

PATOFIZIOLOGIJA I KLASIFIKACIJA ISHEMIJSKOG MOŽDANOG UDARA

Miroslava Živković¹, Vladimir Kostić²

¹Klinika za neurologiju KC Niš

²Institut za neurologiju KC Srbije

Kratak sadržaj: Patogenetski mehanizmi u razvoju ishemičkog i postishemičkog oštećenja moždanog tkiva su brojni i imaju relativno određen vremenski raspored svoga ispoljavanja, čije je poznavanje od ključne važnosti za planiranje uspešne terapije. Nažalost, još uvek nije moguće precizno odrediti vremensku sekvencu uključivanja pojedinih mehanizama, ali se relativno grubo može zaključiti da su energetska iscrpljenje, ekscitotoksičnost, nagomilavanje Ca^{2+} u ćeliji, acidoza i periinfarktne depolarizacije značajni u pokretanju procesa oštećenja tkiva, nasuprot postishemičkoj zapaljenjskoj reakciji i apoptozi koje se uključuju kasnije i doprinose odloženom propadanju ćelija u periodu postishemije. SR se u različitim fazama ovog procesa pojavljuju kao značajni medijatori ishemičkog i postishemičkog oštećenja, ali su njihovi izvori različiti: u početku se radi o samim oštećenim ćelijama tkiva mozga i procesima inhibicije mitohondrija, metabolizma arahidonske kiseline i aktivacije nNOS, dok su u kasnijim fazama za njihovo stvaranje uglavnom odgovorni aktivirani neutrofilni leukociti koji infiltriraju ishemičko tkivo.

Ključne reči: ishemijska bolest mozga, patogeneza, metaboličke promene

Uvod

U najširem smislu moždani udar (engl. *stroke*) se definiše kao nagli ili iktalni početak fokalnih ili globalnih neuroloških simptoma izazvanih ishemijom ili krvarenjem u ili oko mozga, a koje nastaju kao rezultat bolesti krvnih sudova mozga. Najprihvatljivije je ipak definisati ishemiju mozga kao (a) prekid cirkulacije barem u delu moždanog tkiva u toj meri da do njega ne dolazi dovoljno kiseonika i drugih neophodnih sastojaka za podršku moždanih funkcija, niti se odvođaju metabolički produkti (1), ili (b) kao onaj metabolički poremećaj u funkcionisanju mozga, uzrokovano smanjenjem cirkulacije, koji se završava morfološkim oštećenjem nervnih elemenata (2).

Preko 80% svih moždanih udara je rezultat ishemije mozga. *Globalna ishemija mozga* zahvata ceo

mozak i javlja se tokom prestanka rada srca ili teške sistemske hipotenzije. *Fokalna ishemija mozga*, koja je znatno češća od globalne, zahvata samo ograničene delove mozga, najčešće zbog okluzivnih promena arterija koje te regione vaskularizuju. U pitanju su uglavnom tromboza ili embolija arterija (3).

Završna faza u ishemiji mozga je infarkt, koji se karakteriše nekrozom tkiva usled ireverzibilnog oštećenja neurona i glije. Međutim, put do nekroze nije u potpunosti »put bez povratka«; radi se o kaskadi promena koje pokreće ishemija mozga od kojih su mnoge reverzibilne. Razumevanje hemodinamskih, ćelijskih i molekularnih promena koje pokreće ishemija mozga, a još više mehanizama koji dovode do nepovratnog ishemičkog oštećenja tkiva mozga, od suštinskog je značaja za preduzimanje racionalne terapije.

Hemodinamski poremećaji u ishemiji mozga

Kada se krvni protok prekine za 30 sekundi nastupa poremećaj metabolizma mozga. Nakon 1 minute nastupa poremećaj funkcija neurona. Nakon 5

Adresa autora:

Miroslava Živković

Lole Ribara 16 a

18 000 Niš

Tel.: 333-772

Mob.: 063 /7759-760

minuta anoksija započinje lanac promena koje rezultiraju u infarktu mozga. Međutim, ukoliko bi se cirkulacija oksigenisanom krvlju dovoljno brzo ponovo uspostavila, oštećenje može biti reverzibilno. Dugo se smatralo da ishemija duža od 4–5 minuta nesumnjivo znači pojavu konačnih ćelijskih oštećenja, ali su naknadni eksperimentalni rezultati uzdrmali ovu »dogmu«, ukazujući na mogućnost da je tkivo mozga otpornije prema ishemiji nego što se mislilo (4).

U kliničkom smislu, prekid cirkulacije u mozgu izaziva gubitak svesti za oko 10 sekundi, uz gubljenje spontane električne aktivnosti za oko 20 sekundi (5). Znači, ubrzo po početku ishemije mozak postaje električki »tih« i nesposoban za održavanje procesa transporta i sinteze. Međutim, prema histološkim kriterijumima, moždano oštećenje se javlja posle najmanje 5 minuta ishemije. Malo je verovatno da je navedeno brzo gašenje moždanih funkcija, samo po sebi, odgovorno za ishemijom izazvana oštećenja moždanog tkiva. Ovaj vremenski raskorak, u stvari, može predstavljati zaštitni mehanizam u toku koga se mozak »primiri dok ne prođe oluja« (1). Najraniji biološki odgovor na smanjenje protoka krvi u mozgu je relativno brz razvoj kolateralne cirkulacije, čiji je cilj da se ograniči oblast ishemije. Ovaj odgovor je kompromitovan kod osoba sa aterosklerozom ili drugim poremećajima arterija.

Teorija »pragova«

Dejstvo koje ishemija ostvaruje na morfološke strukture i funkcije mozga zavisi istovremeno i od težine i od trajanja smanjenog protoka. Ukratko, to znači da će isti ili sličan deficit izazvati produženi period manje izražene ishemije kao i kraći period teže ishemije (3).

