T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

AKUT HİPERGLİSEMİK VE DİABETİK SIÇANLARDA OLUŞTURULAN EPİLEPTİK NÖBETLERDE LİPOPOLİSAKKARİDİN KAN BEYİN BARİYERİ PERMEABİLİTESİNE ETKİSİ

HATİCE YORULMAZ

DANIŞMAN
PROF.DR.BARİA ÖZTAŞ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI /
FİZYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2008

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

23 / 07 / 2008

Prof.Dr.Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Fizyoloji Doktora Programı
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☐ Doktora ☒
Anabilim Dalı : Fizyoloji
Tez Sahibi : Hatice YORULMAZ
Tez Başlığı : Akut Hiperglisemik ve Diabetik Sıçanlarda Oluşturulan Epileptik Nöbetlerde Lipopolisakkaridin Kan Beyin Bariyeri Permeabilitesine Etkisi
Sınav Yeri : İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 22 / 07 / 2008

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1.Prof.Dr.Baria ÖZTAŞ (Danışman)-İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

2.Prof.Dr.Emel BOZKAYA -İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

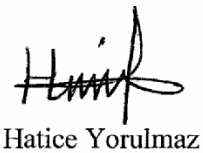
3.Prof.Dr.Sacit KARAMÜRSEL-İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

4.Doç.Dr.Güler ÖZTÜRK-Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji ABD.

5.Prof.Dr.Ümmühan İŞOĞLU-ALKAÇ-İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



Hatice Yorulmaz

(İmza)

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince, Kan Beyin Bariyeri konusundaki bilgi ve tecrübelerinden yararlanma fırsatı yakaladığım, Değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Baria Öztaş'a;

Çalışmalarımızın gerçekleşmesi için uygun ortam sağlayan ve doktora eğitimime katkıda bulunan, Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr.Sacit Karamürsel başta olmak üzere, tüm Fizyoloji Anabilim Dalı' nın değerli öğretim üyelerine ve çalışanlarına;

Her zaman yanımda olan, sevgili aileme ve arkadaşlarıma TEŞEKKÜR ederim

Bu çalışma, T.C.Haliç Üniversitesi ve İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-833. Adı geçen kurumlara teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ X
ÖZET ..... Xİ
ABSTRACT ..... Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 2
2.1. Kan Beyin Bariyeri 2
2.2. Kan Beyin Bariyeri permeabilitesini etkileyen aracı moleküller 11
2.3. Fizyopatolojik Koşullarda Kan Beyin Bariyeri Permeabilitesinde Meydana Gelen Değişiklikler 16
3. GEREÇ VE YÖNTEM 29
4. BULGULAR 37
4.1. EVANS-BLUE BULGULARI 38
4.2. İMMUNOHİSTOKİMYA BULGULARI 55
4.3. SİTOKİN BULGULARI 63
5. TARTIŞMA 67
KAYNAKLAR 79
ETİK KURUL KARARI 98
ÖZGEÇMİŞ 99

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Kan Beyin Bariyerinin Özellikleri . Oldendorf ve Brown (1975); Clough ve Michel (1981); Coomber ve Stewart (1985); Lossinsky ve Shivers (2004)'den. 4
Tablo 2-2: Vücuttaki bazı kapillerlerin Elektriksel Dirençleri Butt ve ark.(1990)'dan 4
Tablo 2-3: Beyin kapiller endotel hücrelerindeki enzimatik bariyeri oluşturan enzimler Joo (1993)'dan. 6
Tablo 2-4: Diabetes Mellitus oluşturulan deneysel çalışmalarda kan beyin bariyeri permeabilitesinde meydana gelen değişiklikler Mooradian (1997)'den. 25
Tablo 2-5: Kan Beyin Bariyerinde diabete bağlı meydana gelen değişikliklere neden olan mekanizmalar Mooradian (1997)'den. 26
Tablo 4-1: Deney Gruplarına arteriyel kan basıncı değerleri. 39

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Paul Ehrlich ve Goldmann'ın tripan mavisini kan ve serebrospinal sıvı kompartmanlarına uygulayarak elde ettikleri deneylerin sonuçları Goldmann (1913)' dan 2

Şekil 2-2: Kan Beyin Bariyerinin genel yapısı. Walsh L (eds) Expert reviews in Molecular Medicine, Cambridge University Pres, (2003)'den.....3

Şekil 2-3: Kan Beyin Bariyerinden madde geçişini sağlayan taşıyıcı sistemler Neuwelt (2004)'den.....5

Şekil 2-4: Kan Beyin Bariyerinde sıkı bağlantılarla ilişkilendirilmiş büyük proteinlerin etkileşimleri Huber ve ark. (2002)'dan. 9

Şekil 2-5: Santral sinir sisteminde TNF-α aracılı sinyal iletiminin etkisi. Pan ve Kastin (2007)'den.....12

Şekil 2-6: Gram-negatif bakterinin membran kısımları. Raetz ve Whitfield (2002)'den. 13

Şekil 2-7: LPS'nin yapısı: O-antijen (Türe özgül), Kor (Ortak polisakkarid yapı), Lipid A (Endotoksin etkiden sorumlu). Raetz ve Whitfield (2002)'den 14

Şekil 2-8: *in vitro* LPS' nin, kan beyin bariyeri permeabilitesinde meydana getirdiği değişikliğe neden olan, endotel sinyal ileti yolları Boje (1995)' den.....15

Şekil 4-1: PTZ grubuna ait bir sıçanın, PTZ verildikten sonra, arteriyal kan basıncında meydana gelen değişme. 39

Şekil 4-2: Kontrol Grubu ve Akut Hiperglisemi+PTZ gruplarına ait sıçan beyinleri. Kontrol Grubunda Evans-blue albuminin beyne geçişi gözlenmemiştir. Akut Hiperglisemi+PTZ grubuna ait sıçanın, hem serebral korteks, hem de beynin sol hemisfer, sağ hemisfer, serebellum+beyin sapı bölgelerinde Evans-blue albumin geçişi gözlenmektedir. 46

Şekil 4-3: Deney gruplarının korteks bölgesindeki beyin kapiller endotel hücrelerinde Zonula Okludens-1 boyanma şiddetini gösteren resimler (X1000) 57

Şekil 4-4: Deney gruplarının serebellum+beyin sapı bölgelerindeki beyin kapiller endotel hücrelerinde Zonula Okludens-1' deki boyanma değişikliklerini gösteren resimler (X1000). 59

Şekil 4-5: Deney gruplarındaki sıçanların korteks bölgesindeki beyin kesitlerinde Glial Fibriller Asidik Proteinin boyanma şiddetini gösteren resimler (X400). 61

Şekil 4-6: Deney gruplarındaki sıçanların serebellum+beyin sapı bölgelerindeki beyin kesitlerinde Glial Fibriller Asidik Protein boyanmasındaki değişiklikleri gösteren resimler (X400) 63

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

KBB: Kan Beyin Bariyeri

LPS: Lipopolisakkarid

PTZ: Pentilentetrazol

TNF-α: Tümör Nekrozis Faktör-alfa

NO: Nitrik Oksit

ÖZET

Yorulmaz, H. (2008). Akut Hiperglisemik ve Diabetik Sıçanlarda Oluşturulan Epileptik Nöbetlerde Lipopolisakkaridin Kan-Beyin Bariyeri Permeabilitesine Etkisi/ İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Bu araştırmada amacımız; akut hiperglisemi ve uzun süreli hiperglisemide oluşturulan epileptik nöbetlerde, lipopolisakkarid'in (LPS), kan beyin bariyeri (KBB) permeabilitesine olan etkisini incelemektir. Aynı zamanda, oluşturulan koşullarda, Zonula Okludens-1 ve Glial Fibriller Asidik Protein'in boyanma şiddetinde ve serum Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), İnterlökin-10 (IL-10), İnterlökin-12+p40 (IL-12+p40) sitokinlerinin salınımlarında, meydana gelen değişiklikleri incelemeyi amaçladık. KBB permeabilitesi Evans-blue metodu, Zonula Okludens-1 ve Glial Fibriller Asidik Protein miktarı immün boyama yöntemi, TNF-α, IL-10, IL-12+p40 sitokinlerinin miktarları Enzyme Linked İmmunosorbent Assay yöntemi kullanılarak gösterildi. Akut Hiperglisemide ve Diyabette oluşturulan nöbetler, normoglisemik koşullarda oluşturulan nöbetlere göre, sol hemisfer, sağ hemisfer ve serebellum+beyin sapı bölgelerinde KBB permeabilitesinin önemli ölçüde artmasına neden oldu ($p<0.01$). LPS uygulanması normoglisemik epileptik nöbetler sırasında, her üç beyin bölgesinde, KBB permeabilitesinde koruyucu etki sağlarken ($p<0.01$), akut hiperglisemik ve diabetik nöbet geçiren sıçanlarda, KBB permeabilitesinde, anlamlı değişikliğe neden olmadığı saptandı ($p>0.05$). Akut Hiperglisemik ve diyabetik sıçanların korteks ve serebellum+beyin sapı bölgelerinde Zonula Okludens-1'in ve sadece diabetik sıçanların bu bölgelerdeki Glial Fibriller Asidik Protein'in boyanma şiddetinde azalma olduğu tespit edildi. LPS, LPS+PTZ, Diabet+LPS gruplarında TNF-α ($p<0.01$), LPS, LPS+PTZ, LPS+Akut Hiperglisemi+PTZ, Diyabet+LPS, Diyabet+LPS+PTZ gruplarında IL-10 ($p<0.01$), ve pentilentetrazol uygulanan tüm gruplarda, IL-12+p40 ($p<0.05$) sitokin seviyelerinde artma meydana geldiği saptandı. Sonuç olarak; LPS'nin, Zonula Okludens-1 ve Glial Fibriller Asidik Proteininde ve serum TNF-α ve IL-10 seviyelerinde artış meydana getirmesine rağmen, akut hiperglisemi ve uzun süreli hiperglisemide oluşturulan epileptik nöbetlerde, KBB permeabilitesinde koruyucu etki göstermediği saptandı.

Anahtar Kelimeler : Akut Hiperglisemi, Diabetes Mellitus, Epileptik nöbet, Kan Beyin Bariyeri, Lipopolisakkarid.

Bu çalışma, T.C.Haliç Üniversitesi ve İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-833

ABSTRACT

Yorulmaz H. (2008). The effect of Lipopolysaccharide on Blood Brain Barrier Permeability of Acute Hyperglycemic and Diabetic Rats during Epileptic Attacks İstanbul University, Institute of Health Science, Departmant of Physiology .

The purpose of this study is to examine the effect of lipopolysaccharide (LPS) on Blood Brain Barrier (BBB) permeability during epileptic attacks occurring in acute hyperglycemia and long-term hyperglycemia. In addition, we have aimed in examining the changes observed in coloring of Zonula Occludens-1 and Glial Fibriller Acidic Protein as well as the changes in the release of serum TNF-α, and IL-10, IL-12+p40 cytokines under artificial conditions.The attacks occurring in acute hyperglycemia and diabetes caused a remarkable the increase of BBB permeability ($p<0.01$). While LPS administration provided protective effects during epileptic attacks on BBB permeability ($p<0.01$), it did not cause a significant change in BBB permeability during epileptic attacks occurring in acute hyperglycemia and long-term hyperglycemia and acute hyperglycemia and diabetes ($p>0.05$). Zonula Occludens-1 in hyperglycemic and diabetic rats and coloring power of Glial Fibriller Acidic Protein in only diabetic rats were observed to reduce. It was determined that TNF-α levels in LPS, LPS+ PTZ, Diabetes +LPS groups ($p<0.01$), IL-10 levels in LPS, LPS+PTZ, LPS+Acute Hyperglycemia+PTZ, Diabetes+LPS, Diabetes+LPS+PTZ groups ($p<0.01$), IL-12+p40 in groups treatment with PTZ ($p<0.05$), increased significantly. As a result, although LPS caused an increase in immune reactivity of Zonula Occludens-1 and Glial Fibriller Acidic Protein and in TNF-α and IL-10 levels, it was determined that LPS did not display a protective effect on BBB permeability during epileptic attacks occurring in acute hyperglycemia and long-term glycemia.

Key Words: Acute Hyperglycemia, Diabetes Mellitus, Epileptic seizure, Blood Brain Barrier, Lipopolysaccharide

The present work was supported by T.C.Halic University and the Research Fund of Istanbul University. Project No. T-833

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes Mellitus (DM) ve Akut Hiperglisemi, santral sinir sistemi dahil çeşitli organ sistemlerinde yapısal ve fonksiyonel değişmelere neden olan metabolik bir hastalıktır. Diyabetlilerde, santral sinir sistemi disfonksiyonuna katkıda bulunan mekanizmalardan biri de kan beyin bariyerinde (KBB) meydana gelen değişmelerdir (Horani ve Mooradian 2003). Diabetes Mellitus ve Akut Hiperglisemi gibi durumlarda hiperglisemi, vasküler disfonksiyona neden olarak KBB yapısının değişmesine neden olabilir (Yamashita ve ark. 1995).

Lipopolisakkarid (LPS), gram negatif bakterilerin hücre duvarında bulunan bir endotoksindir, sitokin, prostaglandin ve nitrik oksitin salınımına neden olarak KBB geçirgenliğini etkileyebilir (Cao ve ark.1997, Mayhan 1998).Yapılan bazı çalışmalar, LPS' nin *in vivo* ve *in vitro* farklı konsantrasyon, süre ve serotiplerde uygulanmasının, KBB permeabilitesinde artışa neden olduğunu göstermektedir. Buna karşın; son zamanlarda yapılan deneysel modellerde LPS' nin iskemik beyin hasarını azalttığı, radyasyon, hipertansiyon ve epileptik nöbetlerde KBB yıkımını önlediği gösterilmiştir. LPS' nin KBB permeabilitesine etkisi ile ilgili çalışmalar çelişkilidir (Mayhan 1998; Ahmed ve ark.2000; Kaya ve ark.2004; Ahishali ve ark.2005).

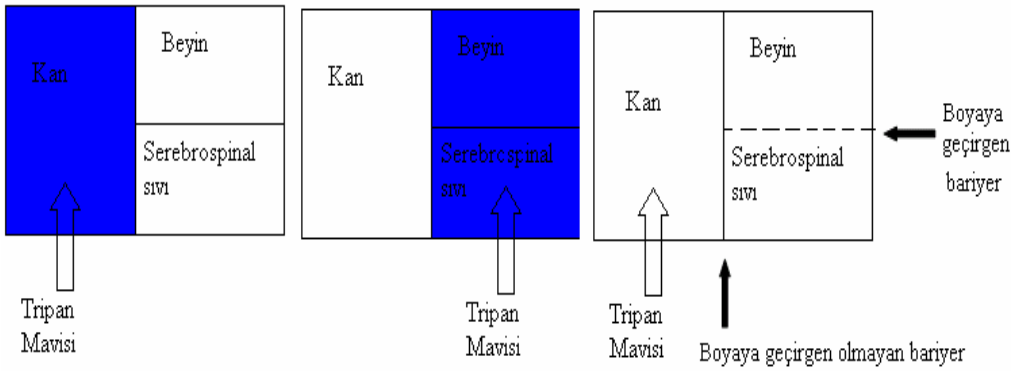
Akut hiperglisemi ve uzun süreli hiperglisemide oluşturulan epileptik nöbetlerde; LPS' nin KBB permeabilitesine etkisi bilinmemektedir. Bu araştırmada amacımız; akut hiperglisemi ve uzun süreli hiperglisemide oluşturulan epileptik nöbetlerde, LPS' nin KBB permeabilitesine olan etkisini incelemektir. Aynı zamanda oluşturulan koşullarda, beyin kapiller endotel hücrelerindeki, sıkı bağlantı proteini Zonula Okludens-1 ve astrosit tanınması ve aktivitesinin bir göstergesi olan Glial Fibriller Asidik Protein'in boyanma şiddetinde ve Tümör Nekrozis Faktör-α, İnterlökin-10 (IL-10), İnterlökin-12+p40 (IL-12+p40) sitokinlerinin salınımlarında meydana gelen değişikliklerin KBB permeabilitesine herhangi bir etkisinin olup olmadığını araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kan Beyin Bariyeri

Merkezi Sinir Sisteminde, homeostazisi sağlayan en önemli yapı, kan beyin bariyeridir (KBB). KBB, nöronal fonksiyonun sağlanması için beyne ihtiyacı olan besinleri sağlarken, dolaşımdaki zararlı maddelerden beyni koruyan, beynin ekstrasellüler ortamının sıkı bir şekilde düzenlenmesini sağlayan, beyin kapiller endotel hücrelerinin özelleşmiş sistemidir (Robinson ve Rapoport 1991).

KBB kavramı, ilk defa 1882 yılında, Alman mikrobiyolog Paul Ehrlich tarafından yapılan araştırmalarla geliştirildi. Paul Ehrlich, Tripan mavisini intravenöz (i.v.) olarak hayvanlara uyguladığında, beyin hariç diğer organların maviye boyandığını gördü. Ehrlich'in öğrencisi olan Goldmann ise, 1909-1913 yıllarında yaptığı araştırmalar ile direkt beyin omurilik sıvısı içine verdiği boyanın tüm beyini boyadığını, fakat diğer organları boyamadığını gösterdi (Goldmann 1913). (Şekil 2-1). Beyne ait kan-beyin omurilik sıvısı ve KBB olarak iki bariyer sistemi olduğunu gözlemleyen Brodman (1941), KBB'ndeki bariyer fonksiyonunun, beyin kapiller endotel hücreleri aracılığı ile gerçekleştiğini ileri sürmüştür (Brodman ve ark. 1965).



Şekil 2-1: Paul Ehrlich ve Goldmann'ın tripan mavisini kan ve serebrospinal sıvı kompartmanlarına uygulayarak elde ettikleri deneylerin sonuçları Goldmann (1913)' dan.

KBB' nin ultrastrüktürel yapısının saptanması ise, elektron mikroskopunun kullanıldığı, 1960'lı yıllara rastlamaktadır. Reese ve Karnovsky, elektron mikroskopu ile beyin kapillerinin spesifik yapısını incelemiş (Reese ve Karnovsky 1967), bundan iki yıl sonrada, Reese ve Brightman histokimyasal olarak elektron mikroskobu ile endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantıları göstermiştir (Brightman ve Reese 1969). Stewart

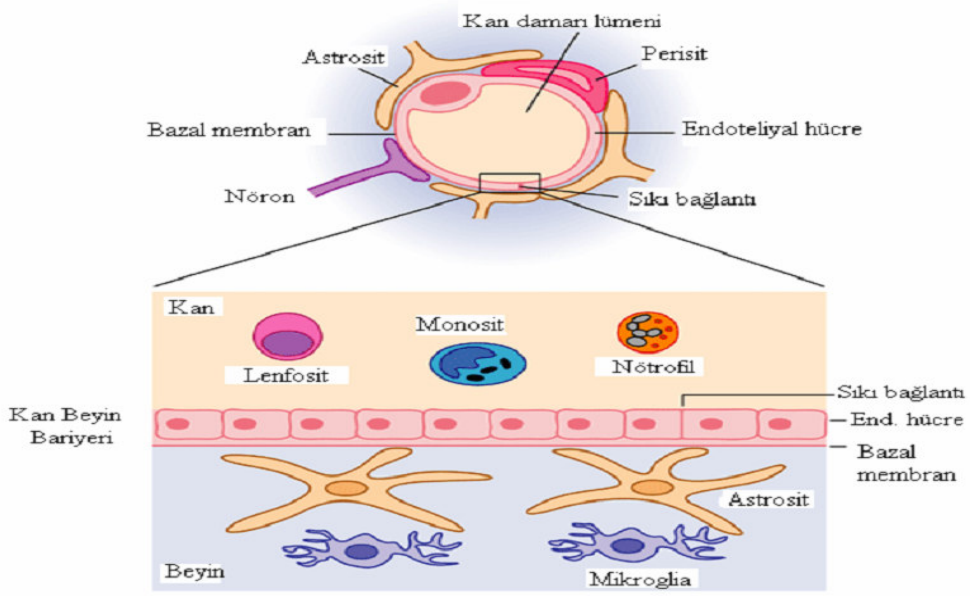
ve Wiley (1981), tarafından yapılan çalışmalarla, periferik organların kapiller bağlantılarıyla karşılaştırıldığında, KBB sıkı bağlantı yapı ve fizyolojisinin farklı olduğu gösterilmiştir.

Kan Beyin Bariyeri içermeyen beyin bölgeleri

Kan Beyin Bariyeri bulunmayan bölgeler sirkumventriküler organlar olarak ifade edilir. Orta hatta üçüncü ve dördüncü ventrikül sınırında yerleşmişlerdir. Bu yapılar; area postrema, pineal bez, alt komissural organ, nörohipofiz, koroid pleksus, subfornikal organ, median eminens ve supraoptik laminadır. Sirkumventriküler organların önemi, periferik değişikliklerin beyin tarafından algılanabilmesini sağlamasıdır (Schulz ve Engelhardt 2005).

Kan Beyin Bariyerinin Yapısı

Kan Beyin Bariyeri; sıkı bağlantılara sahip beyin kapiller endotel hücreleri, bu hücreleri çevreleyen, devamlı bir bazal lamina ve bazal laminaya sitoplazmik uzantılarıyla tutunmuş astrositlerden oluşan, özelleşmiş bir yapıdır (Chaudhuri 2000) (Şekil 2-2). Beyin kapiller endotel hücreleri; KBB' ndeki bariyer olma, mikro ve makro besin moleküllerinin taşınması, reseptör aracılı sinyalleşme, lökosit trafiği ve osmoregülasyon gibi temel fonksiyonları yerine getirir (Pollay ve Roberts 1980).



Şekil 2-2:Kan Beyin Bariyerinin genel yapısı. Walsh L (eds) Expert reviews in Molecular Medicine, Cambridge University Press, (2003)'den

KBB' ni oluşturan merkezi sinir sistemi kapilleri, periferik kapillerden farklı olarak bazı karakteristik özelliklere sahiptir. Bu özellikleri şu şekilde özetleyebiliriz: (Tablo2-1).

1- Devamlı ve kalın bir bazal membran içermesi
2- Endotel hücrelerinin 'tight junction' denilen sıkı bağlantılarla bağlanması
3- Çok yüksek elektriksel direncinin olması
4- Suda eriyen maddelere karşı çok düşük geçirgenliğe sahip olması
5- Çok düşük iyon permeabilitesinin bulunması
6- Pinositotik vezikül sayısının çok az olması
7- Mitokondri içeriklerinin iskelet kası kapillerininkinden 5-6 katı fazla olması
8- Çok fazla miktarda enzim içermesi

Tablo 2-1: Kan Beyin Bariyerinin Özellikleri . Oldendorf ve Brown (1975); Clough ve Michel (1981); Coomber ve Stewart (1985); Lossinsky ve Shivers (2004)'den.

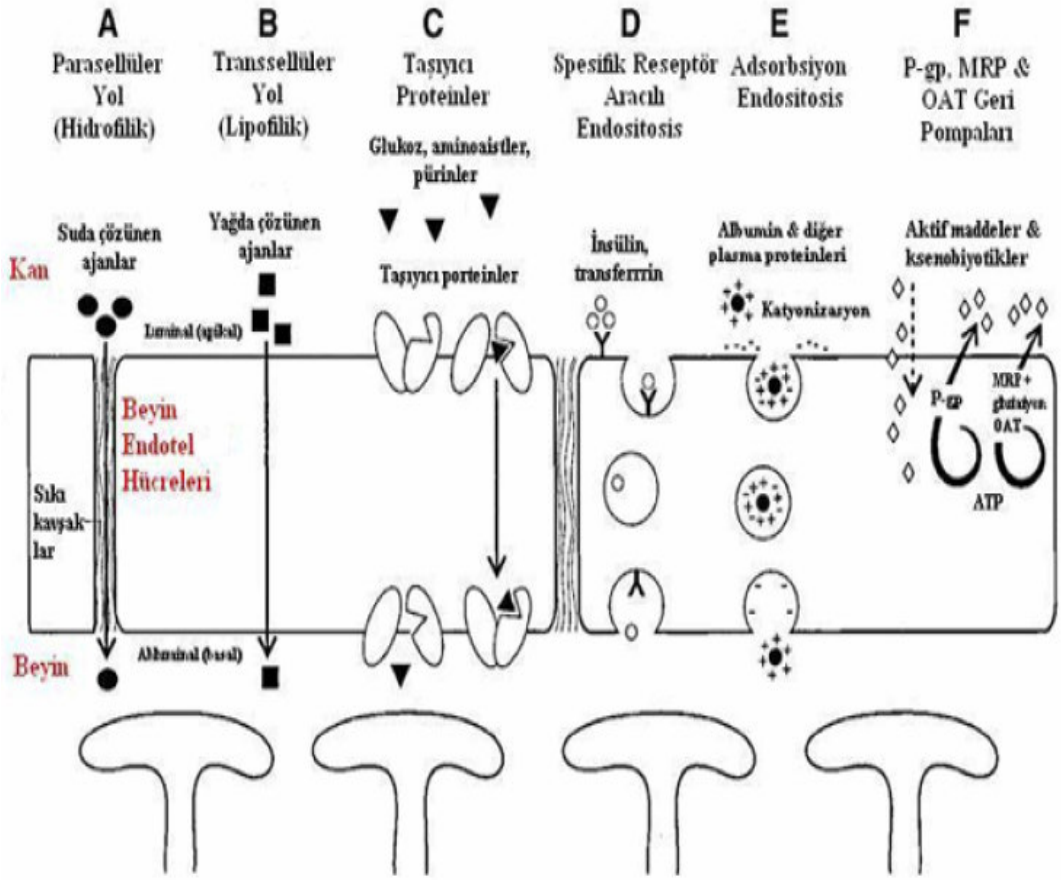
Sıkı bağlantılar, KBB endotel hücreleri arasında, yüksek bir elektrik direnci oluştururlar. KBB' nde elektriksel direnç 2000 Ω /cm^2 dir. Bu sayede, KBB' nden madde geçişi periferik kapillerlere göre azalır (Butt ve ark.1990) (Tablo 2-2).

1. Fötal kan beyin bariyeri	300Ω/cm^2
2. Doğumdan sonra	1128 Ω/cm^2
3.Erişkin kan beyin bariyeri	2000 Ω/cm^2
4.Erişkin kas damarları	20-30 Ω/cm^2
5.Mezenterik kan damarları	2 Ω/cm^2

Tablo 2-2: Vücuttaki bazı kapillerlerin elektriksel dirençleri. Butt ve ark.(1990)'dan.

Beyin, organizmada metabolik aktif organlardan biridir. Beynin ağırlığı vücut ağırlığının % 2'si olmasına rağmen, beyin bazal şartlarda, bir dakikada organizmanın kullandığı 250 ml 0_2' nin, 50 ml'sini kullanır. Dakikada, beyne ortalama 800 ml kan gider, 77 mg glikoz bir dakikada kandan beyne geçer ve ATP'ye çevrilerek kullanılır.

Beyindeki geniş endoteliyal yüzey alanı (180cm^2/g gri madde), oksijen ve karbondioksit geçişi için yeterlidir (Oztas 1994). KBB'nden madde geçişini sağlayan taşıyıcı mekanizmalar Şekil 2-3'de gösterilmiştir. KBB' nden madde transportunda; maddenin lipitte çözünürlüğü, difüzyon yeteneği, molekül ağırlığı, elektrik yükü önemlidir (Sweeney ve Grayling 2005).



Şekil 2-3: Kan Beyin Bariyerinden madde geçişini sağlayan taşıyıcı sistemler. Neuwelt (2004)'den.

Taşıma sistemleri, genellikle KBB' nin luminal yüzünde bulunur. Beyinden kana geçişine izin veren sistemler ise KBB' nin abluminal yüzünde bulunur. KBB endotel hücrelerinin luminal ve abluminal membran yüzeyleri arasında, bir polarite mevcuttur. g-GTP ve alkalen fosfataz enzimleri luminal tarafta bulunmakta iken, Na^+-K^+-ATPaz ve sodyuma bağımlı nötral aminoasit taşıyıcılar abluminal yüzeyde bolca bulunur (Betz ve ark.1980).

Ayrıca, luminal membran yüzeyinde istenmeyen maddelerin dışarı çıkışını sağlayan ve tek yönlü çalışarak ilaçları endotelden kana pompalayan P-glikoproteinler bulunur. Hidrofilik ve 400-700Da'dan büyük molekül ağırlıklı maddeler KBB' yi geçemezken; temel olarak 400-700 Da molekül ağırlığından büyük olduğu halde, lipofilik olan moleküller KBB'yi geçebilir. Bu durumun, P-glikoproteinler ile ilişkili olduğu düşünülmektedir, ancak kesin yerleşimleri tam olarak anlaşılamamıştır (Bendayan ve ark.2002).

Beyin kapiller endotel hücrelerinde, histolojik bariyerin dışında, bir de enzimatik bariyer vardır. Kan ile beyin arasında nörotransmiterlerin ve bazı aminoasitlerin geçişi bu enzimatik bariyer ile sınırlandırılmıştır (Joo 1993) (Tablo 2- 2).

Na^+-K^+ ATPaz
Adenilat siklaz
Guanilat siklaz
Glikoz taşıyıcısı
Gama-glutamil transpeptidaz
DOPA dekarboksilaz
Alkali fosfataz
5'-nükleotidaz
Kolin asetil transferaz

Tablo 2-3:Beyin kapiller endotel hücrelerindeki enzimatik bariyeri oluşturan enzimler Joo (1993)'den.

Ayrıca, beyin kapiller endotel hücreleri vazoaktif potansiyele sahip nörotransmiterleri sentezler ve depolarlar. Beyin endotel hücrelerinde bulunan nörotransmiterler şunlardır: (Betz ve Goldstein 1986)

1-Noradrenalin

2-Serotonin

3-Histamin

4-Asetilkolin

5-Bradikinin

6-Vazoaktif peptidler

7-Adrenalin

8-Gama amino bütirik asit.

Kan Beyin Bariyeri'nin yapısına katılan yapılardan biri de, KBB endotel hücrelerini kuşatan, ekstrasellüler ortamı düzenlemede, nöronları korumada ve destek sağlamada, önemli etkiye sahip glial hücreleri olan astrositlerdir (Hawkins ve Davis 2005). Astrositler ve endotel hücreleri birbirlerinin yapılarını etkiler. Astrositler, KBB'nin bariyer olma özelliğini arttırır ve düzenler. *İn vitro* çalışmalar da, beyin endotel hücreleri ile astrositlerin ortak kültürlerinin KBB permeabilitesi için önemli olduğunu göstermiştir (Tao-Cheng ve ark.1987).

Astrositlerin tanımlanmasında kullanılan, Glial Fibriller Asidik Protein, 1971 yılında tanımlanan önemli astrositik tip III ara filament proteinidir. Glial Fibriller Asidik Protein, astrositlerin şekli ve mekaniksel dayanıklılığının düzenlenmesinde, hücre iletişiminde, KBB' nin bariyer fonksiyonuna katkıda bulunma gibi, hücre fonksiyon işlemlerinde yer alır. Hücrede üretilen Glial Fibriller Asidik Protein miktarı, sitokin ve hormon varlığında değişir. Bu proteinin artmış ekspresyonu, astrositik aktivasyon olarak isimlendirilen durumlarda görülür (Reeves ve ark.1989).

Kan Beyin Bariyeri yapısına katılan perisitlerin, kan damarlarına yakınlığı ile endotel hücrelerin proliferasyonu, yaşaması, göçü, farklılaşması ve damarların dallanmasını düzenlediği önerilmektedir. Perisitler, kapiller duvarı çevresinde gelişen yassı, farklılaşmamış, birleştirici hücrelerdir. Mikrovasküler perisitlerin α-aktinden yoksun olması, kapiller kasılmada yer almadığını gösterebilir (Lai ve Kuo 2005). Perisitlerin görevi; makrofaj dizilimi, eksojen proteinleri fagosite etme kapasitesine sahip olma ve antijen sunumu olabilir (Williams ve ark.2001) Perisitler, endotel ile fiziksel bir yakınlığa sahiptir ve *in vitro* perisitler ile endotel hücreleri arasında gap junctionlar gösterilmiştir. Bu yakın ilişkiye bağlı olarak, kapillerlerin bağlantısını etkileyebileceği ve bariyer fonksiyonunun korunmasını sağlayarak, KBB nin yapısal

bütünlüğünü düzenlemede önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir (Lai ve Kuo 2005).

Perisitler, bazal laminayı kaplayan hücresel uzantılar gönderir ve mikrovasküler alanın yaklaşık olarak, %20-30' unu kaplar. Bununla birlikte; hipoksi, travma veya KBB permeabilitesinin arttığı koşullarda, beyin kapillerlerinden göç ederler (Gonul ve ark.2002, Dore-Duffy ve ark.2000).

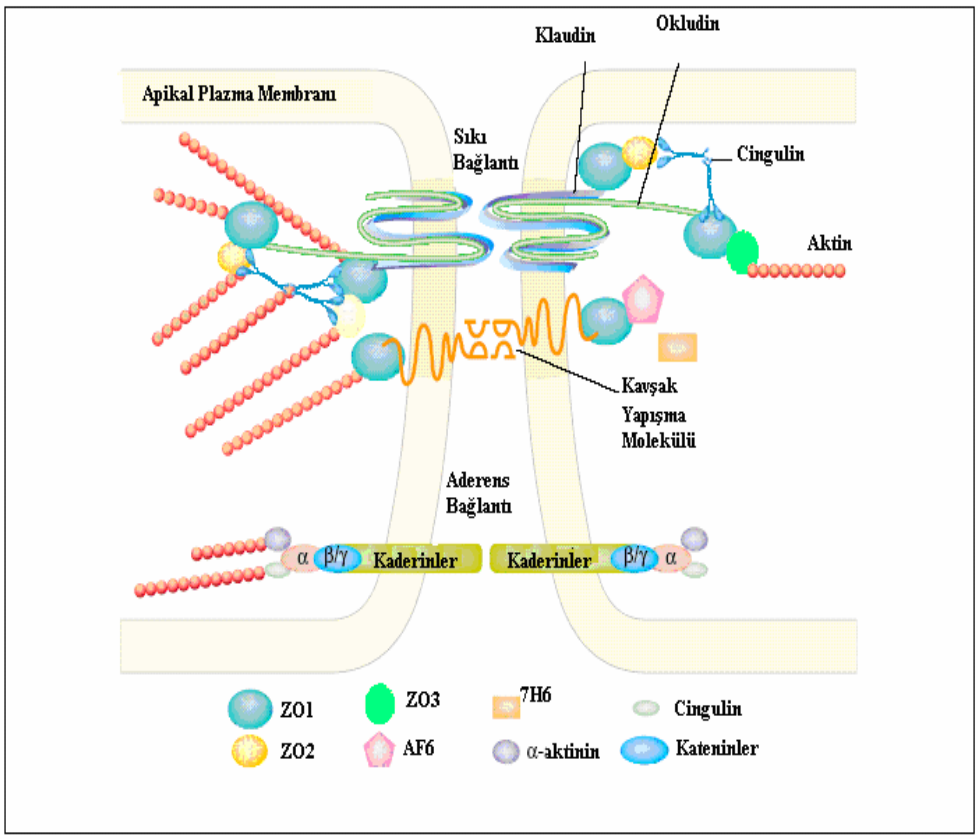
Kan Beyin Bariyeri' nin permeabilitesi nöronlar tarafından da düzenlenir. Bir grup nöronun, beyin kapilller endotel hücreleri için, enzim miktarını arttırdığı ve bariyer fonksiyonunu etkilediği düşünülmektedir (Paemeleire 2002). Beyin mikrovasküler endotel hücreleri ve/veya astrositik uzantılar, noradrenerjik, serotonerjik, kolinerjik, GABAerjik nöronlar ile innerve edilir (Cohen ve ark.1997). Beyin kapilllerlerine noradrenerjik uzantılar gönderen locus sereleusun, kimyasal olarak hasarı KBB' nin akut hipertansiyona karşı dayanıklılığını azaltır (Ben-Menachem ve ark.1982). Alzhemier hastalığında, kortikal kapillerlerin kolinerjik inervasyonunun önemli kaybı ile birlikte beyin fonksiyonunun da bozulduğu görülmüştür (Tong ve Hamel 1999).

