

MİKROMOLEKULYAR TRASSER KİMİ TANIN TURŞUSUNUN ONURĞA BEYNİNİ VƏ PERİFERİK SİNİRLƏRİ ƏHATƏ EDƏN QIŞALAR SƏVİYYƏSİNDƏ YAYILMASININ MÜQAYİSƏLİ TƏDQIQI. ELEKTRON MİKROSKOPIK TƏDQIQAT

Qasimov E.K., Hüseynova Ş.Ə.

Azərbaycan Tibb Universiteti. Histologiya embriologiya və sitologiya kafedrası. Bakı, Azərbaycan.

Nəşr tarixi: sentyabr 2019

***Əlaqə üçün:** AZ 1022, Bakı; Bakixanov küç., 23; e-mail: eldar.gasimov@amu.edu.az

İşin məqsədi. Hazırkı tədqiqat işinin məqsədi mikromolekulyar trasser kimi qəbul olunmuş tanin turşusunun aplikasiya olunduqdan sonra onurğa beynini və periferik sinirləri əhatə edən qişalar səviyyəsində yayılmasının elektron mikroskopik olaraq müqayisəli şəkildə tədqiqidir.

Materal və metodlar. Tədqiqat çəkisi 200-260 qram olan, 10 baş yetkin laborator ağ siçovulların qişalarla birlikdə onurğa beyin qabığının və oturaq sinirinin hissələri üzərində aparılmışdır. Tədqiqat üçün əvvəl dərin narkoz altında fosfat buferində (pH 7,4) hazırlanmış 2,5% qlutaraldehyd məhlulunu qalxan aortaya yeritməklə ağ siçovulların bütün bədəni perfuziya üsulu ilə fiksasiya olunduqdan sonra qişaları ilə birlikdə onurğa beynin və oturaq sinirinin fraqmentləri 1%-li osmium turşusu məhlulunda postfiksasiya edilmişdir. Postfiksasiya qutaran andan 2 saat müddətinə götürülmüş tikələrin üzərinə 0,5 M kakodilat buferində (pH – 7, 4) hazırlanmış 1%-li tanin turşusu məhlulu aplikasiya olunmuşdur. Sonra götürülən tikələrin elektron mikroskopiyada qəbul olunmuş protokollar üzrə Araldit-Epon və Spur blokları onlardan isə ultranazik kəsiklər hazırlanaraq JEM-1400 transmission elektron mikroskopunda tədqiq olunmuşdur.

Nəticələr: Əldə olunan məlumatlar bir mənalı göstərir ki, aplikasiya olunmuş 1%-li tanin turşusu məhlulu kollagen liflərinin özləri və interstisial maddənin tərkib elementlərinin iştirakı ilə nəql olunurlar. Qeyd etmək lazımdır ki, interstisial maddənin hialuron turşusu yerləşən nahiyələr rənglənmədiyi halda qlikozaminqlikanların səviyyəsində tanin turşusunun incə granulyar osofil dənəcikləri aşkar olunur. İstər onurğa beyni, istərsə də oturaq sinirinin qişalarında tanin turşusu bioloji sədd rolunu oynayan strukturlar səviyyəsinə çataaraq beyin-onurğa beyni və endonevral mayelərdən müvafiq olaraq cəmi bir qat araxnoidal və perinevral baryer hüceyrələri qatı ilə ayrılırlar. Beləliklə osmotik aktivliyə malik ionların bioloji səddlər səviyyələrində toplanmaları onurğa beyni və endonevral mayələrin adsorbsiya olunaraq qişalar istiqamətində nəqlini mümkünlüyü həmişə ön plana çəkilmişdir.

Acar sözlər: onurğa beni qişası, oturaq siniri, mikrotrasser kimi tanin turşusu, elektron mikrokoopiya, beyin-onurğa beyni mayesi, endonevral maye.

Compares the distribution of the tanin asid as micromoleculer trasser in the sheaths spinal cord and the peripheral nerves. electron microscopy research

Gasimov E.K., Huseynova Sh.A.

