

ნატალია ქეთრინ ჰარგრეივს¹, რამაზ ხეცურიანი¹, მანანა არაბული-ჭლიკაძე¹,
ანზორ გოგიბერიძე¹, ნოდარ მითაგვარია²

ვირთაგვებში ლოკალური ცერებრული ინფარქტის პენუმბრას ზონაში გამოვლენილი
ულტრასტრუქტურული ცვლილებები პირველი თორმეტი საათის განმავლობაში

¹ადამიანის ანატომიის დეპარტამენტი, თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი;

²ი.ბერიტაშვილის სახელობის ფიზიოლოგიის ინსტიტუტი, საქართველო

Doi: <https://doi.org/10.52340/jecm.2022.08.12>

NATALIA CATHERINE HARGREAVES¹, RAMAZ KHETSURIANI¹, MANANA ARABULI-
TCHLIKADZE¹, ANZOR GOGIBERIDZE¹, NODAR MITAGVARIA²

ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN THE PENUMBRA OF THE LOCAL CEREBRAL INFARCTION
IN RATS DURING THE FIRST TWELVE HOURS

¹Department of Human Anatomy, TSMU, Tbilisi, Georgia;

²I. Beritashvili Institute of Physiology, Tbilisi, Georgia

SUMMARY

We studied changes in the ultrastructure of synapses and myelin nerve fibers that develop in the penumbra in 4 and 12 hours after modeling infarction in the frontoparietal cortex in rats. Ischemic stroke was induced by injection of a photosensitive dye into their bloodstream followed by illumination of the brain surface with a halogen lamp. Visible ultrastructural changes were observed in the penumbra zone, namely in the axodendritic and axospinous synapses; they consisted in polymorphism and disorganization of synaptic vesicles, mitochondrial swelling, swelling and vacuolization of the postsynaptic fragments of dendrites, and shortening and osmiophilia of the active zone. In the presynaptic terminals, clear-cut signs of transformation were not observed during the first 12 hours. It indicates the necessity of early treatment of strokes.

Keywords: local cerebral infarction; penumbra; synapses; myelinated nerve fiber

მწვავე იშემიური ინსულტის მკურნალობისას დროული პათოგენეტიკური თერაპიული ჩარევა განიხილება, როგორც ერთ-ერთი ყველაზე აქტუალური გამოწვევა კლინიკურ ნევროლოგიაში, რადგან აღნიშნული დაავადება ხასიათდება სიკვდილიანობის ან უნარშემლუღლობის განვითარების და ასევე სოციალური მალადაპტაციის მალალი მაჩვენებლით.

ფოკალური ცერებრალური იშემიური ინსულტის რეგიონებში შეიძლება გამოვლინდეს სტრუქტურული და ფუნქციური ცვლილებებისკენ მიდრეკილი ცენტრალური ზონა (იშემიური ფოკუსი) მკვეთრად შემცირებული ცერებრალური სისხლის ნაკადით და უფრო დიდი დისტალური რეგიონით, ე.წ. პენუმბრა/ინფარქტის პერიფოკალური ზონა, მიმდებარე სისხლძარღვებიდან ნაწილობრივი კოლატერალური მომარაგებით [1].

ნერვული ქსოვილის დაზიანების სირთულე დამოკიდებულია ცერებრალური სისხლის ნაკადის გაუარესების ხარისხსა და ხანგრძლივობაზე. ცერებრალური სისხლის ნაკადის მკვეთრმა დაქვეითებამ სულ რამოდენიმე წუთის განმავლობაში შეიძლება გამოიწვიოს შეუქცევადი დაზიანება, და იშემიურ ფოკუსში ლოკალური ცერებრალური ინფარქტის განვითარებას კი. ამასთან, მიუხედავად პენუმბრაში ნეირონების ფუნქციური აქტივობის დაქვეითებისა, უჯრედების უმეტესობაში შენარჩუნებულია მორფოლოგიური მთლიანობა იშემიური ინსულტის განვითარებიდან პირველ საათებში. ეს არის "თერაპიული ფანჯარა" ნეიროპროტექტორული თერაპიისთვის [2,3].

აღმოჩნდა, რომ პენუმბრა არის გადაუდებელი თერაპიის მთავარი სამიზნე, თერაპიის მიზანია თავის ტვინის უჯრედების დაცვა შეუქცევადი დაზიანებისგან. თუმცა, ცერებრალური სისხლძარღვების ხანგრძლივი ოკლუზია, ნორმალური სისხლის ნაკადის აღდგენის გარეშე, წარმოდგენილი იყო მხოლოდ რამდენიმე ნაშრომში, რომლებიც ძირითადად ფოკუსირებული იყო ადგილობრივი ინფარქტის ზონის ფორმირებაზე [5].