Kan Beyin Bariyeri yapısında görev aldığı düşünülen bir diğer yapı, ekstrasellüler matriksdir. Bazal membranın ekstrasellüler matriksi, aynı zamanda beyin kapiller endotel hücreleri ile etkileşime girer. Matriks, beyin endotel hücreleriyle, laminin, kollajen tip IV ve diğer matriks proteinleriyle, beyin kapiller endotel hücreleri üzerindeki integrin reseptörleri ile bağlantı kurar (del Zoppo GJ ve Hallenbeck 2000). Hücre-matriks bağlantıları, bazı hücre içi sinyalleşme yollarına aracı olur ve matriks proteinleri endotel sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunu arttırır, bu yüzden sıkı bağlantıların korunmasında görev aldığı düşünülmektedir (Savettieri ve ark. 2000).

Sıkı Bağlantılar

Kan Beyin Bariyeri'ni teşkil eden en önemli histolojik yapı, beyin endotel hücreleri arasındaki 'tight junction=zonula occludens' denilen sıkı bağlantılardır. Sıkı bağlantılar, intersellüler aralıkları kapatma zincirleridir (Şekil 2-4). Dondurma-kırma çalışmaları da, sıkı bağlantıların membran içi zincir ağı oluşturduğunu göstermiştir (Farquhar ve Palade 1963). KBB' nin sıkı bağlantıları, endotel hücreleri arasında, moleküllerin parasellüler difüzyonunu sınırlayan bir bariyer oluşturur. Oksijen,

karbondioksit gibi küçük lipofilik maddeler, serbest bir şekilde konsantrasyon gradyanına göre geçerken, hidrofilik moleküllerin parasellüler difüzyonu kısıtlanır. Aynı zamanda, polarize endotel ve epitel hücrelerin luminal ve abluminal plazma membran bölümlerini ayırarak, bu bölümlerdeki farklı protein ve lipit yapıyı korur. Sıkı bağlantılar, kolesterolden zengin plazma membranına gömülmüştür (Citi ve Cordenonsi 1998). KBB yapısında sıkı bağlantı proteinleri olarak, transmembran proteinleri; Okludin, Klaudin, Kavşak Yapışma Molekülü (Junctional Adhesion Molecule-JAM); sitoplazmik proteinler; Zonula Okludens (ZO-1, ZO-2, ZO-3), 7H6, AF6, Cingulin ve hücre iskeleti proteini; aktin yer alır (Şekil 2-4) (Huber ve ark. 2001).



Şekil 2-4: Kan Beyin Bariyerinde sıkı bağlantılarla ilişkilendirilmiş büyük proteinlerin etkileşimleri Huber ve ark. (2002)'dan.

Klaudin'ler, sıkı bağlantı yapılarının komşu hücreyle temas ettiği bağlantılarda bulunurlar. Primer yapılardır ve dimerler oluşturur (Nitta ve ark.2003). Sıkı bağlantıların primer kapanmasını oluşturmak için, bitişik endoteliyal hücreler üzerinde klaudin'lere homotipik olarak bağlanır. Okludin, ilk keşfedilen sıkı bağlantı

transmembran proteini olup, 65 Da ağırlığında ve temas bölgelerinin karşısında yer alan dinamik düzenleyici bir proteindir. Klaudin'den, önemli ölçüde daha büyüktür ve aminoasid dizilimi benzerliği göstermez. Beyin endotel hücrelerindeki okludin ekspresyonu, nöral olmayan dokularla karşılaştırıldığında çok daha fazladır (Furuse ve ark. 1999).

Okludin'in, fosforilasyon durumu, hücre membranına bağlanma durumuna ve bariyer permeabilitesinin düzenlenmesine katkıda bulunur. Bariyerde artmış elektriksel direnç ve parasellüler permeabilitenin azalmasından sorumludur (Hirase ve ark.1997). Ayrıca, okludin'in sıkı bağlantıların kapanmasından sorumlu olduğunu gösterilmiştir (Lacaz-Vieira ve ark.1999).

Kavşak yapışma molekülü, sıkı bağlantılarda yer alan 40 Da ağırlığında, immunglobulin süper ailesinin bir üyesidir (Nusrat ve ark. 2000). Okludin, ZO-1 ve cingulin ile ortak yerleşim gösterir ve bağlantı bölgelerinde, okludini stabilize ederek sıkı bağlantıların moleküler mimarisi görevi gördüğü düşünülmektedir (Bazzoni ve ark.2000). Kavşak yapışma molekülü ayrıca, lökosit göçünü düzenlemek için trombosit endotel hücresi yapışma molekülü-1'e bağlı fonksiyon görebilir. (Martin-Padura ve ark.1998)

Zonula okludinler (ZO-1/2/3), okludin ile etkileşim halindeki sitoplazmik proteinlerdir. Sıkı bağlantı bölgeleri için tanıtıcı proteinler olarak, görev yaparlar (Haskins ve ark. 1998). Zonula Okludens-1, 220-Da ağırlığında bir fosfoproteindir ve çoğunlukla endotel ve epitel hücrelerinde eksprese edilir (Mitic ve Anderson 1998). Zonula Okludens-1, aktin filamentlerine ve okludinin C ucuna bağlanır. Zonula Okludens-2, hem epitel hem endotel sıkı bağlantılarında bulunan, 160 Da' luk proteindir.

Zonula Okludens-3, Zonula Okludens-1 ve Zonula Okludens-2 ile birlikte çöken, 130 Da' luk bir fosfoprotein olarak tanımlanmış ve önceleri p130 olarak adlandırılmıştır. Zonula Okludens-3'ün cinguline, Zonula Okludens-1 ve miyozine bağlandığı gösterilmiştir (Cordenonsi ve ark. 1999).

2.2. Kan Beyin Bariyeri permeabilitesini etkileyen aracı moleküller

Kan Beyin Bariyeri geçirgenliğinin artmasından sorumlu faktörler şunlardır: Sitokinler, mikrobiyal faktörler (Mikrobiyal proteinler, lipopolisakkarid, lipoteikoik asid v.b..), serbest radikaller (Reaktif oksijen türleri, Nitrik oksit v.b..) (de Vries ve ark.1997).

Sitokinler

Sitokinler, inflamatuvar cevapta ve immün sistemin aktivasyonunda yer alan bir grup polipeptittir. Sitokinler; interlökinler, tümör nekrozis faktör, kemokinler, interferonlar, büyüme faktörleri nörotrofinleri içine alan bazı kategorilere ayrılırlar.

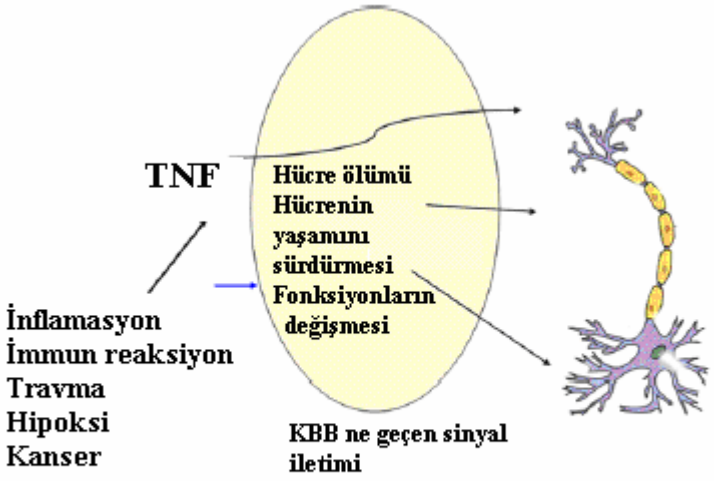
Sitokinler, hem proinflamatuvar hem antiinflamatuvar ajanlar olabilir. Beyinde mikroglia, astrosit, endotel hücre, makrofaj ve T hücreleri tarafından salınabilir. Bu yüzden; sitokin salınımı ve sentezinin serebrovasküler hastalıklar sırasında, inflamasyon gelişiminde önemli bir rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (Hopkins ve Rothwell 1995).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, sitokin sentez ve salınımının hastalık sırasında KBB'deki değişmelerde önemli olduğunu göstermiştir. Örneğin; akut inmeyi takiben insanlarda, serebrospinal sıvıda IL-1 ve IL-6 düzeylerinde artma meydana gelmiştir. Beyin iskemisini takiben, tümör nekrozis faktör ve interlökinlerde yükselme meydana gelmiştir (del Zoppo ve ark. 2000, Wang ve ark. 1997). Sitokinlerin, KBB' ne direkt etkisi bazı model sistemler kullanılarak, bazı çalışmalarda araştırılmıştır. Bu çalışmalar; tümör nekrozis faktör, vasküler endoteliyal büyüme faktörü, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 gibi sitokinlerin KBB'nde, önemli değişiklikler yapabileceğini göstermiştir (Abraham ve ark. 1996, Dobrogowska ve ark. 1998, Brett ve ark. 1995).

Fonksiyonel çalışmalar sitokinlerin KBB hasarını; siklooksijenaz yol aktivasyonu, lökosit yapışma moleküllerinin salınımı ile nötrofillerin endotele yapışmasının artması, nitrik oksit üretiminde artma ve matriks metalloproteinaz ekspresyonunda yükselme gibi mekanizmalar aracılığıyla oluşturduğunu ileri sürmektedir (de Vries ve ark.1996, Rosenberg ve ark.1995).

Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-α), KBB' nden reseptör aracılı endositoz ile geçebilen, proinflamatuvar sitokinlerden biridir. Radyoaktif olarak işaretlenmiş TNF-α nın, farelerde ve aynı zamanda tek tabakalı kültüre edilmiş beyin kapiller endotel hücrelerde kandan beyine ve serebrospinal sıvıya geçişi gösterilmiştir. Hipoksi, inflamasyon, diyabet, hipertansiyon gibi metabolik hastalıklarda konsantrayonu yükselir (Gutierrez ve ark. 1993).

TNF-α, mikrosirkülasyondan santral sinir sistemine geçerek, santral sinir sistemi fonksiyonlarını düzenleyen sekonder sinyallerin oluşumunu sağlayarak, uygulanma zamanına ve konsantrasyonuna bağlı olarak, santral sinir sisteminde nörodejeneratif veya nöroprotektif etki gösterebilir (Pan ve Kastin 2007) (Şekil 2-5).



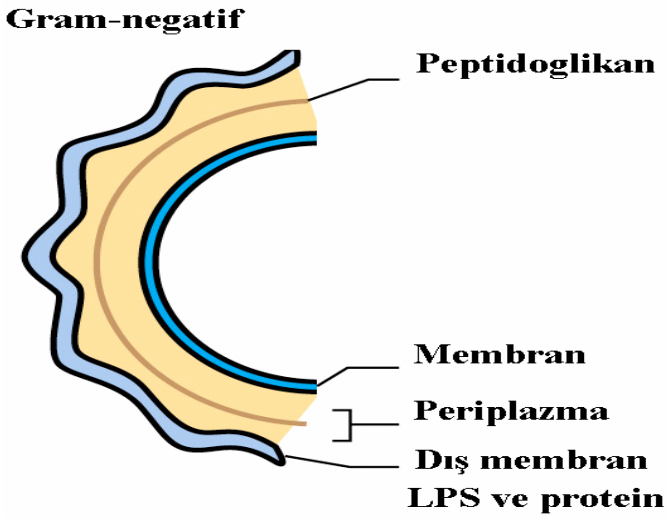
Şekil 2-5: Santral sinir sisteminde TNF-α aracılı sinyal iletiminin etkisi. Pan ve Kastin (2007)'den.

İnterlökin-12 (IL-12), 35,000 (p35) ve 40,000 (p40) molekül ağırlıklı iki ayrı disülfit bağlı alt ünite taşıyan, yapısal olarak benzeri olmayan bir heterodimerdir. Predominant olarak, B hücreleri ve makrofajlardan salınır. IL-12, T lenfositler ve doğal katil hücrelerin proliferasyonunu aktive eder, aynı zamanda, istirahat halindeki ve aktive olmuş T hücreleri ve doğal katil hücrelerinden interferon üretiminin en kuvvetli indükleyicisidir (del Vecchio ve ark.2007).

İnterlökin-10 (IL-10), anti-inflamatuvar molekül olarak tanımlanmıştır. TNF-α , IL-1, IL-8 gibi proinflamatuvarların üretimini baskılayabilir. Bu yüzden de, koruyucu etki gösterdiği düşünülmektedir. Travmatik yaralanmalar ve inme gibi patolojik durumlarda, koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (Grilli ve ark.2000)

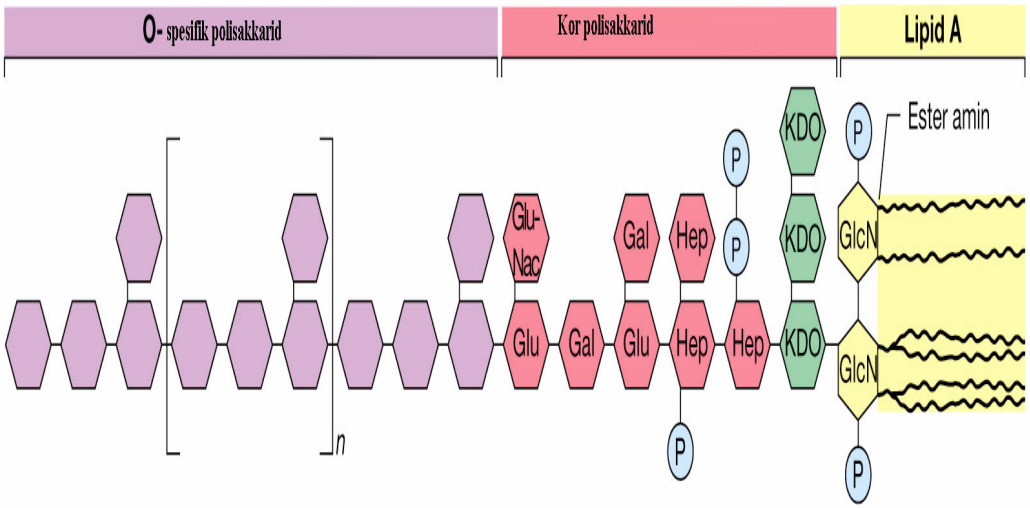
Mikrobiyal Faktörler

Lipopolisakkarid, lipoteikoik asit gibi mikrobiyal faktörlerin, KBB geçirgenliği üzerinde etkisi olduğu gösterilmiştir. LPS, gram negatif bakterilerin hücre duvarında bulunan endotoksindir (Şekil 2-6).



Şekil 2-6: Gram-negatif bakterinin membran kısımları. Raetz ve Whitfield (2002)'den.

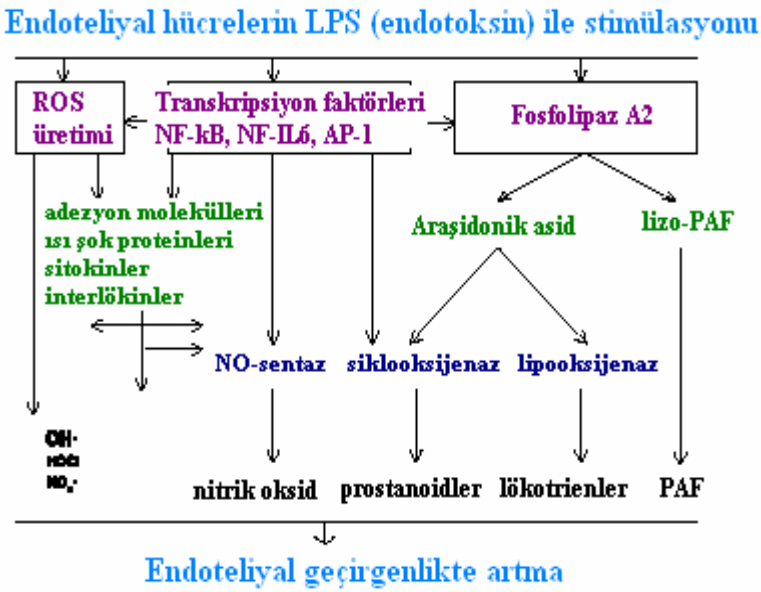
Bakteriyel LPS, temel olarak, Lipid A (endotoksin) olarak bilinen bir hidrofobik ünite, tekrarlamayan oligosakkarid merkez ve bir distal polisakkarid merkezden (O-Antijen) oluşur. Lipid A, Gram (-) bakterilerin en dış membranını örten tek tabakalı bir katmandır ve glikozamin bazlı fosfolipittir. Bir Escherchia coli hücresinde, yaklaşık 10^6 Lipid A bakiyesi ve yaklaşık 10^7 gliserofosfolipid bulunur (Raetz ve Whitfield 2002) (Şekil 2-7).



Şekil 2-7: LPS'nin yapısı: O-antijen (Türe özgül), Kor (Ortak polisakkarid yapı), Lipid A (Endotoksin etkiden sorumlu). Raetz ve Whitfield (2002)'den.

LPS'nin parçalarından biri olan patojene bağlı moleküler örnek, invaze olan mikroorganizma tarafından üretilir ve immün sistem hücreleri ve spesifik reseptörler tarafından tanınır (TLR_S). TLR_S, immün sistem hücreleri tarafından eksprese edilen, böcek ve memelilerde evolüsyon sırasında korunmuş, tip 1 transmembran proteinlerinin bir ailesidir. Bu reseptörlerin ve ortak stimülatör moleküllerin (CD14 gibi) uyarılması, bir kısmı IL 1 reseptör tip hücre içi sinyalleşme yolu ile paylaşılan antijen sunucu hücrelerdeki sinyalleşme olaylarını aktive eder (Akira ve ark.2001**).**

TLR_S aktivasyonu, indüklenebilir nitrik oksit, siklooksijenaz-2, kompleman sistem proteinleri, kemokinler ve sitokinleri kodlayan çeşitli proinflamatuvar genleri tetikleme yeteneğine sahip nüklear faktör κβ gibi transkripsiyonel faktörlerin üretimi ile sonuçlanır (Rivest ve ark.2000). LPS, sistemik infeksiyonu taklit eder. LPS' nin, *in vitro* bazı sinyal ileti yolları aracılığı ile, KBB permeabilitesini etkilediği gösterilmiştir Şekil (2-8).



Şekil 2-8: ***in vitro*** **LPS' nin, kan beyin bariyeri permeabilitesinde meydana getirdiği değişikliğe neden olan, endotel sinyal ileti yolları Boje (1995)' den.**

Serbest Radikaller ve Nitrik Oksit

Lökotrienler, prostaglandinler, interlökinler gibi mediatörlerin artışı, hücre içi Ca^{+2} artışına ve ikincil haberci sistemlerin uyarılmasına yol açar. Hücre içi Ca^{+2} artışı ile, litik enzimler aktive olur ve serbest radikaller oluşur. Oluşan serbest radikaller de, membran fosfolipidlerinin oksidasyonuna neden olarak, araşidonik asit ve metabolitlerinin artışına neden olurlar. Böylece, serbest radikallerin artışı ile yıkıcı metabolik olayların hızlanması şeklinde, bir kısır döngü oluşur. Oluşan serbest radikallerin, KBB hasarında önemli bir payı vardır. KBB'ne zarar veren serbest radikallerden biri de, nitrik oksittir (NO) (Chan ve Fishman 1984, Halliwell 1984).

NO, nöronun ölümüne yol açan toksik reaksiyonları başlatır. Merkezi Sinir Sisteminde, glutamat nörotransmisyonunda, N-Metil-D-Aspartat (NMDA) reseptör aktivasyonu, hücre içi Ca^{+2} da büyük bir artışa neden olur ve nöronal nitrik oksit sentaz (NOS) aktive olur. Bu da, aşırı NO sentezine yol açarak, nöronlarda hasar oluşturur. NO, süperoksit anyonuyla reaksiyona girerek, NO'dan daha toksik olan peroksinitriti ($ONOO^{\bullet}$) oluşturur. Peroksinitritin toksik etkileri; lipid peroksidasyonunu başlatmak, mitokondriyal solunumu azaltmak, membran pompalarının fonksiyonunu bozmak,

DNA'yı yıkmak, hücrede enerji eksikliğine yol açan Poli (ADP riboz) sentazı aktive etmek vs… dir (Alm ve ark. 1998).

2.3. Fizyopatolojik Koşullarda Kan Beyin Bariyeri Permeabilitesinde Meydana Gelen Değişiklikler

KBB permeabilitesini değiştirerek, kandan beyne madde geçişini etkileyen pek çok patolojik koşul vardır:

1-Epileptik Nöbetler

2-Hipertansiyon

3-İskemi, hipoksi

4-X ışınları

5-Beyin tümörleri

6-İnflamatuvar Hastalıklar

7-Hipoglisemi-Hiperglisemi

8-Beyin travmaları

9-Alzhemier hastalığı

10-Multiple Skleroz (de Vries ve ark.1997).

Bu faktörlerden, Epileptik Nöbetlerin, Akut ve Uzun Süreli Hiperglisemi'nin KBB permeabilitesine etkisini daha geniş olarak inceleyelim.

Epileptik Nöbetler ve Kan Beyin Bariyeri

Beyin damar endotel hücrelerinin oluşturduğu KBB, beyin interstisyel sıvısındaki elektrolitlerin sürekli olarak, belirli bir değerde tutulmasında rol oynar ve aynı zamanda, beyin ekstrasellüler sıvısının stabil olmasına katkı sağlar. Böylece, KBB kan ile beyin arasındaki madde değişimini düzenler ve nöronların homeostatik bir ortamda çalışmasına katkıda bulunur (Abbott ve Revest 1991). Epileptik nöbetler sırasında, kan ile beyin arasındaki madde değişiminde meydana gelen dengesizlikler, nöbetler sonrası geçici veya sürekli nöropsikiyatrik bozuklukların gelişiminde, bir rol oynayabilir. Epileptik nöbetler; akut hipertansiyon, KBB yıkımı, beyin kan akımı ve metabolizma artışına eşlik eden sempatik sinir sisteminin aktivasyonunu şiddetlendirir (Rigaud ve ark.1990). Epileptik hastalarda, serebrospinal sıvıda, serum albumin ve

beyin hasarı için bir marker olan enolaz düzeylerinin kontrollere göre arttığı bilinmektedir (Correale ve ark.1998).

Deneysel olarak epilepsi, pentilentetrazol (PTZ), bikükülin, kainik asit veya elektroşok uygulanmasıyla oluşturulur (Nitsch ve Klatzo 1983). PTZ ile oluşturulan nöbet sonrasında, işaretli albumin ve horseradish peroksidase (HRP) gibi büyük molekül ağırlıklı maddelerin, beynin özellikle talamus bölgesinde arttığı gösterilmiştir (Lorenzo ve ark. 1972). Elektron mikroskopik çalışmalarda, HRP vezikülleri kapiller endotel hücresinde bazal membranda ve beynin ekstrasellüler sıvısında gösterilmiş dolayısıyla, transsellüler yolun çalışabileceği ileri sürülmüştür (Petito ve ark.1977).

Nöbetler sırasında, KBB permeabilitesinin artmasının, nöbetin süresi ile orantılı olduğunu ileri süren çalışmalara rağmen, elektrokonvülzif şokla oluşturulan nöbetlerde, HRP traserinin beyne geçişi incelenmiş ve hatta ilk elektrokonvülzif şokta gelişen ilk nöbette, bu maddenin bariyerden beyine geçtiği gösterilmiştir (Westergaard ve ark. 1978)

En önemli beyin aktivite artışı nöbetler tarafından oluşturulmaktadır. Epileptik nöbetler, hem beyin kan akımı hem de beyin metabolizmasında önemli oranda artışlara neden olmaktadır. Sonuç olarak; epileptik nöbetler, beyin fonksiyonlarında birçok düzensiz aktivitenin ortaya çıkmasında rol oynar. Nöbetlerde, glikoz kullanımı iki kat, periferik vasküler dirençteki artışa bağlı olarak, total ve bölgesel beyin kan akımı 1.5-9 kat artırmakta ve şiddetli vazodilatasyondan dolayı beyin damarlarında otoregülasyon kaybolmaktadır (Moshe 1998).

PTZ, bikükülin gibi çeşitli kimyasal ajanlarla oluşturulan epileptik nöbetlerde, beyin glikoz ve oksijen tüketimin arttığı bilinmektedir (Hashizume ve ark. 1998). Hem epileptik nöbetler, hem de ortalama arteryal kan basınç artışı, KBB yıkımına yol açan önemli nedenlerdir. Ancak, gerek nöbetlerde gerekse hipertansiyonda gösterilen KBB yıkımı, bölgesel farklılıklar gösterir (Nitsch ve Klatzo 1983). Lorenzo ve ark.(1972), işaretli albuminin beyine geçişi ile bölgesel kan akımı arasındaki ilişkiyi incelemişler ve

beyin kan akımı arttığı halde, traser geçişinin bu artışa eşlik etmediği sonucuna varmışlardır.

Epileptik nöbetlerdeki beyin kan akımı, nöbetlerin yarattığı metabolik artışla ilişkili çeşitli faktörlerden etkilenebilir ve bu durum, kan basıncı artışından bağımsız olabilir (Plum ve ark. 1968). Sistemik kan basıncı artışına eşlik etmesi gereken ve KBB' nin açılması için gerekli olan, beyin damar otoregülasyon kaybının yanında, makromoleküllerin beyine geçişi ile ifade edilen, KBB yıkımının meydana gelip gelmemesinde, nörojenik faktörlerin de, rol oynayabileceği ileri sürülmektedir (Nitsch ve ark.1985). Epilepsi çalışmalarında, büyük molekül ağırlıklı traserlerin, beyine geçişinde, beyin kan akımının önemli olduğu bildirilmiştir (Bolwig ve ark. 1977). Nöbetler sırasında, gösterilen KBB geçirgenliğindeki artışın beynin birçok bölgesinde yüksek olan beyin kan akımından bağımsız olarak meydana geldiği ve bir saat sonra normale döndüğü ileri sürülmektedir (Lorenzo ve ark. 1972).

Epileptik nöbetlerde kan-beyin bariyer yıkım mekanizmaları

Bu konuyla ilgili, iki mekanizma önerilmektedir. a) Pinositotik aktivite artışı b) Sıkı bağlantıların açılması. Bir grup araştırıcı, epileptik nöbetlerde gösterilen KBB permeabilite artışının kapiller endotel hücrelerindeki pinositotik aktivite artışı ile sağlanabildiğini gösterirken (Petito ve ark. 1977; Nitsch ve ark. 1986); karşı grup, epileptik nöbetlerde kapiller dilatasyona neden olan intraluminal basınç artışı ile sıkı bağlantıların açıldığı ve bu yolla KBB geçirgenliğinin arttığını ileri sürmektedirler (Rapoport 1976; Suzuki ve ark. 1984).

Pinositotik olarak, KBB permeabilitesinin artmasında c-AMP çok önemli bir yere sahiptir. Beyin kapiller endotel hücrelerindeki pinositozun c-AMP ile uyarıldığı bilinmektedir. c-AMP ise, serotonin, histamin, katekolaminler, elektrik pulsları ve yüksek konsantrasyondaki potasyum gibi diğer depolarize ajanlarla uyarılmaktadır (Petito ve ark. 1977). Beyinde bulunan c-AMP, özellikle daha çok talamusta lokalizedir. Epileptik nöbetler sırasında gösterilen pinositoz artışında beyin metabolizmasındaki artışın, önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür (Robinson ve ark. 1970).

Normalde KBB' nden geçemeyen Evans blue-albumin ve HRP gibi makromoleküller, epileptik nöbetler sırasında orta beyin bölgeleri başta olmak üzere beyine geçmektedir. Elektrokonvülzif şok sırasında beyin damar endotel hücrelerinde transendotelyal pinositozun aktivasyonuyla, HRP geçişinin arttığı ve nöbet kesildikten sonra da HRP geçişinin azaldığı gösterilmiştir (Bolwig ve ark. 1977). Diğer yandan, beta adrenerjik reseptörler, beyin damarlarında bulunmakta ve bunların agonistleri, yine endotelde bulunan, adenil siklazı aktive etmektedir. Aktive adenil siklaz ise, c-AMP artışına neden olmaktadır. c-AMP aktivasyonu sonucunda da KBB' nin yıkıldığı ileri sürülmektedir (Ginsberg ve ark.1985).

Kan Beyin Bariyeri, beyin kan akımı ve bölgesel farklılıklar

Hem hipertansiyonda, hem de nöbetlerde, sistemik kan basıncı artmasına rağmen her iki koşulda gösterilebilen, KBB yıkımında bölgesel farklılıklar vardır (Nitsch ve Klatzo 1983). KBB yıkımı, önemli oranda, kan basıncı yükselmesine ve bu yüksekliği belirli bir süre korumasına bağlıdır (Oztas ve Kaya 1991). KBB yıkımı için, kritik noktanın beyin kan akımındaki otoregülasyon kaybı olduğu bilinmektedir (Bolwig 1989). Aksine, beyin kan akımı'nın fazla oranda yükseldiği bölgelerden özellikle kortekste, Evans blue geçişinin bu kan akımı artışına eşlik etmediği gösterilmiştir (Suzuki ve ark. 1984).

Hipertansiyonda, Evans blue-albumin ekstravazasyonu daha çok pariyetal ve oksipital korteks gibi neokorteks alanlarında görülmektedir (Nitsch ve Klatzo 1983). Epileptik nöbetlerde, serebral korteksten ziyade özellikle başta talamus olmak üzere, orta beyin çekirdeklerinde ve serebellumda KBB yıkımı gerçekleşir. Diğer yandan, deneysel çalışmalarda kullanılan konvülzif ajanların, KBB yıkımında bölgesel seçiciliğe sahip oldukları bilinmektedir. Örneğin, PTZ genelde ortabeyin çekirdeklerinde ve kısmen de serebellumda, KBB permeabilitesinde artmaya neden olur. Bikükülin, pallidumda, metoksipiridoksin hipokampusta, kainik asit neokorteks bölgesinde bariyer permeabilitesinin artmasına neden olmaktadır (Bolwig 1989).

Hiperglisemi ve Kan Beyin Bariyeri

Glikoz, tüm memeli hücreleri için önemli metabolik bir substrattır. Nöral dokuların, metabolik aktivitesi glikoza bağlıdır. Beyne glikoz taşınması, KBB den sodyumdan bağımsız glikoz taşıyıcı (GLUT1) aracılığı ile gerçekleşir. (Flier ve ark. 1987). Taşıyıcı, kan glikoz düzeylerine göre düzenlenir. Diğer taşıyıcı proteinler, beyinde farklı hücre tiplerinin membranlarında mevcuttur.

Astrositler, düşük molekül ağırlıklı, daha az glikolizlenmiş GLUT1' ce zengindir. GLUT-1 ve GLUT-4, hipokampus, serebellum, olfaktör bulbus, az miktarda lateral hipotalamus, arkuat nükleus ve globus pallidusta rapor edilmiştir. Nöronal hücrelerde, GLUT-3 ve GLUT-8 yer alır. GLUT-8 olarak isimlendirilen glikoz taşıyıcı, hipokampus, serebral korteks ve hipotalamusta tanımlanmıştır (Sheperd ve ark. 1992, Reagan ve ark. 2002).

Kan plazmasında glikoz miktarının normal değerlere göre artması ile meydana gelen hipergliseminin; kısa süreli veya Diabetes Mellitus' da olduğu gibi uzun süreli meydana gelmesi, vasküler disfonksiyona neden olarak, KBB yapısının değişmesine neden olabilir (Horani ve Mooradian 2003).

Akut Hiperglisemi ve Kan Beyin Bariyeri

Akut Hiperglisemi, kan plazmasında akut olarak glikoz miktarının artışıdır. Yüksek glikoza maruz kalmak, serbest radikal üretimini artırabilir ve endotelyumda karakteristik disfonksiyona ve morfolojik değişikliklere önderlik edebilir. Beyin endotel hücreleri, reaktif oksijen türlerine maruz kaldığı zaman, meydana gelen yapısal değişikliklerin yanında, KBB geçirgenliği artışı meydana gelebilir. Akut Hiperglisemik durumlar, direkt olarak reaktif oksijen türlerinin üretiminde yükselmeye sebep olarak endoteliyal hasarda önemli bir rol oynayabilir (Tesfamariam ve Cohen 1992). Normoglisemik koşullarda beyindeki glikoz karbondioksit ve suya parçalanarak enerji açığa çıkarır. Kan glikoz düzeyinin artması beyin metabolizmasını etkiler. Akut ve Uzun Süreli Hiperglisemide, yüksek glikoz konsantrasyonu başlıca üç mekanizma aracılığı ile KBB ve nöronlara etki edebilir (Bonnefont-Rousselot, 2002).

1. Glikozun Oto-oksidasyonu ve Süperoksit Üretimi

Bir geçiş elementinin varlığında glikoz, reaktif ketoaldehitlere ve süperoksit anyonuna çevrilir. Reaksiyonlar zinciri, superoksit radikalinin, hidrojen peroksit üzerinden, son derece reaktif olan hidroksil radikali oluşturması ile sonuçlanır. Hücre içi glikoz oksidasyonu NADH' nın açığa çıkmasına yol açar. NADH, solunum zincirinde oksidatif fosforilasyon yolu ile ATP üretimi için gerekli enerjiyi sağlamak üzere kullanılır. Solunum zincirindeki bu reaksiyon sırasında, süperoksit radikali açığa çıkar.

Yüksek glikoz konsantrasyonu varlığında, bu yolla süperoksit radikal üretimi artar. Mitokondri solunum zinciri, başlıca hücre içi Reaktif Oksijen Türleri üretim kaynağıdır. Normal solunum zinciri, olayları sırasında sürekli olarak, süperoksit radikali oluştuğu düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, diyabetteki patolojilerin birçoğunun artmış mitokondriyal Reaktif Oksijen Türleri üretimi ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Altan ve ark. 1997; Brownlee 2001; Gren ve ark. 2004).

2. Proteinlerin Glikasyonu ve AGE (ilerlemiş glikasyon son ürünleri) Oluşumu

Proteinler, yüksek glikoz konsantrasyonları ile karşılaştıklarında, glikoz bir enzimin aracılığına gereksinim duymadan proteine bağlanarak, kontrolsüz glikasyon reaksiyonlarına neden olur. Glikasyona uğramış protein, moleküler oksijene bir elektron vererek serbest oksijen radikali oluşumuna neden olur (Gillery ve ark. 1988). Glikoz ve proteinlerin, amino grupları arasında kendiliğinden gelişen, enzimatik olmayan glikasyon reaksiyonları yoluyla, önce Shiff bazları, sonrasında daha stabil olan Amadori ürünleri oluşur. Amadori ürünlerinin oluşumundan sonra, ilerlemiş glikasyon son ürünleri (AGE) meydana gelir (Dinçer ve ark. 2002). İlerlemiş glikasyon son ürünleri, endotelin-1 aracılığıyla vazokonstriksiyonu arttırarak, endotel hasarına yol açtığı gibi, kompleks biyokimyasal mekanizmalarla, serbest radikal üretebilme kapasitesine de sahiptirler. Yine, ilerlemiş glikasyon son ürünleri'nin, toksik etkileri arasında; proteinlerin yapılarını ve fonksiyonlarını değiştirebilmeleri, kendi reseptörleri ile oksidatif stresi indükleyebilmeleri ve sonuçta nükleer faktör kapa B (NFkB) gibi redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerini aktive etmeleri ve ilgili genlerin (prokoagülant doku faktörü endotelin -1, adhezyon molekülü, gibi) ekspresyonlarının artışı bulunmaktadır (Bierhaus ve ark. 1997).