Azerbaijan Medical University. Department of Histology. Embryology and Citology. Baku, Azerbaijan

*Contact information: AZ1078 , Baku, Samed Vurgun str., 163, 3rd building;; e. mail:

eldar.gasimov@amu.edu.az

Aim. The aim of the current research consist using an electron microscope determination diffusion of tannic acid, known as a micromoleculer tracer, at the level of menings surrounding the spinal cord and peripheral nerves sheath after his application.

Materials and methods. The experiment was given 10 mature white rats weighing from 200 to 260 grams. By introducing a 2.5% glutaraldehyde solution onto the ascending aorta, was given general fixation of the studied animals. Postfixation of fragments of the spinal cord and sciatic nerve was performed in a 1% solution of osmium acid within 1 hour. Then, the studied fragments were immersed in a 1% solution of tannic acid prepared in 0.5 M cacodilate buffer (pH 7, 4) within 2 hours. Araldit-Epon və Spur blocks were prepared from the taken fragments according to the protocols used in electron microscopy. Ultrathin sections obtained from the latter were studied under a JEM-1400 electron microscope.

Rezults. The data obtained indicate that the applied 1% tannic acid solution is transported by the collagen fibers themselves and by the intestinal compounds. It should be noted that although the interstitial substance is not colored in areas containing hyaluronic acid, fine, osmifil tannic acid granules are detected at the level of the glycosaminglicans. In both the spinal cord and the sciatic nerves, tannic acid is transported to the level of structures

glycosaminglicans. In both the spinal cord and the sciatic nerves, tannic acid is transported to the level of structures that play a biological barrier.

Therefore, the location of the tracer is separated by a single layer of arachnoidal and perineural barrier cells, respectively, from the cerebrospinal and endoneural fluids. Thus, accumulation of ions with osmotic activity at the level of biological barriers can provide transport of the cerebrospinal and endoneural fluids in the direction of the sheaths that surround them.

Key words: spinal cord, sciatic nerve, tannic acid as microtasser, electron microscopy, cerebrospinal fluid, endoneural fluid

Giriş. Onilliklər ərzində beyin qişalarının ancaq beynin xarici təsirlərdən qoruduğu fikirlər əsasən üstünlük təşkil edirdi [12,3,4]. Lakin artan dəlillər beyin qişalarının mürəkkəb quruluş və tərkibə malik bioloji sədd rolunu oynayan [5], neyron və qliya elementlərinin differensiasiyası üçün morfogenetik siqnal mərkəzləri kimi fəaliyyət göstərən [6,7], beyin-onurğa beyni mayesinin cərəyanını təmin edən [8], müxtəlif istiqamətdə differensiasiya etmək qabiliyyətinə malik kök hüceyrələrinin yerləşməsi və fəaliyyəti üçün şərait yaradan [7], MSS daxil olan immunokompetent hüceyrələrin fəaliyyətlərinin tənzimləyicisi rolunu oynayan [9] və s. bu kimi orqanizm üçün həyati vacib olan bioloji prosesləri yerinə yetirən mürəkkəb morfo-funksional kompleksdir.

Qeyd olunanlara baxmayaraq hələ də beyin qişalarının təşkilində iştirak edən strukturların qarşılıqlı əlaqələri, ultrastruktur quruluş xüsusiyyətləri və müəyyən funksiyaların yerinə yetirilməsində rolları haqqında fikir ayrılıqları qalmaqda davam edir. Ələlxüsus qeyd olunmalıdır ki, beyin qişaları tərkibində istər zülal mənşəli, istərsə də osmotik aktiv ionların beyin qişaları tərkibində qeyri bərabər paylanmalarında iştirak edən strukturlar morfoloji olaraq öz təsdiqini tapmamışdır.

İşin məqsədi. Göstərilənləri nəzərə alaraq hal-hazırkı tədqiqat işinin məqsədi mikromolekulyar trasser kimi qəbul olunmuş tanın turşusunun aplikasiya olunduqdan sonra onurğa beynini və periferik sinirləri əhatə edən qişalar səviyyəsində yayılmasının

müqayisəli şəkildə tədqiqidir.

Tədqiqatın material və metodları.