არსებობს ცერებრალური ფოკალური იშემიის სხვადასხვა მოდელი და კლინიკური ინსულტების პეტროგენული ბუნების მოდელირებისას, თითოეულს გააჩნია როგორც ძლიერი მხარე, ასევე შეზღუდვები [4,10]. წარმოდგენილი კვლევა ფოკუსირებულია ფოტო-თრომბოზული

ინსულტის “Rose Bengal” მოდელზე, რომლის ინდუცირება ხდება სისხლის ნაკადში ფოტოსენსიტიური საღებავის შეყვანით და თავის ტვინის ზედაპირის შემდგომი ილუმინაციით ჰალოგენური ნათურის მეშვეობით. ილუმინაციის/განათების შედეგად აქტივირებული საღებავი წარმოქმნის მაღალრეაქტიულ ჟანგბადის რადიკალებს, რომლებიც ინვევენ ენდოთელიუმის დაზიანებას, თრომბოციტების გააქტიურებას და აგრეგაციას, საბოლოოდ კი თრომბის წარმოქმნას [6].

ამ მოდელის უპირატესობაა კლინიკური პრაქტიკის ანალოგიური თრომბების წარმოქმნის ხელშეწყობა; ამასთან ერთად, აღნიშნული მოდელი მარტივია და რეპროდუცირებადი. მეთოდი ხასიათდება დაბალი ვარიაბელობით, განათებული ზონის ირგვლივ პიალური სისხლძარღვების სელექტიური ოკლუზიიდან გამომდინარე [3,10]. რამდენადაც ჩვენთვის ცნობილია, არსებობს მხოლოდ ერთი ნაშრომი ვირთაგვებში კეროვანი ფოტოთრომბოზული ინფარქტის შემდეგ მორფოლოგიური და პროტეომიული ცვლილებების კვლევასთან დაკავშირებით (ექსპერიმენტული კვლევები განხორციელდა ინფარქტის მოდელირებიდან 4 და 12 საათში) [7]. აღნიშნული კვლევა პირველია, რომელიც ეძღვნება მორფოლოგიური ცვლილებების, კერძოდ კი, ლოკალური ცერებრალური ინფარქტის პენუმბრას ზონაში სინაფსებსა და მიელინურ ნერვულ ბოჭკოებში განვითარებულ ულტრასტრუქტურული ცვლილებების შესწავლას უფრო დეტალური, დროზე-დამოკიდებული ექსპერიმენტების მეშვეობით, ილუმინაციის დასრულებიდან 4, 12 სთ-ში.

მასალები და მეთოდები. კვლევები განხორციელდა ახალგაზრდა, თეთრ, ექსპერიმენტულ ვირთაგვებზე წონით 150-200გ. ექსპერიმენტული მოდელი გამოყენებული იქნა ცერებრალურ (სენსომოტორული) ქერქში ინფარქტის გამონვევის მიზნით [4], ცერებრალური თრომბოზი გამონვეული იყო ფოტოქიმიური მეთოდის მეშვეობით. კეტამინის ხსნარით ანესთეზიის შემდეგ თეთრ ვირთაგვებში 2-3 წუთის განმავლობაში 37°C ტემპერატურაზე შეჰყავდათ ფოტოსენსიტიური საღებავის - Rose Bengal-ის ხსნარი (0,13 მლ 0,75% ხსნარი 100 გ წონაზე). ცხოველები მოათავსეს სტერეოტაქტიკურ აპარატში და ფრონტოპარიეტალური ცერებრალური ქერქის ილუმინაცია / განათება მიმდინარეობდა 60 წუთის განმავლობაში 250-ვტ ჰალოგენური ნათურის მეშვეობით ექსპოზიციურ თავის ქალაზე ოპტიკურ-ბოჭკოვანი კაბელის გამოყენებით (დიამეტრი 2 მმ); განათების სიმძლავრის საბოლოო სიმკვრივე (თავის ქალას ზედაპირზე) - 64 ვტ/სმ².