Infarkt nastaje kada protok krvi padne ispod 10–12 mL/100 g/min (20–30% normalnih vrednosti) (6). U tom opsegu protoka prestaje sinteza ATP-a, otkazuju jonske pumpe, nastupa globalni poremećaj transmembranskih jonskih gradijenata, oslobađanje glutamata i drugih neurotransmitera izmiče svakoj regulaciji. Javlja se porast ekstracelularnih koncentracija K^+ , a znatan pad Ca^{2+} , što ukazuje da Ca^{2+} ulazi u ćelije, odnosno da je na delu »anoksička depolarizacija« (5). Visoke koncentracije K^+ utiču i na depolarizaciju susednih neurona, što stvara preduslov za pokretanje talasa depolarizacije (tzv. depolarizacioni pomak; engl. *electrical spreading depression*) koji se širi iz fokusa ishemičke lezije ka perifernim regionima, utiču na prelaz Na^+ i vode u neurone i glialne ćelije, sa posledičnim citotoksičkim edemom (8) i, najzad, uzrokuju vazokonstrikciju koja dalje smanjuje rezidualni protok ka ishemičkom regionu (9). Visoki nivoi vanćelijskog glutamata aktiviraju NMDA (N-metil-D-aspartat) i AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionat) receptorske kanale na neuronima, koji se otvaraju i omogućavaju dalji pro-

dor Ca^{2+} u ćelije (10). Ovim se sada pokreće poslednja sekvenca poremećaja koji dovode do ćelijske smrti (11).

Penumbra

Okluzija neke od glavnih arterija mozga izaziva naglo smanjenje moždanog krvnog protoka u onim oblastima mozga koje ta arterija vaskularizuje. Međutim, sama granica između ishemičkog tkiva i tkiva sa normalnom perfuzijom nije oštro definisana. Ni redukcija protoka nije homogena u celoj ishemičkoj teritoriji: najveća je u centru ishemičkog žarišta, a zatim je progresivno sve manje izražena što se više udaljavamo od tog centra, sve dok se protok na marginama ishemijom zahvaćane oblasti ne normalizuje zahvaljujući snabdevanju iz susednih, neokludiranih arterija. Upravo taj periferni deo ishemičke teritorije u kome je smanjenje protoka manje izraženo naziva se *zonom ishemičke penumbre*, u kojoj još uvek postoji izvestan rezidualni protok krvi i u kojoj su neuroni funkcionalno »nemi«, ali strukturno još uvek intaktni (12). U zoni penumbre je protok krvi ispod 20 mL/100 g/min i to je upravo protok na kojem prestaje električna komunikacija između neurona (6).

Ishod moždane ishemije ne mora biti isti u centru ishemičkog žarišta i u zoni penumbre. Naime, nakon relativno kratkog vremena u centru ishemičke zone, zbog teške ishemije (> 80%), nastaju ireverzibilne promene i infarkt tkiva (4). Suprotno, funkcionalni poremećaji neurona u zoni penumbre su potencijalno reverzibilni pod uslovom da se u odgovarajućem vremenskom intervalu (»prozoru«) ponovo uspostavi krvni protok i obezbedi zaštita neuronima (12). Prema tome, sve neuroprotektivne terapijske strategije usmerene su na zonu penumbre, dok je centralnoj zoni ishemije i dalje namenjen terapijski nihilizam. Međutim, penumbra nije statična, tj. ne radi se o »uspavanoj lepotici« koja čeka poljubac neurologa (13), već o zoni u kojoj stanje može da se progresivno pogoršava i da se odnos centralnog ishemičkog žarišta i penumbre menja u korist infarktne centra. Kompletna nekroza svih tkivnih elemenata (pannekroza) se u centru ishemije, zoni s najmanjim krvnim protokom, javlja nakon približno jednog sata, ali se zona pannekroze radijalno širi i ima maksimalnu zapreminu nakon 6–8 sati kod primata u eksperimentalnim istraživanjima (14), dok kod ljudi ovo vreme nije određeno. Može se slobodno reći da u satima nakon početka ishemične infarktne zona polako »regrutuje« susedne regione penumbre i da je to vreme u kome treba farmakološki delovati, naravno pod uslovom da znamo koji su to procesi i mehanizmi koji ćelije u penumbri »guraju« u ireverzibilne pannekrotičke promene (Tabela 1).

Tabela I Kategorizacija ishemičkog oštećenja mozga

	Primarna oštećenja (rana)	Sekundarna oštećenja (kasna)
Promene	Piknoza i eozinofilija neurona koji umiru Izostanak električne aktivnosti mozga Smanjenje ekstracelularnog prostora uz bubrenje glije (citotoksički edem)	Nekroza glije i endotela; akumulacija leukocita; hemoragija Vazogeni edem Hernijacija moždanog tkiva
Mehanizmi	Energetski deficit (\downarrow ATP) Poremećaj sinteze proteina Izlaganje toksičnim supstancama koje oslobađa ishemičko tkivo (npr. glutamat, laktati) Nagomilavanje Ca^{2+} u ćelijama Promene strukture/ekspresije genetskog materijala	Oslobađanje citokina iz aktiviranih leukocita Promene propustljivosti krvno-moždane barijere Povećan viskozitet krvi Moždana hiperemija

Reperfuzija

Brza reperfuzija ishemičkog tkiva je kritična za ponovno uspostavljanje normalnih funkcija, ali ona može i da paradoksalno pokrene progresivno propadanje reverzibilno oštećenih ćelija, sa nekrozom tkiva (tzv. reperfuziono oštećenje). Etiologija reperfuzionog oštećenja je multifaktorska i obuhvata infiltraciju leukocita, oslobađanje citotoksičkih medijatora i dr (15). To je u skladu sa kliničkim zapažanjem da reperfuziona terapija može biti efikasna ako se ostvari unutar prvih nekoliko sati nakon ishemije moždanog tkiva, dok kasnije može biti čak i štetna, uzrokovati moždana krvarenja i povećati mortalitet (3).