Tədqiqat çəkisi 200-260 qram olan, 10 baş yetkin laborator ağ siçovulların qişalarla birlikdə baş beyin qabığının və oturaq sinirinin hissələri üzərində aparılmışdır. Tədqiqat üçün əvvəl dərin narkoz altında fosfat buferində (pH 7,4) hazırlanmış 2,5% qluturaldehid məhlulunu qalxan aortaya yeritməklə ağ siçovulların bütün bədəni perfuziya üsulu ilə fiksasiya olunduqdan sonra qişaları ilə birlikdə onurğa beyni və oturaq sinirinin fraqmentləri 1%-li osmium turşusu məhlulunda postfiksasiya edilmişdir. Postfiksasiya qutaran andan 2 saat müddətinə götürülmüş tikələrin üzərinə 0,5 M kakodilat buferində (pH – 7, 4) hazırlanmış 1%-li tanin turşusu məhlulu apli-kasiya olunmuşdur. Damar daxili perfuziyanın toxumaların keçiricilik imkanlarında nəzərə çarpacaq təsiri olmadığını nəzərə alaraq ultrastruktur səviyyədə yüksək osmiofilliyi ilə seçilən sahələrin tanin turşusunun yayıldığı yerlər kimi qiymətləndirilmişdir.

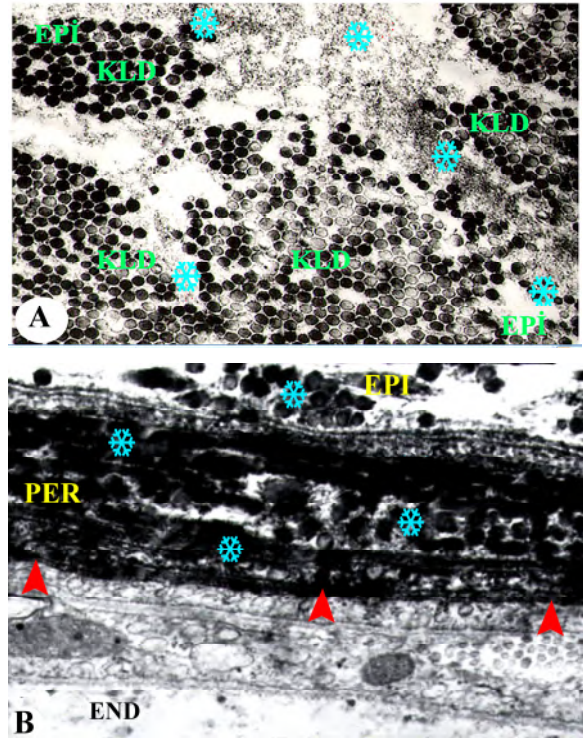
Daha sonra götürülmüş tikələr artan dərəcəli etil spirti məhlullarında susuzlaşdırılaraq Araldit-Epon və Spur qətranlarında blok halına salınmışdır. Bloklardan Leica EM UC7 ultratomlarında alınmış yarım-nazik (1-2µm) kəsiklər metilen abısı, azur II və əsasi fuksinlə rənglənərək Zeiss işıq mikroskopunda lazımi hissələrin şəkilləri Canon D650 (Yaponiya) rəqəmli fotokamera sistemi ilə çəkilmişdir. Eyni bloklardan alınmış 70-100 nm qalınlıqlı ultranazik kəsiklər əvvəlcə 2%-li uranil-asetat məhlulu,

sonra NaOH-ın 0,1N qatılıqlı məhlulunda hazırlanmış 0,2%-li təmiz qurğuşun sitratla rənglənmişdir. Ultr nazik kəsiklər 80-100 kv gərginlik altında JEM-1400 transmission elektron mikroskopunda tədqiq olunaraq elektronogramlar çəkilmişdir.