Araştırmalar; ilerlemiş glikasyon son ürünleri'nin reseptör aracılı mekanizma ile, serbest radikal üretimini uyarmasının yanı sıra, artmış serbest radikallerin de hücre içi ilerlemiş glikasyon son ürünlerinin oluşumunu arttırdığını göstermektedir (Eidland ve ark. 2001). Giardino ve ark. (1996) hücre içi ilerlemiş glikasyon son ürünlerinin oluşumu ile lipid peroksidasyonu arasında sıkı bir ilişki olduğunu, lipid peroksidasyonunun önlenmesi ile ilerlemiş glikasyon son ürünlerinin oluşumunun da önlendiğini bildirmişlerdir. Diyabetik nefropati oluşturulan sıçanlara, ilerlemiş glikasyon son ürünlerinin inhibitörleri verildiğinde, glisemik kontrolde, herhangi bir değişiklik olmaksızın, albüminüri'nin önlenebildiği gösterilmiştir (Giardino ve ark. 1998).

Yapılan çalışmalarda, ilerlemiş glikasyon son ürünleri ve serbest radikallerin, protein kinaz C'yi aktive ettiği gösterilmiştir. Aktive olan protein kinaz C'nin, vasküler kan akımını, damar permeabilitesini, hücre dışı matriks bileşenlerini ve hücre büyümesini etkileyerek, damar komplikasyonların patogenezinde rol aldığı öne sürülmektedir (Soulis ve ark. 1997; Chappey ve ark. 1997).

3-Poliol Yol

Yüksek glikoz konsantrasyonu, poliol yolu ile sorbitol üretimine neden olur. Bu yoldaki aldoz redüktaz enzim aktivitesi için NADPH kullanıldığından hücre içi NADPH tüketilir. Okside glutatyonun redükte forma çevrilebilmesi ve nitrik oksit (NO) sentezi için NADPH gereklidir. Bu nedenle, sorbitol yolunun aktif olması ve sonuçta NADPH'ın yokluğu, hücrenin antioksidan kapasitesinin sınırlanması anlamına gelmektedir (Maritim ve ark. 2003). Redükte glutatyonun ve vazodilatasyonda görev yapan NO sentezinin azalması, diabetin vasküler komplikasyonlarının ortaya çıkışında rol oynar (Das ve Chainy 2001).

Glikozun, sorbitol yolu ile fruktoza ve sorbitola çevrilmesinin bir sonucu olarak, hücrede miyoinozitol düzeylerinde azalma ve bunun sonucunda da Na^+-K^+- ATP-az enzim aktivitesinde düşme olduğu gözlenmiştir ki, bu enzim aktivitesi sinir iletim hızı için önem taşımaktadır (Grene ve ark.1987). Sorbitolun kendisi, bir doku toksini gibi

hareket eder. Bu nedenle, retinopati, nöropati, katarakt, nefropati ve kalp hastalığı patogenezinde rolü olduğu düşünülmektedir (Bukan ve ark. 2004).

Diabetes Mellitus ve Kan Beyin Bariyeri

Diabetes Mellitus artmış parasellüler geçirgenlik, hücre iskeleti yapısının değişmesi, bazal membran kalınlığı gibi damarsal komplikasyonlara neden olan, kronik bir hastalıktır (Idris ve ark. 2004, Yu ve ark.2005). Diabetes Mellitus' daki uzun süreli hiperglisemi, hipertansiyon, artmış oksidatif stres, dislipidemi ve insülin direnci diyabette oluşan endotel hücre disfonksiyonuna katkıda bulunabilir (Lee ve ark.2002; Osicka ve ark. 2003). Bununla birlikte; klinik kanıtlar diyabetin, vasküler demans, ventriküler hipertrofi, laküner enfarktüs, hemoraji gibi değişikliklere neden olduğunu göstermiştir (Karapanayiotides ve ark. 2004; Rosenkranz ve ark. 2003).

Diabetes Mellitus'da Beyin Kapillerlerindeki Histolojik Değişiklikler

Diyabette, kapiller endotel hücreleri ve bu hücrelerin bazal membranları, özellikle kalp (Yamaji ve ark. 1993) ve böbrekte (Ditzel ve Junker 1972) önemli değişikliklere neden olur. Diyabet süresince, santral sinir sistemi kan kapiller yoğunluğunda azalma ve kapiller membran kalınlığında artma gibi değişiklikler gösterilmiştir (McCall ve ark.1982; Mooradian 1997). Diyabetik hayvanların kapillerlerinde kalsiyum birikmeleri rapor edilmiştir (Mooradian 1997).

Diabetes Mellitus'da Kan Beyin Bariyeri'nin Taşıma Fonksiyonunda Değişiklikler

Gjedde ve Crone (1981) ve Mc Call (1992), KBB' ne özel taşınma işlemlerinin, kronik hiperglisemide değişebildiğini gösterilmiştir. Özellikle, uzun süreli hiperglisemide KBB glikoz taşınması azalmıştır. Çoğu çalışmada KBB' ne glikoz taşınmasının azalması ile birlikte, KBB ne spesifik glikoz taşıyıcılarının yoğunluğunun azaldığını göstermiştir (Matthaei ve ark.1986; Lutz ve Pardridge 1993) Hiperglisemi'nin, insülin tedavisi ile iyileştirilmesi, KBB' nden glikoz taşınmasını normale döndürmüştür. İnsülin tedavisi ile hipergliseminin düzelmesi, KBB' nden glikoz taşınmasının azalmasının klinik önemi bilinmemektedir. Santral sinir sistemini, uzun süreli glikotoksisiteden korumak için, adaptif değişiklik olabilir veya kan glikozu, aniden öglisemik seviyelere düşen, kronik kalıcı hiperglisemi hastalarında gelişen,

nöroglukopenik semptomlardan sorumlu olabilir. Aynı zamanda, diyabetik hayvanlarda, vitamin C 'nin dokuda tükenmesinden sorumlu olabilir, çünkü beyne vitamin C girişi, glikoz taşıyıcıları aracılığı ile gerçekleşir (Mooradian ve Morin 1991).

Glikoz, aynı zamanda dokuya taşınmasında, miyoinositol ile yarışır, bununla birlikte bu durum, beynin miyoinositol içeriğini değiştirebilir (Rikans 1981). Bazı aminoasitler ve laktatın KBB'nden taşınması diyabetlilerde değişmemiştir (McCall ve ark.1982). Bununla birlikte, devamlı infüzyon metodu kullanılarak yapılan çalışmalar, fenilalanin ve lizinin beyne girişinin azaldığını göstermiştir. Kronik kontrol edilemeyen hiperglisemik sıçanlarda, asetilkolin için substrat olan kolinin, KBB' ye taşınması azalmıştır (Mans ve ark. 1987).

KBB'nin sodyum, potasyuma geçirgenliği, diyabetik sıçanlarda azalmıştır. Diyabetik sıçanlarda, KBB'nin sodyum, potasyum ve hidrojen iyonlarına permeabilitesinin azaldığı, klor ve kalsiyuma karşı değişmediği görülmüştür (Jakobsen ve ark. 1987, Mooradian ve ark. 1994).

Diabetes Mellitus'da Beyin Kapiller Dolaşımındaki Hemodinamik Değişiklikler

Çeşitli dokularda kapiller dolaşımında, diyabet ile ilişkili değişiklikler rapor edilmiştir (Joyner ve ark.1981, Katz. ve McNeill 1987). Bu değişiklikler, en iyi intravital mikroskopi ile incelenmiştir. 1 aylık diyabetlilerde lokal oksijen yükselmelerine arteriyol ve venüllerin vasokonstriktif cevapları azalmıştır (McCuskey PA ve McCuskey RS 1984). Diyabetik sıçanlarda, artmış arteriyo-venöz şant gözlenmiştir. Bu değişim, besinlerin beyin dokusuna dağılımını azaltabilir. Diyabetik farelerde, pial arteriyollerin norepinefrin, serotonin, prostaglandin F2α ve tromboxan analoğuna cevabının değişmediği gösterilmiştir. Yine, diyabetik farelerde beyin arteriyollerinin, papaverin veya nitrogliserine dilatasyon cevabı önemli ölçüde değişmemiştir (Knudsen ve ark. 1991, Mayhan 1989, Mayhan ve ark. 1993).

Diabetes Mellitus'da Beyin Kapilllerlerindeki Fonksiyonel Değişiklikler

Diyabetin genel komplikasyonları olan; geçici iskemi, hipertansiyon, hiperosmolalite KBB bütünlüğüne zarar verebilir (Arieff ve Kleeman 1973; Mueller ve

Luft 1982; Sage ve ark. 1984) Diabetes Mellitus, periferal vasküler yatakların permeabilitesinde artış meydana getirir (Joyner ve ark. 1981). Diabetes Mellitusun, KBB permeabilitesine etkisi farklı traserler ve diyabet süreleri oluşturularak, yapılan deneysel çalışmalar ile gösterilmiştir. Araştırıcılardan bazıları, diyabetin KBB permeabilitesinde artış meydana getirdiğini gösterirken, bazı araştırıcılar, KBB permeabilitesinde herhangi bir değişiklik meydana gelmediğini göstermiştir (Tablo 2-3).

Ürünler	Moleküler ağırlık ($X10^3$)	Permeabilite	Diyabet süresi (hafta)	Referans
Albümin	69	Artış/Değişlik yok	2	Bradbury ve ark.1991 Chehade ve ark. 2002
Ig G	150	Değişiklik yok	2	Chehade ve ark. 2002
C3	80-110	Değişiklik yok	2	Chehade ve ark. 2002
HRP	40	Değişiklik yok	4	Gjedde ve Crone 1981
Sitokrom C	12	Değişiklik yok	4-20	Jakobsen ve ark. 1978
İnülin	4	Artış/Değişlik yok	4	Gjedde ve Crone 1981
Sükroz	0.342	Değişiklik yok	4-20	McCall ve ark.1982
EDTA	0.372	Değişiklik yok	2	Mooradian ve Morin 1991
α-aminobütirik asit	0.104	Değişiklik yok	8	Fouyas ve ark. 2003

Tablo 2-4: Diabetes Mellitus oluşturulan deneysel çalışmalarda kan beyin bariyeri permeabilitesinde meydana gelen değişiklikler Mooradian (1997)'den.

Diabetes Mellitus'da Beyin Kapillerlerindeki Biyokimyasal değişiklikler

Diyabetli sıçanların beyin kapillerlerinde lipid peroksidasyon ürünleri konjüge dienler ve malondialdehid konsantrasyonları önemli ölçüde artmıştır. (Mooradian 1995). Antioksidan enzim aktivitesinde azalma sonucu veya hiperglisemi veya glikooksidasyon sonucu, deneysel diyabetlilerde, oksidatif stres artmıştır (Habib ve ark. 1994). Artmış oksidatif stres, diyabetli hayvan modellerinde gözlenen, KBB deki değişikliklere katkıda bulunabilir. Diyabette, aynı zamanda, beyin kapillerlerinde protein komposizyonunda değişiklikler oluşur. Bu değişikliklerden bazıları, gen ekspresyonunun değişmesi ile sonuçlanırken, diğerleri proteinlerin, post translasyonal modifikasyonu veya protein dönüşümünün değişmesi ile sonuçlanmıştır (Tablo 2-4).

1. Beyin kapiller dolaşımındaki patolojik değişiklikler
(a) Kapiller yoğunluğun azalması
(b) Bazal membran kalınlığının artması
2. Beyin kapiller dolşımındaki hemodinamik değişiklikler
(a) Arteriyovenöz şant
(b) Damar reaktivitesinin değişmesi
3. Beyin kapillerlerinde biyofiziksel değişiklikler
(a) Membran akıcılığının değişmesi
(b) Endotel yüzeyinin yük değişimi
4. Beyin kapillerlerinde biyokimyasal değişiklikler
(a) Protein içeriğinin değişmesi
(b) Lipid içeriğinin değişmesi
(c) Lipid peroksidasyon son ürünlerinin birikmesi
5. Beyin kapillerlerinde nörotransmiter aktivitesinde değişiklikler
(a) β-adrenerjik reseptör sayısının değişmesi
(b) Adenilat siklaz aktivitesinin değişmesi

Tablo 2-5:Kan Beyin Bariyerinde diyabete bağlı meydana gelen değişikliklere neden olan mekanizmalar Mooradian (1997)'den.

Diyabetik sıçanlarda 5 hafta sonra, beyin kapillerlerinde bulunan çoğu zorunlu proteinlerin miktarlarında değişme gözlenmemiştir. 25 protein türünden sadece bir

tanesi diyabetik sıçanlarda önemli ölçüde değişmiştir. Diyabetik sıçanlarda, kontrol sıçanlara göre beyin kapillerlerinde protein karışımının glikolizasyon seviyesi, önemli ölçüde artmıştır KBB' nde yer alan alkalin fosfataz ve gama glutamil transpeptidaz enzimlerinin miktarı, diyabetik sıçanlarda değişmemiştir. Beyin kapillerlerinde sodyum potasyum ve magnezyum ATP az aktivitesi, 4 haftalık diyabetlilerde değişmemiştir (Mooradian ve ark. 1994).

Diabetes Mellitus'da Beyin Kapillerlerindeki Biyofiziksel Değişiklikler

Hücredeki taşınma sistemleri, membran akıcılığı ve hücrelerin yüzey değişikliklerinden etkilenir. Membran akıcılığında, diyabetle ilişkili değişiklikler, dokuya spesifiktir. Streptozosin ile oluşturulmuş diyabetik sıçanlarda, 6 hafta sonra, sinaptosomal membranlarında, mikroviskositide değişiklik oluşmazken, eritrosit membranlarının mikroviskositesi artmıştır (Baba ve ark. 1979).

Diabetes Mellitus'da Beyin Kapillerlerinde Nörotransmiter Aktivitesinde Değişmeler

Beyin metabolizma ve kan akımı üzerinde nörotransmiterlerin, özellikle adrenerjik sinir iletisinin önemli rolü vardır (Bates ve ark. 1977). Bazı çalışmalar, diabetes mellitus'un beta adrenerjik reseptör aktivasyonunu cevaben, bozulmuş beyin kan akımı, büyük ve küçük beyin damarlarında dilatasyon cevabının bozulduğunu göstermiştir (Mayhan ve ark. 1991). Diyabette, beyin kapillerleri üzerindeki, beta adrenerjik reseptör sayısında azalma meydana gelmiştir. Bununla birlikte, beyin kapillerlerinde adenilat siklazın, reseptör sonrası aktivasyonunda da azalma olduğu gösterilmiştir (Mooradian ve ark. 1988).

Diabetes Mellitus'da Kognitif Değişiklikler

Diabetes Mellitus' daki sürekli hiperglisemi sonucu, beyin kapillerlerinde bariyer ve taşıma fonksiyonlarında değişiklikler oluşur. Bu değişiklikler, diyabetin santral sinir sistemi komplikasyonlarına katkıda bulunabilir. Hipoglisemi, ketosis, hiperglisemi, hiperosmolite ve diğer faktörler periferal ve otonomik nöropati, görme bozukluğu, böbrek rahatsızlığı gibi komplikasyonlara neden olabilir (Horani ve Mooradian 2003). Bazı çalışmalarda, tip 1 diyabet hastalarında, öğrenme, hafıza,

problem çözmede ve mental ve motor çabuklukta bozulmalar olduğu bulunmuştur (Ryan 1988; Biessels ve ark. 1994).

Tip 2 diyabet hastalarında yapılan nöropsikolojik çalışmalarda, ılımlı kognitif bozulmalar, özellikle, sözlü hafıza ve kompleks bilgi işlemlerinde yer alan ödevlerde rapor edilmiştir (Stewart ve Liolitsa 1999). Temel dikkat işlemleri, motor reaksiyon zamanı ve kısa süreli hafıza etkilenmemiştir. Tip 2 diyabetlilerde, kognitif bozulma için risk faktörleri; kronik hiperglisemi, dislipidemi, periferal nöropatidir (Strachan ve ark. 1997). Diyabetli hayvan modellerinde, öğrenme ve hafıza bozulmalarında, insülin tedavisi ile geri dönüşüm sağlanmıştır (Pelligrino ve ark.1981).

Diyabetiklerde, hafıza eksikliklerinin altında yatan öncelikli mekanizmalar bilinmemekle birlikte, beyin yaşlanmasına bağlı, oksidatif stres, ilerlemiş glikasyon son ürünleri, vasküler disfonksiyon, ve nöronal Ca homeostazisinin patogenezde yer aldığı düşünülmektedir (Smith ve ark. 1995). Diğer muhtemel neden, hiperinsülinemi olabilir. (Vanhanen ve Soininen 1998). Çünkü insülin ve insülin reseptörleri beyne yerleşmiştir. Sinaptik iletimde ve buna bağlı olarak öğrenme ve hafızada önemli rol oynayabilir (Havrankova ve ark. 1978).

Çalışmamız tüm bu bilgilerin ışığında;

1- Normoglisemik, Akut Hiperglisemik ve Diyabetik sıçanlarda oluşturulan epileptik nöbetlerin kan beyin bariyeri permeabilitesine etkileri nelerdir?

2-Normoglisemik, Akut Hiperglisemik ve Diyabetik sıçanlarda oluşturulan epileptik nöbetlerde LPS'nin kan beyin bariyerini koruyucu etkisi var mıdır?

3- Akut hiperglisemi ve uzun süreli hiperglisemi, epileptik nöbetler ve LPS' nin yer aldığı patolojik koşullarda, Zonula Okludens-1 ve Glial Fibriller Asidik Proteinlerinin immunohistokimyasal boyanmasındaki değişiklikler nelerdir?

4- Akut hiperglisemi ve uzun süreli hiperglisemi, epileptik nöbetler ve LPS' nin yer aldığı patolojik koşullarda, TNF-α, IL-10, IL-12+p40 sitokin düzeylerinde meydana gelen değişmeler ve bu değişikliklerin kan beyin bariyeri permeabilitesine etkileri nelerdir? sorularına yanıt almak için planlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji ve Mikrobiyoloji Anabilim Dallarında yapılmıştır. Çalışmada İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (Karar No:09/12.12.2006). Deneylerde; ağırlıkları 180-230 g arasında değişen erişkin dişi Wistar-Albino sıçanlar kullanıldı. Deneyler, on iki grup olarak düzenlendi. Deneylerdeki tüm hayvanlar normal hayvan pelletiyle beslendi ve içme suyu olarak musluk suyu kullanıldı.

Deney Grupları; üç parametre açısından değerlendirildi.

1-Kan Beyin Bariyeri Geçirgenliği Tayini.

2-Zonula Okludens-1 ve Glial Fibriller Asidik Proteinlerinin Tayini.

3-Serum TNF-α, IL-10, IL-12+p40 Sitokinlerinin Tayini.

1-Kan Beyin Bariyeri Geçirgenliği Tayini

Kan beyin bariyeri traseri olarak, Evans-blue boyası (Sigma, E-2129, %2' lik,4mg/kg) kullanıldı. Evans-blue, serum albuminine bağlanır. Normal koşullarda kan-beyin bariyerini geçemeyen bu kompleks, patolojik koşullarda, bariyer permeabilitesinin artmasıyla, bariyerin yıkıldığı bölgelerde beyin dokusuna geçerek, o bölgenin maviye boyanmasına neden olur (Rawson 1943).

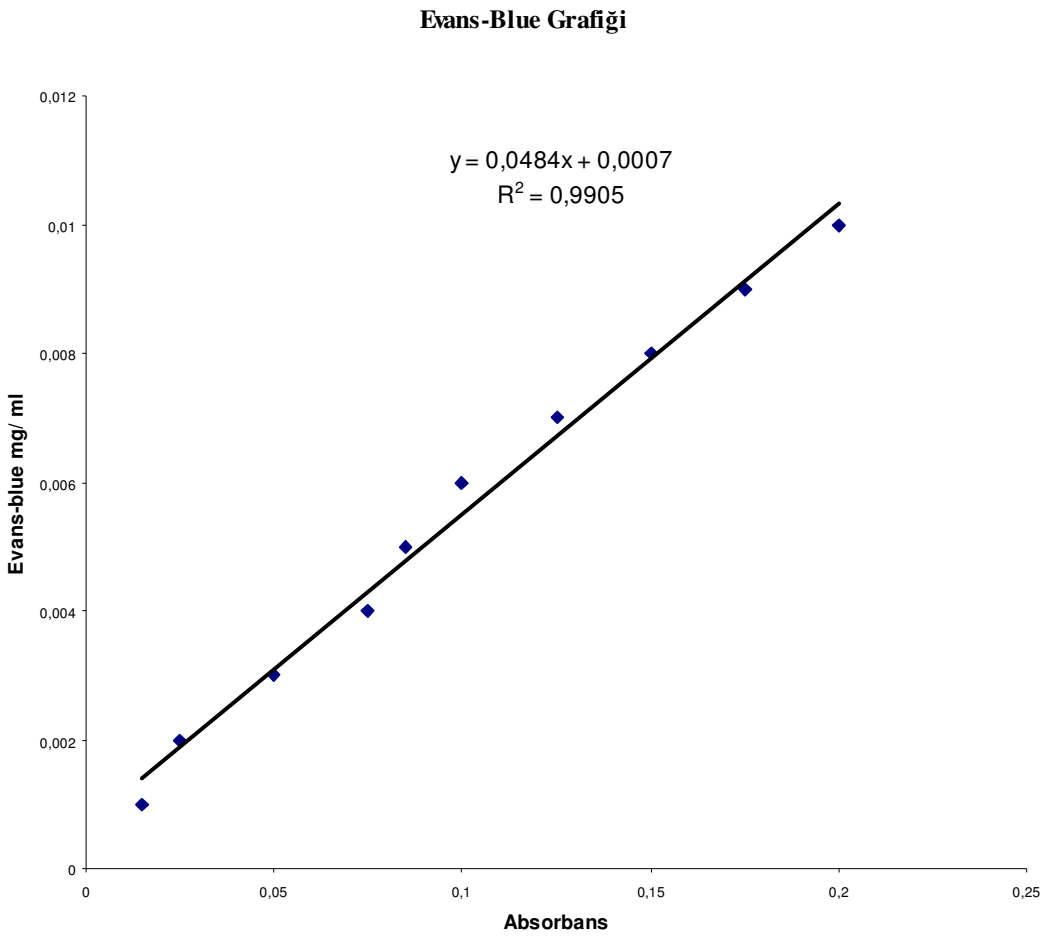
Deneylerde, eter narkozu kullanıldı. Lokal anestezik olarak, jetokain uygulandı. Femoral arter ve femoral venden kanülasyon yapıldı. Femoral ven kanülünden madde enjeksiyonu yapılırken, femoral arterden direkt kan basıncı ölçümü yapıldı. Sıçan anestezi altına alındıktan sonra, sağ femoral artere heparinli serum fizyolojik ile dolu olan enjektöre takılı olan PE-50 polietilen kateter yerleştirildi. Kateterin diğer ucu basınç sensörüne bağlandıktan sonra, bir dönüştürücü-yükseltici aracılığı ile bilgisayara aktarılarak deney süresince her hayvanın direkt kan basıncı kaydedildi (LabScribe Software).

İntravenöz uygulanacak maddeler için, hayvanın sağ femoral venine yerleştirilen PE-50 polietilen kateter kullanıldı. Deneyler sonunda sıçanlar, derin eter narkozu altında, albumine bağlanan Evans blue boyasının vücuttan uzaklaştırılması için yıkamaya alındılar.

Yıkama işlemi için; göğüs kafesi sternum boyunca kesilerek açıldı ve juguler venleri ve atriyumları kesildi. Sol ventrikülden fizyolojik basınçta, % 0,9'luk NaCl infüze edildi. Juguler venlerden berrak perfüzyon sıvısı gelinceye kadar, perfüzyona devam edildi. Perfüzyondan sonra, hayvanların beyinleri çıkarıldı. Bu işlemden sonra, beyinler sırasıyla; sol hemisfer, sağ hemisfer ve serebellum+beyin sapı bölgelerine ayrıldı. Ayrılan beyin parçaları, daha önceden tartısı alınmış olan alüminyum folyolar ile tartılarak yaş ağırlıkları hesaplandı.

Daha sonra, her bir beyin bölgesi içinde 2,5 ml fosfat tamponu olan tüplere konularak homojenize edildi. Homojenize edildikten sonra, her tüp üzerine %60'lık trikloroasetikasit konuldu ve 2 dk süresince vorteks (MS2 Minishaker, IKA) ile karıştırılarak, Evans-blue'nin albuminden ayrılması sağlandı. Vorteks işleminden sonra, tüpler, +4°C'de 30 dk bekletildi ve 1000 g'de 30 dk santrifüj (Rotina 46R, Hettich Zentrifugen) işlemine tabi tutuldu. Santrifüj işleminden sonra, süpernatantlar spektrofotometre (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech) tüplerine aktarılarak, 620 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu. Elde edilen absorbans değerleri; Evans-blue absorbans-miktar regresyon denklemi ve eğrisi kullanılarak beyin dokusunda 100 g başına mg cinsinden (%mg) Evans-blue değerleri hesaplandı (Figure 3-1).

İstatistiksel analiz: SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Sciences) programı ile yapıldı. Deneylerde elde edilen, Evans-blue %mg değerleri arasındaki istatistiksel anlamlılık için, One Way Anova kullanıldı. Post Hoc test olarak, Tukey HSD test kullanıldı ve $p<0.05$ anlamlı kabul edildi. Gruplar arasındaki arteriyel kan basınçlarının istatistiksel anlamlılığı Wilcoxon işaretli sıra testi kullanılarak belirlendi.



Grafik 3-1: Evans-blue absorbans-miktar regresyon denklemi ve eğrisi.

Tüm bu parametreler için toplam 288 hayvan kullanıldı.

Deney grupları aşağıdaki gibi düzenlendi:

Grup 1: Kontrol Grubu (n=8),

Grup 2: Konvülziyon Grubu (n=8),

Grup 3: Lipopolisakkarid Grubu (n=8),

Grup 4: Akut Hiperglisemi Grubu(n=8),

Grup 5: Diyabet Grubu (n=8),

Grup 6: Lipopolisakkarid + Konvülziyon Grubu (n=8),

Grup 7: Akut Hiperglisemi+ Konvülziyon Grubu (n=8),

Grup 8: Lipopolisakkarid + Akut Hiperglisemi (n=8),

Grup 9: Lipopolisakkarid +Akut Hiperglisemi + Konvülziyon Grubu (n=8),

Grup 10: Diyabet + Konvülziyon Grubu (n=8),

Grup 11: Diyabet + Lipopolisakkarid Grubu (n=8),

Grup 12: Diyabet + Lipopolisakkarid + Konvülziyon Grubu (n=8) şeklinde oluşturuldu.

Kontrol Grubu: Bu gruptaki hayvanlara, serum fizyolojik plasebo olarak uygulandı. Eter narkozu altında, femoral artere takılan kanül aracığı ile arteriyel kan basınçları kaydedilmeye başlanan sıçanlara, Evans-blue 4 ml/kg olarak intravenöz enjekte edildi. Evans-blue enjeksiyonundan 30 dk sonra, beyinleri yıkama işlemine alındı.

Konvülziyon Grubu: Sıçanların, arteriyel kan basıncı ölçümleri kaydedilmeye başlandıktan sonra, İntravenöz Evans-blue enjekte edildi. Enjeksiyondan 5 dk sonra, kimyasal konvulzif ajan olan pentilentetrazol (PTZ, Sigma Katalog No: 6500) intravenöz olarak 100 mg/kg dozda, femoral venden verildi. PTZ, eksitatör etkisini, klor iletkenliğini uyaran transmiterlerde azalmaya neden olarak gösterir. PTZ uygulanmasından, 2-3 sn sonra tüm hayvanlarda tonik-klonik kasılmalarla karakterize generalize konvülziyon gözlendi. 30 dk süresince aralıklı olarak generalize tonik-klonik nöbetleri izlendikten sonra, sıçanların beyinleri yıkama işlemine alındı.

Lipopolisakkarid Grubu : Escherichia coli den elde edilen lipopolisakkarid (026:B6 serotip, Sigma Katalog No:L8274), %0,9' luk NaCl' de çözülerek, sabah 7:00, öğlen 13:00, akşam 19:00 olmak üzere, 3 kez ,5 mg/kg, intraperitonal olarak uygulandı. İlk LPS enjeksiyonundan 24 saat sonra, sıçanlar anestezi altına alınarak arteriyel kan basıncı ölçümleri kaydedilmeye başlandı. Evans-blue enjeksiyonundan 30 dk sonra, sıçanların beyinleri yıkama işlemine alındı.

Akut Hiperglisemi Grubu: Bu gruptaki sıçanlara, arteriyel kan basıncı ölçümleri alınmaya başladıktan sonra, Akut Hiperglisemi oluşturmak için 2ml %50 glikoz çözeltisi intraperitonal olarak uygulandı. Enjeksiyondan yaklaşık 30 dakika sonra, plazma glikoz seviyeleri kuyruktan kan alınarak şeker ölçüm cihazı (Accu-check go) ile belirlendi. Kan şekeri düzeyi, 250 mg/dl den yüksek olanlar deneye alındı. Evans-blue enjeksiyonundan 30 dk sonra sıçanların beyinleri yıkama işlemine alındı.

Diyabet Grubu: Diabet oluşturmak için, Streptozotosin intraperitonal (65 mg/kg, Sigma S0130) enjekte edildi. Ortalama 30 gün sonra açlık kan şekeri düzeyi 250 mg/dl den yüksek olanlar deneye alındı. Arteriyel kan basıncı ölçümleri alınırken, Evans-blue enjekte edildi. Enjeksiyondan 30 dk sonra, sıçanların beyinleri yıkama işlemine alındı.

Lipopolisakkarid+Konvülziyon Grubu: LPS (026:B6 serotip) sabah 7:00, öğlen 13:00, akşam 19:00 olmak üzere 3 kez 5 mg/kg intraperitonal olarak uygulandı. İlk LPS enjeksiyonundan 24 saat sonra sıçanlar anestezi altına alınarak arteriyel kan basıncı ölçümleri alınmaya başlandı. Evans-blue enjekte edilen sıçanlara 5 dk sonra PTZ (100 mg/kg, İ.V.) enjekte edildi. 30 dk süresince aralıklı olarak generalize tonik-klonik nöbetleri izlendikten sonra sıçanların beyinleri yıkama işlemine alındı.

Akut Hiperglisemi+Konvülziyon Grubu: Femoral arterden kan basıncı ölçümleri alınırken, Akut Hiperglisemi oluşturmak için 2ml %50 glikoz çözeltisi intraperitonal olarak uygulandı. Enjeksiyondan yaklaşık 30 dakika sonra, plazma glikoz seviyeleri kuyruktan kan alınarak belirlendi. Kan şekeri düzeyi 250 mg/dl den yüksek olanlar deneye alındı. Evans-blue enjekte edilen sıçanlara 5 dk sonra PTZ (100 mg/kg, İ.V.) enjekte edildi. 30 dk süresince aralıklı olarak generalize tonik-klonik nöbetleri izlendikten sonra sıçanların beyinleri yıkama işlemine alındı.

Lipopolisakkarid + Akut Hiperglisemi Grubu: LPS (026:B6 serotip), sabah 7:00, öğlen 13:00, akşam 19:00 olmak üzere 3 kez 5 mg/kg intraperitonal olarak uygulandı. İlk LPS enjeksiyonundan 24 saat sonra sıçanlar anestezi altına alındı. Arteriyel kan basıncı ölçümleri kaydedilmeye başlandıktan sonra, Akut Hiperglisemi oluşturmak için, 2ml %50 glikoz çözeltisi intraperitonal olarak uygulandı. Enjeksiyondan yaklaşık 30 dakika sonra, plazma glikoz seviyeleri kuyruktan kan alınarak belirlendi. Kan şekeri düzeyi 250 mg/dl den yüksek olanlar deneye alındı. Evans-blue enjeksiyonundan 30 dk sonra sıçanların beyinleri yıkama işlemine alındı.

Lipopolisakkarid +Akut Hiperglisemi + Konvülziyon Grubu: LPS (026:B6 serotip), yukarıdaki gibi 6 saat aralıklarla 3 kez 5 mg/kg intraperitonal olarak uygulandı. İlk LPS enjeksiyonundan 24 saat sonra sıçanlar anestezi altına alındı. Femoral arterden kan

basıncı ölçümleri kaydedilmeye başlandı. Akut Hiperglisemi oluşturmak için 2ml %50 glikoz çözeltisi intraperitonal olarak uygulandı. Enjeksiyondan yaklaşık 30 dakika sonra plazma glikoz seviyeleri kuyruktan kan alınarak belirlendi. Kan şekeri düzeyi 250 mg/dl den yüksek olanlar deneye alındı. Evans-blue enjekte edilen sıçanlara 5 dk sonra PTZ (100 mg/kg, İ.V.) enjekte edildi. 30 dk süresince aralıklı olarak generalize tonik-klonik nöbetleri izlendikten sonra sıçanların beyinleri yıkama işlemine alındı.

Diyabet+ Konvülziyon Grubu: Diyabet oluşturmak için, Streptozotosin 65 mg/kg i.p. olarak uygulandı. Ortalama 30 gün sonra açlık kan şekeri düzeyi 250 mg/dl den yüksek olanlar deneye alındı. Arteriyel kan basıncı ölçümleri alınmaya başlandıktan sonra Evans-blue enjekte edilen sıçanlara 5 dk sonra PTZ (100 mg/kg, İ.V.) enjekte edildi. Evans-blue enjeksiyonundan 30 dk sonra sıçanların beyinleri yıkama işlemine alındı.

Diyabet+ Lipopolisakkarid Grubu: Diyabet oluşturmak için; Streptozotosin 65 mg/kg i.p. olarak uygulandı. Ortalama 30 gün sonra, açlık kan şekeri düzeyi 250 mg/dl den yüksek olanlar deneye alınarak, LPS (026:B6 serotip) sabah 7:00, öğlen 13:00, akşam 19:00 olmak üzere 3 kez 5 mg/kg, intraperitonal olarak uygulandı. İlk LPS enjeksiyonundan 24 saat sonra, sıçanlar anestezi altına alınarak arteriyel kan basıncı ölçümleri kaydedilmeye başlandı. Evans-blue enjeksiyonundan 30 dk sonra sıçanların beyinleri yıkama işlemine alındı.

Diyabet+ Lipopolisakkarid + Konvülziyon Grubu: Diyabet oluşturmak için, Streptozotosin (65 mg/kg) uygulandı. Ortalama 30 gün sonra, açlık kan şekeri düzeyi 250 mg/dl den yüksek olanlar deneye alınarak, LPS (026:B6 serotip) altışar saat arayla 3 kez 5 mg/kg, intraperitonal olarak uygulandı. İlk LPS enjeksiyonundan 24 saat sonra sıçanlar anestezi altına alındı. Femoral arterden kan basıncı ölçümleri alınmaya başlandı. Evans-blue enjekte edilen sıçanlara 5 dk sonra PTZ (100 mg/kg, i.v.) enjekte edildi. 30 dk süresince aralıklı olarak generalize tonik-klonik nöbetleri izlendikten sonra sıçanların beyinleri yıkama işlemine alındı.

2- Zonula Okludens-1 ve Glial Fibriller Asidik Proteinlerinin Tayini

Zonula Okludens-1 ve Glial Fibriller Asidik Protein'lerini görünür hale getirebilmek için, immün boyama yöntemi kullanıldı. Bunun için; eter narkozu altındaki sıçanlar, izotonik ve ardından fiksatif solüsyonları ile (fosfat tamponu içinde %4'lük formaldehit pH:7,4) 10'ar dk perfüze edildi. Beyinler perfüzyon işeminden sonra, aynı fiksatifin içinde +4ºC'de 24 saat bekletilerek parafine gömüldü. 4-5 μm kalınlığında kesitler alınıp, parafinden arındırıldı ve sitrat tamponu içinde basınçlı olarak 10 dk ısı ile muamele edildi. Endojen peroksidaz aktivitesi, hidrojen peroksit ile 10 dk bekletilerek inaktive edildi. Zonula Okludens-1 için Poliklonal rabbit anti-ZO-1 (Zymed Lab Inc., CA, 40-2200 1:50, bir gece), Glial Fibriller Asidik Protein için monoklonal mouse anti-GFAP (Neomarker; Fremont, CA; 1:100, 60 dk) primer antikorlar olarak kulanıldı. Sekonder antikorlar olarak; Zonula Okludens-1 için biotinlenmiş goat anti-polyvalent, Glial Fibriller Asidik Protein için, biotinlenmiş goat anti-mouse (Lab Vision Co., Westinghouse, CA) kullanıldı. Yıkama işleminden sonra peroksidazla konjuge streptavidin uygulandı ve aminoetil karbazol kromojen kullanıldı. Kesitler, mayer hematoksilin ile işaretlendi. Daha sonra işaretli bölgeler, ışık mikroskobunda görüntülendi.