Mehanizmi oštećenja ćelija u ishemiji mozga

Postoje brojni mehanizmi koji uzrokuju ishemičko oštećenje mozga, koji deluju u različitim vremenskim rasponima nakon početka ishemije i zavisno od regiona ishemičke teritorije.

Energetsko osiromašenje tkiva

U intaktnom mozgu ukupna metabolička aktivnost predstavlja zbir aktivacionog potencijala (sinaptička transmisija, akcioni potencijali) i bazalnog metabolizma koji podržava vitalne funkcije ćelija. U toku rada, mozak utroši trećinu energije na održavanje sinaptičke transmisije, trećinu na transport Na^+ i K^+ , i poslednju trećinu na održavanje strukturnog integriteta ćelija (16). Jasno je kakve posledice stoga nosi iscrpljivanje energetskih zaliha tkiva (ATP i fosfokreatin). Međutim, izgleda da je energetski deficit osnovni mehanizam ćelijske smrti samo u centru ishemičkog oštećenja, dok na periferiji infarktne zone (penumbra) drugi faktori izgleda da imaju značajniju ulogu (7). Prema tome, iako je izvestan stepen ener-

getskog osiromašenja neizbežna karakteristika svih ishemičkih lezija mozga, u većini stanja koje izaziva moždana ishemija potpuno energetsko osiromašenje nije ni dovoljno, ni neophodno da se uzrokuje ireverzibilno oštećenje neurona.

Poremećaj jonske homeostaze

Sa padom nivoa ATP-a u ishemičkim ćelijama mozga kompromituju se funkcije energetski zavisnih jonskih pumpi, uključujući Na^+/K^+ -ATPazu i Ca^{2+} -ATPazu (12), sa ulaskom Na^+ i izlaskom K^+ iz ćelija. Posledica ovakvih promena je depolarizacija neuronskih membrana, sa otvaranjem tzv. »voltažnih« kalcijumskih kanala, te ulaskom ovog jona u neurone. Uz to, smanjenje energetskih depoa u neuronima remeti i procese unutarćelijske sekvestracije Ca^{2+} .

Membranski potencijali neurona počinju da se menjaju obično već nakon 15–90 sekundi anoksičkog ili ishemičkog inzulta (17). Međutim, iznenađujuće je da u tim početnim fazama, čak i u populacijama neurona definisanih struktura mozga, koji imaju slične osobine, neuroni različito reaguju: kod nekih nastupa hiperpolarizacija, drugi se depolarišu, a neki neuroni samo neznatno reaguju, kao na primer piramidni neuroni somatosenzorne kore. Međutim, ako sam inzult traje duže od par minuta, svi neuroni bivaju depolarisani.

Nagli porast vanćelijskih koncentracija K^+ tokom ishemičke epizode se obično pripisuje brzom otkazivanju Na^+/K^+ -ATPaze, ali porast ekstracelularnog K^+ zapravo počinje već u trenutku kada su nivoi ATP-a smanjeni za samo 15%. Prema tome, pored ove jonske pumpe, u ranom porastu vanćelijskih koncentracija K^+ još značajniju ulogu ima povećanje membranske konduktivnosti za kalijum, koje pokreće ishemija (17). Uporedo sa promenama potencijala membrana ili neposredno nakon njih, uočava se

smanjenje vanćelijskih koncentracija Na^+ i Cl^- , a povećanje intracelularnih nivoa Cl^- i Ca^{2+} .

Acidoza

Fokalna ishemija uzrokuje smanjenje pH u tkivu mozga do 6,4–6,7 (6). Ovakva acidoza se objašnjava smanjenim dotokom O_2 u mitohondrije, sa smanjenom produkcijom ATP-a i posledičnom, sekundarnom aktivacijom anaerobnog metabolizma (18). Kada se 1 mol glukoze metabolize do 2 mola laktata i ako se dva mola ATP-a, koja se u ovoj reakciji stvaraju, ponovo hidrolizuju do $\text{ADP} + \text{P}_i$, oslobodiće se 2 mola H^+ . Sa porastom anaerobne glikolize u uslovima teške ishemije nastupiće porast nivoa laktata u tkivu mozga, sa smanjenjem i intra i ekstracelularnog pH (acidoza). Uz to, dopunske količine H^+ se takođe stvaraju i u drugim reakcijama koje se odigravaju u anaerobnim uslovima (19). Acidoza se uvek registruje u uslovima teške ishemije i verovatno je odgovorna za njen pannekrotički karakter, tj. smrt ne samo neurona, već i glijalnih ćelija i vaskularnog endotela. Da je zaista u pitanju patogenetska uloga acidoze svedoči i zapažanje da se tokom hipoglikemičke kome ne razvija infarkt, iako postoji energetski deficit i gubitak jonske homeostaze, ali ne i acidoza.

Ekscitotoksičnost

Aminokiseline glutamat i aspartat predstavljaju glavne brze, ekscitatorne neurotransmitere CNS-a sira, u kome se nalaze u miliosmolarnim koncentracijama (20). U fiziološkim uslovima, glutamat je uglavnom lokalizovan unutar svojih intracelularnih kompartmana, ali njegov izuzetni značaj za obezbeđivanje ekscitatornih sinaptičkih signala zahteva i postojanje posebnih presinaptičkih mehanizama koji regulišu njegovo oslobađanje, kao i ponovno preuzimanje u presinaptičke završetke. Najkraće rečeno, svako stanje praćeno depolarizacijom membrana neurona ili njihovim preteranim pražnjenjem ima za posledicu povećano sinaptičko oslobađanje i povišene vanćelijske nivoe glutamata (10).