ვიზუალურად თრომბწარმოქმნის მანიფესტაცია დაიწყო დასხივებიდან 30 წუთში და გაგრძელდა დაახლოებით 4 სთ [6] განმავლობაში. თავის ტვინის დაზიანებულ ქსოვილს აქვს ნაკვეთილი კონუსის ფორმა, სადაც იშვიათად ყველაზე მეტად გამოხატულია განათებულ მიდამოში და ვრცელდება მიმდებარე უბნებზე კლებადი ინტენსივობით (სურ. 1ა). საკონტროლო ჯგუფში განხორციელდა იგივე პროცედურები, როგორც ექსპერიმენტული ცხოველების შემთხვევაში, გარდა ფოტოსენსიტიური საღებავის ინექციისა, რომელიც ჩანაცვლებული იქნა იმავე მოცულობის ფიზიოლოგიური ხსნარით.

კვლევისთვის მასალების აღება მოხდა ილუმინაციის დასრულებიდან 4, 12 საათში, შესაბამისად. ულტრასტრუქტურული ცვლილებების შესწავლის მიზნით განხორციელდა საკონტროლო და ექსპერიმენტული ჯგუფის ცხოველების (თითოეულ ჯგუფში - 4 ვირთაგვა) ანესთეზია კეტამინის ხსნარით - ინტრაკარდიული პერფუზია 2.5% გლუტარალდეჰიდით 0.01 M ფოსფატის ბუფერში (pH 7.4) 15-20 წუთის განმავლობაში.

შემდეგ, განხორციელდა თავის ქალის ექსპოზიცია და ინფარქტის ზონის ირგვლივ აღებული ქერქის მცირე ნაწილები (დაახლოებით 2 მმ-ის ზომის ფარგლებში) მოვათავსეთ ოსმიუმის ტეტროქსიდის (OsO₄) ცივ (4°C) 2% ხსნარში 2,5 საათის განმავლობაში. ეთანოლისა და აცეტონის ხსნარების მზარდ კონცენტრაციაში დეჰიდრატაციის შემდეგ, ნიმუშები ჩავასხით არალდიტში, საყოველთაოდ აღიარებული მეთოდის მიხედვით.

ანათლები (40-50 ნმ) დამზადდა ულტრამიკროტომის (OmU2, Reichert) მეშვეობით, ხოლო ტყვიის ციტრატთან (Pb) კონტრასტირების შემდეგ, განხორციელდა მათი გამოკვლევა JEM-100B და JEM-100CX ელექტრონული მიკროსკოპების გამოყენებით (JEOL, იაპონია). თითოეული ცხოველის შემთხვევაში სლაიდების რაოდენობა იყო 25 და თითოეული ჯგუფის შემთხვევაში განხორციელდა 100 სლაიდის ანალიზი.

შედეგები. ექსპერიმენტული ჩარევიდან 4 საათის შემდეგ თავის ტვინის ლოკალური იშვიათი ზონის ირგვლივ, ილუმინაციის ზონაში, აქსოლენდრიტული და აქსოსპინოზური სინაფსების აბსოლუტური უმრავლესობა, ისევე როგორც აქსოსომატური სინაფსები პენუმბრას ზონაში

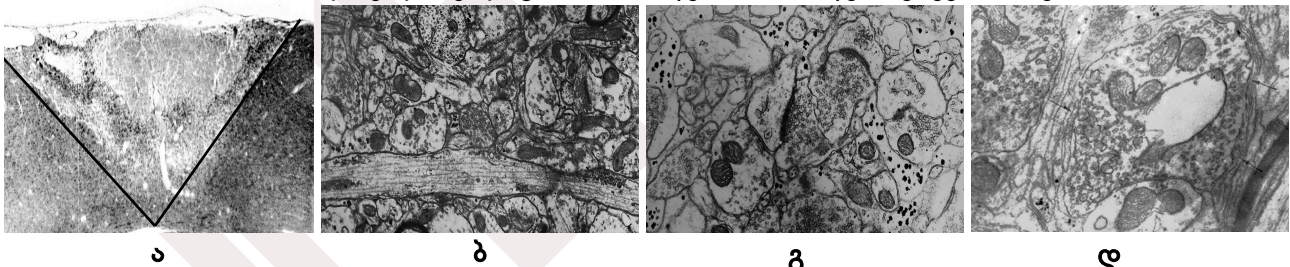
ინარჩუნებენ ინტაქტური სინაფსების ულტრასტრუქტურულ მახასიათებლებს (სურ. 1ბ,გ). თუმცა სინაფსები გარემორტყმულია მსხვილი ასტროციტული გამონაზარდებით (მორჩები), ისინი შეიცავენ დიდი რაოდენობით გლიკოგენის გრანულებსა და გლიკოფიბრილებს კონებს.

მსგავსი ზომიერი ცვლილებები აღწერილია ანალოგიურ კვლევაში [7], თუმცა, ასტროციტული გამონაზარდების შემცველი გლიკოფიბრილების მონაწილეობა არ იქნა იდენტიფიცირებული.

