

## Poređenje otpornosti krvno-moždane i barijere između krvi i očne vodice na osmotski pritisak kod zamorčića

---

*Poređena je otpornost krvno-moždane barijere i barijere između krvi i očne vodice na osmotski pritisak manitola kod zamorčića. Kao osnovni postupak u radu primenjena je tehnika perfuzije glave in situ. Pokazalo se da je krvno-moždana barijera otpornija na mehanički pritisak i otvara se tek pri koncentraciji od 40% manitola, omogućivši tako prelazak molekula trypan plavo iz perfuzionog medijuma u mozak što je dovelo do jakog obojenja moždanog tkiva. Barijera između krvi i očne vodice otvara se postepeno počevši od 5%-tne koncentracije, dok sa daljim koncentrisanjem rastvora manitolom dolazi do prelaska sve veće količine proteina iz perfuzata.*

---

### Uvod

Tokom evolucije u organizmu kičmenjaka razvijene su strukture koje nazivamo "sistemi barijera". Ove strukture zapravo su ćelijski slojevi spojeni tesnim vezama što onemogućava slobodnu difuziju hidrosolubilnih molekula (Redžić *et al.* 1997). Na ovaj način moguća je samo kontrolisana razmena između tkiva i plazme pa se tako štite složene i osetljive strukture kao što su mozak i oko od varijacija u sastavu telesnih tečnosti. Barijere se prema građi dele na endotelne (krvno-moždana i krvno-retinalna) i epitelne (između krvi i očne vodice i krvi i likvora). Endotelnu barijeru predstavljaju specifično građeni kapilari mozga čija se građa u mnogome razlikuje od građe kapilara sistemske cirkulacije. Između endotelnih ćelija cerebralnih kapilara ne postoje međućelijske pore već su one međusobno spojene tesnim vezama koje onemogućavaju slobodnu difuziju molekula između ćelija. Oko kapilara nalaze se obmotani stopalasti produžeci astrocita koje najverovatnije predstavljaju vezu između krvi i ekstraćelijske tečnosti mozga. Kako je površina membrana endotelnih ćelija kapilara mozga mnogo veća od zapremine u mnogim istraživanjima endotelne ćelije kao i njihovo glijalno okruženje pojednostavljeno se posmatraju kao selek-

---

*Sanja Bilbija (1980), Beograd, Kneza Danila 12, učenica 4. razreda V beogradske gimnazije u Beogradu*

*Ivo Kovačević (1980), Beograd, 22 oktobra 24, učenik 3. razreda Matematičke gimnazije u Beogradu*

*Slobodan Obrenović (1981), Čačak, Zoje Tošić 22, učenik 2. razreda Gimnazije u Čačku*

**MENTOR:**  
*Doc. Dr Zoran Redžić, Institut za biohemiju, Medicinski fakultet Beograd*

tivno propustljiva membrana. Između krvi i očne vodice barijeru gradi epitel koji oblaže kapilare (Dawson 1991).

Postojanje barijera ima veoma važnu zaštitnu ulogu u organizmu. Međutim, ovakvo stanje u isto vreme onemogućuje dopremanje hidrosolubilnih lekova u tkiva i organe koji su odvojeni sistemima barijera od ostatka organizma. Tako danas postoji niz lekova koji zbog nemogućnosti prolaska kroz biološke barijere ne mogu imati terapijsku primenu u lečenju maligniteta nervnog sistema. Jedana od mogućnosti da se lekovi ipak dopreme do ciljnog tkiva je da se barijere za momenat "otvore". Otvaranje barijera, pre svih krvno-možđane barijere, moguće je mehaničkim putem ili hemijskim putem. Mehaničko otvaranje postiže se povećanjem osmotske sile koja deluje na kapilare i za kratko vreme razmiče tesne veze među endotelnim ćelijama.

U ovom eksperimentu korišćen je manitol kao osmotski aktivna supstanca. Molekul manitola ne može da prođe iz krvi u mozak pošto za ovaj polihidroksilni alkohol ne postoje opisani mehanizmi transporta. Međutim, povećanje koncentracije manitola u kapilarima dovodi do povlačenja vode iz endotelnih ćelija u kapilare i povećava osmotsku silu koja deluje na kapilar. U jednom momentu ova sila je dovoljna da raskine tesne veze koje postoje između endotelnih ćelija i omogući nekontrolisan prelazak molekula iz krvi u mozak u toku kraćeg vremenskog perioda (do 30 min). Zbog toga smo smatrali važnim da se porede efekti rastućih koncentracija manitola na dve barijere paralelno, jednu epitelnu (između krvi i očne vodice) i jednu endotelnu (krvno-možđanu).

Cilj rada je da se ustanovi koja koncentracija manitola dovodi do otvaranja krvno-možđane (KMB) i barijere između krvi i očne vodice.

