10^3 respectivement et leurs valeurs ont été maximales parmi les autres régions.

Les groupes 30 et 60 min de RC ont montré un passage pour les PAs alors que l'AIB n'est pas entré dans le cerveau. A 60 min de RC, le Kin de PUT dans l'hippocampe a été de 6.64 ± 0.62 ml/g/min 10^3 et le Kin de SPMD de 2.7 ± 0.3 ml/g/min 10^3 . Ces valeurs correspondent à une augmentation de 117 % et de 121 % respectivement.

L'hyperthermie intraischémique suivie de 60 min de RC a montré des valeurs de Kin élevées pour SPMD et pour l'AIB. Le striatum a montré la plus forte augmentation du Kin de SPMD (306%).

Ces résultats suggèrent un passage non spécifique des PAs dans le cerveau à 10 min de RC tandis que le transport des PAs devient spécifique à 30 min et à 60 min de RC. Comme une légère augmentation de la température du cerveau perturbe les deux fonctions de la BHE, nous soulignons l'importance de la mesurer dans toutes les études sur l'ischémie cérébrale.

ÖZGEÇMİŞ

A. Sarper Diler 1966'da Tarsus' ta doğdu. 1984'de Tarsus Amerikan Kolejini, 1991'de İstanbul Tıp Fakültesini bitirdi. 1991'de Prof Ziylan ile doktora başladı. Doktora öğrenimi sırasında Fransa ve İsveç'te çalışmalar yaptı. Yabancı dilde basılmış 11, Türkçe 29 adet yayını olan Diler, İ. T. F. Tıbbi Biyoloji ABD'da araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Evli olup bir çocuk babasıdır.