Glutamat na nivou neurona deluje tako što aktivira receptore za ekscitatorne aminokiseline, čija se klasifikacija zasniva na agonistima koji ih selektivno aktiviraju (21). Glutamat i aspartat kao neurotransmiteri CNS-a, međutim, imaju zastrašujuću prirodu »Doktor Džekil i Mister Hajda« (9), s obzirom da imaju vitalno važne metaboličke, neurotrofičke i neurotransmiterske uloge, ali da u određenim stanjima ispoljavaju i veoma snažne neurotoksične efekte (22). S obzirom da se radi o ekscitatornim aminokiselinama, uveden je koncept »ekscitotoksičnosti«. Molekularna osnova ekscitotoksičnosti nije u potpunosti rasvetljena, ali je glavna uloga namenjena povećanju unutarćelijskih koncentracija Ca^{2+} . *In vitro* eksperimenti su ukazali da se oštećenje kortikalnih neurona na-

kon kratkog, ali intenzivnog izlaganja glutamatu može podeliti u 2 faze. Prva faza je praćena neposrednim, masivnim ulaskom Na^+ u ćelije, uz pasivni ulazak Cl^- i vode, što rezultira u depolarizaciji i povećanju volumena ćelije, do eventualnog krajnjeg ishoda, tj. lize ćelije (22). Drugu fazu karakteriše odložena dezintegracija neurona, koju pokreće ulazak Ca^{2+} u neurone preko jonskih kanala vezanih za NMDA ili druge glutamatne receptore. Sa protrahanim dejstvom glutamata na neurone, selektivna aktivacija kainatnih i AMPA receptora je takođe potencijalno veoma toksična (23). Joni kalcijuma sa svoje strane, pokreću čitav niz štetnih metaboličkih procesa, čiji je završni čin dezintegracija ćelije. Između ostalih enzimskih sistema, Ca^{2+} aktivira protein kinaze, koje menjaju aktivnost raznih enzima, a regulišu i aktivnost membranskih proteina, uključujući jonske kanale i receptorske molekule (24, 25). Na primer, fosforilacija GABA_A receptora smanjuje njihovu aktivnost, dok fosforilacija NMDA receptora povećava aktivnost ovih receptora – mehanizam koji dalje pojačava ekscitatorne funkcije, pa i ekscitotoksičnost (25).

Prema tome, u ishemičkim uslovima u mozgu se veoma brzo postiže osnovni preduslov za ispoljavanje ekscitotoksičnosti: povišeni nivoi ekscitatornih aminokiselina, pre svega glutamata. Posledično se razvija depolarizacija neurona, sa aktivacijom NMDA receptora i ulaskom Ca^{2+} u neurone.

Uloga jona kalcijuma u ishemiji mozga

Kalcijum ima dvostruku ulogu u ćelijskim funkcijama. Pod kontrolisanim uslovima njegove uloge su stabilizovanje membrana, očuvanje integriteta ćelije, u metaboličkoj regulaciji, kao sekundarnog glasnika i dr. Međutim, pod nekontrolisanim uslovima, u različitim patološkim stanjima, Ca^{2+} zauzima i centralno mesto medijatora ćelijskog oštećenja i smrti. Centralni događaj u »kalcijumskoj hipotezi« ćelijske smrti je poremećaj bioenergetskog statusa ćelije koji uzrokuje porast citosolnih koncentracija Ca^{2+} [Ca^{2+}]_i (26).

U toku ishemije nivoi ATP-a u tkivu mozga opadaju do 5% svojih fizioloških vrednosti unutar samo 5–7 minuta nakon početka ishemije. Sa energetskim osiromašenjem kompromituje se funkcija jonskih pumpi, uključujući Ca^{2+} -ATP-azu. Uz to, smanjenje energetskih depoa i smanjeno snabdevanje kiseonikom u ishemiji mozga, remete procese sekvestriranja Ca^{2+} u ER i mitohondrije. Tačnije, ove organele oslobađaju Ca^{2+} u citosol za vreme ishemije. Štaviše, s obzirom da H^+ i Ca^{2+} mogu da kompetuju za ista mesta vezivanja, acidoza može dalje da pospešuje oslobađanje deponovanog Ca^{2+} iz mitohondrija i ER.

Pojednostavljeno, ishemija pokreće masivan ulaz Ca^{2+} u ćelije mozga kroz različite vrste kalcijumskih kanala koji se u toku ishemije aktiviraju, uz sekundarno pražnjenje i intracelularnih depoa ovog jo-

na (ER, kalciozomi, mitohondrije). U stanjima energetske deficita, povećanju $[Ca^{2+}]_i$ se ne suprotstavljaju energetske-zavisni mehanizmi transmembranskog transporta Ca^{2+} ili mehanizmi njegove sekvencijalne. Završni rezultat je povećanje $[Ca^{2+}]_i$ u nervnim ćelijama do toksičnih nivoa, koji pokreću kaskadu fatalnih poremećaja i procesa koji uzrokuju smrt ćelija Ca^{2+} aktivira različite degradativne enzime u ćelijama, tipa proteaza koje razgrađuju strukturne proteine, fosfolipaza (npr. fosfolipaza C) koje katalizuju hidrolizu fosfolipida membrana, endonukleaza koje razgrađuju DNK, transglutaminaza i dr (27). Ekscesivno povećanje $[Ca^{2+}]_i$ aktivira neutralnu proteazu, kalpain I. Kalpaini hidrolizuju peptidne veze u mijelinu, mikrotubulima, neurofilamentima i drugim strukturnim proteinima, čime oštećuju membrane i uzrokuju smrt ćelija. Inhibitori kalpaina deluju neuroprotektivno (28).

Najzad, i kratkotrajna povećanja $[Ca^{2+}]_i$ uzrokuju promene u fosforilaciji proteina i transkripciji gena (29). Na primer, ulaz Ca^{2+} kroz voltažne kanale tokom ishemije mozga može da pokrene ekspresiju c-fos gena (30).