3-Serum TNF-α, IL-10, IL-12+p40 Sitokinlerinin Tayini

Deney gruplarına ait sıçanların kanları 20 dk 2500 rpm santrifüjle hücresel elemanlarından ayrıldı. Alınan serum örnekleri çalışılana kadar -20°C de ependorf tüplerinde saklandı. Serum sitokin düzeyleri, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (TNF-α Biosource Immunoassay Kit Katolog No:KRC3011, IL-10 Biosource Immunoassay Kit Katolog No:KRC0101, IL-12+p40 Biosource Immunoassay Kit Katolog No:KRC0122/KRC0121) yöntemi ile çalışıldı. Ölçümler; üretici firmanın kitle beraber verilen kullanma kılavuzunda önerdiği şekilde yöntemde değişiklikler yapılmadan gerçekleştirildi. Optik absorbans dereceleri micro-Elisa otomatik okuyucu tarafından 450 nm'de ölçüldü. Serum sitokin düzeyleri kitle beraber verilen ve konsantrasyonu belli olan standartlar ile oluşturulan standart eğrilerinin, örneklerin absorbans dereceleri ile Microsoft Excel programı kullanılarak bilgisayarda karşılaştırılmasıyla tespit edildi. Elisa kitlerinin duyarlılığı; TNF-α için <4pg/ml, IL-10 için <5pg/ml, IL-12+P40+p40 için <3pg/ml idi. İstatistiksel analizler SPSS 13.0

(Statistical Package for the Social Sciences for Windows, SPSS Inc., Chicago, Il. USA) programı kullanılarak yapıldı. Sitokin yanıtlarının gözlenmesinde Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p<0.05$ anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Araştırmamızda tespit ettiğimiz en önemli bulguları şu şekilde özetleyebiliriz:

1- Akut Hiperglisemi ve Diyabet KBB permeabilitesinde anlamlı bir Evans-blue albumin ekstravazasyonuna neden olmadı. Diğer bir deyimle; kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman, bariyer permeabilitesinde önemli bir değişiklik meydana getirmedi ($p>0.05$).

2-Akut Hiperglisemide ve Diyabette oluşturulan nöbetler, normoglisemik koşullarda oluşturulan nöbetlere göre sol hemisfer, sağ hemisfer ve serebellum+beyin sapı bölgelerinde KBB permeabilitesinin önemli ölçüde artmasına neden oldu ($p<0.05$).

3-Lipopolisakkarid uygulanması, normoglisemik koşullardaki epileptik nöbetler sırasında her üç beyin bölgesinde KBB permeabilitesinde koruyucu etki sağlarken ($p<0.01$), akut hiperglisemik ve diyabetik nöbet geçiren sıçanlarda KBB permeabilitesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı saptandı ($p>0.05$).

4- Akut Hiperglisemik ve Diyabetik sıçanlara lipopolisakkarid uygulanmasının KBB permeabilitesine etki etmediği tespit edildi ($p>0.05$).

6- Konvülziyon ve Lipopolisakkarid grupları ile PTZ ve LPS' nin birlikte uygulandığı sıçanların korteks ve serebellum+beyin sapı bölgelerinde, beyin kapiller endotel hücrelerinde, Zonula Okludens-1'in ve Glial Fibriller Asidik Protein'in boyanma şiddetinde artma olduğu saptandı.

5-Akut Hiperglisemik ve Diyabetik sıçanların, korteks ve serebellum+beyin sapı bölgelerinde, beyin kapiller endotel hücrelerinde, Zonula Okludens-1'in ve sadece diabetik sıçanların bu beyin bölgelerinde Glial Fibriller Asidik Protein'in boyanma şiddetinde azalma olduğu tespit edildi.

6-Lipopolisakkarid, LPS+PTZ ve Diyabet +LPS gruplarında TNF-α, LPS, LPS+PTZ, LPS+Akut Hiperglisemi+PTZ, Diyabet+LPS, Diyabet+LPS+PTZ gruplarında IL-10, PTZ, Akut Hiperglisemi, LPS+PTZ, Akut Hiperglisemi+PTZ, Diyabet+LPS+PTZ gruplarında IL-12+p40 seviyelerinde ileri derecede artma meydana geldiği saptandı ($p<0.01$).

Yukarıda ana hatları verilen bulgularımızın detaylı dökümü ise aşağıda verilmektedir:

4.1. EVANS-BLUE BULGULARI

Kontrol Grubu

Beyinleri makroskopik olarak incelediğimiz zaman; Kontrol Grubunda sirkumventriküler organlar dışında, Evans-blue albumin kompleksi ekstravazasyonu gözlenmedi. Kontrol grubunda sıçanlarda saptanan Evans-blue miktarları aşağıda gösterilmiştir:

Sol Hemisfer: 0,265±0,09 % mg

Sağ Hemisfer: 0,243±0,12 % mg

Serebellum+Beyin Sapı: 0,407±0,09 % mg.

Bu grupta femoral arterden elde edilen kan basıncı 98±7.7 olarak ölçüldü. (Tablo 4-1).

Konvülziyon Grubu

İntravenöz olarak PTZ enjekte edilen sıçanlarda, yaklaşık 20-30 sn sonra, generalize nöbetlerle uyumlu hipersalivasyon ve tonik-klonik karakterde kasılmalar başladığı gözlendi. 30 dakika boyunca gözlenen sıçanlarda nöbet aktivitesi kısa süreli aralıklarla devam etti. Konvülziyon grubunda başlangıç arteriyel kan basıncı 98±12.6 mmHg iken; PTZ verilmesi ile, basınç 171±9.5 mmHg' e çıktı ve ortalama 30 dakika bu yüksekliği korudu (Şekil 4-1). Bu yükselme istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ($p<0.01$) (Tablo 4-1). PTZ grubunda başta serebellum+beyin sapı olmak üzere, sol hemisfer ve sağ hemisfer bölgelerinde kan beyin bariyeri permeabilitesinin kontrol grubuna göre ileri derecede arttığı gözlendi ($p<0.01$) (Grafik 4-1,4-2,4-3). PTZ grubunda saptanan Evans-blue miktarları aşağıda gösterilmiştir:

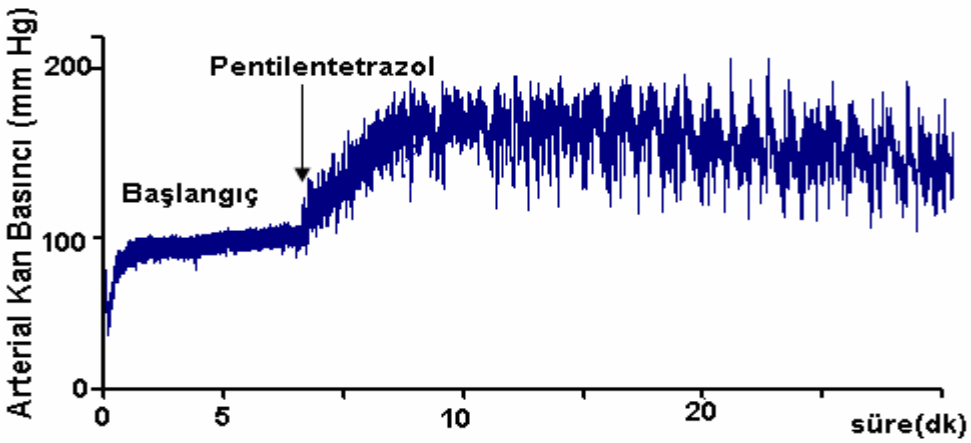
Sol Hemisfer: 0,56±0,13 % mg

Sağ Hemisfer: 0,551±0,12 % mg

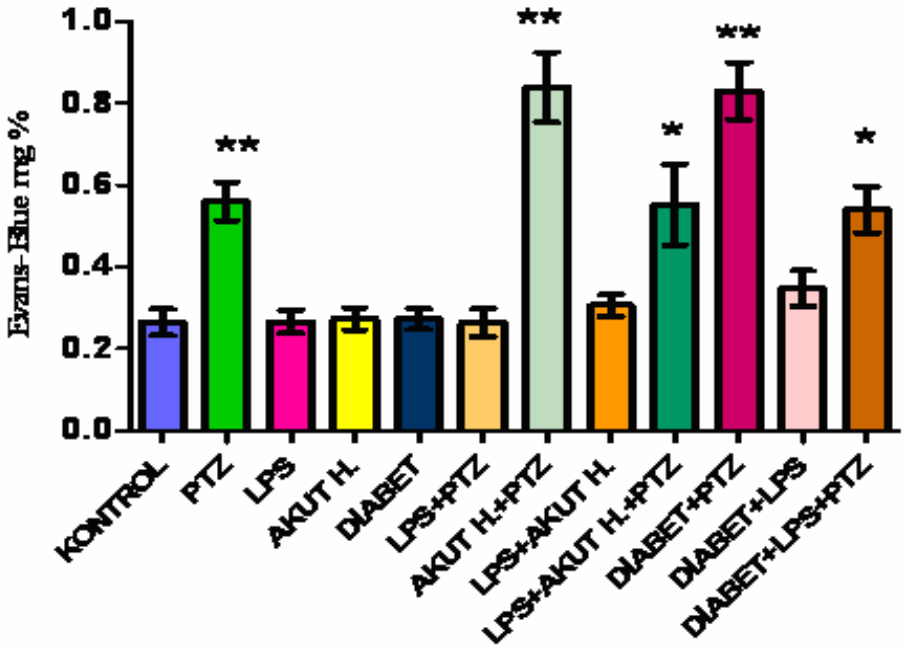
Serebellum+Beyin Sapı: 0,731±0,1 % mg

Deney Grupları	Arteriyel Kan Basıncı (mmHg)	
	Başlangıç	PTZ sonrası
Kontrol	98±7.7	-
PTZ	98±12.6	171±9.5**
LPS	90±8.4	-
Akut Hiperglisemi	100±7.2	-
Diyabet	115±5.3	-
LPS+PTZ	105±8.7	177±8.2**
Akut Hiperglisemi+PTZ	92±8.6	174±9.4**
LPS+Akut Hiperglisemi	106±13.8	-
LPS+Akut Hiperglisemi+PTZ	117±5.6	169±10**
Diyabet+PTZ	112±.6.7	182±9.3**
Diyabet+LPS	110±9.4	-
Diyabet+LPS+PTZ	120±6.2	184±4.5**

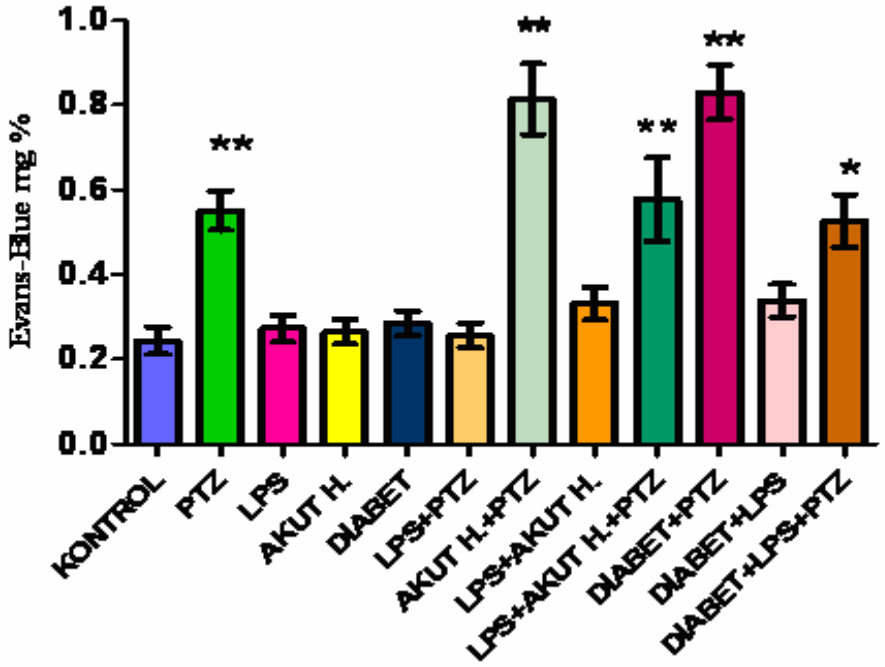
Tablo 4-1:Deney gruplarına ait arteriyel kan basıncı değerleri. PTZ uygulanan gruplarda arteriyel kan basıncının ileri derecede arttığı saptandı (p<0,01)**



Şekil 4-1: PTZ grubuna ait bir sıçanın PTZ verildikten sonra arteriyel kan basıncında meydana gelen değişme.

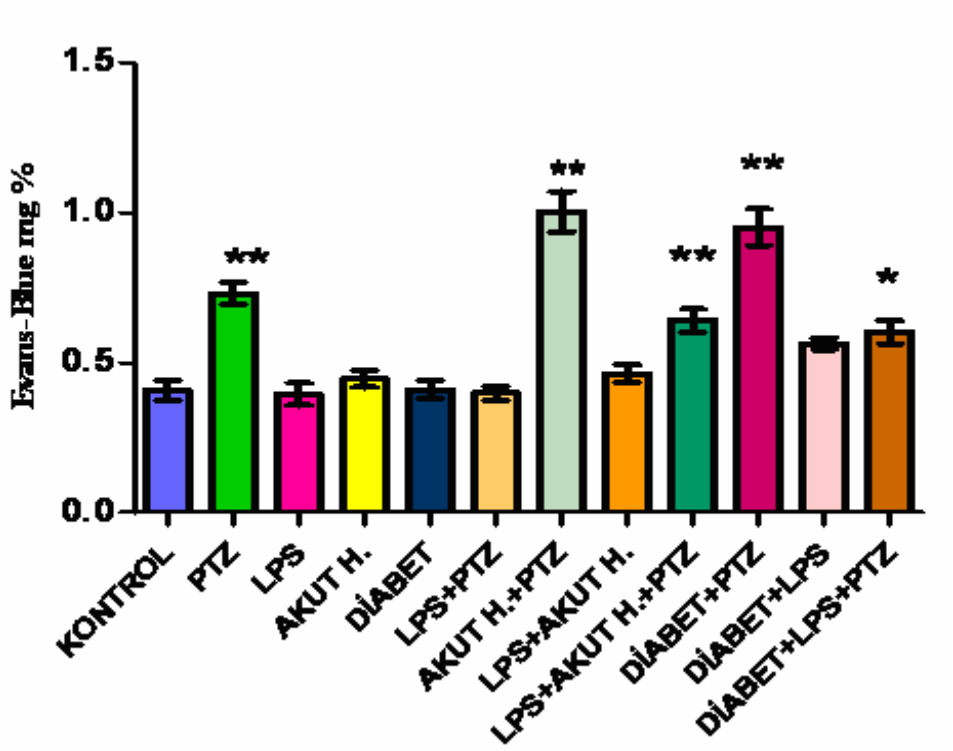


Grafik 4-1: Deney gruplarının sol hemisferlerindeki Evans-blue değerleri: Kontrol grubu ile PTZ, Akut Hiperglisemi+PTZ, Diyabet+PTZ grupları karşılaştırıldığı zaman, kan beyin bariyeri permeabilitesinin kontrol grubuna göre ileri derecede arttığı saptandı (p<0,01). LPS+Akut Hiperglisemi+PTZ ve Diyabet+LPS+PTZ gruplarında ise bu artış anlamlı idi (*p<0,05).**



Grafik 4-2: Deney gruplarının sağ hemisferlerindeki Evans-blue değerleri: Kontrol grubu ile PTZ, Akut Hiperglisemi+PTZ, Diyabet+PTZ, LPS+Akut Hiperglisemi+PTZ, grupları karşılaştırıldığı zaman kan beyin bariyeri permeabilitesinin kontrol

grubuna göre ileri derecede arttığı saptandı (p<0,01). Diyabet+LPS+PTZ grubunda ise bu artış anlamlı idi (*p<0,05).**



Grafik 4-3: Deney gruplarında serebellum+beyin sapı bölgelerindeki Evans-blue değerleri: Kontrol grubu ile PTZ, Akut Hiperglisemi+PTZ, Diyabet+PTZ, LPS+Akut Hiperglisemi+PTZ grupları karşılaştırıldığı zaman, kan beyin bariyeri permeabilitesinin kontrol grubuna göre ileri derecede arttığı saptandı (p<0,01). Diyabet+LPS+PTZ grubunda ise bu artış anlamlı idi (*p<0,05).**

Lipopolisakkarid Grubu

Esherichia coli' den elde edilen Lipopolisakkarid (026:B6 serotip), sabah 7:00, öğlen 13:00, akşam 19:00 olmak üzere 3 kez 5 mg/kg, intraperitonal olarak uygulandıktan 24 saat sonra deneye alınan sıçanlarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman, beyin bölgelerinde kan beyin bariyeri permeabilitesinde anlamlı bir fark saptanmadı (p>0.05) (Grafik 4-1, 4-2, 4-3). LPS grubuna ait, ortalama arteriyel kan basıncı 90±8.4 mmHg olarak hesaplanmıştır. Arteriyel kan basıncı değerleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bir anlamlı fark bulunmadı (p>0,05) (Tablo 4-1). LPS grubunda saptanan Evans-blue miktarları aşağıda gösterilmiştir:

Sol Hemisfer: 0,276±0,07 % mg

Sağ Hemisfer: 0,272±0,09 % mg

Serebellum+Beyin Sapı: 0,395±0,1 % mg.

Akut Hiperglisemi Grubu

2ml %50 glikoz çözeltisi intraperitonal olarak uygulanan sıçanlarda, enjeksiyondan 30 dakika sonra, sıçanların plazma glikoz düzeyleri ortalama 376±29,8 mg/dl, arteriyel kan basınçları 100±7.2 mmHg olarak bulundu. Sıçanların, arteriyel kan basıncı değerlerinde, kontrol grubuna göre anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo 4-1). Evans-blue enjeksiyonundan ortalama 30 dakika sonra, perfüzyona alınan sıçanlarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman; beyin bölgelerinde kan beyin bariyeri permeabilitesinde anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$) (Grafik 4-1,4-2,4-3). Akut Hiperglisemi grubunda, beyin bölgelerinde saptanan Evans-blue miktarları, aşağıda gösterilmiştir:

Sol Hemisfer: 0,273±0,07 % mg

Sağ Hemisfer: 0,265±0,08 % mg

Serebellum+Beyin Sapı: 0,446±0,07 % mg

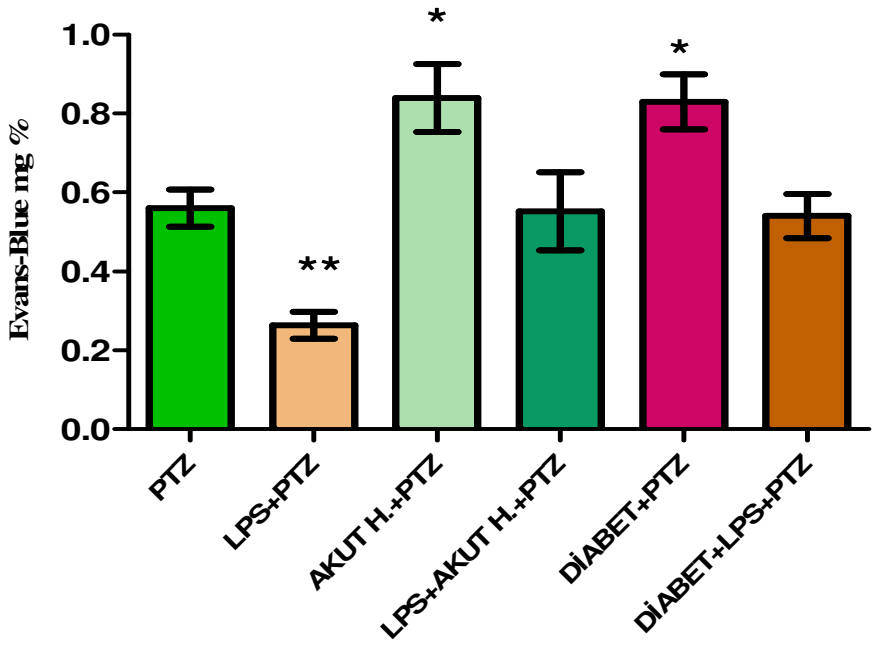
Diyabet Grubu

Streptozotosin (65 mg/kg, i.p.) verilerek diyabet oluşturulan sıçanlar, 30 gün sonunda deneye alındı. Diyabet oluşturulan sıçanların, plazma glikoz düzeyleri; ortalama 405±39mg/dl olarak bulundu. Diyabet grubundaki sıçanların, arteriyel kan basıncı 115±5.3 mmHg idi. Arteriyel kan basıncı değerleri; kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo 4-1). Bu grupta da, kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman; her üç beyin bölgesinde kan beyin bariyeri permeabilitesinde önemli bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$) (Grafik 4-1, 4-2, 4-3). Diyabet grubunda saptanan, Evans-blue miktarları aşağıda gösterilmiştir:

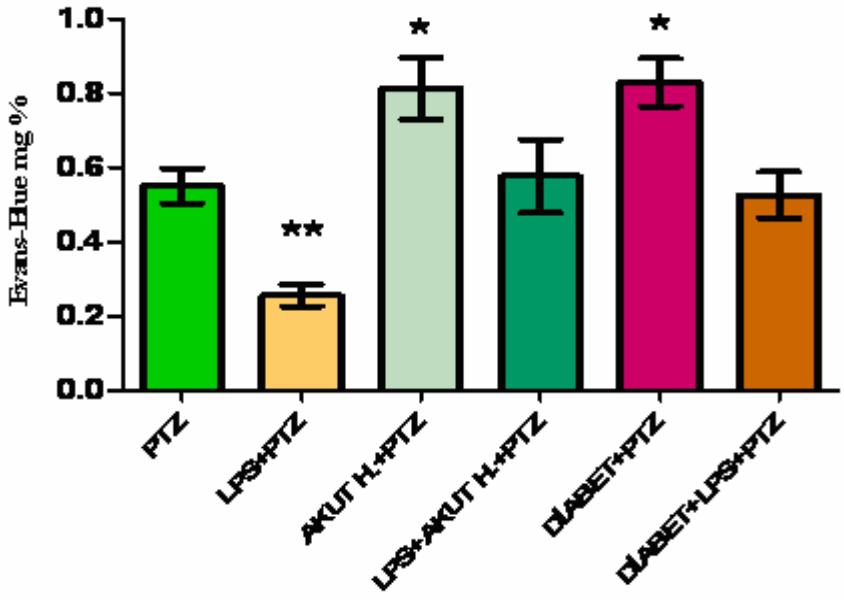
Sol Hemisfer: 0,272±0,07 % mg

Sağ Hemisfer: 0,285±0,08 % mg

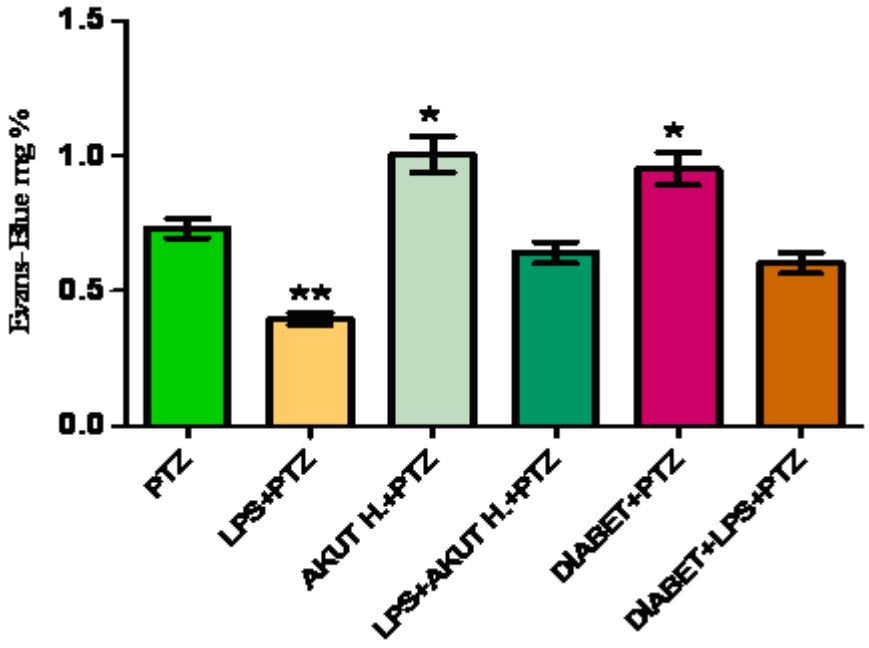
Serebellum+Beyin Sapı: 0,410±0,08 % mg



Grafik 4-4: PTZ uygulanan deney gruplarının sol hemisferlerindeki Evans-blue değerleri: Bu grup LPS+PTZ grubu ile karşılaştırıldığı zaman LPS'nin PTZ nöbetlerindeki permeabiliteyi azalttığı (p<0,01), Akut Hiperglisemi+PTZ ve Diyabet+PTZ deki permeabiliteyi arttırdığı izlendi (*p<0,05).**



Grafik 4-5: PTZ uygulanan deney gruplarının sağ hemisferlerindeki Evans-blue değerleri: Bu grup LPS+PTZ grubu ile karşılaştırıldığı zaman LPS'nin PTZ nöbetlerindeki permeabiliteyi azalttığı (p<0,01), Akut Hiperglisemi+PTZ ve Diyabet+PTZ deki permeabiliteyi arttırdığı izlendi (*p<0,05).**



Grafik 4-6: PTZ uygulanan deney gruplarının serebellum+beyin sapı bölgelerindeki Evans-blue değerleri: Bu grup LPS+PTZ grubu ile karşılaştırıldığı zaman LPS'nin PTZ nöbetlerindeki permeabiliteyi azalttığı (p<0,01), Akut Hiperglisemi+PTZ ve Diyabet+PTZ deki permeabiliteyi arttırdığı izlendi (*p<0,05).**

Lipopolisakkarid+Konvülziyon Grubu

LPS (026:B6 serotip) altışar saat arayla üç kez 5 mg/kg intraperitonal olarak uygulandıktan 24 saat sonra, Evans-blue enjekte edilen sıçanlara, 5 dk sonra PTZ (100 mg/kg, i.v.) enjekte edildi. 30 dk süresince aralıklı olarak generalize tonik-klonik nöbetler izlendi. Bu grupta da, kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman kan beyin bariyeri permeabilitesinde anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$) (Grafik 4-1,4-2,4-3). Lipopolisakkarid+Konvülziyon grubunda, her üç beyin bölgesindeki kan beyin bariyeri permeabilitesinin, PTZ grubuna göre ileri derecede azaldığı saptandı ($p<0,01$). Bu sonuç; LPS' nin, normoglisemik koşullarda oluşturulan konvülziyonlarda, KBB' nin önemli ölçüde koruduğunu gösteren önemli bir sonuçtur (Grafik 4-4, 4-5, 4-6). Lipopolisakkarid+Konvülziyon grubunda saptanan Evans-blue miktarları aşağıda gösterilmiştir:

Sol Hemisfer: 0,263±0,09 % mg

Sağ Hemisfer: 0,256±0,08 % mg

Serebellum+Beyin Sapı: 0,397±0,06 % mg

Bu grupta saptanan başlangıç arteriyel kan basıncı değeri 105±8.7 mmHg iken, PTZ uygulaması sonrası 177±8.2 mmHg' e yükseldi. Arteriyel kan basıncı değerinin kontrol grubuna göre ileri derecede arttığı saptandı ($p<0,01$) (Tablo 4-1).

Akut Hiperglisemi+Konvülziyon Grubu

2 ml %50 glikoz çözeltisi intraperitonal olarak uygulanan sıçanlarda, plazma glikoz düzeyi ortalama 379±37,5 olarak saptandı. Evans-blue enjekte edilen sıçanlara 5 dk sonra PTZ (100 mg/kg, i.v.) enjekte edildi. 30 dk süresince, aralıklı olarak generalize tonik-klonik nöbetleri izlendi. Başlangıç arteriyel kan basıncı 92±8.6 mmHg iken, PTZ enjeksiyonundan sonra, 174±9.4 mmHg'ye yükselmiştir. Bu yükselme, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$) (Tablo 4-1). Akut Hiperglisemi ile birlikte epileptik nöbet oluşturulan sıçanlar, normoglisemik konvülziyon grubu ve akut hiperglisemi grubu ile karşılaştırıldığı zaman KBB permeabilitesinin sol hemisfer, sağ hemisfer ve serebellum+beyin sapı bölgelerinde anlamlı derecede arttığı saptandı. ($p<0.05$) (Grafik 4-4, 4-5, 4-6, 4-7, 4-8, 4-9). Akut Hiperglisemi; deney sonuçlarımıza göre, konvülziyonlarda KBB yıkımını ileri derecede provoke etmektedir. Aynı zamanda, KBB permeabilitesinin en fazla artış gösterdiği gruplardan biridir. Şekil 4-2 ve 4-3 de görüldüğü gibi bu grupta sağ hemisfer, sol hemisfer ve serebellum+beyin sapı bölgelerinde Evans-blue albumin ekstravazasyonu, bu bölgelerin maviye boyanmasına neden olmuştur. Normoglisemik konvülziyonlarda, talamus çekirdekleri ve beyin sapında en fazla KBB permeabilitesi artarken, hiperglisemik koşullardaki nöbetlerde, korteks bölgesinde de önemli ölçüde bariyer yıkımı olduğu izlendi.

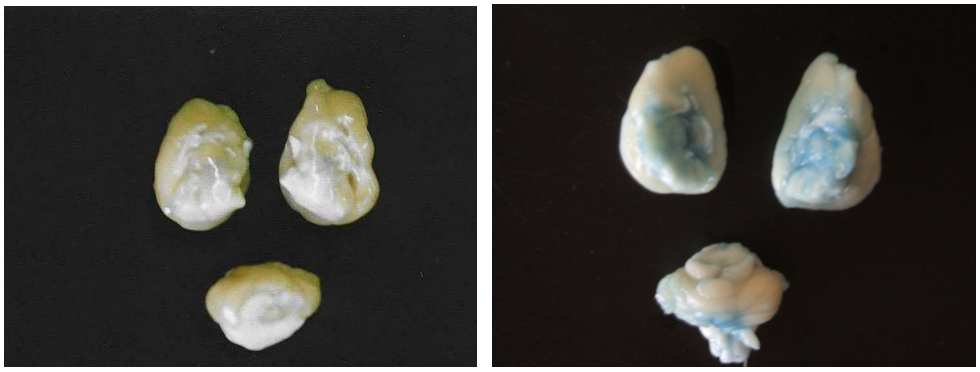
Akut Hiperglisemi+Konvülziyon grubunda, her üç beyin bölgesindeki KBB permeabilitesinin tek başına, Konvülziyon ve Akut Hiperglisemi grubuna göre anlamlı derecede arttığı saptandı ($p<0,05$). Akut Hiperglisemi+PTZ grubunda, saptanan Evans-blue miktarları aşağıda gösterilmiştir:

Sol Hemisfer: 0,838±0,22 % mg

Sağ Hemisfer: 0,813±0,21 % mg

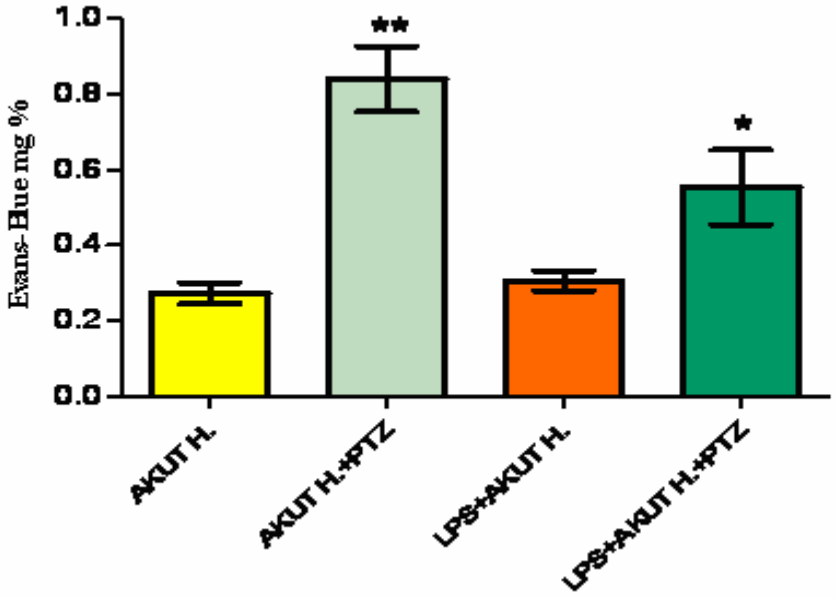
Serebellum+Beyin Sapı: 1,005±0,18 % mg

Kontrol Grubu **Akut Hiperglisemi+PTZ Grubu**

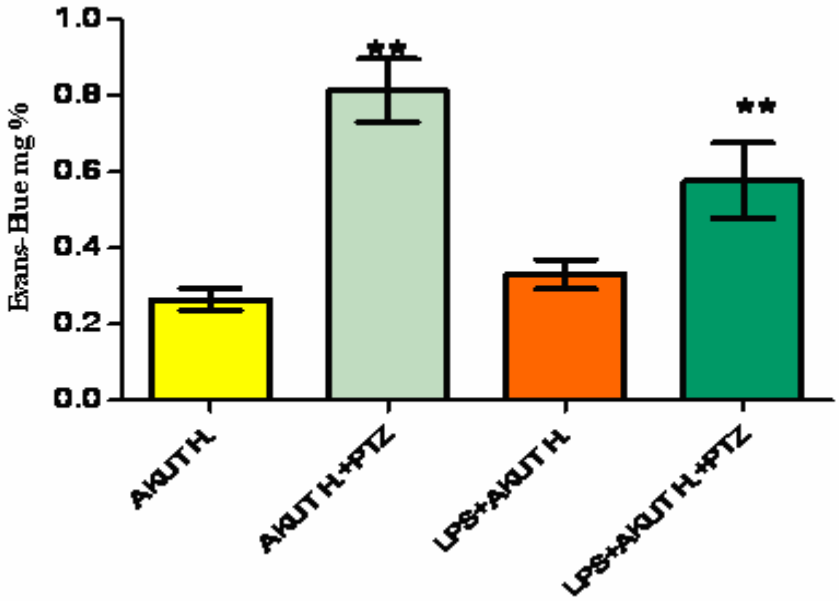


Kontrol Grubu **Akut Hiperglisemi+PTZ Grubu**

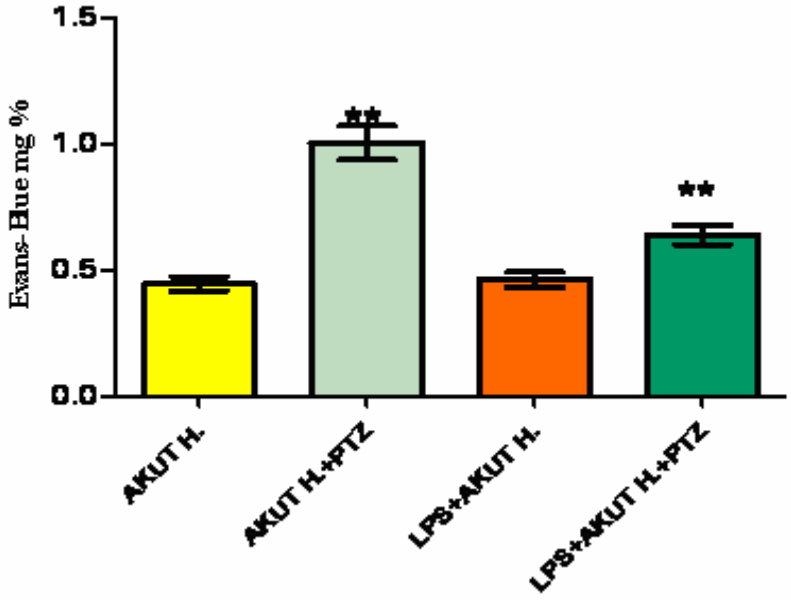
Şekil 4-2: Kontrol Grubu ve Akut Hiperglisemi+PTZ gruplarına ait sıçan beyinleri. Kontrol Grubunda Evans-blue albuminin beyne geçişi gözlenmemiştir. Akut Hiperglisemi+PTZ grubuna ait sıçanın, hem serebral korteks, hem de beynin sol hemisfer, sağ hemisfer, serebellum+beyin sapı bölgelerinde Evans-blue albumin geçişi gözlenmektedir.