12 სთ-ში, აქსოდენდრიტული და აქსოსომატური სინაფსების პრე- და პოსტსინაფსურ მონაკვეთებში, გამოვლინდა ულტრასტრუქტურული ცვლილებები, რომლებიც დამახასიათებელია ქსოვილებისთვის (სურ. 1დ). ყველაზე მეტად გამოხატული ცვლილებები შეინიშნება დენდრიტებსა და მათ ხორკლებში. კერძოდ კი, უშუალოდ აქტიური ზონის ფარგლებში გამოვლინდა პოსტსინაფსური დენდრიტების (განსაკუთრებით ცენტროდენდრიტული კონვერგენტული სინაფსური კომპლექსების შემადგენლობაში) ვაკუოლიზაცია, მიტოქონდრიების შეშუპება და ამორფული ოსმიოფილური მასალის დეპონირება/დაგროვება.

დენდრიტულ მორჩებში შეინიშნება Spiny აპარატის დეზორგანიზაცია, რაც გამოხატულია ცისტერნების შემცირებითა და შეშუპებით და აქტიური პოსტსინაფსური მემბრანიდან აპარატის აშრევებით. მცირე ნაზარდები და დენდრიტული მორჩები ნეირონების ყველაზე რეაქტიული ნაწილებია; ეს ზონები ასოცირდება ნეირონების ყველაზე დახვეწილ რეაქციებთან და უკიდურესად სენსიტიურია სხვადასხვა გამაღიზიანებლის მიმართ [8,9,11]. მიკრომილაკების დენდრიტის ლერძის პარალელური ლოკაცია აუცილებელი წინაპირობაა დენდრიტების მიერ მონოდებულ ინფორმაციაზე ნეირონების შესაბამისი საპასუხო რეაქციის მისაღებად. ნერვული სისტემის აქტივაციისას იზრდება spiny - აპარატის ცისტერნების რაოდენობა და სიგრძე და პირიქით; ხოლო spiny აპარატის ცისტერნების შემცირება კი მიუთითებს თავის ტვინის სწავლასთან დაკავშირებული პროცესების შეფერხებაზე.

ამრიგად, გამოვლენილმა ცვლილებებმა შეიძლება მიგვიყვანოს სინაფსური პლასტიური დაბოლოებების დაზიანებამდე. თუმცა პრესინაფსურ ტერმინალებში განვითარებული ცვლილებები იყო ზომიერი. პრესინაფსურ ტერმინალებში მიტოქონდრიების ნაწილი არის ედემატოზური, ხოლო სინაფსური ვეზიკულები - პოლიმორფული და აქტიურ ზონაში აკუმულირების ნაცვლად (სინაფსური სპეციალიზაციის ზონები) რანდომულად არიან გაფანტული მთელს ტერმინალში. ზოგან ეს სინაფსები იზოლირებულია და ერთმანეთისგან გამოყოფილია პროტოპლაზმური ასტროციტების თხელი ლამელარული გამონაზარდების რამოდენიმე ფენით (სურ.1).



სურ.1. ინფარქტის ზონა და პენუმბრა (ა), პენუმბრა საკონტროლო (სიმულაციური ოპერაცია) ვირთხებში (ბ) 4 სთ (გ), 12 სთ (დ)

დასკვნა: ფოტოქიმიური მეთოდით გამოწვეული ლოკალური ცერებრალური ინფარქტების პენუმბრის ზონაში ფიქსირდება ულტრასტრუქტურული ცვლილებები, ჩვეულებრივ აქსოდენდრიტულ სინაფსებში, რაც გამოიხატება შემდეგი მიმართულებებით: პოლიმორფიზმი და სინაფსური ვეზიკულების დეზორგანიზაცია; მიტოქონდრიის შეშუპება; აქტიური ზონის სიგრძისა და ოსმიოფილურობის შემცირება; ასევე პოსტსინაფსური დენდრიტული უბნების შეშუპება და ვაკუოლიზაცია. ვფიქრობთ, რომ აღნიშნული ცვლილებები სავარაუდოდ ასოცირდება დენდრიტების პოსტსინაფსური ზონების ვაკუოლიზაციასთან.