Slobodni radikali i ishemija

Slobodni radikali (SR) su atomi ili molekule koji sadrže orbitu sa nesparenim elektronom, što ih čini nestabilnim i izuzetno reaktivnim formama koje su u stanju da preuzmu elektron od susednih molekula i tako kompletiraju svoju orbitu. Oksiradikali koji se stvaraju aktivnošću mitohondrijalnog respiratornog lanca elektrona kao intermedijati u transformaciji O_2 u vodu, u fiziološkim uslovima su čvrsto vezani za aktivna mesta enzima i ne predstavljaju opasnost za ćeliju. Međutim, i u tim uslovima se oslobode (»procure«) izvesne količine superoksidnih radikala.

SR, a posebno hidrosilni radikali ($OH\cdot$), mogu da reaguju i oštete bukvalno bilo koji biomolekul, uključujući esencijalne enzime, strukturne proteine, DNK, a posebno membrane ćelija u lančanim reakcijama njihove lipoperoksidacije. Kada SR reaguju sa neradikalnim jedinjenjem, stvaraju se novi SR koji tako dalje šire lančanu reakciju, koja prestaje tek kada dva SR reaguju međusobno ili kada ih neutrališu antioksidantna jedinjenja. Prema ovakvim lančanim reakcijama su posebno osetljive ćelijske membrane zbog visokog udela višestruko nezasićenih masnih kiselina, sa lipoperoksidacijom membrana koja konačno dovodi do ćelijske smrti. Međutim, kakav je odnos ishemije mozga i SR?

Pretpostavlja se da SR imaju važnu ulogu u patogenezi ishemičkog oštećenja mozga, a posebno u zoni penumbre i u fazi reperfuzije. SR se stvaraju u ishemičkom tkivu mozga u kome je kompromitovana aerobna glikoliza i tada su mitohondrije glavni izvor reaktivnih SR. Aktivacija glutamatnih receptora je praćena oslobađanjem SR, dok, sa druge strane slo-

bodni kiseonički radikali i sami izazivaju oslobađanje ekscitatornih aminokiselina (31). SR se mogu stvarati i tokom razgradnje adeninskih nukleotida, preko ksantin oksidaze, kada se stvara vodonik peroksid i superoksidni radikal. Oni se generišu i kao uzgredni produkti metabolizma arahidonske kiseline, koja se ekscesivno oslobađa u ishemiji mozga, i iz polimorfonuklearnih leukocita koji infiltriraju ishemičku zonu. U ishemiji mozga i tokom reperfuzije nije značajan samo dramatičan porast produkcije SR, već i poremećaj u antioksidativnim mehanizmima odbrane, čija aktivnost ne može više da predupredi nepovoljno dejstvo SR (32).

Poseban interes u grupi SR je privukao azot oksid (NO) i njegov značaj u akutnom ishemičkom moždanom udaru (33). NO je SR koji se stvara tokom konverzije arginina u citrulin, u reakciji koju katalizuje sintaza NO (NOS).

U akutnoj ishemiji mozga povećava se aktivnost NOS i oslobađanje NO (33), koje može da ima i pozitivne i negativne efekte. Povećana aktivnost endotelijalne NOS (eNOS), preko vazodilatatornog dejstva u mozgu, inhibicije agregacije trombocita i adhezije leukocita za zidove krvnih sudova, izgleda da deluje neuroprotektivno (33). Nasuprot, aktivacija nNOS usled povećanih koncentracija $[Ca^{2+}]_i$ i neuronalno oslobađanje NO izgleda da ima jednu od najznačajnijih uloga u ishemičkom oštećenju neurona.

Razgradnja lipida i metabolizam arahidonske kiseline

Ishemija mozga u različitim eksperimentalnim modelima aktivira fosfolipaze i uzrokuje dramatičnu akumulaciju slobodnih masnih kiselina, a pre svih višestruko nezasićene arahidonske kiseline (AK) (34). Nakon prestanka funkcije glicerofosfolipidnih puteva sinteze, koji zavise od utroška ATP-a i ubrzanja katabolizma lipida membrana pod dejstvom fosfolipaza A_2 i C, koje se aktiviraju povećanjem $[Ca^{2+}]_i$, nastupa skok koncentracija slobodnih masnih kiselina za 10–20 puta u ishemičkom tkivu mozga.

Arahidonska kiselina (AK) ali i druge višestruko nezasićene masne kiseline, na više načina doprinose razvoju ishemičkog oštećenja mozga: (a) uzrokuju regionalna smanjenja pH i povećanje osmolalnosti tkiva; (b) tokom reperfuzije u prisustvu velikih količina oslobođene AK nastupa njena konverzija u eikozanoide, preko ciklooksigenaznog (COX) i lipooksigenaznog puta, kada se u različitim enzimskim reakcijama oslobađaju SR, a posebno superoksidni radikali; (c) leukotrijeni, produkti aktivnosti lipooksigenaze, remete propustljivost endotela malih krvnih sudova i olakšavaju razvoj vazogenog edema; (d) AK i druge višestruko nezasićene masne kiseline u sinaptozomima inhibiraju Na^+/K^+ -ATP-azu i doprinose razvoju ćelijskog, citotoksičnog edema; (e) AK i druge više-

struko nezasićene masne kiseline uzrokuju povećano oslobađanje, ali i poremećeno presinaptičko preuzimanje glutamata, sa posledičnom akumulacijom i produženim sinaptičkim delovanjem ovog neurotransmitera (34).

Promene neurotransmiterskih sistema tokom ishemije

Slično glutamatu i drugi neurotransmiteri bivaju oslobođeni tokom ili nakon ishemičke epizode u vanćelijski prostor mozga (35). Pražnjenje neurotransmiterskih depoa je, posebno u regionima koji su bogati monoaminergičkim projekcijama, dokumentovano za noradrenalin (NA), dopamin (DA) i serotonin (5-HT).