Grafik 4-7: Akut Hiperglisemi oluşturulan deney gruplarında sol hemisfer bölgesindeki Evans-blue değerleri: Bu grup, Akut Hiperglisemi+PTZ grubu ile karşılaştırıldığı zaman, kan beyin bariyeri permeabilitesinin ileri derecede arttığı (p<0,01). LPS+Akut Hiperglisemi+PTZ grubunda ise bu artışın anlamlı (*p<0,05) olduğu hesaplandı.**



Grafik 4-8: Akut Hiperglisemi oluşturulan deney gruplarında sağ hemisfer bölgesindeki Evans-blue değerleri: Bu grup, Akut Hiperglisemi+PTZ veLPS+Akut Hiperglisemi+PTZ grubu ile karşılaştırıldığı zaman, kan beyin bariyeri permeabilitesinin ileri derecede arttığı izlendi (p<0,01).**



Grafik 4-9: Akut Hiperglisemi oluşturulan deney gruplarında, serebellum+beyin sapı bölgesindeki Evans-blue değerleri: Bu grup, Akut Hiperglisemi+PTZ ve LPS+Akut Hiperglisemi+PTZ grubu ile karşılaştırıldığı zaman, kan beyin bariyeri permeabilitesinin ileri derecede arttığı izlendi (p<0,01).**

Lipopolisakkarid+Akut Hiperglisemi Grubu

LPS enjeksiyonundan 24 saat sonra anestezi altına alınan sıçanlara, 2ml %50 glikoz çözeltisi intraperitonal uygulanarak Akut Hiperglisemi oluşturuldu. Sıçanların ortalama plazma glikoz seviyeleri 394±50 mg/dl olarak belirlendi. LPS enjeksiyonundan sonra akut hiperglisemi oluşturulan bu grupta; arteriyel kan basıncı değerleri (106±13.8 mmHg) kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 4-1). Lipopolisakkarid +Akut Hiperglisemi grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman, her üç beyin bölgesinde kan beyin bariyeri permeabilitesinde anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlendi ($p>0.05$) (Grafik 4-1,4-2,4-3). Lipopolisakkarid +Akut Hiperglisemi grubunda saptanan Evans-blue miktarları aşağıda gösterilmiştir:

Sol Hemisfer: 0,306±0,07 % mg

Sağ Hemisfer : 0,331±0,1 % mg

Serebellum+Beyin Sapı: 0,463±0,08 % mg

Lipopolisakkarid +Akut Hiperglisemi+PTZ Grubu

LPS enjeksiyonundan 24 saat sonra, Akut Hiperglisemi oluşturulan sıçanların ortalama plazma glikoz seviyeleri 369±33 olarak belirlendi. Evans-blue enjekte edilen

sıçanlara, 5 dk sonra PTZ (100 mg/kg, i.v.) enjekte edildi. 30 dk süresince, aralıklı olarak generalize tonik-klonik nöbetleri izlendi. Bu grupta, femoral arterden kaydedilen başlangıç kan basıncı değeri 117±5.6 mmHg iken, nöbetler sırasında bu değer 169±10 mmHg olarak bulundu. Kan basıncı değerleri, kontrol grubuna göre önemli derecede yükseldi ($p<0.01$). Lipopolisakkarid +Akut Hiperglisemi+PTZ grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman, her üç beyin bölgesinde kan beyin bariyeri permeabilitesinin arttığı gözlendi ($p<0.05$) (Grafik 4-1,4-2,4-3). Lipopolisakkarid+Akut Hiperglisemi+PTZ grubunda her üç beyin bölgesindeki kan beyin bariyeri permeabilitesinde Akut Hiperglisemi+PTZ grubuna göre anlamlı bir değişiklik saptanmadı ($p>0.05$). Lipopolisakkarid +Akut Hiperglisemi+PTZ grubunda saptanan Evans-blue miktarları aşağıda gösterilmiştir:

Sol Hemisfer 0,552±0,26 % mg

Sağ Hemisfer 0,577±0,26 % mg

Serebellum+Beyin Sapı 0,641±0,1 % mg

Diyabet+Konvülziyon Grubu

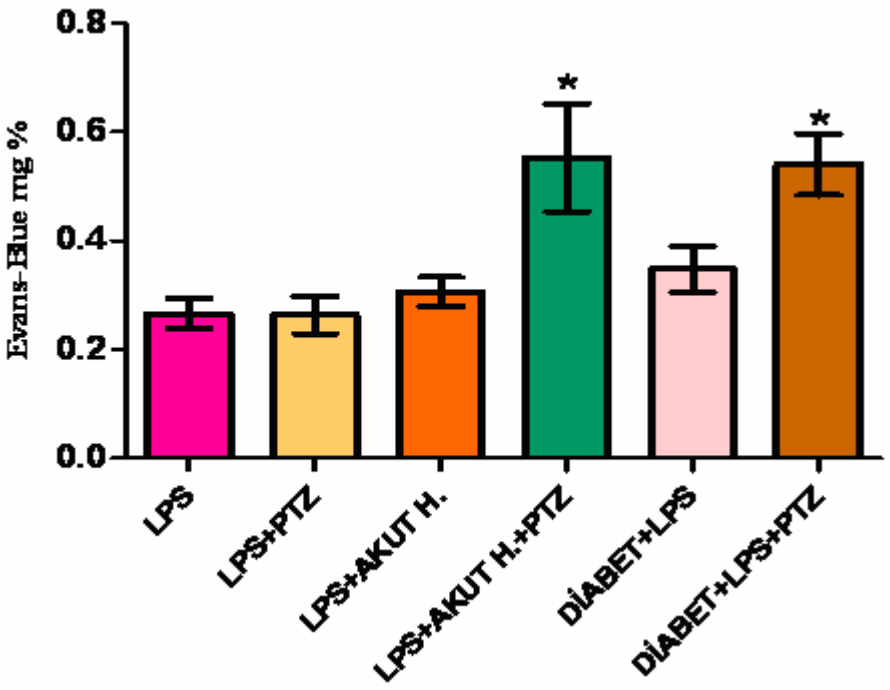
Streptozotosin (65 mg/kg, i.p.) verilerek diyabet oluşturulan sıçanlar 30 gün sonunda deneye alındı. Diyabet oluşturulan sıçanların plazma glikoz düzeyleri ortalama 381±52 olarak bulundu. PTZ uygulamasından sonra 30 dk süresince aralıklı olarak generalize tonik-klonik nöbetleri izlendi. Normoglisemik koşullardaki epileptik nöbetler ile diyabette izlediğimiz nöbetler arasında, nöbet şiddeti ve süresi bakımından önemli bir fark izlemedik. Her iki grupta da PTZ enjeksiyonundan sonra, arteriyel kan basıncı önemli şekilde arttı (Tablo 4-1). Bu grupta başlangıçta 112±.6.7 mmHg olan arteriyel basıncı değeri 182±9.3 mmHg değerine yükselerek kontrol grubuna göre, ileri derecede yükseldi ($p<0,05$). Diyabet+Konvülziyon grubunda sol hemisfer, sağ hemisfer, serebellum+beyin sapı bölgelerinde kan beyin bariyeri permeabilitesinin kontrol ve diyabet gruplarına göre ileri derecede arttığı gözlendi ($p<0.01$) (Grafik 4-1, 4-2, 4-3, 4-13, 4-14, 4-15). Diyabet+PTZ grubunda bu beyin bölgelerindeki kan beyin bariyeri permeabilitesinin konvülziyon grubuna göre anlamlı derecede arttığı saptandı ($p<0,05$) (Grafik 4-4, 4-5, 4-6). Diyabet+ Konvülziyon grubunda her üç beyin bölgesindeki kan beyin bariyeri permeabilitesinde Diyabet+Lipopolisakkarid+ Konvülziyon grubuna göre anlamlı bir değişiklik saptanmadı ($p>0,05$). Deney gruplarımızda en fazla KBB permeabilitesinin arttığı gruplardan biri, diyabetli sıçanlarda oluşturduğumuz nöbetlerde izlendi. Diyabet konvülziyonlarda yıkılan KBB'nin daha fazla yıkılmasına neden olmuştur.

Diyabet+Konvülziyon grubunda saptanan Evans-blue miktarları aşağıda gösterilmiştir:

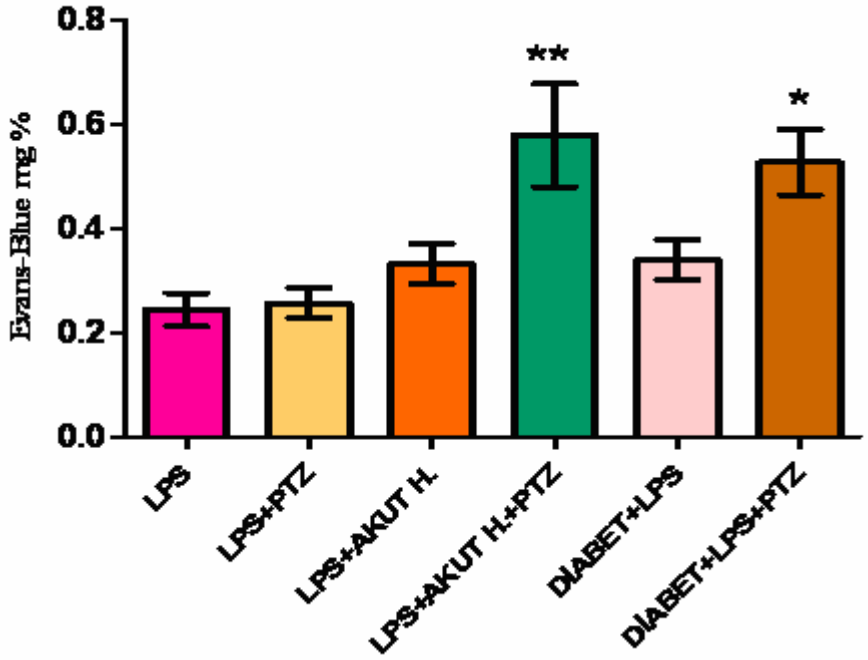
Sol Hemisfer: 0,83±0,19 % mg

Sağ Hemisfer :0,83±0,17 % mg

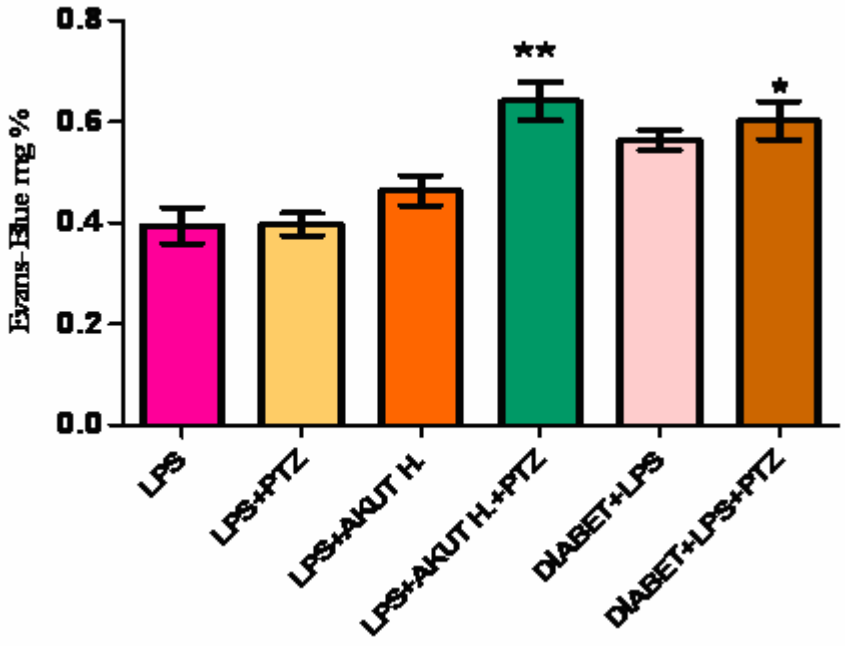
Serebellum+Beyin Sapı: 0,952±0,16 % mg



Grafik 4-10: LPS uygulanan deney gruplarında sol hemisfer bölgesindeki Evans-blue değerleri: Bu grup, LPS+Akut Hiperglisemi+PTZ ve Diyabet+LPS+PTZ grupları ile karşılaştırıldığı zaman kan beyin bariyeri permeabilitesinin anlamlı derecede arttığı izlendi (*p<0,05)



Grafik 4-11: LPS uygulanan deney gruplarında sağ hemisfer bölgesindeki Evans-blue değerleri: Bu grup, LPS+Akut Hiperglisemi+PTZ grubu ile karşılaştırıldığı zaman kan beyin bariyeri permeabilitesinin ileri derecede arttığı izlendi (p<0,01). Diyabet+LPS+PTZ grubunda ise anlamlı derecede artmıştır (*p<0,05).**



Grafik 4-12: LPS uygulanan deney gruplarında serebellum+beyin sapı bölgelerindeki Evans-blue değerleri: Bu grup, LPS+Akut Hiperglisemi+PTZ grubu ile

karşılaştırıldığı zaman, kan beyin bariyeri permeabilitesinin ileri derecede arttığı izlendi (p<0,01). Diyabet+LPS+PTZ grubunda ise anlamlı derecede artmıştır (*p<0,05).**

Diyabet+Lipopolisakkarid Grubu

Streptozotosin (65 mg/kg, i.p.) verilerek diyabet oluşturulan sıçanlar 30 gün sonunda deneye alındı. Diyabet oluşturulan sıçanların plazma glukoz düzeyleri ortalama 401±59 olarak bulundu. Sıçanlara LPS (026:B6 serotip) altışar saat arayla üç kez intraperitonal olarak uygulandıktan 24 saat sonra sıçanlar deneye alındı. Diyabet+Lipopolisakkarid grubunda, her üç beyin bölgesinde kontrol grubuna göre, kan beyin bariyeri permeabilitesinde anlamlı bir farklılık saptanmadı (p>0.05) (Grafik 4-1,4-2,4-3). Diyabet+Lipopolisakkarid grubunda saptanan Evans-blue miktarları aşağıda gösterilmiştir:

Sol Hemisfer 0,35±0,11 % mg

Sağ Hemisfer 0,34±0,1 % mg

Serebellum+Beyin Sapı 0,563±0,05 % mg

Diyabet+Lipopolisakkarid grubuna arteriyel kan basıncı değeri 110±9.4 mmHg olarak tespit edildi. Bu değer kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermedi (p>0.05).

Diyabet+Lipopolisakkarid+Konvülziyon Grubu

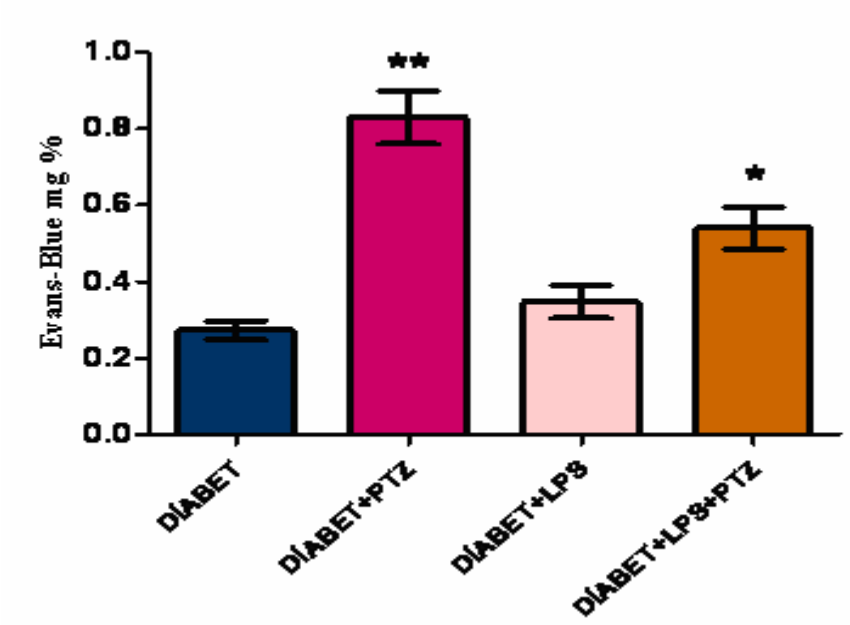
Streptozotosin (65 mg/kg, i.p.) verilerek diyabet oluşturulan sıçanlar 30 gün sonunda deneye alındı. Diyabet oluşturulan sıçanların plazma glukoz düzeyleri ortalama 401±59 olarak bulundu. Sıçanlara LPS (026:B6 serotip) altışar saat arayla üç kez 5 mg/kg, intraperitonal olarak uygulandı. Evans-blue enjekte edilen sıçanlara 5 dk sonra PTZ (100 mg/kg, İ.V.) enjekte edildi. PTZ uygulamasından sonra 30 dk süresince aralıklı olarak generalize tonik-klonik nöbetleri izlendi. Konvülziyon öncesi arteriyel kan basıncı değeri 120±6.2 mmHg idi. Nöbetler sırasında bu değer 184±4.5 mmHg' a kadar yükseldi. Bu gruptaki sıçanlarda arteriyel kan basıncı değeri, kontrol grubuna göre ileri derece yüksek bulundu (p<0.01). Diyabet+Lipopolisakkarid+Konvülziyon grubunda, her üç beyin bölgesinde kan beyin bariyeri permeabilitesinin kontrol, LPS ve diyabet gruplarına göre arttığı gözlendi (p<0.05) (Grafik 4-1,4-2,4-3,4-7, 4-8, 4-9, 4-13, 4-14, 4-15).

Diyabet+Lipopolisakkarid+Konvülziyon grubunda saptanan Evans-blue miktarları aşağıda gösterilmiştir:

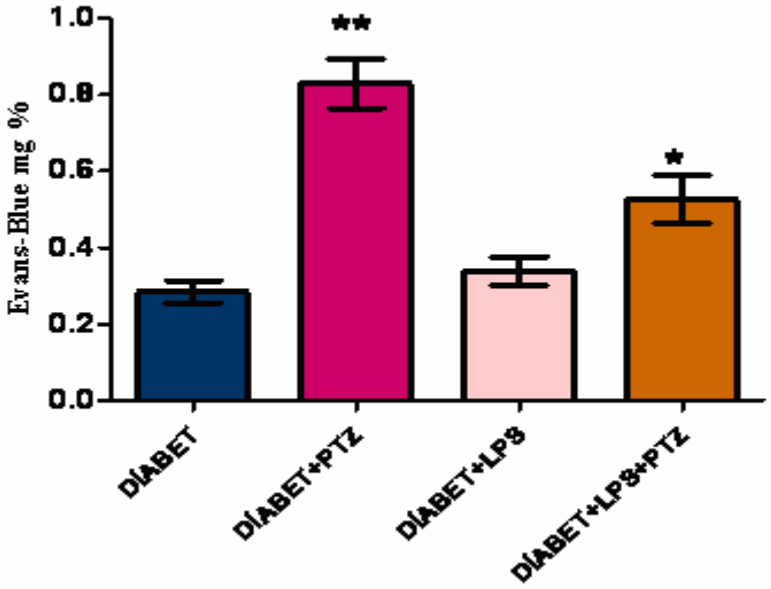
Sol Hemisfer 0,54±0,14 % mg

Sağ Hemisfer 0,52±0,17 % mg

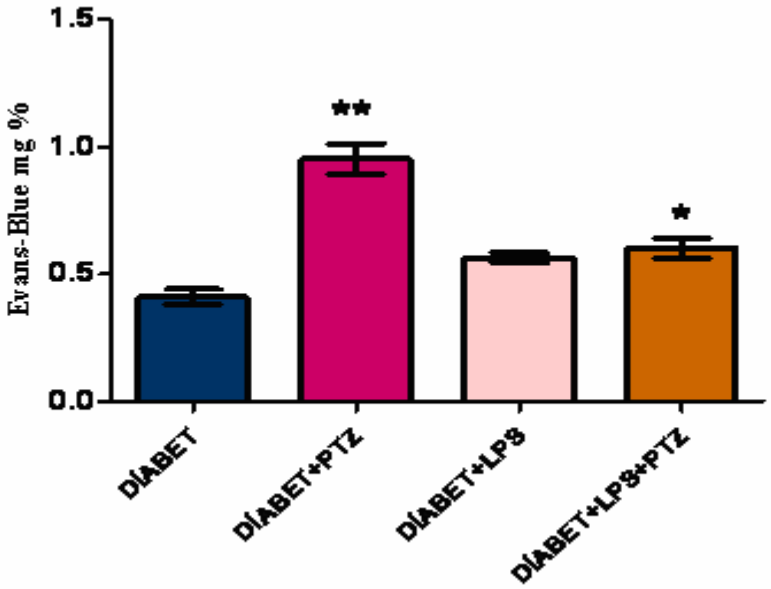
Serebellum+Beyin Sapı 0,602±0,1 % mg



Grafik 4-13: Diyabet oluşturulan deney gruplarında sol hemisfer bölgesindeki Evans-blue değerleri: Bu grup ile Diyabet+PTZ grubu ile karşılaştırıldığı zaman kan beyin bariyeri permeabilitesinin ileri derecede arttığı saptandı (p<0,01). Diyabet+LPS+PTZ grubunda ise anlamlı derecede artma gözlendi (*p<0,05).**



Grafik 4-14: Diyabet oluşturulan deney gruplarında sağ hemisfer bölgesindeki Evans-blue değerleri: Bu grup ile Diyabet+PTZ grubu karşılaştırıldığı zaman kan beyin bariyeri permeabilitesinin ileri derecede arttığı saptandı (p<0,01). Diyabet+LPS+PTZ grubunda ise anlamlı derecede artmıştır (*p<0,05).**



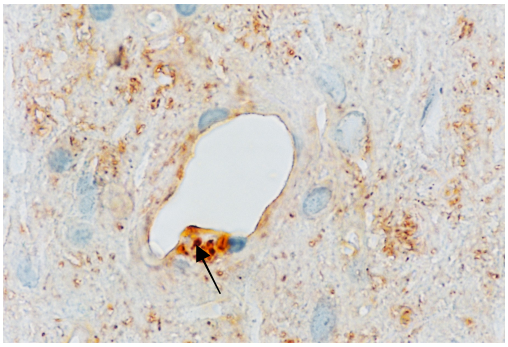
Grafik 4-15: Diyabet oluşturulan deney gruplarında serebellum+beyin sapı bölgesindeki Evans-blue değerleri: Bu grup ile Diyabet+PTZ grubu karşılaştırıldığı zaman kan beyin bariyeri permeabilitesinin ileri derecede arttığı saptandı. (p<0,01) Diyabet+LPS+PTZ grubunda ise anlamlı derecede artmıştır (*p<0,05).**

4.2. İMMUNOHİSTOKİMYA BULGULARI

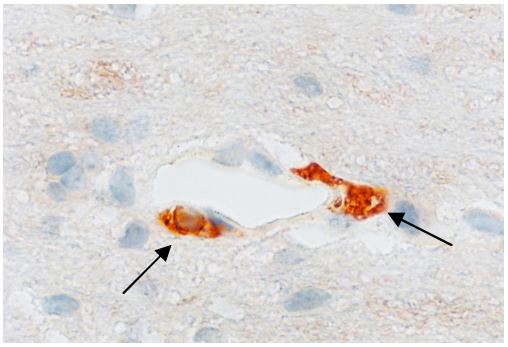
Deney gruplarına ait sıçanların beyinlerinin korteks ve serebellum bölgelerinden alınan kesitlerde, Zonula Okludens-1 ve Glial Fibriller Asidik Proteinleri immunohistokimyasal olarak işaretlendi. Boyanma şiddetleri kontrol gruplarında gözlenen boyanma şiddetleri ile karşılaştırılarak değerlendirildi. İmmunohistokimyasal boyanmalarını takiben ışık mikroskobunda her grubun özelliğini yansıtacak şekilde Zonula Okludens-1 X1000, GFAP X400 büyütmede fotoğraf makinesi ile alınan fotoğaflar bilgisayara aktarıldı. Her antikor için yapılan değerlendirmede, her gruptan alınan fotoğrafların incelenmesinden sonra o grubun özelliğini ifade eden bir fotoğraf teze konulmak üzere seçildi.

Zonula Okludens-1 Boyanmasındaki Değişiklikler

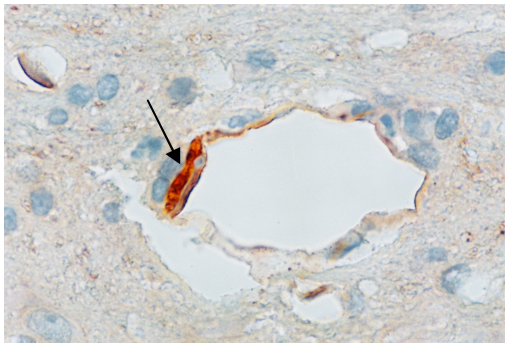
Yapılan histolojik incelemeler sonucu; Akut Hiperglisemi ve Diyabet gruplarındaki sıçanların, korteks bölgesindeki beyin endotel hücrelerindeki, Zonula Okludens-1 boyanma şiddetinde kontrol grubuna göre azalma, LPS+Akut Hiperglisemi ve Diyabet+LPS gruplarındaki sıçanların, korteks bölgesindeki, beyin kapiller endotel hücrelerinde Zonula Okludens-1 boyanma şiddetinin kontrol grubuna yakın olduğu, PTZ, LPS, LPS+PTZ, Akut Hiperglisemi+PTZ, LPS+ Akut Hiperglisemi+PTZ, Diyabet+PTZ, Diyabet+LPS+PTZ gruplarındaki sıçanların, korteks bölgesindeki beyin kapillerlerinin endotel hücrelerinde, Zonula Okludens-1 boyanma şiddetinde kontrol grubuna göre artma tespit edildi (Şekil 4-3).



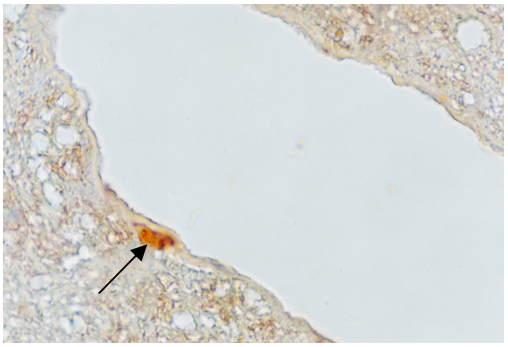
Kontrol Grubu



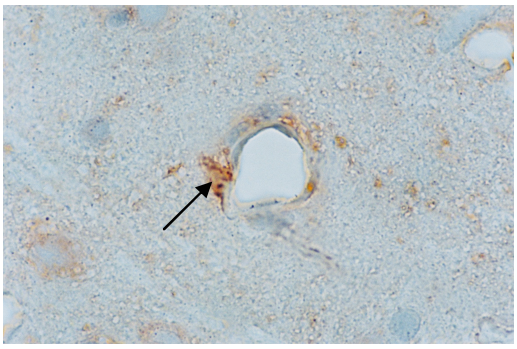
PTZ Grubu



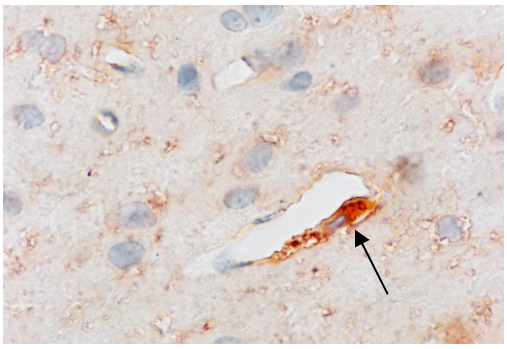
LPS Grubu



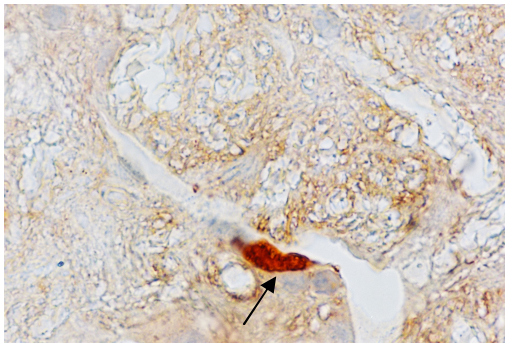
Akut Hiperglisemi Grubu



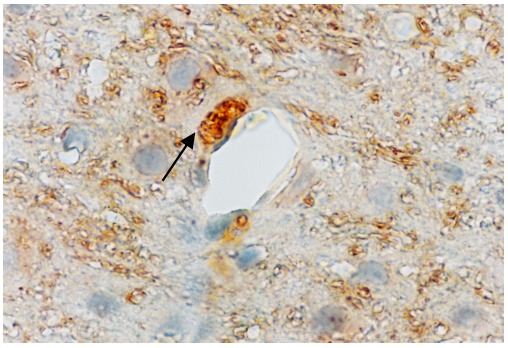
Diyabet Grubu



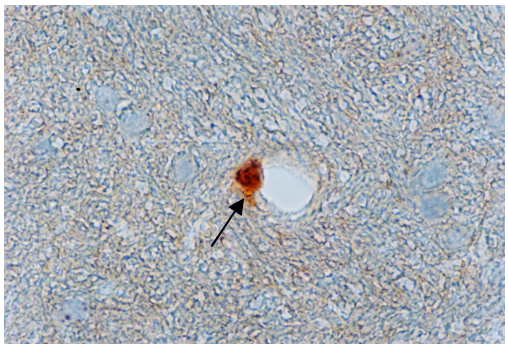
LPS+PTZ Grubu

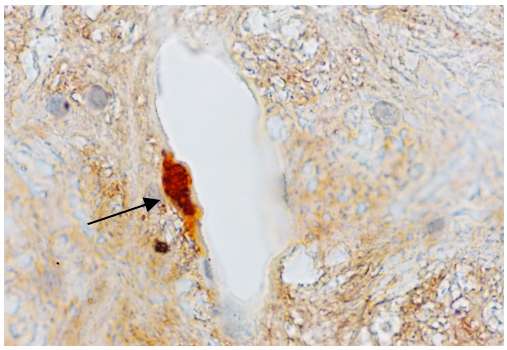


Akut Hiperglisemi+PTZ Grubu

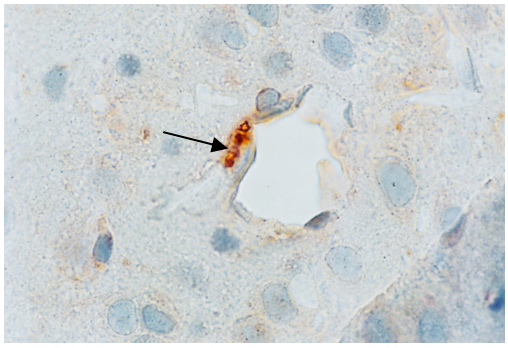


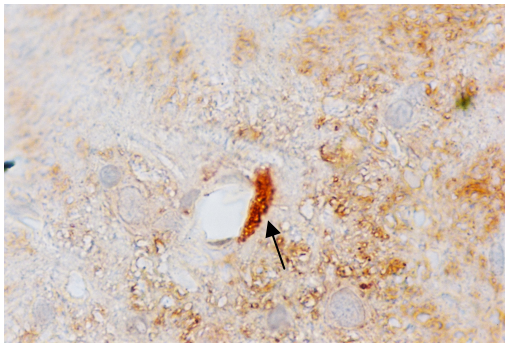
LPS+Akut Hiperglisemi Grubu





LPS+Akut Hiperglisemi+PTZ Grubu Diyabet+PTZ Grubu

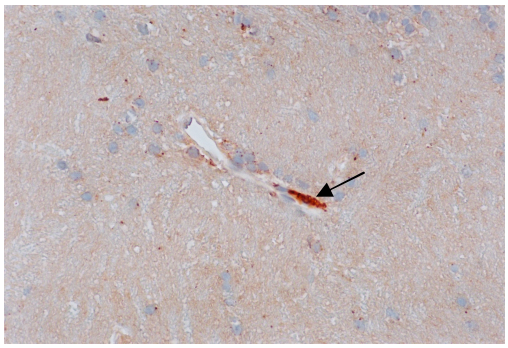




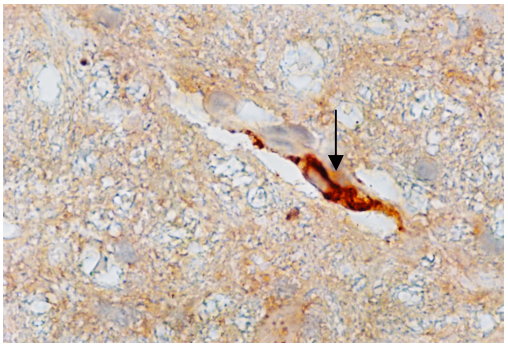
Diyabet+LPS Grubu Diyabet+LPS+PTZ Grubu

Şekil 4-3:**Deney gruplarının korteks bölgesindeki beyin kapiller endotel hücrelerinde Zonula Okludens-1 boyanma şiddetini gösteren resimler (X1000)**

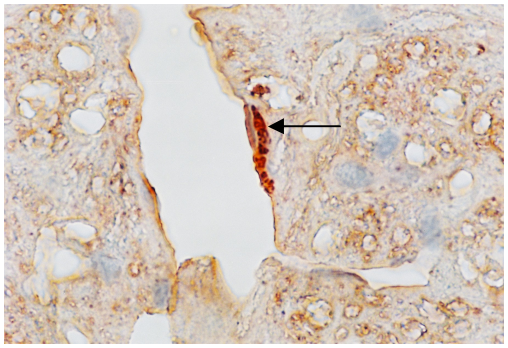
Yapılan histolojik incelemeler sonucu; Akut Hiperglisemi ve Diyabet gruplarındaki sıçanların, serebellum+beyin sapı bölgelerindeki, beyin kapiller endotel hücrelerinde, Zonula Okludens-1 boyanma şiddetinde kontrol grubuna göre azalma, LPS+Akut Hiperglisemi ve Diyabet+LPS gruplarındaki sıçanların, serebellum+beyin sapı bölgelerindeki, beyin kapiller endotel hücrelerinde, Zonula Okludens-1 boyanma şiddetinin kontrol grubuna yakın olduğu, PTZ, LPS, LPS+PTZ, Akut Hiperglisemi+PTZ, LPS+ Akut Hiperglisemi+PTZ, Diyabet+PTZ, Diyabet+LPS+PTZ gruplarındaki sıçanların serebellum+beyin sapı bölgelerindeki beyin kapiller endotel hücrelerinde Zonula Okludens-1 boyanma şiddetinde kontrol grubuna göre artma tespit edildi (Şekil 4-4).