References:

1. Bandera E, Botteri M, Minelli C, Sutton A, Abrams KR, Latronico N. Cerebral blood flow threshold of ischemic penumbra and infarct core in acute ischemic stroke: a systematic review. Stroke. 2006;37(5):1334-1339. doi: 10.1161/01.STR.0000217418.29609.22

2. Chavez JC, Hurko O, Barone FC, Feuerstein GZ. Pharmacologic interventions for stroke: looking beyond the thrombolysis time window into the penumbra with biomarkers, not a stopwatch. *Stroke*. 2009;40(10):e558-e563. doi: 10.1161/STROKEAHA.109.559914
3. Iadecola C, Anrather J. Stroke research at a crossroad: asking the brain for directions. *Nat. Neurosci*. 2011;14(11):1363-1368. doi: 10.1038/nn.2953
4. Chlikadze N, Solomonias R, Shukakidze A, Arabuli M, Mitagvaria N. Some physiological processes in ischemic penumbra of the brain (review). *Georgian Med. News*. 2018; 284:132-135.
5. Karatas H, Erdener SE, et al. Thrombotic distal middle cerebral artery occlusion produced by topical FeCl₃ application: a novel model suitable for intravital microscopy and thrombolysis studies. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2011;31(6):1452-1460. doi: 10.1038/jcbfm.2011.8
6. Dietrich WD, Watson BD, Busto R, Ginsberg MD, Bethea JR. Photochemically induced cerebral infarction. I. Early microvascular alterations. *Acta Neuropathol*. 1987;72(4):315-325. doi: 10.1007/BF00687262
7. Hagmann P, Sporns O, Madan N, Cammoun L, Pienaar R, Wedeen VJ, Meuli R, Thiran JP, Grant PE. White matter maturation reshapes structural connectivity in the late developing human brain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2010;107(44):19067-19072. doi: 10.1073/pnas.1009073107
8. Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann. Neurol*. 1985;17(5):497-504. doi: 10.1002/ana.410170513
9. Uzdensky A, Demyanenko S, Fedorenko G, Lapteva T, Fedorenko A. Protein profile and morphological alterations in penumbra after focal photothrombotic infarction in the rat cerebral cortex. *Mol. Neurobiol*. 2017;54(6):4172-4188. doi: 10.1007/s12035-016-9964-5
10. Kaddumi EG, Hubscher CH. Changes in rat brainstem responsiveness to somatovisceral inputs following acute bladder irritation. *Exp. Neurol*. 2007;203(2):349-357. doi: 10.1016/j.expneurol.2006.08.011
11. Park H, Jonas E. Mitochondrial regulators of synaptic plasticity in the ischemic brain. *Synaptic Plasticity*. Intech. 2017. 39-67. doi: 10.52.5772/67126

ნატალია ქეთრინ ჰარგრივს¹, რამაზ ხეცურიანი¹, მანანა არაბული -ჭლიკაძე¹,
ანზორ გოგობერიძე¹, ნოდარ მითავგარია²

**ვირთაგვებში ლოკალური ცერებრული ინფარქტის პენუმბრას ზონაში გამოვლენილი
ულტრასტრუქტურული ცვლილებები პირველი თორმეტი საათის განმავლობაში**

¹აღამიანის ანატომიის დეპარტამენტი, თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი;

²ი.ბერიტაშვილის სახელობის ფიზიოლოგიის ინსტიტუტი, საქართველო

რეზიუმე

ვირთაგვების მაგალითზე შესწავლილი იქნა პენუმბრაში განვითარებული სინაფსების და მიელინის ნერვული ბოჭკოების ულტრასტრუქტურული ცვლილებები, რომლებიც განვითარდა ფრონტოპარიეტალურ ქერქში ინფარქტის მოდელირებიდან 4 და 12 საათში, შესაბამისად. იშემიური ინსულტი გამონვეული იყო სისხლის ნაკადში ფოტოსენსიტიური საღებავის ინექციით, რის შემდგომაც განხორციელდა თავის ტვინის ზედაპირის ილუმინაცია ჰალოგენური ნათურის მეშვეობით. პენუმბრას ზონაში, კერძოდ კი აქსოდენდრიტულ და აქსო-სპინოზურ სინაფსებში დაფიქსირდა ხილული ულტრასტრუქტურული ცვლილებები; აღნიშნული ცვლილებები გამოხატული იყო შემდეგი მიმართულებებით: სინაფსური ვეზიკულების პოლიმორფიზმი და დებორგანიზაცია, მიტოქონდრიული შეშუპება, დენდრიტების პოსტსინაფსური ფრაგმენტების შეშუპება და ვაკუოლიზაცია, აქტიური ზონის დამოკლება და ოსმიოფილია. პრესინაფსურ ტერმინალებში ტრანსფორმაციის აშკარა ნიშნები არ დაფიქსირებულა, რაც ხაზს უსვამს ინსულტის ადრეული მკურნალობის აუცილებლობას.