## Materijal i metode

Eksperiment je rađen na 12 zamorčića koji su podeljeni u grupe:

- 1) kontrolna grupa – perfuzioni rastvor bez manitola
- 2) grupa I – perfuzioni rastvor sa 5% manitola
- 3) grupa II – perfuzioni rastvor sa 20% manitola
- 4) grupa III – perfuzioni rastvor sa 40% manitola

Kao osnovni postupak u radu primenjena je tehnika perfuzije glave zamorčića *in situ*. Zamorčići su anestetizirani, a zatim im je hirurški otvorena vratna loža i preparisani krvni sudovi. U desnu karotidnu arteriju ubačena je kanila povezana sa sistemom za perfuziju. U trenutku početka perfuzije leva arterija se podvezuje, a obe jugularne vene presecaju. Na taj način omogućeno je prisustvo samo perfuzionog medijuma u kapilarima mozga. Perfuzioni rastvor je osim standardnih sastojaka sadržao i goveđi serumski albumin koncentracije 30 g/L. Perfuzija je trajala sedam minuta.

U toku prvog minuta perfundovan je sam perfuzioni rastvor da bi se isprala krv iz kapilara. Zatim je u njega pet minuta uvedena boja trypan plavo sporim ubrizgavanjem špricom. Molekuli boje ne mogu da prođu kroz barijeru koja normalno funkcioniše. Međutim, kada barijera bude mehanički probijena osmotskim pritiskom koji indukuje manitol dolazi do prelaska boje u moždano tkivo, omogućujući tako makroskopsko posmatranje otpornosti barijere (na osnovu obojenosti moždanog tkiva). U toku poslednjeg minuta glava je ponovo perfundovana prvobitnim rastvorom koji ima ulogu da ispere boju iz kapilara kako ona ne bi stvorila lažnu sliku probijene barijere. O otpornosti barijere između krvi i očne vodice zaključivano je na osnovu količine proteina koja je prešla iz perfuzionog medijuma u očnu vodicu. Količina proteina određivana je biuretskom metodom uz standardni rastvor goveđeg serumskog albumina (Rakić i Japundžić 1994).

## Rezultati

Mera očuvanosti integriteta krvno-moždane barijere je da mozak po završenom eksperimentu ostane neobojen. Obojenost tkiva je znak da su veze među endotelnim ćelijama prekinute i da je boja ušla u tkivo.

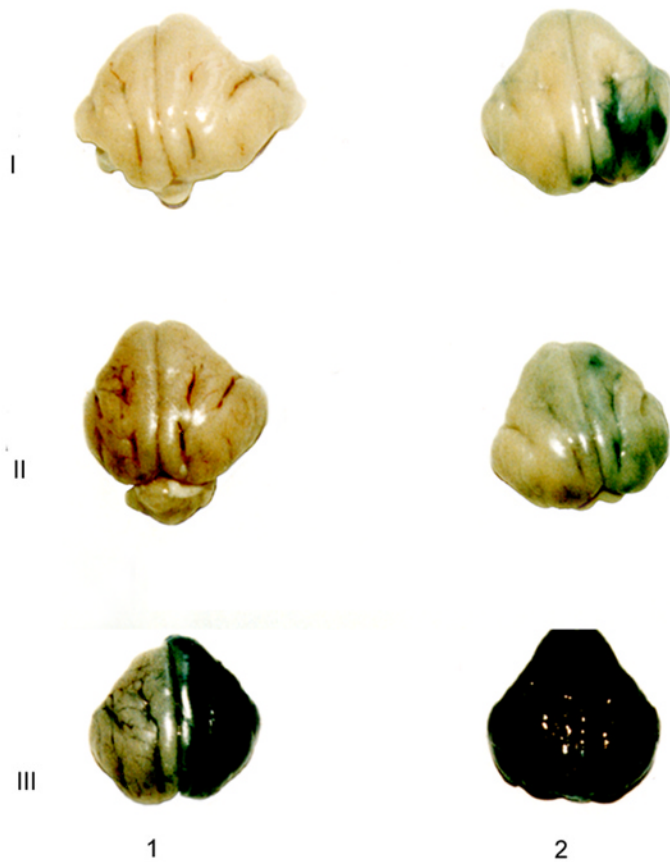
Na slici 1 vidi se mozak zamorčića iz kontrolne grupe. Mozak je neobojen, što znači da KMB normalno funkcioniše ne propuštajući molekule boje.



*Slika 1.  
Mozak zamorčića iz  
kontrolne grupe.*

*Figure 1.  
Brain of guinea pig  
in control group.*

Na slici 2 prikazani su mozgovi zamoraca perfundovani različitim koncentracijama manitola. Koncentracije manitola od 5% i 20% dovele su do veoma malog i regionalnog prebojenja tkiva. Do masovnog obojenja moždanog tkiva, koje potvrđuje da su tesne veze između endotelnih ćelija kapilara zaista raskinute došlo je kod grupe čija je glava perfundovana rastvorom 40% manitola.