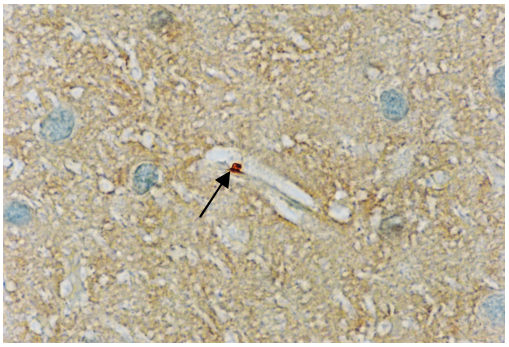
Kontrol Grubu



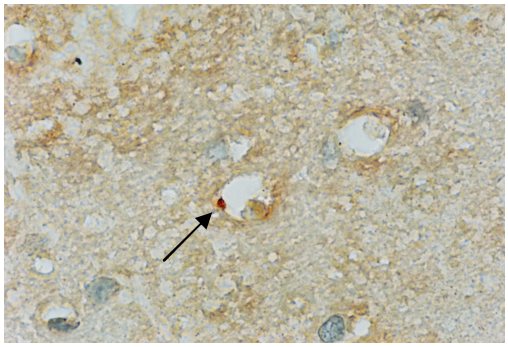
PTZ Grubu



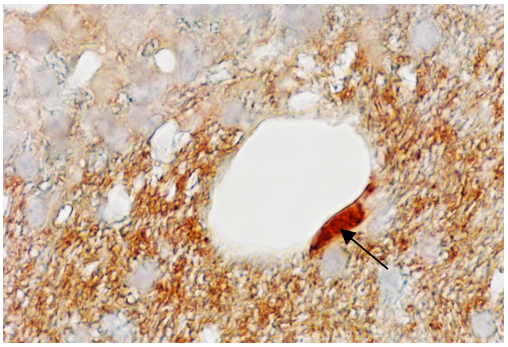
LPS Grubu



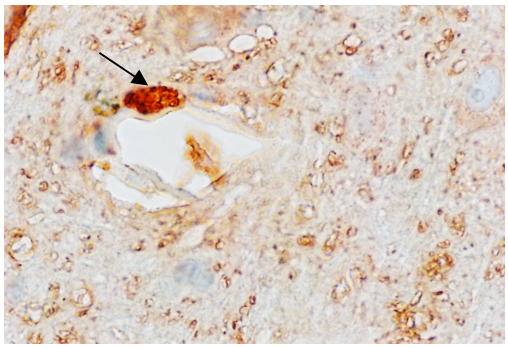
Akut Hiperglisemi Grubu



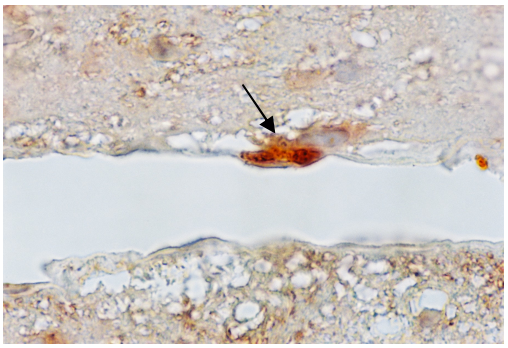
Diyabet Grubu



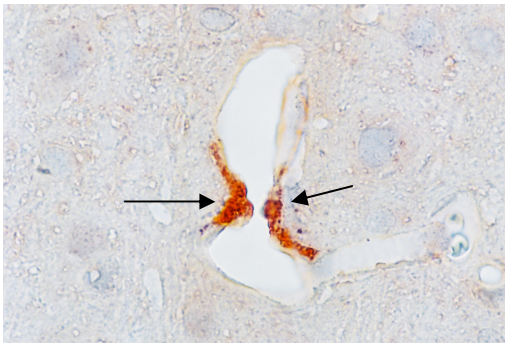
LPS+PTZ Grubu

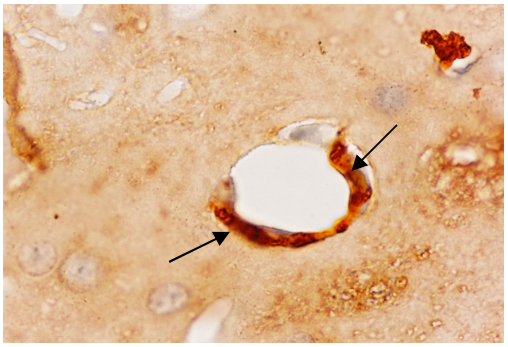


Akut Hiperglisemi+PTZ Grubu

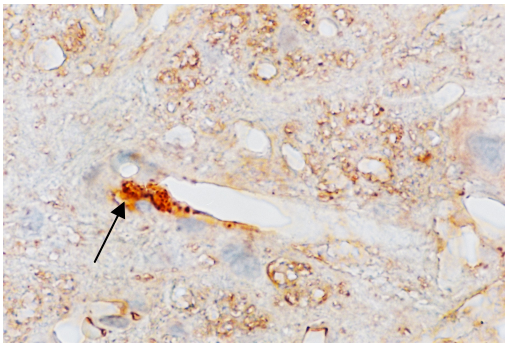


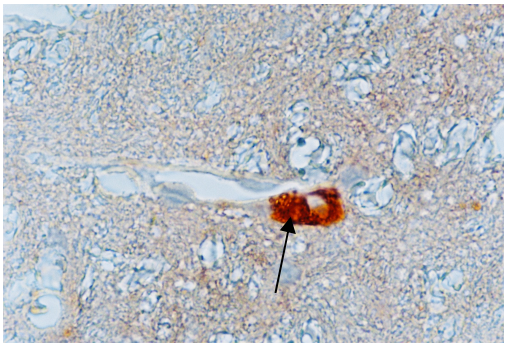
LPS+Akut Hiperglisemi Grubu





LPS+Akut Hiperglisemi+PTZ Grubu Diyabet+PTZ Grubu



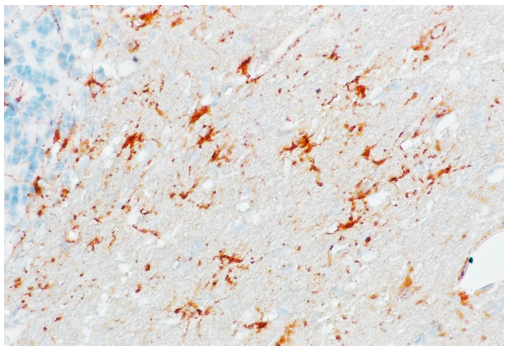


Diyabet+LPS Grubu Diyabet+LPS+PTZ Grubu

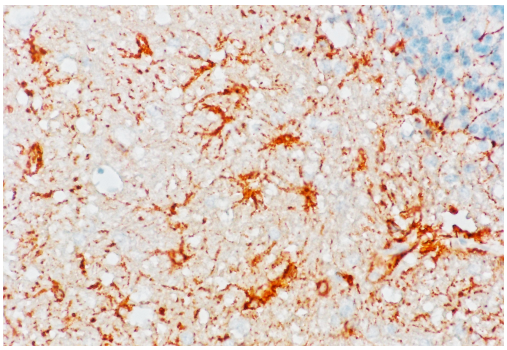
Şekil 4-4: **Deney gruplarının serebellum+beyin sapı bölgelerindeki beyin kapiller endotel hücrelerinde Zonula Okludens-1' deki boyanma değişikliklerini gösteren resimler (X1000).**

Glial Fibriller Asidik Proteinin Boyanmasındaki Değişiklikler

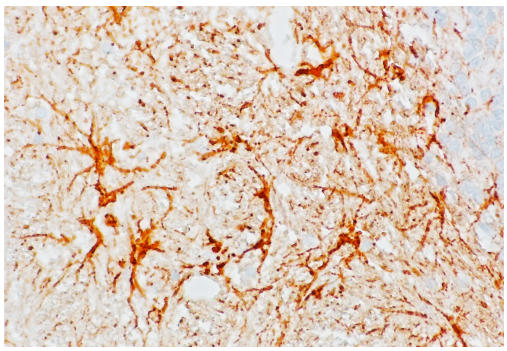
Yapılan histolojik incelemeler sonucu; Diyabet grubundaki sıçanların, korteks bölgesindeki, beyin kesitlerinde, Glial Fibriller Asidik Protein boyanma şiddetinde kontrol grubuna göre azalma, Akut Hiperglisemi, LPS+Akut Hiperglisemi ve Diyabet+LPS gruplarındaki sıçanların, korteks bölgesindeki, beyin kesitlerinde, Glial Fibriller Asidik Protein boyanma şiddetinin kontrol grubuna yakın olduğu, PTZ, LPS, LPS+PTZ, Akut Hiperglisemi+PTZ, LPS+ Akut Hiperglisemi+PTZ, Diyabet+PTZ, Diyabet+LPS+PTZ gruplarındaki sıçanların, korteks bölgesindeki, beyin kesitlerinde Glial Fibriller Asidik Protein boyanma şiddetinde kontrol grubuna göre artma tespit edildi. (Şekil 4-5).



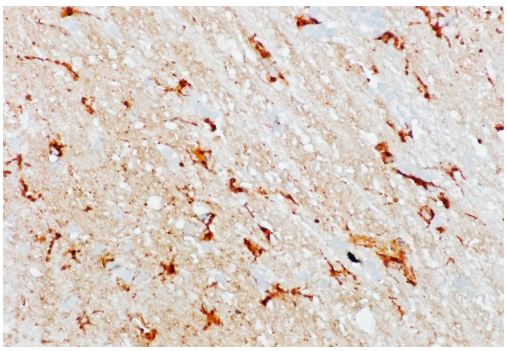
Kontrol Grubu



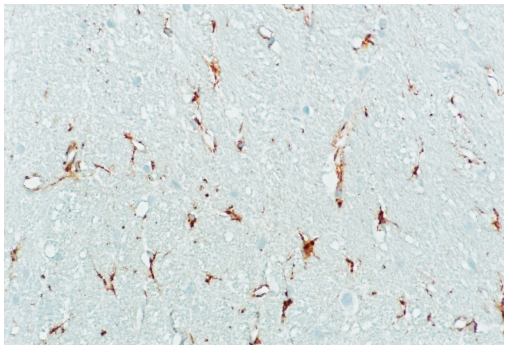
PTZ Grubu



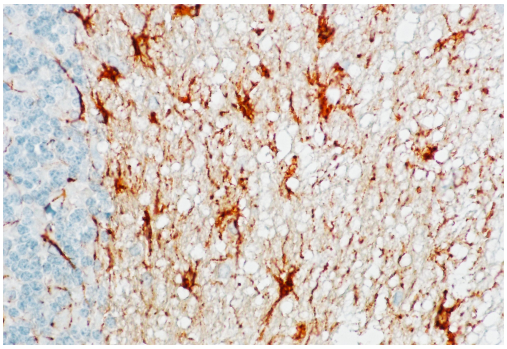
LPS Grubu



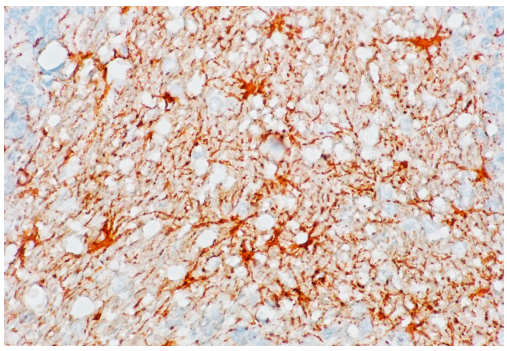
Akut Hiperglisemi Grubu



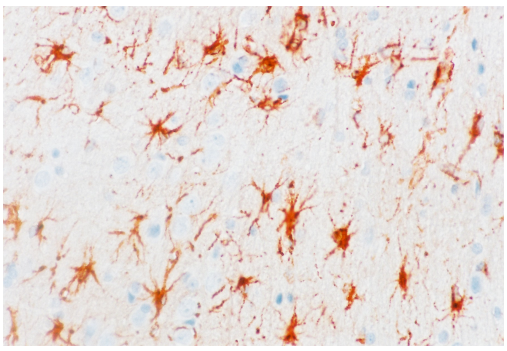
Diyabet Grubu



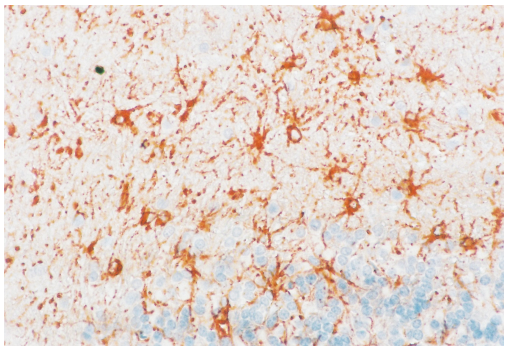
LPS+PTZ Grubu

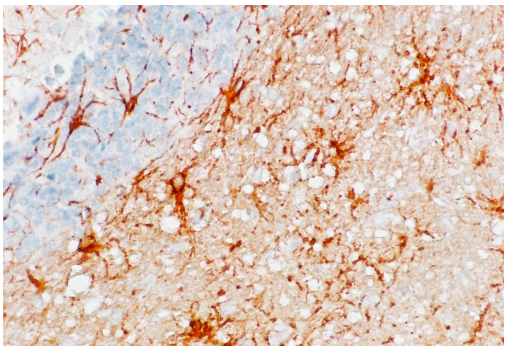


Akut Hiperglisemi+PTZ Grubu

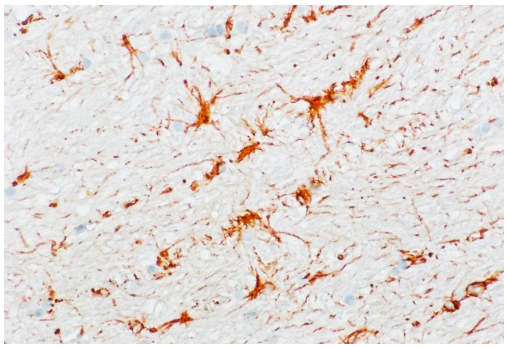


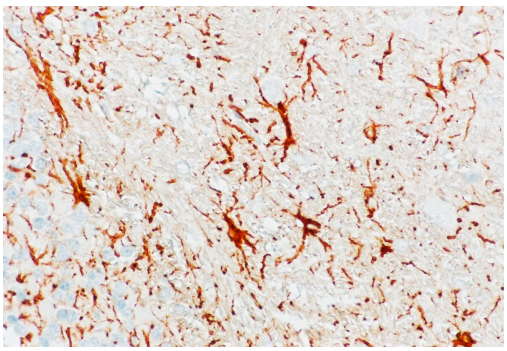
LPS+Akut Hiperglisemi Grubu





LPS+Akut Hiperglisemi+PTZ Grubu Diyabet+PTZ Grubu

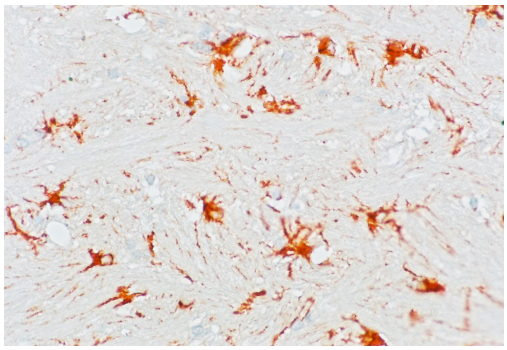




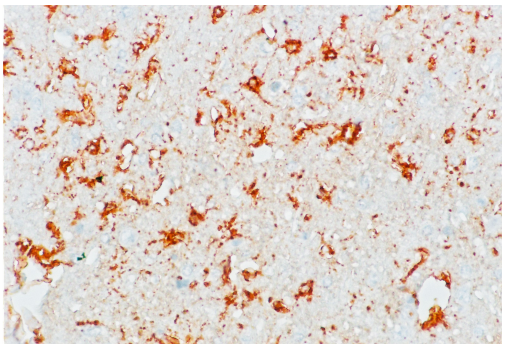
Diyabet+LPS Grubu Diyabet+LPS+PTZ Grubu

Şekil 4-5: **Deney gruplarındaki sıçanların korteks bölgesindeki beyin kesitlerinde Glial Fibriller Asidik Proteinin boyanma şiddetini gösteren resimler (X400).**

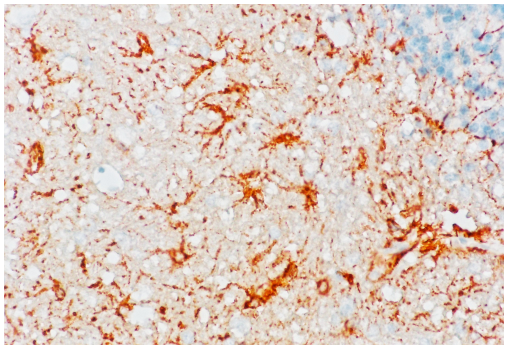
Yapılan histolojik incelemeler sonucu Diyabet grubundaki sıçanların serebellum+beyin sapı bölgelerindeki beyin kesitlerinde, Glial Fibriller Asidik Protein'in boyanma şiddetinde kontrol grubuna göre azalma, Akut Hiperglisemi, LPS+Akut Hiperglisemi ve Diyabet+LPS gruplarındaki sıçanların, serebellum+beyin sapı bölgelerindeki beyin kesitlerinde, Glial Fibriller Asidik Protein'in boyanma şiddetinin kontrol grubuna yakın olduğu, PTZ, LPS, LPS+PTZ, Akut Hiperglisemi+PTZ, LPS+ Akut Hiperglisemi+PTZ, Diyabet+PTZ, Diyabet+LPS+PTZ gruplarındaki sıçanların serebellum+beyin sapı bölgesindeki beyin kesitlerinde, Glial Fibriller Asidik Protein'in boyanma şiddetinde kontrol grubuna göre artma tespit edildi (Şekil 4-6).



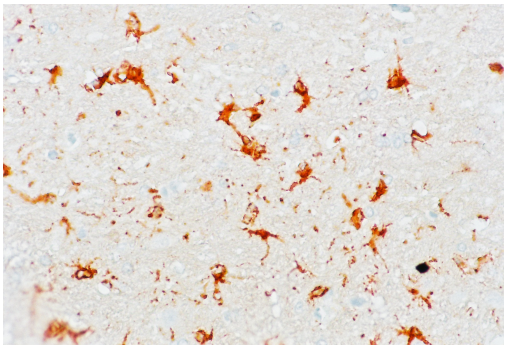
Kontrol Grubu



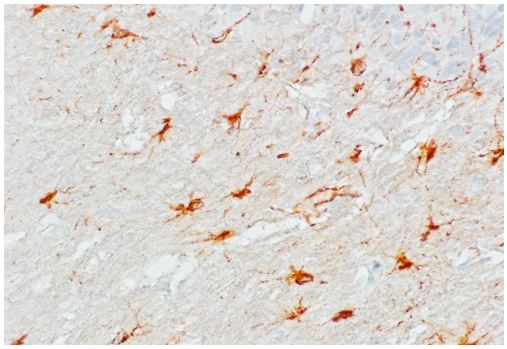
PTZ Grubu



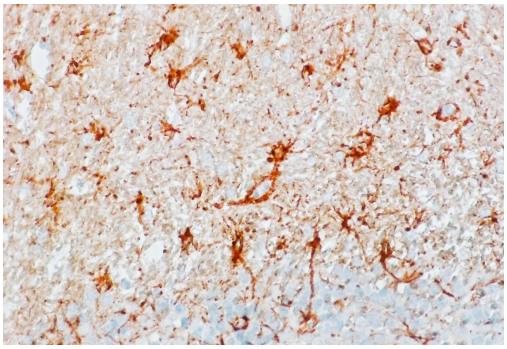
LPS Grubu



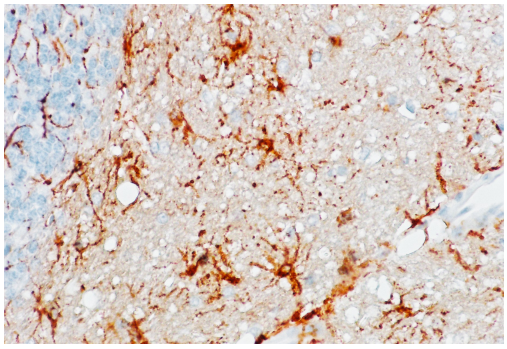
Akut Hiperglisemi Grubu



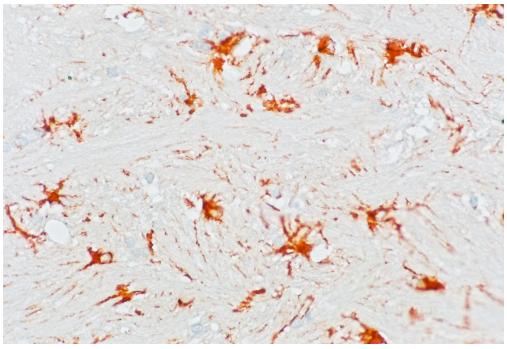
Diyabet Grubu



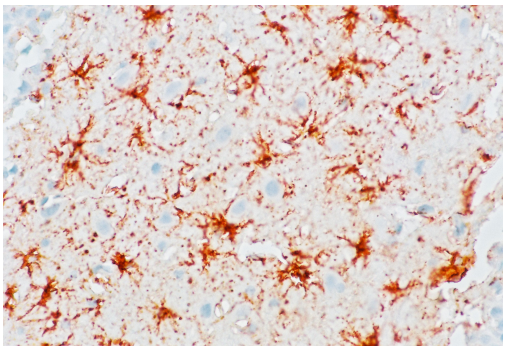
LPS+PTZ Grubu

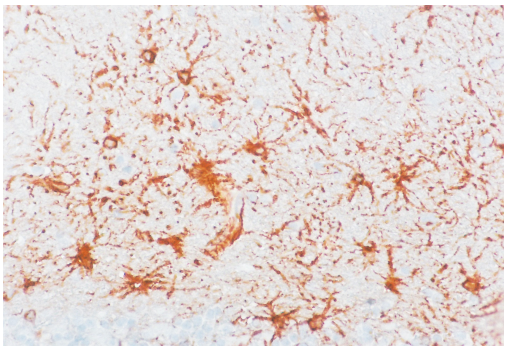


Akut Hiperglisemi+PTZ Grubu

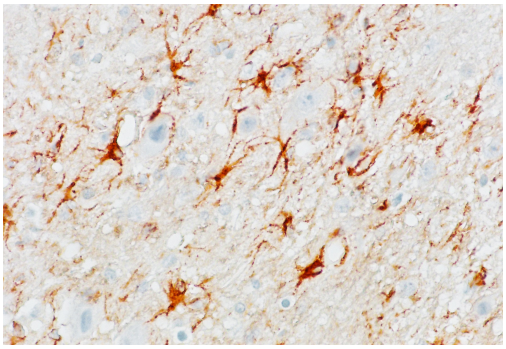


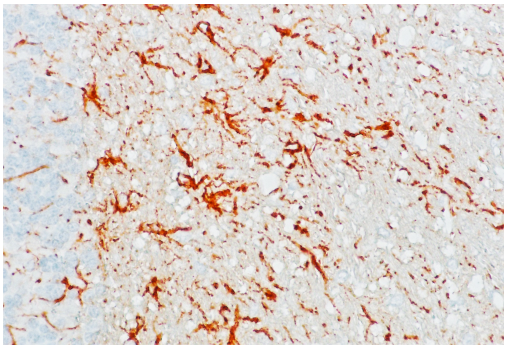
LPS+Akut Hiperglisemi Grubu





LPS+Akut Hiperglisemi+PTZ Grubu Diyabet+PTZ Grubu





Diyabet+LPS Grubu Diyabet+LPS+PTZ Grubu

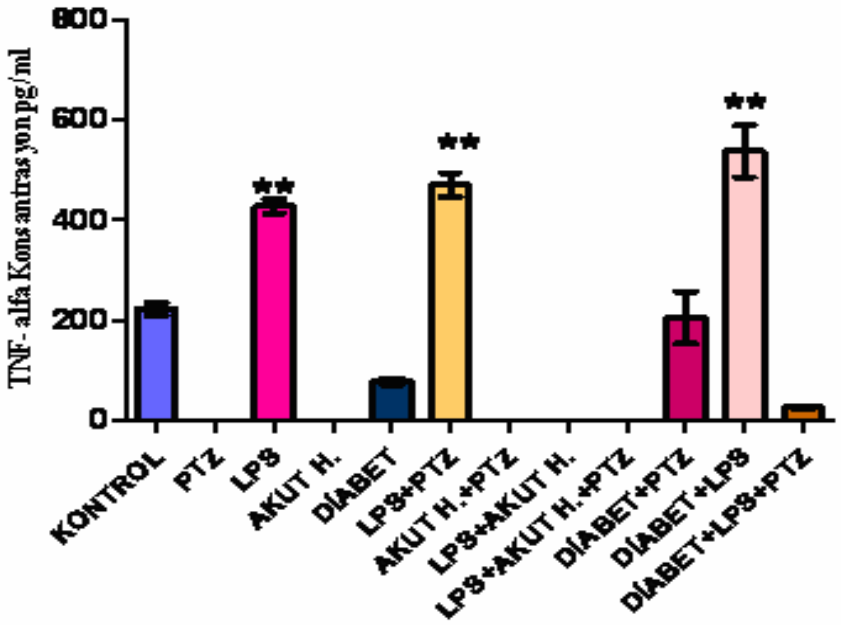
Şekil 4-6:**Deney gruplarındaki sıçanların serebellum+beyin sapı bölgelerindeki beyin kesitlerinde Glial Fibriller Asidik Protein boyanmasındaki değişiklikleri gösteren resimler (X400).**

4.3. SİTOKİN BULGULARI

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kitleri kullanılarak deney gruplarına ait sıçanların serum TNF-α, IL-10, IL-12+p40 sitokin düzeyleri ölçüldü.

TNF- α

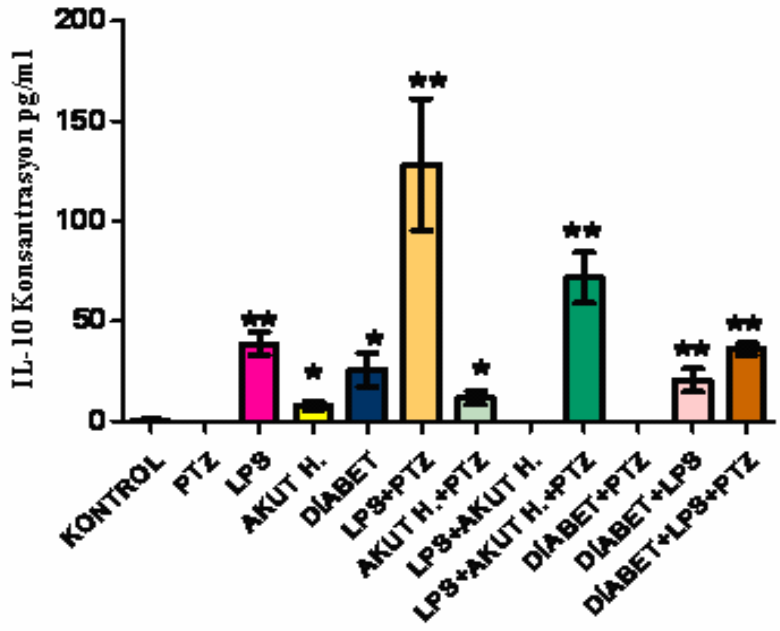
Deney gruplarına ait sıçanların, serum TNF-α seviyeleri; Kontrol grubunda 222.7±32 pg/ml, LPS grubunda 427±34.7 pg/ml, LPS+PTZ grubunda 471±59, Diyabet grubunda 77.7±15.1 pg/ml, Diyabet+PTZ grubunda 205.9±129 pg/ml Diyabet+LPS grubunda 538.1±126.7 pg/ml, Diyabet+LPS+PTZ grubunda 25.9±4.9 pg/ml olarak saptandı. LPS, LPS+PTZ, Diyabet+LPS, gruplarında TNF-α seviyelerinin kontrol grubuna göre ileri derecede arttığı saptandı ($p<0.01$). PTZ, Akut Hiperglisemi, Akut Hiperglisemi+PTZ, LPS+Akut Hiperglisemi, LPS+Akut Hiperglisemi+PTZ gruplarına ait serum TNF-α salınımı saptanmadı (Grafik 4-16).



Grafik 4-16: Deney gruplarına ait sıçanların serum TNF-α seviyeleri. LPS, LPS+PTZ, Diyabet+LPS gruplarında TNF-α seviyelerinin kontrol grubuna göre ileri derecede arttığı saptandı (p<0.01).**

IL-10

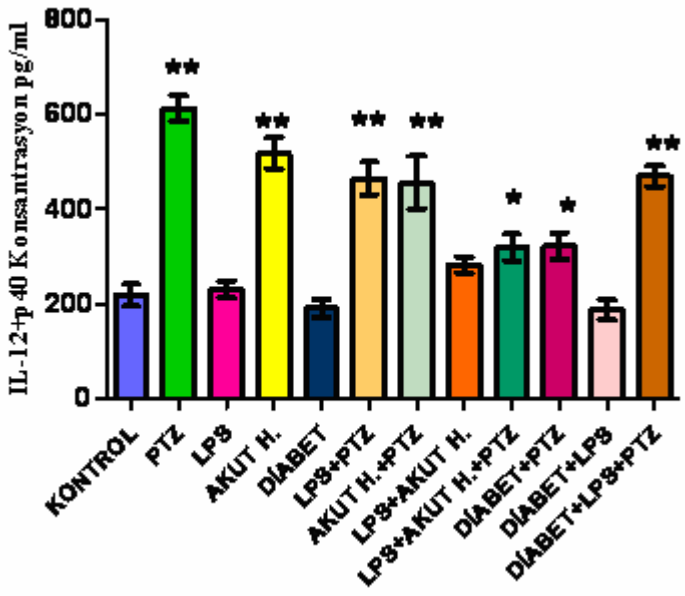
Deney gruplarına ait sıçanların serum IL-10 seviyeleri; Kontrol grubunda 0.71±1.74 pg/ml, LPS grubunda 39±14.4 pg/ml, Akut Hiperglisemi grubunda 7.7±5.4 pg/ml Diyabet grubunda 25.9±20.2 pg/ml, LPS+PTZ grubunda 128±80.7 pg/ml, Akut Hiperglisemi+PTZ grubunda 12±8.6 pg/ml, LPS+Akut Hiperglisemi+PTZ grubunda 72±31.2 pg/ml, Diyabet+LPS grubunda 72±31.2 pg/ml, Diyabet+LPS+PTZ grubunda 36±7.7 pg/ml olarak saptandı PTZ, LPS+Akut Hiperglisemi, Diyabet+PTZ gruplarına ait IL-10 salınımı saptanmadı. LPS, LPS+PTZ, LPS+Akut Hiperglisemi+PTZ, Diyabet+LPS, Diyabet+LPS+PTZ gruplarında serum IL-10 seviyelerinin kontrol grubuna göre ileri derecede arttığı saptandı ($p<0.01$). Akut Hiperglisemi, Diyabet ve Akut Hiperglisemi+PTZ gruplarında serum IL-10 seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı saptandı ($p<0.05$) (Grafik 4-17).



Grafik 4-17: Deney gruplarına ait sıçanların serum IL-10 seviyeleri. LPS, LPS+PTZ, LPS+Akut Hiperglisemi+PTZ, Diyabet+LPS, Diyabet+LPS+PTZ gruplarında serum IL-10 seviyelerinin kontrol grubuna göre ileri derecede arttığı saptandı (p<0.01). Akut Hiperglisemi, Diyabet ve Akut Hiperglisemi+ PTZ gruplarında serum IL-10 seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı saptandı (*p<0.05).**

IL-12+p40

Deney gruplarına ait sıçanların serum IL-12+p40 seviyeleri; Kontrol grubunda 219±57.1 pg/ml, PTZ grubunda 614±67 pg/ml, LPS grubunda 231±43.7 pg/ml, Akut Hiperglisemi grubunda 518±79.8 pg/ml, Diyabet grubunda 190.9±45.7 pg/ml, LPS+PTZ grubunda 465.7±84.4 pg/ml, Akut Hiperglisemi+PTZ grubunda 456.6±136.8 pg/ml, LPS+Akut Hiperglisemi grubunda 282.7±42 pg/ml, LPS+Akut Hiperglisemi+PTZ grubunda 319±69 pg/ml, Diyabet+PTZ grubunda 322.4±67.9 pg/ml, Diyabet+LPS grubunda 187.6±52 pg/ml, Diyabet+LPS+PTZ grubunda 470±53.5 pg/ml olarak saptandı. PTZ, Akut Hiperglisemi, LPS+PTZ, Akut Hiperglisemi+PTZ, Diyabet+LPS+PTZ gruplarında serum IL-12+p40 seviyelerinin kontrol grubuna göre ileri derecede arttığı saptandı ($p<0.01$). LPS+Akut Hiperglisemi+PTZ ve Diyabet+PTZ gruplarında serum IL-12+p40 seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı saptandı ($p<0.05$) (Grafik 4-18).



Grafik 4-18: Deney gruplarına ait sıçanların serum IL-12+p40 seviyeleri. PTZ, Akut Hiperglisemi, LPS+PTZ, Akut Hiperglisemi+PTZ, Diyabet+LPS+PTZ gruplarında serum IL-12+p40 seviyelerinin kontrol grubuna göre ileri derecede arttığı saptandı (p<0.01). LPS+Akut Hiperglisemi+PTZ ve Diyabet+PTZ gruplarında serum IL-12+p40 seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı saptandı (*p<0.05).**

5. TARTIŞMA

Bu araştırmada normoglisemik, akut ve uzun süreli hiperglisemik koşullarda oluşturduğumuz konvülziyonların kan beyin bariyeri permeabilitesi, Zonula Okludens-1 ve Glial Fibriller Asidik Proteinleri ve Serum TNF-α, IL-10, IL-12+p40 sitokinlerine olan etkisini inceledik. Aynı zamanda bu gruplarda uyguladığımız LPS'nin yukarıdaki parametrelere etki edip etmediğini göstermek istedik.

Araştırmamızda oluşturduğumuz yukarıdaki patolojik koşullarda kan beyin bariyeri traseri olarak, Evans-blue kullanıldı. Sıçanlara eter narkozu altında femoral venden %2'lik Evans-blue 4 ml/kg olarak enjekte edildi. Bu dozdaki Evans-blue tamamen serum albuminine bağlanır. Bir molekül albumin 11-14 molekül Evans-blue bağlar. Normal koşullarda; kan beyin bariyeri'ni geçemeyen bu kompleks, patolojik koşullarda bariyer permeabilitesinin artmasıyla bariyerin yıkıldığı bölgelerde, beyin dokusuna geçerek o bölgenin maviye boyanmasına neden olur (Rawson 1943).

Kan Beyin Bariyeri yapısında yer alan sıkı bağlantı proteinlerinden biri olan, Zonula Okludens-1'de meydana gelen histolojik değişiklikleri immunohistokimyasal yöntemle gösterdik. Sıkı bağlantılardan madde geçişi, kan beyin bariyeri taşıma sistemlerinden biri olan parasellüler yol olarak isimlendirilir (Şekil 2-3) (Citi ve Cordenonsi 1998). Kan Beyin Bariyeri permeabilitesinde meydana gelen değişiklikler, sıkı bağlantı proteinlerinin yapısında değişime neden olabilir (Mitic ve Anderson 1998). İmmunohistokimyasal yöntemi kullanılarak, Zonula Okludens-1'in boyanma şiddetinin kontrol grubuna göre artışının gözlenmesi, Zonula Okludens-1 proteinin beyin dokusundaki varlığının artmış olduğunu gösterir. Zonula Okludens-1 proteinindeki artma, kan beyin bariyerindeki parasellüler permeabilitenin azalmasına, dolayısıyla, bariyer geçirgenliğinin korunmasına katkıda bulunabilir. Tersine; Zonula Okludens-1'in boyanma şiddetinin kontrol grubuna göre azalması, sıkı bağlantıların kaybına neden olarak, kan beyin bariyeri permeabilitesinin artmasına ve istenmeyen makromoleküllerin kan beyin bariyeri'nden geçerek, beyne zarar vermesine neden olabilir (Mark ve Davis 2002). Bundan dolayı; Zonula Okludens-1' in, immunohistokimyasal yöntemle tespiti patolojik koşullardaki bariyer permeabilitesi için önemlidir.