Nametalo se pitanje da li opisane promene neurotransmitera imaju patogenetski značaj? Ishemičko oštećenje mozga nastupa i pri samo naznačenom povećanju ekstracelularnih nivoa monoamina, što ukazuje da oni nisu neophodni da bi se pokrenuo početni proces oštećenja. Međutim, prethodno pražnjenje depoa kateholamina (36) ili lezija substantie nigre, sa smanjenjem nivoa DA u strijatumu (37), obezbeđuju izvesnu zaštitu protiv ishemičkog oštećenja. Moguće objašnjenje je da masivno oslobođeni monoamini podležu bilo autooksidaciji ili oksidaciji koju katalizuje monoaminooksidaze (MAO), sa povećanim stvaranjem SR, čiju smo moguću ulogu u ishemiji mozga već opisali.

Utvrđeni su i poremećaji holinergičkog sistema tokom ili ubrzo nakon ishemije mozga, uglavnom u pravcu deficita funkcije, čime su barem delimično objašnjavani poremećaji pamćenja i ponašanja nakon moždanog udara (36).

Postishemička zapaljenjska reakcija

Osnovna karakteristika zapaljenjske reakcije je akumulacija leukocita u oštećenom tkivu, bez obzira na uzrok tog oštećenja. Migracija leukocita u različite organe, uključujući mozak, može biti izazvana ne samo infektivnim ili toksičkim stimulusima, već i neinflamatornim/neimunskim nadražajima tipa ishemije ili traume, kada se radi o »sterilnoj« zapaljenjskoj reakciji koja ne uključuje patogene iz spoljne sredine (38).

Zapaljenjska reakcija koja obuhvata ishemičko tkivo mozga posledica je kaskade patofizioloških promena i dinamičkih međusobnih uticaja različitih ćelija oštećenog tkiva, tipa neurona, astrocita, fibroblasta, glatkih mišićnih i endotelnih ćelija, kao i komponenti krvi (39). Ćelijske efekte inflamacije pokreću citokini, mali proteini koji se stvaraju u većini ćelija i koji imaju brojne biološke aktivnosti koje pospešuju međućelijske interakcije. Već nakon jednog sata posle fokalne ishemije i tokom prvih 24–48 sati reperfuzije, endotelne ćelije, neuroni, astrociti i perivasku-

larne inflamatorne ćelije bivaju aktivirane i započinju zapaljenjsku reakciju oslobađanjem ključnih citokina, interleukina (IL)-1 β i tumorskog faktora nekroze (TNF)- α , za kojima sledi sekundarni odgovor sa oslobađanjem IL-6, IL-8 i dr (40). Ovi citokini, uporedo sa drugim jedinjenjima tipa prostaglandina i kiseoničkih SR, aktiviraju migraciju leukocita ka oštećenom tkivu (41). Ukupni efekat svih ovih promena je protrombotsko/proinflamatorno stanje lokalnog endotela i pokretanje migracije leukocita ka mestu primarnog ishemičkog oštećenja, koje se odigrava već posle nekoliko sati reperfuzije. Leukociti se nagomilavaju u oštećenom tkivu i različitim patološkim mehanizmima dalje pogoršavaju oštećenje tkiva (sekundarno oštećenje) (39).

Molekularne promene u ishemiji mozga

Fokalna ishemija mozga aktivira složene genetske programe, što rezultira u sekvencijalnoj ekspresiji velikog broja gena. Neki od ovih molekula učestvuju u neposrednim reakcijama moždanog tkiva na oštećenje, drugi su uključeni u ćelijske procese koji određuju ishod ishemičkog oštećenja, dok treća grupa molekula koordinira procese oporavka lediranog tkiva (3). Sa početkom ishemije mozga, geni mogu biti izuzetno brzo indukovani, što je osnova pretpostavke da je moguće genetskim manipulacijama povećati otpornost mozga prema ishemičkom oštećenju.

Geni ranog odgovora

Geni ranog odgovora (GRO; engl. *immediate early response genes*) kodiraju za proteine koji se vezuju za DNK, ili transkripcione faktore, koji aktiviraju ekspresiju drugih gena (42). GRO se brzo i samo tranzitorno ekspimiraju u odgovoru na različite nadražaje, kao što je npr. porast [Ca²⁺]_i, aktivacija NMDA receptora i povećano stvaranje SR (43). Unutar prvih minuta ishemije, GRO tipa fos, jun i krox porodice gena se ekspimiraju u celoj hemisferi na strani na kojoj je okludirana srednja moždana arterija (43). Ovaj odgovor brzo i prestaje zbog njihovog kratkog poluživota, sem u neuronima oko zone ishemije (penumbre), gde porast ekspresije perzistira i do 4 dana posle ishemije (44).

Proteini toplotnog stresa

Proteine toplotnog stresa (engl. *heat-shock proteins*; HSP) kodira porodica gena, koji se ekspimiraju u odgovoru na različite metaboličke stresove, a sa ulogom da doprinesu mehanizmima adaptacije na takve stresove. Na primer, ekspresija hsp70 se javlja pre razvoja histoloških promena koje izaziva ishemija i smatra se ranim i osetljivim markerom ishemičkog oštećenja ćelije (43).

Citokini i drugi geni povezani sa zapaljenjskom reakcijom

Treća grupa gena čiju ekspresiju pokreće ishemija mozga su geni koji kodiraju za inflamatorne citokine o kojima je već bilo reči (TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1, CINC) i adhezione molekule, kao i za enzime koji mogu da imaju značajnu ulogu u mehanizmima odloženog ishemičkog oštećenja, kao što je iNOS i COX-2. Povećanje nivoa IL-1 β , TNF- α i IL-6 je utvrđeno nakon eksperimentalne ishemije mozga (45), koja, kao i ekspresija adhezionih molekula, preti infiltraciji ishemičkog tkiva neutrofilnim leukocitima i makrofagima i verovatno je molekularni signal za pokretanje zapaljenjske reakcije (3). Najveći deo ovih promena je lokalizovan u reaktivnim ćeljskim tipovima, ali poremećena ekspresija citokina i drugih gena povezanih sa zapaljenjskom reakcijom se nalazi i u postishemičkim neuronima.