*Slika 2.  
Mozak zamorčiča  
perfundovanog  
rastvorom sa:  
I – 5% manitola  
II – 20% manitola  
III – 40% manitola.*

*Figure 2.  
Guinea pig's brain  
after perfusion by  
I – 5%  
II – 20%  
III – 40%  
manitol concentration*

Količina proteina u očnoj vodici progresivno se uvećavala srazmerno sa povećanjem koncentracije manitola u perfuzionom medijumu (tabela 1).

Tabela 1. Koncentracije proteina u očnoj vodici

Grupa	Koncentracija proteina [g/L]	
	srednja vrednost	standardna devijacija
kontrola	2.3	0.2
I	4.2	0.8
II	8.8	0.9
III	12.0	1.8

Ustanovljeno je statistički važno povećanje koncentracije proteina u očnoj vodici svake od grupa u odnosu na kontrolnu, kao i kod druge grupe u odnosu na prvu. U trećoj grupi nije zabeležena statistički značajna promena u koncentraciji proteina u odnosu na vrednosti izmerene u drugoj

grupi, ukazujući na to da je do probijanja barijere došlo već pri 20%-tnoj koncentraciji manitola i da dalje povišavanje njegove koncentracije u perfuzionom medijumu znatno ne utiče na promenu u količini proteina detektovanu u očnoj vodici.

## Diskusija i zaključak

Dobijeni rezultati pokazuju da su barijere koje postoje između krvi i mozga i krvi i očne vodice različito otporne na mehanički pritisak izazvan osmotski aktivnim manitolom. Krvno-moždana barijera pokazala se kao otpornija – obojenje je detektovano pri koncentraciji od 40% manitola, za razliku od barijere između krvi i očne vodice gde je prelazak proteina iz perfuzionog rastvora zapažen već pri perfuziji 5%-tnim manitolom. Takođe je uočena direktno proporcionalna zavisnost između koncentracije proteina u očnoj vodici i koncentracije manitola do 20%. Pri ovoj koncentraciji barijera je probijena tako da dalje povećanje koncentracije rastvora (na 40%) ne dovodi do statistički značajnog povećanja koncentracije proteina. Ovakvo stanje može se objasniti razlikom u građi između ova dva tipa barijere (Dawson *et al.* 1993). Krvno-moždana barijera je čvršće građena struktura, koja ima osnovnu ulogu u restrikciji prolaza supstanci iz krvi u mozak. Lumen kapilara nalazi se u sredini endotelne ćelije (kao otvor na prstenu) i cela struktura je mnogo otpornija na mehaničke pritiske. Epitelne barijere imaju mnogo manju površinu kontakta među ćelijama, pa je i otpornost tesnih veza između njih mnogo manja.

Iz dobijenih rezultata može da se zaključi sledeće:

- U toku perfuzije mozga zamorca *in situ* rastvorom različitih koncentracija manitola pokazalo se da su KMB i barijera između krvi i očne vodice različito otporne na povišene koncentracije manitola kao osmotski aktivne supstance.
- KMB je otpornija na mehanički pritisak i ostvara se pri koncentraciji od 40% manitola omogućujući prelazak molekula trypan plavo iz perfuzionog medijuma u mozak što dovodi do jakog obojenja moždanog tkiva. Barijera između krvi i očne vodice otvara se postepeno počevši od 5%-tne koncentracije, dok sa daljim povećanjem koncentracije manitola dolazi do prelaska sve veće količine proteina iz perfuzata.

---

## Literatura

Dawson, H. 1991. *Physiology of the eye*. London: The Mac Millan

Dawson, H., Rakić, Lj., Zloković, B., Segal, M. 1993. *Introduction to the blood barrier*. London: The Mac Millan

Rakić, Lj., Japundžić, J. 1994. *Biohemija*. Priručnik za praktičnu nastavu i laboratorijske analize. Beograd: Službeni list

Redžić, Z. B., *et al.* 1997. The characteristic of nucleoside transport throughbasolateral side of perfused sheep choroid plexus and the effects of no synthazes inhibition on this proces. *Brain research*, 144: 150-9.

---

*Sanja Bilbija, Ivo Kovačević, Slobodan Obrenović*

### Comparison of Guinea Pig's Blood-brain and Blood-eyehumor Barrier Resistance to Osmotic Pressure

In this experiment, the resistance of guinea pig's blood-brain and blood-eyehumor barrier to the osmotic pressure of manitol were examined and compared. The technique of head perfusion *in situ* was applied as a basic procedure in this experimental work. Blood-brain barrier turned out to be more resistant to the mechanical pressure then barrier between blood and eyehumor and it was penetrated at the 40% manitol concentration. It enabled the trypan blue colour to enter the brain tissue from perfusion medium. Due to this brain tissue was strongly coloured.

Blood-eyehumor barrier was gradually penetrated starting with 5% concentration. Further increasment of manitol concentration led to transfer of even greater amounts of proteins from perfusin solutin.