Kan beyin bariyeri yapısına katılan astrositlerde bulunan, hücre iskeleti ara filament proteini olan, Glial Fibriller Asidik Protein'inde meydana gelen histolojik değişiklikleri, immunohistokimyasal yöntemle gösterdik. İmmunohistokimyasal yöntemi kullanılarak, Glial Fibriller Asidik Protein' in boyanma şiddetinde kontrol grubuna göre artış gözlenmesi, bu protein miktarının beyin dokusunda artmış olduğunu gösterir. Glial Fibriller Asidik Protein artışı, astrositlerin aktivasyonuna ve kan beyin bariyeri permeabilitesinin korunmasına neden olur. Tersine; Glial Fibriller Asidik Protein'in boyanma şiddetinin kontrol grubuna göre azalması, bu proteinin azalmış olduğunu gösterir. Bu durumda, kan beyin bariyeri permeabilitesinin artmasına neden olabilir (Reeves ve ark. 1989). Travma, genetik hastalıklar ve bazı kimyasal maddelerin, astrosit uzantılarının boyunu artırarak, astrositleri daha fazla Glial Fibriller Asidik Protein sentezlemesi için uyardığı gösterilmiştir (Takamiya ve ark. 1988, Eng ve ark. 2000). Kimyasal ve mekaniksel etkilerin, diyabet gibi kalıcı değişiklikler oluşturabilen patolojik durumları santral sinir sisteminde astrositik reaksiyonlara neden olabilir (Morrison ve ark.1985, Nicole ve ark. 1993).

Deneylerimizde dişi erişkin sıçanlar kullanıldı. Kan Beyin Bariyeri konusunda yapılan deneysel araştırmaların çok büyük bir bölümü, erkek deney hayvanları kullanılarak yapılmıştır. Dişilerdeki östrus siklusunun deneylere etki edeceği düşünülmüştür. Erkek deney hayvanlarından elde edilen sonuçların, dişilere uygulanması da son derece yanlıştır. Dünya nüfusunun yarısının erkek olmadığı düşünülürse dişilerde yapılan araştırmaların önemi ortaya çıkmaktadır.

Deney Gruplarımızda, bu parametreleri kullanarak elde ettiğimiz sonuçları değerlendirecek olursak;

Araştırma bulgularımızdan ilki; Normoglisemik koşullarda oluşturduğumuz epileptik nöbet geçiren sıçanlarda, sol hemisfer, sağ hemisfer ve serebellum+beyin sapı bölgelerindeki, Evans blue konsantrasyonunun, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, kan beyin bariyeri permeabilitesinin ileri derecede artmış olmasıdır. Bu durum, daha öncede yapılan pek çok sayıda çalışma ile gösterilmiştir (Lorenzo ve ark. 1975; Bolwig 1989, Sahin ve ark. 2003). Konvülziyonların şiddeti, nöbet süresi, kan beyin bariyeri permeabilite artışında önemlidir. Lee ve Olszewski (1961) yaptıkları çalışmada, beş

dakikayı aşan nöbetlerde kan beyin bariyeri permeabilitesinin arttığını göstermiştir. PTZ'nin konvülzan olarak kullanıldığı çalışmalarda, tripan mavisi kedide (Shealy ve Crafts 1965) sodyum fluoresin ise kobaylarda (Librizzi ve ark. 2001) traser olarak kullanılmış ve kan beyin bariyeri geçirgenliğinin arttığı bildirilmiştir. Bizim bulgularımızda; konvülziyonlarda en fazla bariyer yıkımı talamus çekirdekleri, beyin sapı, frontal korteks ve serebellumda izlenmiştir. Rozdilsky ve Olszewski, elektrokonvülzif şokta özellikle beynin talamus bölgesinde bariyer yıkımının meydana geldiğini göstermiş ve bu bulgular PTZ ve elektriksel şok uygulanarak köpeklerde oluşturulan epileptik nöbetlerde de elde edilmiştir (Rozdilsky ve Olszewski 1957, Lending ve ark. 1969). Bir diğer çalışmada ise tek ve tekrarlanan elektrokonvülzif şokların, kan beyin bariyeri geçirgenliğini artırdığı belirtilmektedir (Oztas ve Kaya 1991). Bolwig ve ark.(1977), elektroşok ile oluşturdukları nöbetlerde 24Na,36Cl 14[C]-tioüre ve 14[C]- D-glikozu (küçük molekül ağırlıklı traserler) kullanmışlar ve beyin kan akımı artışına bağlı olarak bu maddelerin beyne geçişinde artış olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmamızda, PTZ uygulanan tüm gruplarda, hem Zonula Okludens-1'in hem de Glial Fibriller Asidik Protein' in boyanma şiddetinde artma tespit ettik. Bu konuda yapılan daha önceki tek araştırmada; Arican ve ark. (2006) bizim çalışmamıza benzer bulguları saptamıştır. Epileptik nöbetler sırasında, Zonula Okludens-1 ve Glial Fibriller Asidik Protein'in artışı, kan beyin bariyeri permeabilitesini koruyucu etki göstermesine rağmen, kan beyin bariyerinin yıkılıp Evans-blue albumin kompleksinin beyne geçmesi tezat olarak durmaktadır. Ancak; epileptik nöbetler sırasında kan beyin bariyeri permeabilitesinin artmasında iki önemli mekanizma ileri sürülmüştür. Bir grup araştırıcı; permeabilitedeki artışın, kapiller endotel hücrelerindeki pinositotik aktivite artışından kaynaklandığını gösterirken (Petito ve ark. 1977; Nitsch ve ark. 1986, Westergaard 1978), karşı grup araştırıcı; epileptik nöbetlerde kapiller dilatasyona neden olan intraluminal basınç artışı ile sıkı bağlantıların açıldığını ve bu yolla kan beyin bariyeri geçirgenliğinin arttığını ileri sürmektedirler (Chan ve Fishmann 1984; Harik 1986). Zonula Okludens-1' in artışı parasellüler geçişin azaldığını gösterir. Parasellüler geçişin azalması, sıkı bağlantıların nöbetler sırasında korunduğunu göstermektedir. Bu nedenle, bulgularımız epileptik nöbetlerin beyin endotel hücrelerinde pinositotik

aktiviteyi artırarak, Evans-blue albumin kompleksinin beyne geçtiğini savunan birinci grup araştırmacıyı desteklemektedir.

Çalışmamızda da nöbet geçiren tüm deney gruplarında, kan basıncında önemli ölçüde artış meydana geldiği saptandı ($p<0.01$). Epileptik nöbetler sırasında ortaya çıkan ani kan basıncı artışı (Şekil 4-1), kan basıncının yüksek kalma süresi ve yükselme hızının, kan beyin bariyeri permeabilitesinin artışından sorumlu olduğunu göstermiştir (Johansson 1983). Cipallo ve ark. (2004) inme sırasında kan basıncındaki yükselmenin, beyin endotel hücrelerindeki pinositotik aktivitenin artmasında önemli bir etken olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışma da, epileptik nöbetler sırasında pinositotik aktivite artışı ile kan beyin bariyeri permeabilitesinin arttığı yönündeki bulgularımızı desteklemektedir.

Ayrıca çalışmamızda, konvülziyon geçiren sıçanlarda, IL-12+p40 düzeyinde kontrol grubuna göre artış tespit ettik. Bu da nöbetlerin, IL-12+p40 tarafından oluşturulan proinflamatuvar yanıtı artırdığını göstermektedir. Konvülziyonlar, kan beyin bariyeri' ni yıkarak, vazojenik beyin ödemi oluştururken, proinflamatuvar yanıtı arttırarak nöronlara ikinci bir zararı veren patolojik bir durum olarak ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamızda; akut uyguladığımız yüksek glikoz ile hiperglisemi oluşturduğumuz süre içinde, sıçanların her üç beyin bölgesinde kan beyin bariyeri permeabilitesinde herhangi bir değişiklik meydana gelmemiştir ($p>0.05$). Yine çalışmamızın sonuçlarına benzer şekilde, akut hipergliseminin kan beyin bariyeri permeabilitesinde değişme meydana getirmediğini gösteren bazı çalışmalar vardır (Arican ve ark.2002; Kaya ve ark.2002). Buna karşın; *in vitro* 2 saat süreyle yüksek glikoza maruz kalan, retinal endotel hücre permeabilitesinde artış meydana geldiği yapılan çalışma ile gösterilmiştir (Gillies 1997).

İlk defa bizim çalışmamızda, akut hipergliseminin Glial Fibriller Asidik Proteinin boyanma şiddetinde herhangi bir değişme meydana getirmediğini, buna karşın; çalışmamızda, beyin kapiller endotel hücrelerindeki Zonula Okludens-1 boyanma şiddetinde azalma meydana getirdiğini saptadık. Zonula Okludens-1'in

azalmasıyla parasellüler permeabiltede artış meydana gelir. Bu artışda, kan beyin bariyeri permeabilitesinin artmasına neden olabilir. Zonula Okludens-1'in azalması, akut hipergliseminin, kan beyin bariyeri permeabilitesi için masum bir ajan olmadığını göstermektedir. Ancak, kullandığımız Evans Blue traseri ile akut hiperglisemide, kan beyin bariyeri permeabilitesinde herhangi bir değişme saptamadık. Bu koşulda, kan beyin bariyeri permeabilitesinde değişme meydana gelmesine rağmen, meydana gelen değişiklikliği gözlemleyememiz, kullandığımız Evans Blue traserinin 69000 Da ağırlığındaki albumine bağlanarak, bu düzeyde permeabilite değişikliklerini belirlememesi olabilir. Bu durum, daha sonraki çalışmalarda, akut hiperglisemide kan beyin bariyeri geçirgenliğini tespit etmede, HRP, inülin gibi daha hassas traserler kullanılarak aydınlatılabilir.

Araştırmamızın bir diğer bulgusu; Evans-blue traseri ile yaptığımız deneylerde tek başına KBB permeabilitesinde değişikliğe neden olmayan akut hiperglisemi ile birlikte oluşturduğumuz epileptik nöbetlerin, normoglisemik epileptik sıçanlara göre kan beyin bariyeri permeabilitesinin önemli ölçüde artmasına neden olmasıdır ($p<0.01$). Glikoz, tüm memeli hücreleri için önemli metabolik bir substrattır. Beyin temel enerji kaynağı olarak sürekli glikoza bağlıdır. Akut Hiperglisemi, yüksek glikoz serbest radikal üretiminin artmasına yol açabilir ve endotelyumda karakteristik disfonksiyona ve morfolojik değişikliklere önderlik edebilir. Beyin endotel hücreleri reaktif oksijen türlerine maruz kaldığı zaman, meydana gelen yapısal değişikliklerin yanında, kan beyin bariyeri geçirgenliği artışı meydana gelebilir. Akut hiperglisemik durumlar direkt olarak, reaktif oksijen türlerinin üretiminde yükselmeye sebep olarak endoteliyal hasarda önemli bir rol oynayabilir (Tesfamariam ve Cohen 1992; Yamashita ve ark. 1995).

Deneysel çalışmalar, nöbetler sırasında beyinde glikoz tüketiminin artması ile birlikte, glikozun beyne taşınımının arttığını göstermiştir (Cornford ve ark.1998). Epileptik nöbetler sırasında, artan glikoz tüketimi ile birlikte serbest radikal miktarının artması, aynı zamanda akut hiperglisemide, glikozun otooksidasyonu, proteinlerin glikasyonu, ilerlemiş glikasyon son ürünlerin oluşumunu sağlaması ve poliol yol gibi mekanizmaların devreye girmesiyle, yine serbest radikal miktarında artış ve hücre içinde ve hücre zarında yer alan proteinlerin yapısında değişmeler meydana gelebilir.

(Lagrange ve ark. 1999, Bonnefont-Rousselot, 2002). Bu değişiklikler, endotel hücrelerin metabolik aktivitesinin artmasına neden olabilir. Kan beyin bariyeri permeabilitesinin normoglisemik epileptik sıçanlara göre önemli ölçüde hasara uğramasına neden olabilir. Bu grupta; hem Zonula Okludens-1 hem de Glial Fibriller Asidik Protein'in boyanma şiddetinde artma tespit ettik. Bu artış nöbetlerin etkisiyle oluşmuş olabilir. Konvülziyon grubunda olduğu gibi bu grupta da, kan beyin bariyeri permeabilitesinde meydana gelen artışdan, pinositotik aktivitenin artmış olmasının sorumlu olabileceğini düşünmekteyiz.

Araştırmamızda, streptozosin ile diyabet oluşturduğumuz sıçanlarda, 1 aylık süre sonunda, kan beyin bariyeri permeabilitesinin değişmediği saptandı ($p>0.05$). Diabetes Mellitusun KBB permeabilitesine etkisi ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar çelişkilidir. Stauber ve ark.(1981), Diabetes Mellitus oluşumundan 2 hafta sonra, kan beyin bariyerin'in albumine geçirgenliğinin arttığını rapor etmişlerdir. İmmunohistokimyasal teknik kullanılarak yapılan çalışmalarda, kan beyin bariyerinin albümine geçirgenliği uzun süreli diyabetik sıçanlarda insülin tedavisi ile normal haline dönmüştür (Lorenzi ve ark. 1986). Ayrıca, diyabetik sıçanların beyninde adrenalin ile oluşturulan akut hipertansiyondan sonra kontrollere göre, Evans blue albümin ekstravazasyonunun arttığı gözlenmiştir (Oztas ve Kucuk 1995). Diğer çalışmalarda da, diyabetik sıçanlarda kan beyin bariyerinin horseradish peroksidaz, sükroz veya sitokrom C ye geçirgenliği değişmediği gösterilmiştir. Bu bulgu bizim bulgularımızı teyit etmektedir (Jakobsen ve ark.1978, Rechthand ve ark. 1987 McCall 1992). Mayhan (1990), Diabetes Mellitus oluşumundan 3.5 ay sonra, kan beyin bariyeri permeabilitesini araştırmış ve diyabetik olmayan sıçanları ile diyabetik sıçanlar karşılaştırıldığında, beyin kapiller dolaşımındaki sızıntı bölgelerinin sayısında artma bulmuştur. Bradbury ve ark. (1991) sıçanlarda, Diabetes Mellitus indüksiyonundan 3.hafta, 6. hafta, 6.ay, 7.ay, 13.ay, 14.ay sonrasında kan beyin bariyerinin sükroza geçirgenliğinde değişme gözlememişlerdir. Ennis ve Betz (1986) 20 haftalık diyabette kan-retinal bariyerinin şekere geçirgenliğinin arttığını kan beyin bariyeri permeabilitesinin değişmediğini göstermiştir. Çalışmalarda farklı sonuçların elde edilmesi, kan beyin bariyeri permeabilitesinde kullanılan traserler, uygulanan yöntemler ve diyabet sürelerinin farklılığından kaynaklanıyor olabilir.

Bu grupla ilgili bir diğer bulgumuz, diyabet oluşturduğumuz sıçanların korteks ve serebellum bölgelerinden alınan kesitlerde, beyin kapiller endotel hücrelerindeki, Zonula Okludens-1 ve Glial Fibriller Asidik Protein boyanma şiddetlerinde azalma tespit ettik. Zonula Okludens-1'in azalması, sıkı bağlantıların oluşturduğu parasellüler permeabilitede artış meydana geldiğini, Glial Fibriller Asidik Protein boyanma şiddetinde azalma, astrositlerin KBB'ni koruma fonksiyonunda azalma meydana geldiğini göstermektedir. Dolayısıyla, diyabet grubunda kandan beyne parasellüler yol ile madde geçişinin bozulduğu söylenebilir. Ancak, akut hiperglisemi grubunda olduğu gibi kullandığımız Evans-blue traseri (69000 Da) yerine daha hassas traserler kullanarak permeabilite değişiklikleri saptanabilir. Gjedde A, Crone (1981), deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda 4 hafta süre sonunda mediyodorsal hipotalamus, mediyobazal hipotalamusu içeren beyin bölgelerinde H^3 işaretli inülin (4000 Da) alanları göstermişlerdir. Fakat, yine aynı çalışmada beyne horseradish peroxidase (40000 Da) geçişi gözlememişlerdir. Bu sonuçlar, bizim bulgularımızı desteklemektedir.

Diyabetin beyinde ve retinada, Glial Fibriller Asidik Protein seviyelerini değiştirdiği, deneysel hayvan modellerinde gösterilmiştir (Rungger-Brandle ve ark. 2000, Saravia ve ark. 2002). Son çalışmalar streptozosin ile oluşturulmuş diyabetik sıçanlarda, hipokampus, serebellum, korpus kallosumun ak maddesinde Glial Fibriller Asidik Protein seviyelerinde önemli azalmalar olduğunu gösterirken, bazı araştırıcılar streptozosin ile oluşturulmuş diyabetik sıçan ve farelerde serebral korteks, serebellumda glial reaktivitede artma meydana geldiğini göstermiştir (Asnaghi ve ark. 2003; Coleman ve ark. 2004). Barber ve ark.(2000), Glial Fibriller Asidik Protein'in, immun reaktivitesinde kontrol sıçanlara göre azalma meydana geldiğini, insülin uygulanmasından sonra Glial Fibriller Asidik Protein'in immun reaktivitesinde artma meydana geldiğini göstermiştir. Glial Fibriller Asidik Protein immun reaktif astrositlerde sayıca azalma meydana gelmesinin, astrositlerin diyabetik sinir dokusunda destek ve fizyolojik düzenlemelerinde kayıp meydana getirebileceğini göstermektedir (Afsari ve ark. 2008).

Orijinal olarak, çalışmamızda diyabet grubunda oluşturduğumuz konvülziyonlarda, sıçanlarda KBB permeabilitesinin önemli ölçüde arttığını saptadık ($p<0.01$). Fakat diyabetteki hangi mekanizma ile konvülziyonların kan beyin bariyeri

permeabilitesini ileri derecede arttırdığını bilmiyoruz. Konvülziyonlarda kan beyin bariyerinin yıkılmasında en önemli parametrelerden biri arteriyel kan basıncının ani artışıdır. Diyabet grubu ile normoglisemik gruptaki nöbetlerde kan basınçlarının artışı karşılaştırıldığı zaman, aralarında önemli bir fark olmaması diyabetik sıçanlarda oluşturulan nöbetler sırasında, aşırı bariyer yıkımından arteriyel hipertansiyonu sorumlu tutmamızı engellemektedir (Tablo 4-1). Tablo 2-5'de gösterildiği gibi; diyabet süresince santral sinir sistemi kan kapiller yoğunluğu ve kapiller membran kalınlığında değişiklikler rapor edilmiştir (Johnson ve ark. 1982, Jakobsen ve ark. 1987). İntravital mikroskopi ile yapılan deneyler, kortikal kapillerin azlığı ile kortikal dokuda arteriyovenöz şantı açığa çıkarmıştır. 5 aylık kontrol edilemeyen diyabetlilerde, damar bazal membran kalınlığında fokal değişiklikler bulunmuştur (Mc Cuskey PA ve Mc Cuskey RS 1984). Kapillerin azalması, bazal membranın kalınlığının artması ve arteriyo- venöz şant nöronal dokulara besin dağıtımını bozabilir, kötü ventilasyon veya azalmış perfüzyon basıncı hayvanları beyin hipoksik yaralanmalara yatkınlaştırabilir (Horani ve Mooradian 2003). Diabetes Mellitusdaki uzun süreli hiperglisemi, hipertansiyon, artmış oksidatif stresi dislipidemi, insülin direnci, ketoasidoz diyabette oluşan endotel hücre disfonksiyonuna katkıda bulunarak epileptik nöbetler sırasında KBB hasarının şiddetinin artmasına neden olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda tekrarlayan dozlarda uyguladığımız LPS'nin (5mg/kg, intraperitonal) uygulandıktan 24 saat sonra deneye alınan sıçanlarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman her üç beyin bölgesinde kan beyin bariyeri permeabilitesinde anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).

Lipopolisakkarid' in sistemik olarak yüksek dozlarda uygulanmasının kan beyin bariyeri'nde herhangi bir hasar meydana gelmediğini gösteren çalışmaların yanında (Bickel ve ark. 1998), *in vivo* ve *in vitro* uygulanmasının kan beyin bariyeri'nde hasar meydana getirdiğini gösteren çalışmalar vardır (de Vries ve ark. 1996; Singh ve Jiang 2004). Uygulanan LPS'nin farklı serotiplerinin kullanılması ve uygulama yollarının farklılığı traserlerin beyne geçişlerinin farklı değişikliklerle sonuçlanmasına neden olabilir.

Lipopolisakkarid grubunda, konvülziyon grubuna benzer şekilde, hem Zonula Okludens-1, hem de Glial Fibriller Asidik Protein'in boyanma şiddetinde artma tespit ettik. LPS'nin bu etkiside kan beyin bariyeri'ni koruyucu etki göstermiş olabilir. Arican ve ark.(2006)'nın bulguları da bizim çalışmamızın bulgularına paraleldir. Ancak, Papadopoulos ve ark (2001). LPS ile oluşturulan endotokseminin beyinde sıkı bağlantılara zarar vermeden ödeme neden olduğunu göstermiştir.

Ayrıca LPS uyguladığımız grupta, IL-12+ p40 düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir değişme gözlemlemedik ($p>0.05$). Bu da çalışmamızda uyguladığımız süre ve dozlarda LPS' nin IL-12+ p40 tarafından oluşturulan bir proinflamatuvar uyarı gerçekleşmediğini göstermektedir.

Araştırmamızın bir diğer bulgusu; normoglisemik koşullardaki epileptik nöbetlerde, LPS'nin KBB hasarını önemli ölçüde azalttığını saptadık ($p<0.01$). Bizim bulgularımıza parelel olarak, LPS'nin iskemik beyin hasarını azalttığı, hipertansiyon, radyasyon ve epileptik nöbetlerde kan beyin bariyeri'nde meydana gelen hasarı azalttığı yapılan deneysel modellerde gösterilmiştir (Mayhan 1998; Ahmed ve ark.2000; Kaya ve ark.2004; Ahishali ve ark.2005). Buna karşın, Sayyah ve ark. (2003) LPS uygulanmasının (1 mg/kg, i.p.) farelerde zamana bağlı olarak PTZ kaynaklı nöbetleri kolaylaştırdığını rapor etmiştir. LPS'nin, nöronal eksitabilitede değişiklik meydana getirdiğini gösteren çalışmaların yanında, Yuhas ve ark. (1995) ve Wang ve White (1999) ise LPS'nin tek başına uygulanmasından 6 veya 24 saat sonra PTZ kaynaklı nöbetleri etkilemediğini göstermiştir.

Araştırmamızda, LPS ve LPS+PTZ gruplarında TNF-α önemli derecede artma meydana geldiği saptadık ($p<0.01$). LPS uygulanması, gram negatif bakteriyel infeksiyonu taklit eder. LPS'nin, periferal dolaşımda, immun sistem hücrelerini proinflamatuvar sitokin salgılaması için (IL-1, IL-6, TNF-α) aktive ettiği bildirilmektedir (Davenpeck ve ark. 1998). Artan proinflamatuvar sitokinlerin, beyinde akut faz cevabı düzenlemek veya başlatmak için glial hücrelerden, IL-1, IL-6 gibi sitokinlerin salınımını uyardığı düşünülmektedir (Rothwell, 1997). TNF-α, kan beyin bariyerinden reseptör aracılı endositoz ile geçebilen proinflamatuvar sitokinlerden

biridir. TNF-α farklı süre ve konsantrasyonlarda uygulanması, santral sinir sisteminde, nörodejeneratif veya nöroprotektif etki gösterebilir. TNF-α' nın, astroglia aktivasyonu ve nörotrofik faktör salınımının uyarılması ve beyin kapiller dolaşımının ve periferal sinirlerin onarım işlemlerinin aktivasyonu gibi olaylarda yer alarak, beyin hücrelerini etki gösterdiği düşünülmektedir (Pan ve Kastin 2007). LPS'nin, epileptik nöbetlerde koruyucu etki göstermesinin bir diğer nedeni, TNF-α seviyesini artırması olabilir. Çünkü TNF-α beyin hücrelerini koruyucu etkileri yanında, beyinde süperoksid dismutaz upregülasyonunu artırmaktadır (Tartaglia ve Goeddel 1992). Bu durum, epileptik nöbetler sırasında artmış olan serbest radikallerin kan beyin bariyeri de meydana getirdiği hasarın azaltılmasına katkıda bulunabilir.

Ayrıca, TNF-α konsantrasyon artışı Glial Fibriller Asidik Protein aktivasyonun artmasına sebep olmaktadır (Liedtke ve ark.1996). LPS uyguladığımız sıçanlarda, TNF-α artışı, Glial Fibriller Asidik Protein aktivasyonun artmasına neden olarak LPS'nin koruyucu etki göstermesine katkıda bulunabilir.

Yine bu gruptaki sıçanların, Zonula Okludens-1 aktivitesinde, artış meydana gelmiştir. Bu artış, nöbetler sırasında kan beyin bariyeri permeabilitesinde koruyucu etki meydana gelmesine neden olan faktörlerden biri olabilir.

Araştırmamızda; LPS+PTZ grubunda, serum IL-10 seviyesinin kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttığını tespit ettik ($p<0.01$). Arıcan ve ark.(2006) LPS ile birlikte PTZ oluşturulan epileptik nöbetlerde, anlamlı ölçüde artan nitrik oksit ve IL-6'nın LPS'nin, epileptik nöbetlerdeki koruyucu etkisine aracı olabileceğini ileri sürmüşlerdir. IL-10 da IL-6 gibi anti inflamatuar sitokinlerden biridir, proinflamatuvar sitokin üretimini azaltarak, inme sonrası beyin hasarını azalttığı gösterilmiştir (Grilli ve ark.2000). Bizim çalışmamızda da; IL-10, LPS+PTZ grubunda, kan beyin bariyeri permeabilitesini koruyucu etki sağlamış olabilir.

Hem LPS+Akut Hiperglisemi+PTZ grubunda hem de LPS+Diyabet+PTZ grubunda Evans-blue albumin ekstravazasyonu Akut Hiperglisemi+PTZ ve Diyabet+PTZ grupları ile karşılaştırıldığı zaman anlamlı bir fark saptanmadı. Bu da LPS'nin akut hiperglisemik ve diyabetik nöbet geçiren sıçanlarda koruyucu bir etki

meydana getirmediğini göstermektedir. LPS normoglisemik koşullarda oluşturulan nöbetlerde, kan beyin bariyeri yıkımını önemli ölçüde azaltırken, akut ve uzun süreli hiperglisemideki nöbetlerde bu etkisinin görülmemesi, hipergliseminin bariyer ve nöronlar için ciddi bir travma oluşturduğunu düşündürmektedir.

Ayrıca hem LPS+Akut Hiperglisemi+PTZ grubunda, hem de LPS+Diyabet+PTZ gruplarında, Akut Hiperglisemi+PTZ ve Diyabet+PTZ gruplarında olduğu gibi Zonula Okludens-1 ve Glial Fibriller Asidik Protein boyanma şiddetinde artış saptandı. Bu etki LPS'nin, PTZ'nin veya her ikisinin birden etkisiyle meydana gelmiş olabilir. Bu da bu gruplarda artan permeabiliteden zonula nokludens-1'in yer aldığı parasellüler yolun ve Glial Fibriller Asidik Proteinin major rol oynamadığını göstermektedir. Bu yüzden Akut Hiperglisemik ve diyabetik epileptik nöbet geçiren sıçanlarda kan beyin bariyeri permeabilitesinde meydana gelen değişikliğin sebebinin pinositotik aktivitenin artışı veya transsellüler yolda meydana gelebilecek hasardan kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak;

1-Araştırmamızda, Akut Hiperglisemi ve Diyabet grubunda oluşturulan konvülziyonlar, normoglisemik koşullarda oluşturulan konvülziyonlar ile karşılaştırıldığı zaman, hiperglisemi her iki grupta da ciddi bariyer yıkımına neden olmaktadır. Bu gruplar, kan beyin bariyeri yıkımının en fazla gerçekleştiği gruplardır. (Şekil 4-2). Hiperglisemi, bu yönüyle, hem beyin kapiller endotel hücreleri için, hem de nöronlar için ciddi bir patolojidir.

2-Lipopolisakkarid normoglisemik koşullarda oluşturduğumuz, konvülziyonlarda önemli ölçüde kan beyin bariyeri yıkımını önlerken, Hiperglisemik ve diyabetik sıçanlardaki konvülziyonlarda bu etkiyi göstermemiştir. Bu da, Hiperglisemi' nin nöronlar üzerinde hem de beyin endotel hücreleri üzerinde oluşturduğu hasarı LPS' nin önleyemediği sonucunu göstermiştir.

3-Akut Hiperglisemi ve Diyabet grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman kan beyin bariyeri permeabilitesinde Evans-blue miktarları yönünden anlamlı bir fark bulunmamasına rağmen, hipergliseminin hem akut hem de uzun süreli uygulanması

kan beyin bariyerinde en önemli sıkı bağlantılarından biri olan, Zonula Okludens-1 i azaltarak, kandan beyine madde geçişinde önemli olan, parasellüler geçişin bozulmasına neden olmaktadır görüşündeyiz (Şekil 2-3).

4-Diyabet grubunda, Glial Fibriller Asidik Proteinin azalması da, astrositlerin fonksiyonlarının uzun süreli hiperglisemik ortamda bozulmasına neden olabilir.

5- Araştırma sonuçlarımıza göre, konvülziyonlarda kan beyin bariyeri yıkımından sorumlu mekanizmada 'tight junction' ların açılmadığı, konvülziyonlarda parasellüler yolun korunduğu buna karşılık; pinositotik aktivitenin artarak bariyer yıkımına neden olduğu görüşünün önem kazandığını vurgulayabiliriz. Çünkü, nöbetler sırasında, Zonula Okludens-1 proteininin arttığını tespit ettik. Zonula Okludens-1 parasellüler yolun korunmasında son derece önemli bir proteindir.

6- Lipopolisakkarid' in, TNF-α ve IL-10 sitokin seviyelerini önemli ölçüde artırdığını, buna karşın IL-12+p40 sitokin seviyesinde önemli bir değiikliğe neden olmadığını tespit ettik. Bu da, LPS' nin normoglisemik nöbet geçiren sıçanlarda kan beyin bariyerini koruyucu etkisine katkıda bulunmuş olabilir.

7- Konvülziyonların, IL-12+p40 sitokin seviyesinde artma meydana getirerek proinflamatuvar uyarıyı tetiklediğini saptadık.

KAYNAKLAR

Abbott, N.J., ve Revest, P.A. (1991). Control of brain endothelial permeability. *Cerebrovascular and brain metabolism reviews, 3,* 39

Abraham, C.S., Deli, M.A., Joo, F., Megyeri, P., ve Torpier, G. (1996). Intracarotid tumor necrosis factor-alpha administration increases the blood-brain barrier permeability in cerebral cortex of the newborn pig: quantitative aspects of double-labelling studies and confocal laser scanning analysis. *Neuroscience Letters, 19,*85-88.

Afsari, Z.H., Renno, W.M., ve Abd-El-Basset, E. (2008). Alteration of glial fibrillary acidic proteins immunoreactivity in astrocytes of the spinal cord diabetic rats. *Anatomical Record (Hoboken), 291,* 390-399.

Ahishali, B., Kaya M, Kalayci R, Uzun H, Bilgic B, Arican N, ve ark. (2005). Effects of lipopolysaccharide on the blood-brain barrier permeability in prolonged nitric oxide blockade-induced hypertensive rats. *International Journal of Neuroscience,115*, 151-168.

Ahmed S.H., He, Y.Y., Nassief, A., Xu, J., Xu, X.M., Hsu, C.Y., Faraci, F.M.,ve ark.(2000). Effects of lipopolysaccharide priming on acute ischemic brain injury. *Stroke, 31,* 193–199.

Akira, S., Takeda, K.,ve Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology,2,* 675–680.

Alm, P., Sharma, H.S., Hedlund,S., Sjoquist,P.O., ve Weatman, J. (1998)Nitric oxide in the pathophysiolgy of hyperthermic brain injury. Influence of a new anti-oxidant compound H-290/51. A pharmacological study using immunohistochemistry in the rat. *Amino Acids. 14*, 95-103

Altan, N., Yiğit, Ş., Elmalı, E., Malhatun, E., Rota, S., ve Kılıç, N. (1997) Effects of the Sulfonylurea Glyburide on Superoxide Dismutasein Streptozotocine-Induced Diabetic Rat Muscle. *General Pharmacology, 28*(5), 795-96.

Arican, N., Kaya, M., Kalayci, R., Kucuk, M., Cimen, V., ve Elmas, I. (2002). Effects of acute cold exposure on blood-brain barrier permeability in acute and chronic hyperglycemic rats. *Forensic science international, 18,*137-141.

Arican, N., Kaya, M., Kalayci, R., Uzun, H., Ahishali, B., Bilgic, B., ve ark. (2006). Effects of lipopolysaccharide on blood-brain barrier permeability during pentylenetetrazole-induced epileptic seizures in rats. *Life Science, 30,* 1-7

Arieff, A.I., ve Kleeman, C.R. (1973) Studies on mechanisms of cerebral edema in diabetic comas: effects of hyperglycemia and rapid lowering of plasma glucose in normal rabbits. *Journal Clinical Investigation, 52,* 571-583

Asnaghi, V., Gerhardinger, C., Hoehn, T., Adeboje, A., ve Lorenzi, M. (2003).A role for the polyol pathway in the early neuroretinal apoptosis and glial changes induced by diabetes in the rat. *Diabetes, 52,* 506–511.

Baba, Y., Kai, M., Kamada, T., Setoyama, S. ve Otsuji, S. (1979). Higher levels of erythrocyte microviscosity in diabetes, *Diabetes, 28,* 1138–1140.

Barber, A.J., Antonetti, D.A., ve Gardner, T.W. (2000). Altered expression of retinal occludin and glial fibrillary acidic protein in experimental diabetes. *The Penn State Retina Research Group.Investigative ophthalmology & visual science, 41,* 3561-3568.

Bates, D., Weinshiltboum, R.M., Campbell, R.J. ve Sundt, M.T., (1977). The effect of lesions in the locus coeruleus on the physiological responses of the cerebral blood vessels in rats, *Brain Research, 136*, 431–443

Bazzoni, G., Martinez-Estrada, O.M., Orsenigo, F., Cordenonsi, M., Citi S, ve Dejana, E. (2000) Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *The Journal of biological chemistry; 275*(27), 20520-20526.

Ben-Menachem, E., Johansson, B.B., ve Svensson, T.H. (1982). Increased vulnerability of the blood–brain barrier to acute hypertension following depletion of brain noradrenaline. *Journal of neural transmission, 53,*159–167.

Bendayan, R., Lee, G., ve Bendayan, M. (2002) Functional expression and localization of P-glycoprotein at the blood brain barrier. *Microscopy research and technique, 57,* 365-380

Betz, A.L., Firth, J.A., ve Goldstein, G.W. (1980).Polarity of the blood-brain barrier: distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells. *Brain Research,1 ,* 17-28

Betz,A.L.,ve Goldstein,G.W.(1986). Specialized properties and solute transport in brain capillaries. *Annual review of physiology,* 48, 241-250

Bickel, U., Grave, B., Kang, Y.S., del Rey, A., ve Voigt, K.(1998). No increase in blood–brain barrier permeability after intraperitoneal injection of endotoxin in the rat. *Journal of Neuroimmunology, 85,* 131–136.

Bierhaus, A., Chevion, S., Chevion, M., Hofmann, M., Quehenberger, P., Illmer, T., ve ark. (1997) Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes 46*(9), 1481-1490.

Biessels, G.J., Kappelle, A.C., Bravenboer, B., Erkelens, D.W., ve Gispen W.H (1994). Cerebral function in diabetes mellitus. *Diabetologia, 37*(7), 643-650.

Bonnefont-Rousselot, D. (2002) Glucose and reactive oxygen species. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care 5*(5), 561-568.

Boje, K.M. (1995) Cerebrovascular permeability changes during experimental meningitis in the rat. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 274(3),*1199-1203.

Bolwig, T.G., Hertz, M.M., Holm-Jensen, J. (1977) The permeability of the blood-brain barrier during electroshock seizures in the rat. *European journal of clinical investigation,7,*951

Bolwig, T.G. (1978). Increased permeability to horseradish peroxidase across cerebral vessels, evoked by electrically induced seizures in the rat. *Acta Neuropathology (Berlin), 41,*73

Bolwig TG, (1989) Epileptic seizures and the blood-brain barrier. *Plenum Medical Book Company* New York and London S, 567

Bradbury, M.W., Lightman, S.L., Yuen, L., ve Pinter, G.G. (1991).Permeability of blood-brain and blood-nerve barriers in experimental diabetes mellitus in the anaesthetized rat. *Experimental Physiology, 76,* 887-898.