Faktori rasta

Neurotrofički faktori su peptidni faktori rasta koji deluju direktno na neurone i od kritične su važnosti za njihov rast, diferencijaciju i preživljavanje u različitim situacijama. U neuronima odraslih životinja neurotrofički faktori mogu da indukuju metaboličke odgovore koji im pomažu da podnesu određeno oštećenje ili degenerativne procese.

Fokalna moždana ishemije pokreće ekspresiju i većeg broja faktora rasta, kao što su BDNF (engl. *brain-derived neurotrophic factor*), NGF (engl. *ner-*

ve growth factor), bFGF (engl. *basic fibroblast growth factor*), PDGF (engl. *platelet-derived growth factor*), TGF- β (engl. *transforming growth factor- β*), VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*), APP (amiloidni prekursorski protein), IGF-II (engl. *insulin-like growth factor II*) i dr (45).

Vremenski tok delovanja različitih patofizioloških mehanizama u ishemiji mozga

Patogenetski mehanizmi u razvoju ishemičkog i postishemičkog oštećenja moždanog tkiva su brojni i imaju relativno određen vremenski raspored svoga ispoljavanja, čije je poznavanje od ključne važnosti za planiranje uspešne terapije. Nažalost, još uvek nije moguće precizno odrediti vremensku sekvencu uključivanja pojedinih mehanizama, ali se relativno grubo može zaključiti da su energetska iscrpljenje, ekscitotoksičnost, nagomilavanje Ca²⁺ u ćeliji, acidoza i periinfarktne depolarizacije značajni u pokretanju procesa oštećenja tkiva, nasuprot postishemičkoj zapaljenjskoj reakciji i apoptozi koje se uključuju kasnije i doprinose odloženom propadanju ćelija u periodu postishemije. SR se u različitim fazama ovog procesa pojavljuju kao značajni medijatori ishemičkog i postishemičkog oštećenja, ali su njihovi izvori različiti: u početku se radi o samim oštećenim ćelijama tkiva mozga i procesima inhibicije mitohondrija, metabolizma arahidonske kiseline i aktivacije nNOS, dok su u kasnijim fazama za njihovo stvaranje uglavnom odgovorni aktivirani neutrofilni leukociti koji infiltriraju ishemičko tkivo.

PATHOPHYSIOLOGY AND CLASSIFICATION OF STROKE

Miroslava Živković¹, Vladimir Kostić²

¹*Clinic for Neurology, Clinical Centre Niš*
²*Institute for Neurology, Clinical Centre Niš*

Summary: Pathogenetic mechanisms in development of ischaemic and postischaemic brain damage are numerous, with relatively defined time disposal of their manifestation, which concept is essential for planning efficient therapy. Unfortunately, at this level, it isn't yet possible to determine exact induction time sequence of several mechanisms, but it is possible to deduce that the energetic exhaustion, exocytotoxicity, cellular accumulation of Ca²⁺, acidosis and periinfarctal depolarisations are important for tissue damage induction, opposite to postischaemic inflammatory reaction and apoptosis, which are interfered later and contribute to the delay of the cell deterioration during postischaemic period. Free radicals occur in various sections of this process as important mediators of ischaemic and postischaemic damage, but from different sources: on the onset it is from the damaged brain cells and processes of mitochondrial inhibition, arachidonic acid metabolism and nNOS activation, while during later sections they are product of activated neutrophil leucocytes which infiltrate the ischaemic tissue.