Brett, F.M., Mizisin, A.P., Powell, H.C., Campbell, I.L. (1995). Evolution of neuropathologic abnormalities associated with blood-brain barrier breakdown in transgenic mice expressing interleukin-6 in astrocytes. *Journal of neuropathology and experimental neurology, 54*(6), 766-75.

Brightman, M.W., ve Reese, T.S. (1969). Junctions between intimately opposed cell membranes in the vertebrate brain. *Journal of Cell Biology, 40,* 207-217.

Broman, T., Gröntoft, O., ve Steinwall, O.(1965). Comparative intravital and postmortem studies on chemically induced blood-brain barrier damage tested with trypan blue. *Acta neurologica Scandinavica, 41*, 527-538.

Brownlee, M. (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature 414,* (6865), 813-820.

Bukan, N., Sancak, B., Bilgihan, A., Kosova, F., Buğdaycı, G., ve Altan N (2004) The effects of the sulfonylurea glyburide on glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase activities in the heart tissue of streptozotocin-induced diabetic rat. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology 26*(7),519-522.

Butt, A.M., Jones, H.C., ve Abbott, N.J. (1990). Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *Journal of Physiology,429,*47-62.

Cao, C., Watanabe, Y., Yamagata, K., ve K. Matsumura (1997). Involvement cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPS in the rat brain, *American Journal of Physiology, 27,2* 1712–1725.

Chan, P.H., ve Fishman,R.A. (1984). The role of arachidonic acid in vasogenic brain edema. *Federation proceedings*, 43, 210-213

Chappey, O., Dosquet, C., Wautier, M.P., Wautier, J.L. (1997). Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions.*European Journal of Clinical Investigation. 27*(2), 97-108.

Chaudhuri, J.D. (2000) Blood brain barrier and infection. *Medical science monitor,* 6, 1213-1222.

Chehade, J.M., Haas, M.J.,.ve Mooradian, A.D (2002) Diabetes-related changes in rat cerebral occludin and zonulaoccludens-1 (ZO-1) expression, *Neurochemical. Research, 27,* 249– 252.

Cipolla, M.J., Crete, R., Vitullo, L., Rix, R.D. (2004). Transcellular transport as a mechanism of blood–brain barrier disruption during stroke. *Frontiers in Bioscience, 9*, 777–785.

Citi, S., ve Cordenonsi, M.(1998). Tight junction proteins. *Biochimica et biophysica acta,19,*1448(1),1-11.

Clough, G., ve Michel, C.C. (1981). The role of vesicles in the transport of ferritin through frog endothelium. *Journal of Physiology. 315*, 127-142

Cohen, Z., Molinatti, G., ve Hamel, E. (1997) Astroglial and vascular interactions of noradrenaline terminals in the rat cerebral cortex. *Journal of cerebral blood flow and metabolism, 17,* 894–904

Coleman, E., Judd, R., Hoe, L., Dennis, J., ve Posner, P. (2004). Effects of diabetes mellitus on astrocyte GFAP and glutamate transporters in the CNS. *Glia, 48,*166–178.

Coomber, B.L., ve Stewart, P.A. (1985). Morphometric analysis of CNS microvascular endothelium. *Microvascular Research, 30,* 99-115.

Cordenonsi, M., D'Atri ,F., Hammar, E., Parry, D.A., Kendrick-Jones, J., Shore, D., ve ark.(1999). Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *The Journal of cell biology, 147*(7), 1569-1582.

Cornford, E.M., Hyman, S., Cornford, M.E., Landaw, E.M., ve Delgado-Escueta, A.V.(1998) Interictal seizure resections show two configurations of endothelial Glut1 glucose transporter in the human blood-brain barrier. *Journal of cerebral blood flow and metabolism,18*, 26-42.

Correale, J., Rabinowicz, A.L., Heck, C.N., Smith, T.D., Loskota, W.J., ve DeGiorgio, C.M. (1998). Status epilepticus increases CSF levels of neuron-specific enolase and alters the blood-brain barrier. *Neurology ,50,* 1388

Das, K., ve Chainy, G.B.N. (2001). Modulation of rat liver mitochondrial antioxidant defense system by thyroid hormone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease 1537*(1), 1-13.

Davenpeck, K.L., Zagorski, J., Schleimer, R.P., ve Bochner, B.S. (1998) Lipopolysaccharide- induced leukocyte rolling and adhesion in the rat mesenteric microcirculation: regulation by glucocorticoids and role of cytokines. *Journal of Immunology, 161,* 6861– 6870

de Vries, H.E., Blom-Roosemalen, M.C., van Oosten, M., de Boer, A.G., van Berkel T.J., Breimer, D.D., ve ark. (1996) The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *Journal of Neuroimmunology, 64,*(1):37-43.

de Vries, H.E., Blom-Roosemalen, M.C., de Boer, A.G., van Berkel, T.J., Breimer, D.D., ve Kuiper, J. (1996). Effect of endotoxin on permeability of bovine cerebral endothelial cell layers in vitro. *Journal Pharmacology Experimental Therapeutics, 277*, 1418–1423.

de Vries, H.E., Kuiper, J., de Boer, A.G., Van Berkel, T.J., ve Breimer, D.D. (1997). The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases, *Pharmacological Reviews, 49,*143-155.

del Vecchio, M., Bajetta, E., Canova, S., Lotze, M.T., Wesa, A., Parmiani G,ve ark.(2007) Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clinical cancer research, 13(16),* 4677-4685.

del Zoppo, G.J., ve Hallenbeck, J.M. (2000) Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thrombosis research, 98*, 73–81

del Zoppo, G., Ginis, I., Hallenbeck, J.M., Iadecola, C., Wang, X., ve Feuerstein, G.Z.(2000) Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia.*Brain Pathology,* 10, 95-112.

Dinçer, Y., Akçay. T., Alademir, Z., ve İlkova, H. (2002) Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism 51*(10), 1360-1362.

Ditzel, J.ve Junker, K. (1972) Abnormal glomerular filtration rate, renal plasma flow and renal protein excretion in recent and short-term diabetes. *British medical journal, 1,* 13–19

Dobrogowska, D.H., Lossinsky, A.S., Tarnawski, M., Vorbrodt, A.W. (1998). Increased blood-brain barrier permeability and endothelial abnormalities induced by vascular endothelial growth factor. *Journal of neurocytology, 27*(3),163-73.

Dore-Duffy, P., Owen, C., Balabanov, R., Murphy, S., Beaumont, T., ve Rafols, J.A. (2000) Pericyte migration from the vascular wall in response to traumatic brain injury. *Microvascular Research 60,* 55–69

Eidland, A., Sebekova, K., ve Schinzel, R. (2001) Advanced glycation end products and the progressive course of renal disease. *American Journal of Kidney Diseases, 38* (4), 100-106.

Eng, L.F., Ghirnikar, R.S., ve Lee, Y.L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty one years (1969–2000). *Neurochemical Research, 25,*1439–1451.

Ennis, S.R.,ve Betz, A.L.(1986). Sucrose permeability of the blood-retinal and blood-brain barriers. Effects of diabetes, hypertonicity, and iodate. *Investigative ophthalmology & visual science, 27,*1095-1102

Farquhar, M.G., ve Palade, G.E. (1963). Junctional complexes in various epithelial. *The Journal of cell biology ,17,* 375– 412

Flier, J.S., Mueckler, M., McCall, A.L., Lodish, H.F.(1987) Distribution of glucose transporter messenger RNA transcripts in tissues of rat and man. *The Journal of clinical investigation, 79*(2), 657-661.

Fouyas, I.P., Kelly, P.A., Ritchie, I.M., Lammie, G.A., ve Whittle, I.R. (2003). Cerebrovascular responses to pathophysiological insult in diabetic rats, *Journal of clinical neuroscience, 10* (1), 88– 91.

Furuse, M., Sasaki, H., ve Tsukita, S. (1999) Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *The Journal of cell biology 147*, 891–903

Giardino, I., Edelstein, D., Brownlee, M. (1996). Bcl-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation end products in bovine endothelial cells. *The Journal of Clinical Investigation, 97*, 1422-1428.

Giardino, I., Fard, A.K., Hatchell, D.L., ve Brownlee, M. (1998) Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes, 47,* 1114-1120.

Gillery, P., Monboisse, J.C., Maquart, F.X., ve Borel, J.P. (1988). Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabetes 14*(1), 1114-1120.

Gillies, M.C., Su, T., Stayt, J., Simpson, J.M., Naidoo, D., ve Salonikas, C. (1997). Effect of high glucose on permeability of retinal capillary endothelium in vitro. *Investigative ophthalmology & visual science* 38,635-642.

Ginsberg, M.D., Busto, R., ve Harik, S.I. (1985).Regional blood-brain barrier permeability to water and cerebral blood flow during status epilepticus: Insensivity to norepinephrine depletion. *Brain Research, 337,*59

Gjedde, A., ve Crone, C. (1981). Blood-brain glucose transfer: repression in chronic hyperglycemia, *Science, 214,* 456–457.

Goldmann, E.E.(1913) Vitalfarbung am Zentral nerven system. *Abh Preuss Akademic Wiss Physial Klass Mathematical Techinal,*11-60.

Gonul, E., Duz, B., Kahraman, S., Kayali, H., Kubar, A., ve Timurkaynak, E. (2002) Early pericyte response to brain hypoxia in cats: an ultrastructural study. *Microvascular Research, 64,*116–119;

Grene, D.A., Lattimer, S.A., ve Sima A.A.F (1987) Sorbitol, phosphoinositides and sodium-potasium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *The New England Journal of Medicine 316*(10), 599-606.

Gren, K., Brand, M.D., ve Murphy, M.P. (2004) Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes, 53, (1),* 110-118.

Grilli, M., Barbieri, I., Basudev, H., Brusa, R., Casati, C., Lozza, G., ve ark. (2000) Interleukin-10 modulates neuronal threshold of vulnerability to ischaemic damage. *The European journal of neuroscience, 12*(7), 2265-2272.

Gutierrez, E.G., Banks,W.A.,ve Kastin, A.J., (1993). Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse. *Journal of neuroimmunology, 47,* 169–176.

Habib, M.P., Dickerson, F. ve Mooradian, A.D.(1994). Effect of diabetes,insulin and glucose on lipid peroxidation in the rat,*Metabolism, 43,* 1442–1445.

Halliwell, B. (1984). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *The Lancet, 23*, 1396-1398.

Harik,S.I. (1986). Blood-brain barrier sodium/potassium: Modulation by central noradrenergic innervation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 83,* 4067-4070.

Hashizume, K., Tanaka, T, ve Yonemasu, Y. (1998). Change in cerebral glucose metabolism during limbic seizures elicited from lateral septal nucleus. *Epilepsy Research, 30,*167

Haskins, J., Gu, L., Wittchen, E.S., Hibbard, J., ve Stevenson, B.R.(1998). ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *The Journal of cell biology, 141*, 199-20.

Havrankova J, Roth J, ve Brownstein M. (1978). Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature,27*, 272827-829.

Hawkins, B.T., ve Davis T.P. (2005). The blood–brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacological in Reviews, 57,*173–185

Hirase, T., Staddon, J.M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Itoh, M., Furuse, M., ve ark. (1997) Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *Journal of cell science,110,* 1603–1613

Hopkins, S.J., ve Rothwell, N.J. (1995).Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends in neurosciences, 18*(2):83-88

Horani, M.H., ve Mooradian, A.D. (2003). ,Effect of diabetes on the blood brain barrier. *Current pharmaceutical design, 9*, 833-840.

Huber, J.D., Egleton, R.D., ve Davis, T.P. (2001). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends in neurosciences*, 24(12):719-725.

Idris, I., Gray, S., ve Donnelly, R. (2004). Protein kinase C-beta inhibition and diabetic microangiopathy: effects on endothelial permeability responses in vitro. *European journal of pharmacology, 485*, 141–144.

Jakobsen, J., Malmgren, L., ve Olsson, Y. (1978). Permeability of the blood-nerve barrier in the streptozotocin-diabetic rat. *Experimental Neurology,60,* 277-285.

Jakobsen, J., Knudsen, G.M. ve Juhler, M.(1987). Cation permeability of the blood–brain barrier in streptozotocin diabetic rats, *Diabetologia, 30,* 409–413.

Jakobsen, J., Sideius, P., Gundersen, H.J.G, ve Østerby, R (1987) Quantitative changes in cerebral neocortical structure in insulin-treated long-term streptozotocin-diabetic rats. *Diabetes, 36,* 597–601;

Johansson,B.B. (1983). The blood-brain barrier and cerebral blood flow in acute hypertension. Acta medica Scandinavica. Supplementum, 678:107-112.

Johnson, P.C., Brendel, K., ve Meezan, E. (1982) Thickened cerebral cortical capillary basement membranes in diabetics. *Archives of pathology & laboratory medicine, 106,* 214–217.

Joo, F. (1993). The role of second messenger molecules in the regulation of permeability in the cerebral endotelial cells. *Advances in experimental medicine and biology, 3311*,155-164.

Joyner, W.L., Mahyan, W.G., Johnson, R.L., ve Phares, C.K. (1981). Microvascular alterations develop in Syrian hamsters after the induction of diabetes mellitus by streptozotocin.*Diabetes, 30*(2),93-100

Karapanayiotides, T., Piechowski-Jozwiak, B., van Mele, G., Bogousslavsky, J., ve Devuyst G. (2004). Stroke patterns, etiology, and prognosis in patients with diabetes mellitus. *Neurology* ,62, 1558–1562.

Katz., M.A. ve McNeill, G. (1987). Defective vasodilation response toexercise in cutaneous precapillary vessels in diabetic humans, *Diabetes, 36*, 1386–1396.

Kaya, M., Cimen, V., Kalayci, R., Kucuk, M., Gurses, C., Arican, N. ve ark.(2002). Catalase and alpha-tocopherol attenuate blood-brain barrier breakdown in pentylenetetrazole-induced epileptic seizures in acute hyperglycaemic rats. *Pharmacological Research, 45,*129-133.

Kaya, M., Palanduz, A., Kalayci, R., Kemikler, G., Simsek, G., Bilgic, B.,ve ark. (2004). Effects of lipopolysaccharide on the radiation-induced changes in the blood–brain barrier and the astrocytes. *Brain Research, 1019,* 105–112.

Knudsen, G.M., Gobel, U., Paulson, O.B. ve Kuschinsky, W., (1991) Regional density of perfused capillaries and cerebral blood flow in untreated short-term and long-term streptozotocin diabetes, *Journal of cerebral blood flow and metabolism, 11,* 361–365.

Lacaz-Vieira, F., Jaeger, M.M.M., Farshori, P., ve Kachar, B., (1999). Small synthetic peptides homologous to segments of the first loop of occludin impair tight junction resealing. *The Journal of membrane biology,168,* 289– 297.

Lagrange, P., Romero, I.A., Minn,A.,ve Revest,P.A. (1999). Transendothelial permeability changes induced by free radicals in an in vitro model of the blood-brain barrier. Free radical biology & medicine, 27, 667-672

Lai, C.H., ve Kuo, K.H. (2005) The critical component to establish in vitro BBB model: pericyte. *Brain Research, 50,*258–265

Lee, J.C, ve Olszewski, J. (1961) Increased cerebrovascular permeability after repeated electroschocks. *Neurology,11,* 515

Lee, I.K., Kim, H.S., ve Bae, J.H. (2002). Endothelial dysfunction: its relationship with acute hyperglycemia and hyperlipidemia. *International journal of clinical practice,*59–64

Lending, M., Slobody, L.B., ve Mestern, J. (1969). Effect of prolonged convulsion on the blood-cerebrospinal fluid barrier. *American Journal of Physiology, 197,* 465

Librizzi, L., Janigro, D., De Biasi, S, ve de Curtis M.(2001). Blood-brain barrier preservation in the in vitro isolated guinea pig brain preparation. *Journal of neuroscience research,15,* 289-297.

Liedtke, W., Edelmann, W., Bieri, P.L. , Chiu, F.C., Cowan, N.J. Kucherlapati R., ve ark.(1996). GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron, 17,* 607–615.

Lorenzi, M., Healy, D.P., Hawkins, R., Printz, J.M., Printz, M.P. (1986) Studies on the permeability of the blood-brain barrier in experimental diabetes. *Diabetologia, 29,* 58-62.

Lorenzo, A.V., Shirahige, I., Liang, M. ve Barlow, C.F. (1972). Temporary alteration of cerebrovascular permeability to plasma protein during drug-induced seizures. *American. Journal of Physiology*, *223*, 268

Lorenzo, A.V., Hedley-Whyte, E.T., Eisenberg, H.M., ve Hsu, D.W. (1975). Increased penetration of hoseradish peroxidase across the blood-brain barrier induced by metrazole seizures. *Brain Research, 88*,136.

Lossinsky, A.S., ve Shivers, R.R. (2004). Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions. *Histology and histopathology* 19:535-564

Lutz, A.J., ve Pardridge, W.M. (1993). Insulin therapy normalizes GLUT1 glucose transporter mRNA but not immunoreactive transporter protein in streptozocin-diabetic rats. *Metabolism. 42*(8), 939-44.

Mans, A.M., DeJoseph, M.R., Davis, D.W., ve Hawkins, R.A.(1987) Regional amino acid transport into brain during diabetes: effect of plasma amino acids. *American Journal of Physiology, 253*(5):575-83

Maritim, A.C., Sanders, R.A., Watkins, III J.B. (2003) Diabetes, oxidative stress and antioxidants: *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 17*(1), 4-38.

Mark, K.S. ve Davis, T.P. (2002) Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia-reoxygenation. *American Journal of Physiology, Heart Circulation Physiology, 282,*1485–1494.

Martìn-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P.,ve ark. (1998) Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *The Journal of cell biology, 142*, 117–127

Matthaei, S., Horuk, R., Olefsky, J.M. (1986). Blood-brain glucose transfer in diabetes mellitus. Decreased number of glucose transporters at blood-brain barrier. *Diabetes, 35*(10),1181-4

Mayhan, W.G. (1989). Impairment of endothelium-dependent dilatation of cerebral arterioles during diabetes mellitus, *American. Journal of Physiology, 256*, 621–625.

Mayhan, W.G. (1990). Effect of diabetes mellitus on disruption of the blood-brain barrier during acute hypertension. *Brain Research, 26,* (534)106-110.

Mayhan, W.G., Simmons, L.K. ve Sharpe, G.M., (1991). Mechanism of impaired responses of cerebral arterioles during diabetes mellitus. *American Journal of Physiology,*260, 319–326)

Mayhan, W.G., ve Faraci, F.M.(1993) Responses of cerebral arterioles in diabetic rats to activation of ATP-sensitive potassium channels, *American Journal of Physiology, 265*, (1) 152–157.

Mayhan, W.G. (1998). Effect of lipopolysaccharide on the permeability and reactivity of the cerebral microcirculation: role of inducible nitric oxide synthase. *Brain Research, 792* 353–357

McCall, A., Millington, W.R., Wurtman, R.J. (1982) Metabolic fuel and amino acid transport into the brain in experimental diabetes mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America ,79,* 5406–5454;

McCall, AL.(1992). The impact of diabetes on the CNS. *Diabetes, 41*(5),557-570

McCuskey, P.A., ve McCuskey, R.S. (1984). In vivo and electron microscopic study of the development of cerebral diabetic microangiography. *Microcirculation Endothelium Lymphatics, 1*(2),221-44

Mitic, L.L, ve Anderson, J.M (1998) Molecular architecture of tight junctions. *Annual review of physiology, 60,* 121–142.

Mooradian, A.D., Morley, J.E. ve Scarpace, P.J., (1988). The role of zinc status in altered cardiac adenylate cyclase activity in diabetic rats. *Acta Endocrinology*, 119 176–180.

Mooradian, A.D., ve Morin, A.M. (1991). Brain uptake of glucose in diabetes mellitus. The role of glucose transporters, *The American journal of the medical sciences,301*, 173-177.

Mooradian, A.D., Grabau, G. ve Bastani, B., (1994) Adenosine triphosphatases of rat cerebral microvessels. Effect of age and diabetes mellitus, *Life Science, 55,* 1261–1265.

Mooradian, A.D., Pinnas, J.L., Lung, C.C., Yahya, M.D., ve Meredith, K.(1994). Diabetes-related changes in the protein composition of rat cerebral microvessels, *Neurochemical. Research*, 19, 123–128

Mooradian, A.D., (1995). The antioxidative potential of cerebral microvessels in experimental diabetes mellitus, *Brain Research, 671, 164–169.*

Mooradian, A.D. (1997) Central nervous system complicationsof diabetes mellitus; a perspective from the blood brain barrier. *Brain Research, 23,* 210–218;

Morrison, R.S., De Vellis, J., Lee, Y.L, Bradshaw, R.A., ve Eng, L.F. (1985). Hormones and growth factors induce the synthesis of glial fibrillary acidic protein in rat brain astrocytes. *J Neuroscience Research, 14,*167–176.

Moshe, S.I. (1998). Brain injury with prlonged seizures in children and adults. *Journal of child neurology, 13* (1):3

Mueller, S.M., ve Luft, F.C. (1982) The blood-brain barrier in renovascular hypertension. *Stroke.;13(2),* 229-234.

Neuwelt, E.A. (2004). Mechanisms of disease: The blood-brain barrier. *Neurosurgery,54*,131-142

Nicole, N.R., Day, J.R., Laping, N.J., Johnson, S.A., ve Finch. C.E. (1993).GFAP mRNA increases with age in rat and human brain. *Neurobioloy in Aging,14,* 421–429.

Nitsch C, ve Klatzo I (1983).Regional patterns of blood-brain barrier breakdown during epileptiform seizures induced by various convulsive agents. *Journal of the neurological sciences, 59,*305

Nitsch, C., Goping, G., Laursen, H., ve Klatzo, I. (1986). The blood-brain barrier to horseradish peroxidase at the onset of biculline-induced seizures in hypothalamus, pallidum, hippocampus, and other selected regions of the rabbit. *Acta Neuropathology, 69,*1

Nitsch, C., Suzuki, R., Fujiwara, K. ve Klatzo I (1985). Incongruence of regional cerebral blood flow increase and blood-brain barrier opening in rabbits at the onset of seizures induced by bicuculline, methopyridoxine and kainic acid. *Journal of the neurological sciences 67,*67

Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., ve ark.(2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *The Journal of cell biology 161*,653-660

Nusrat, A., Turner, J.R., ve Madara, J.L. (2000.) Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology; 279*,851-857.

Oldendorf, W.H., Brown, W.J.(1975) Greater number of capillary endothelial cell mitochondria in brain than in muscle. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.149,*736-738.

Osicka, T.M., Russo, L.M., Qiu, M.L., Brammar, G.C., Thallas, V., Forbes, J.M. ve ark. (2003). Additive effects of hypertension and diabetes on renal cortical expression of PKC alpha and epsilon and alpha tubulin but not PKC beta 1 and beta 2. *Journal of hypertension, 21*, 2399–2407

Oztas, B., ve Kaya, M. (1991) Blood-brain bariyer permeability during acute and chronic electroconvulsive seizures. *Polish journal of pharmacology and pharmacy , 43,* 259

Oztas,B.(1994).Cinsiyetin beyin fonksiyonları ve kan-beyin bariyeri permeabilitesine etkisi. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*, *4*, 1-6

Oztas, B.,ve Küçük M. (1995). Influence of acute arterial hypertension on blood-brain barrier permeability in streptozocin-induced diabetic rats. *Neuroscience Letters, 16*, (188)53-56

Paemeleire, K. (2002) The cellular basis of neurovascular metabolic coupling. *Acta neurologica Belgica,102,* 153–157.

Pan, W., ve Kastin, A.J. (2007). Tumor necrosis factor and stroke: role of the blood-brain barrier. *Progress in Neurobiology. 83,*363-374.

Papadopoulos, M.C., Saadoun, S., Woodrow, C.J., Davies, D.C., Costa- Martins, P., Moss, R.F.ve ark.(2001). Occludin expression in microvessels of neoplastic and non-neoplastic human brain, *Neuropathology and applied neurobiology, 27,* 384–395.

Pelligrino, D., Almquist L.O., ve Siesjö B.K. (1981). Effects of insulin-induced hypoglycemia on intracellular pH and impedance in the cerebral cortex of the rat. *Brain Research, 221,* 129-47.

Petito, C.K., Schaefer, J.A. ve Plum F (1977) Ultrastructural characteristics of the brain blood-brain barrier in experimental seizures. *Brain Research, 127,* 251

Plum, F., Posner, J.B., ve Troy, B. (1968). Cerebral metabolic and circulatory responses to induced convulsion in animals. *Archives of neurology, 18,*1

Pollay, M., ve Roberts, P.A. (1980) Blood-brain barrier: a definition of normal and altered function. *Neurosurgery, 6*(6):675-85.

Raetz, C.R., ve Whitfield C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual review of biochemistry, 71,* 635-700

Rapoport, S.I., (1976). Blood-brain barrier in physiology and medicine. *Raven Press,* New York

Rawson, R.A. (1943). The binding of T-1824 and structurally related diazo dyes by the plasma proteins. *American. Journal of Physiology, 138,* 708-717

Reagan, L.P., Rosell, D.R., Alves, S.E., Hoskin, E.K., McCall, A.L., Charron, M.J. ve ark. (2002). GLUT8 glucose transporter is localized to excitatory and inhibitory neurons in the rat hippocampus. *Brain Research, 932,* (1–2)129–134)

Rechthand, E., Smith, Q.R., Latker, C.H., ve Rapoport, S.I. (1987). Altered blood-nerve barrier permeability to small molecules in experimental diabetes mellitus. *Journal of neuropathology and experimental neurology, 46*(3),302-314.

Reese, T.S., ve Karnovsky MJ. (1967). Fine Structural Localization of A Blood Brain Barrier to Exogenous Peroxidase. *Journal of Cell Biology, 40, 648*-677,

Reeves, S.A., Helman, L.J., Allison, A., ve Israel, M.A. (1989). Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 86* (13): 5178–5182.

Rigaud, A.S., Pinard, E., Borredon, J., ve Seylaz, J. (1990) Effect of chronic cervical sympathectomy on local cerebral blood flow during limbic seizures in rat. *Brain Research, 532,*347

Rikans, L.E. (1981). Effect of alloxan diabetes on rat liver ascorbic acid. *Hormone and metabolic research, 13*(2):123

Rivest, S., Lacroix, S., Vallières, L., Nadeau, S., Zhang, J., ve Laflamme N. (2000). How the blood talks to thebrain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 223,* 22–38.

Rosenberg, G.A., Estrada, E.Y., Dencoff, J.E., ve Stetler-Stevenson, W.G. (1995). Tumor necrosis factor-alpha-induced gelatinase B causes delayed opening of the blood-brain barrier: an expanded therapeutic window. *Brain Research, 703*(1-2)151-5.

Rosenkranz, C.A., Hood, G.S., Woods, L.R., Dusting, J.G., ve Ritchie, H.R. (2003).B-type natriuretic peptide prevents acute hypertrophic responses in the diabetic rat heart: importance of cyclic GMP. *Diabetes* 52: 2389–2395,

Rothwell, N.J., (1997). Neuroimmune interactions. *British journal of pharmacology, 121,* 841–847.

Rozdilsky, B., ve Olszewski, J. (1957) Permeability of cerebral blood vessels studied by radioactive iodinated bowine albumin. *Neurology,7,* 270

Robinson, G.A., Schmith, M.J., Sutherland, S.W. (1970) On the development and properties of the brain adenylcylase systems. *Advances in biochemical psychopharmacology,3,*11

Robinson, P.J. ve Rapoport,S.I. (1991). Blood-brain barrier. *Encyclopedia of Human Biology, 1,*715-727

Rungger-Brandle, E., Dosso, A.A.,ve Leuenberger, P.M. (2000). Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science, 41,* 1971–1980.

Ryan, C.M. (1988). Neurobehavioral complications of type I diabetes. Examination of possible risk factors. *Diabetes Care, 11*(1), 86-93

Sage, J.I., Van Uitert, R.L., ve Duffy, T.E.(1984). Early changes in blood brain barrier permeability to small molecules after transient cerebral ischemia., *Stroke,15* (1):46-50.

Sahin, D., Ilbay, G., ve Ates N. (2003). Changes in the blood-brain barrier permeability and in the brain tissue trace element concentrations after single and repeated pentylenetetrazole-induced seizures in rats.*Pharmacological Research. 48*(1),69-73.

Saravia, F.E., Revsin, Y., Gonzalez Deniselle, M.C., Gonzalez, S.L., Roig,P., Lima, A., ve ark.. (2002). Increased astrocyte reactivity in the hippocampus of murine models of type 1 diabetes: the nonobese diabetic (NOD) and streptozotocin-treated mice. *Brain Research , 957,* 345–353.

Savettieri, G., Di Liegro, I., Catania, C., Licata, L., Pitarresi, G.L., D'Agostino, S., ve ark.(2000) Neurons and ECM regulate occludin localization in brain endothelial cells. *NeuroReport 11*,1081–1084

Sayyah, M., Javad-Pour,M., ve Ghazi-Hhansari, M., (2003). The bacterial endotoxin enhances seizure susceptibility in mice: Involvement of proinflamatory factors: nitric oxide and prostaglandins. *Neuroscience, 122,* 1073–1080.

Schulz, M., ve Engelhardt B. (2005).The circumventricular organs participate in the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cerebrospinal Fluid Research.,30,* 2-8.

Shealy, C.N., ve Crafts, D. (1965). Selective alteration of the blood-brain barrier. *Journal of Neurosurgery*, 23,484-487.

Sheperd, P.R., Gibbs, E.M., Wesslau, C., Gould, G.W. and Kahn, B.B., (1992). Human small intestine facilitative fructose/glucose transporter (GLUT5) is also present in insulin-responsive tissues and brain. Investigation of biochemical characteristics and translocation. *Diabetes, 41,* 1360–1365

Singh, A.K., Jiang, Y., 2004. How does peripheral lipopolysaccharide induce gene expression in the brain of rats? *Toxicology, 201,* 197–207.

Smith, M.A., Sayre, L.M., Monnier, V.M., ve Perry G. (1995) Radical AGEing in Alzheimer's disease.*Trends Neuroscience, 18*(4),172-176

Soulis, T., Cooper, M.E., Sastra, S., Thallas, V., Panagiotopoulos, S., Bjerrum, O.J., ve ark.(1997) Relative contributions of advanced glycation and nitric oxide synthase inhibition to amino guanidine- mediated renoprotection in diabetic rats. *Diabetologia, 40,* 1141-1151.

Stauber, W.T., Ong, S.H., ve McCuskey, R.S. (1981) Selective extravascular escape of albumin into the cerebral cortex of the diabetic rat. *Diabetes, 6,* 500-503.

Stewart, P.A., ve Wiley MJ. (1981). Structural and histochemical features of the avian blood-brain barrier. *The Journal of comparative neurology, 202 (2),*157-167.

Stewart, R., ve Liolitsa, D. (1999). Type 2 diabetes mellitus, cognitive impairment and dementia.,*Diabet Medicine, 16*(2),93-112.

Strachan, M.W., Deary, I.J., Ewing, F.M., ve Frier, B.M. (1997) Is type II diabetes associated with an increased risk of cognitive dysfunction? A critical review of published studies. *Diabetes Care. 20*(3),438-445

Suzuki R., Nitsch, C., Fujiwara, K., ve Klatzo, I. (1984). Regional changes in cerebral blood flow and blood-brain barrier permeability during epileptiform seizures and in acute hypertension in rabbits. *Journal of cerebral blood flow and metabolism , 4,* 96

Sweeney B.P, ve Grayling, M. (2005).Opioids, transporters and the blood--brain barrier. *European journal of anaesthesiology 22*, 489-491

Takamiya, Y., Kohsaka, S., Toya, S., Otani, M., Tsukada, Y. (1988). Immunohistochemical studies on the proliferation of reactive astrocytes and the expression of cytoskeletal proteins following brain injury in rats. *Brain Research, 466,* 201–210.

Tao-Cheng, J.H., Nagy, Z., Brightman, M.W. (1987). Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. *Journal of Neuroscience, 7,* 3293–3299

Tartaglia, L.A., ve Goeddel, D.V. (1992). Two TNF receptors, *Immunology Today, 13,* 151– 153.

Tesfamariam, B., ve Cohen, R.A. (1992). Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *American Journal of Physiology, 263* ,321–326.

Tong, X.K., ve Hamel, E. (1999) Regional cholinergic denervation of cortical microvessels and nitric oxide synthase-containing neurons in Alzheimer's disease. *Neuroscience, 92,*163–175

Vanhanen, M., ve Soininen, H. (1998). Glucose intolerance, cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Current opinion in neurology, 11* (6):673-677.

Wang, X., Barone, F.C., Aiyar , N.V., ve Feuerstein, G.Z. (1997) Interleukin-1 receptor and receptor antagonist gene expression after focal stroke in rats. *Stroke. 28* (1):155-161

Wang, Y.S., White, T.D., (1999). The bacterial toxin lipopolysaccharide causes rapid inappropriate excitation in rat cortex. *Journal of neurochemistry, 72*, 652–660.

Westergaard,E., Hertz,M.M.,ve Bolwig,T.G. (1978). Increased permeability to horseradish peroxidase across cerebral vessels, evoked by electrically indused seizures in the rat. *Acta Neuropathology. 19*(1),73-80

Williams, K.C., Corey, S., Westmoreland, S.V., Pauley, D., Knight, H., deBakker, C., ve ark. (2001) Perivascular macrophages are the primary cell type

productively infected by simian immunodeficiency virus in the brains of macaques: implications for the neuropathogenesis of AIDS. *The Journal of experimental medicine, 193,* 905 – 915

Yamaji, T., Fukuhara, T., Kinoshita, M. (1993) Increased capillary permeability to albumin in diabetic rat myocardium. *Circulation Research, 72*, 947–957

Yamashita, T., Mimura, K., Umeda, F., Kobayashi, K., Hashimoto, T., ve Nawata, H. (1995). Increased transendothelial permeation of albumin by high glucose concentration. *Metabolism, 44,* 739–744.

Yu, P.K., Yu, D.Y., Cringle, S.J., ve Su, E.N. (2005). Endothelial F-actin cytoskeleton in the retinal vasculature of normal and diabetic rats. *Current eye research, 30,* 279–290,

Yuhas, Y., Weizman, A., Dinari, G., ve Ashkenazi, S. (1995). An animal model for the study of neurotoxicity of bacterial products and application of the model to demonstrate that shiga toxin and lipopolysaccharide cooperate in inducing neurologic disorders. *The Journal of infectious diseases,171,* 1244–1249.

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
DENEYSEL TIP ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ
(DETAE)
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU

Msc. Hatice Yorulmaz, İ. Ü. İst. Tıp Fak. Fizyoloji Anabilim Dalı

Karar No:09

İlgi:12.12.2006 tarihli yazınız.

Sorumluluğunu üstlendiğiniz "Akut hiperglisemik ve diyabetik sıçanlarda oluşturulan epileptik nöbetlerde lipopolisakkaridin kan-beyin bariyeri permeabilitesine etkisi" isimli projeniz Etik Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul İlkeleri'ne uygun bulunmuştur.

Yard. Doç. Dr. Mutlu KÜÇÜK
Deney Hayvanları Etik Kurulu
Başkanı

Prof. Dr. Mehmet KAYA
Üye

Prof. Dr. Müzeyyen MAMAL TORUN
Üye

Doç. Dr. Asiye NURTEN
Üye

Uzm. Dr. Mehmet ÖZEK
Üye

Doç. Dr. Bülent AHISHALI
Üye

Vet. Hek. Fatma TEKELİ
Raportör

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Hatice	**Soyadı**	Yorulmaz
Doğ.Yeri	İncesu	**Doğ.Tar.**	10-09-78
Uyruğu	T.C.	**TC Kim No**	
Email	haticeyorulmaz@hotmail.com	**Tel**	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü	2001
Lisans	İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü	1999
Lise	İstanbul Bahçelievler Lisesi	1994

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Öğretim Görevlisi	T.C.Haliç Üniversitesi	2005-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	iyi	orta	iyi	78	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):