Key words: ischaemic brain disease, pathogenesis, metabolic alterations

Literatura

1. Mršulja BB. Brain metabolism and cerebrovascular insufficiency. Ljubljana, Lek, 1981.
2. Mršulja BB, Kostić VS. Neurohemija u neurološkim bolestima. Medicinska knjiga, Beograd, 1994.
3. Iadecola C. Mechanisms of cerebral ischemic damage. In: Walz W (ed) Cerebral Ischemia: Molecular and Cellular Pathophysiology. Totowa, Humana Press, 1999, pp 3–32.
4. Hossmann KA. Treatment of experimental cerebral ischemia: J Cereb Blood Flow Metab 1982; 2: 275–297.
5. Astrup J, Siesjo BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia. – the ischemic penumbra. Stroke 1981; 12:723–725.
6. Hakim AM. Ischemic penumbra: the therapeutic window. Neurology 1998; 51(suppl 3): 44–46.
7. Astrup J, Symon L, Branston NM, Lassen NA. Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. Stroke 1977; 8:51–57.
8. Kostić VS, Mršulja BB. Edem mozga uzrokovan ishemi-jom. U: Mršulja BB, Kostić VS (ed) Patofiziologija, dijagnoza i terapija cerebrovaskularnih bolesti. Beograd, Izdavačka delatnost Medicinskog fakulteta, 1989, str 57–65.
9. Raichle ME. The pathophysiology of brain ischemia. Ann Neurol 1983; 13: 2–10.
10. Kostić VS. Ekscitotoksična hipoteza u patofiziologiji ishemijske bolesti mozga: terapijska obećanja. U: Mršulja BB, Kostić VS (ed) Biološki osnovi terapije cerebrovaskularne bolesti. Beograd, Izdavačka delatnost Medicinskog fakulteta, 1992, str 47–65.
11. Milić S, Kostić VS. Metabolizam kalcijuma, antagonisti kalcijuma i njihova klinička primena u neurologiji. U: Mršulja BB, Kostić VS (ed) Biološki osnovi terapije cerebrovaskularne bolesti. Beograd, Izdavačka delatnost Medicinskog fakulteta, 1992, str 31–46.
12. Kostić VS, Sokić D. Savremene terapijske strategije u lečenju ishemijske bolesti mozga. U: Živković M, Đurić S (ur) Niške sveske. Niš, Prosveta, 1998; str 19–33.
13. Lassen NA, Vorstrup S. Ischemic penumbra results in incomplete infarction: is the sleeping beauty dead? Stroke 1984; 15: 755–764.
14. Jones TH, Morawetz RB, Crowell RM et al. Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys. J Neurosurg 1981; 54: 773–782.
15. Winquist RJ, Kerr S. Cerebral ischemia – reperfusion injury and adhesion. Neurology 1997; 49 (suppl 4): 23–26.
16. Back T. Pathophysiology of the ischemic penumbra – a revision of a concept. Cell Mol Neurobiol 1998; 18: 621–638.
17. Martin RL, Lloyd HGE, Cowan AI. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? TINS 1994; 17: 251–257.
18. Hakim AM, Shoubrifge EA. Cerebral acidosis in focal ischemia. Cerebrovasc Brain Metab Rev 1989; 1: 115–132.
19. Siesjo B, Smith M-L. Mechanisms of acidosis-related damage. In: Welch KMA, Caplan LR, Reis DJ, Siesjo BK, Weir B (eds) Primer on cerebrovascular diseases. San Diego, Academic Press, 1997, str 223–227.
20. Choi DW. Methods for antagonizing glutamate neurotoxicity. Cerebrovasc Brain Metab Rev 1990; 2: 105–147.
21. Williams K, Romano C, Dichter MA, Molinoff PB. Modulation of the NMDA receptor by polyamines. Life Sci 1991; 48: 469–498.
22. Olney JW, Ishimaru MJ. Excitotoxic cell death. In: Koliatsos VE, Ratan RR (eds) Cell death and diseases of the nervous system. Totowa, Humana Press Inc, 1998, pp 197–219.
23. Koh J, Goldberg MP, Hartley DM, Choi DW. Non-NMDA receptor-mediated neurotoxicity in cortical culture. J Neurosci 1990; 10: 693–705.
24. Hartley DM, Choi DW. Delayed rescue of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuronal injury in cortical culture. J Pharmacol Exp Ther 1989; 250: 752–758.
25. Meldrum B. Protection against ischemic neuronal damage by drugs acting on excitatory neurotransmission. Cerebrovasc Brain Metab Rev 1990; 2: 27–57.
26. Siesjo BK, Hu B, Kristian T. Is the cell death pathway triggered by the mitochondrion or the endoplasmic reticulum? J Cereb Blood Flow Metab 1999; 19: 19–26.
27. Ghosh A, Greenberg ME. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. Science 1995; 268: 239–247.
28. Siesjo BK, Siesjo P. Mechanisms of secondary brain injury. Eur J Anesthesiol 1996; 13: 247–268.
29. Squier MKT, Cohen JJ. Calpain and cell death. Cell Death Differentiation 1996; 3: 275–283.
30. Morgan JI, Curran T. Role of ion flux in the control of c-fos expression. Nature 1986; 322: 552–555.
31. Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F. Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. J Neurosci 1990; 10: 1035–1041.
32. Chan PH. Oxygen radicals. In: Walz W (ed) Cerebral ischemia: molecular and cellular pathophysiology. Totowa, Humana Press Inc, 1999, pp 105–124.

33. O'Mahony D, Kendall MJ. Nitric oxide in acute ischemic stroke: a target for neuroprotection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; 67: 1–3.
34. Kostić VS, Nenadović M. Eikozanoidi i ishemija mozga. U: Mršulja BB, Kostić VS (ed) *Biološki osnovi terapije cerebrovaskularne bolesti*. Beograd, CIBIF, 1992, str 74–90.
35. Nogawa S, Forster C, Zhang F, et al. Interaction between inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 after cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 10966–71.
36. Obrenovitch TP, Richards DA. Extracellular neurotransmitter changes in cerebral ischaemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1995; 7: 1–54.
37. Ahn SS, Blaha CD, Alkire MT, et al. Biphasic striatal dopamine release during transient ischemia and reperfusion in gerbils. *Stroke* 1991; 22: 674–9.
38. Feuerstein G. Inflammatory mediators in brain microvessels. In: Welch KMA, Caplan LR, Reis DJ, Siesjo BK, Weir B (eds) *Primer on cerebrovascular diseases*. San Diego, Academic Press, 1997, pp 220–3.
39. DelGraba TJ. The role of inflammation after acute stroke: utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy. *Neurology* 1998; 51 (suppl 3): 62–8.
40. Wang X, Yue TL, Barone FC, et al. Concomitant cortical expression of TNF- α and IL-1beta mRNAs follows early response gene expression in transient focal ischemia. *Mol Chem Neuropathol* 1994; 23: 103–14.
41. Hallenbeck JM. Inflammatory reactions at the blood-endothelial interface in acute stroke. *Adv Neurol* 1996; 71: 281–97.
42. Akins PT, Liu PK, Hsu CY. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia, friend or foe? *Stroke* 1996; 27: 1682–7.
43. Akiyama K, Hakim AM. Gene therapy in stroke. In: Bogousslavsky J (ed) *Acute stroke treatment*. London, Martin Dunitz, 1997, pp 163–70.
44. Uemura Y, Kowall NW, Moskowitz MA. Focal ischemia in rat causes time-dependent expression of c-fos protein immunoreactivity in widespread regions of ipsilateral cortex. *Brain Res* 1991; 552: 99–105.
45. Koistinaho J, Hekfelt T. Altered gene expression in brain ischemia. *Neuroreport* 1997; 8: 1–8.

Rad primljen: 18. 05. 2005.

Prihvaćen za štampu: 30. 05. 2005.