Tədqiqatın nəticələri və onların müzakirəsi. Əldə olunmuş elektronogramların analizi göstərir ki, istər oturaq sinirinin, istərsə də onurğa beyninin qışaları səviyyələrində aplikasiya olunmuş tanin turşusunun nəqlində iştirak edən əsas strukturun kollagen lifləri olduğu aşkar olunmuşdur. Bununla bərabər birləşdirici toxumanın tərkib hissələrindən biri olan qlikozaminqlikanların (köhnə adı mukopolisaxadirlər) da tanin turşusunun sinir sisteminin müxtəlif hissələrini əhatə edən qısa elementlərində tanin turşusunun nəqlində, bioloji sədd rolunu oynayan strukturların elektron mikroskopik olaraq aşkarlanmasında mühüm əhəmiyyətə malikdirlər.

Şəkil 1A-da oturaq sinirinin əhatə edən epi-nevral qışanın periferik hissəsində aplikasiya olunmuş tanin turşusunun nəqlində iştirak edən strukturların fərqli iştirakları heç bir çətinlik olmadan aşkar olunurlar. Belə ki, kollagen liflərinin tam əksəriyyətinin nəinki ətraflarında, hətta onların mərkəzi hissələrində yerləşən fibrillərin tünd osmiofil rənglənmələri fibrilyar strukturların bütövlükdə tanin turşusunun nəqlində iştirak etmələrini göstərir. Kollagen lifi dəstələrindən fərqli olaraq, amorf struktura malik interstisial maddə daxilində tanin turşusunun paylanması qeyri-bərbər (mozaik) xarakter daşıyır. Nəzər diqqəti cəlb edən incə dənəvər qurluşa malik osmiofil toplantılarla (şək. 1A-da qar dənəcikləri ilə nişanlanmışlar) yanaşı, müxtəlif formaya malik rənglənməmiş sahələrin olduğu ilkin böyüdücü x15000 olan elektronogramlarda aydın görünurlər. Digər nəzər diqqəti cəlb edən rənglənməmiş sahənin topoqrafik olaraq mərkəzi vəziyyətdə

yerləşmələridir. Əgər proteoqlikanların tərkibində hialuron turşularının mərkəzi vəziyyətdə yerləşərək özək rolunu oynadıklarını qlikozaminqlikanların isə periferik mövqe tutmalarını nəzərə alaraq [10] əsasən sonuncuların tanin turşusunun nəqlində iştirak etdiklərini söyləmək olar.



Şək.1. Tanin turşusunun oturaq sinirinin epinevral (A) və perinevral qışaları səviyyələrində yayılmalarının electron mikroskopik şəkilləri. A və B - ultr nazik kəsiklər. Rəng: uranil-asetat və təmiz qurğuşun-sitrat. İlk böyüdücü: A – x15000; B – 21000. İxtisarlər: EPI – epinevrium; PER – perinevrium; END – endonevrium; KLD – kollagen lifi dəstələri. İzahı mətnə verilmişdir. Tanin turşusunun yayıldığı yerlərin bir qismi qar dənəcikləri ilə nişanlanmışlar.

Periferik sinir dəstələrində bioloji sədd rolunu oynayan perinevral qısa səviyyəsində aplikasiya olunmuş tanin turşusunu yayılması şək.1B-də nümayiş etdirilmiş elektronogramda verilmişdir.

Göründüyü kimi, epinevriumun daxili qatında yerləşən kollagen lifləri (şək. 1B) tur-

şusu ilə rəngləndikləri halda, perinevral qişanın xarici qarlarını əhatə edən bazal səfhədə və hüceyrənin sitoplazmasının osmiofil çöküntü aşkar edilmir. Bununla birlikdə təsvir olunan elektronqrammanın qırmızı ox başları ilə nişanlanmış hissələrinə qədər yerləşən kol-lagen liflərinin hamısı və interstisial mad-dələrin çox hissəsi tanin turşusu ilə rəngləndiyi sonuncunun perinevral qişanın daxili qatlarına qədər sərbəst olaraq nəql olun-duğunu heç bir mübaliğəsiz söyləməyə əsas verir. İkinci birtərəfdən nümayiş etdirilən elektronqramma bir daha endo-nevral sahədə cərəyan edən mayenin tərkibinin sabit saxlanmasında iştirak edən bioloji səddin perinevral qişanın daxili qat hüceyrələri tərəfindən həyata keçirildiyini sübut edir.

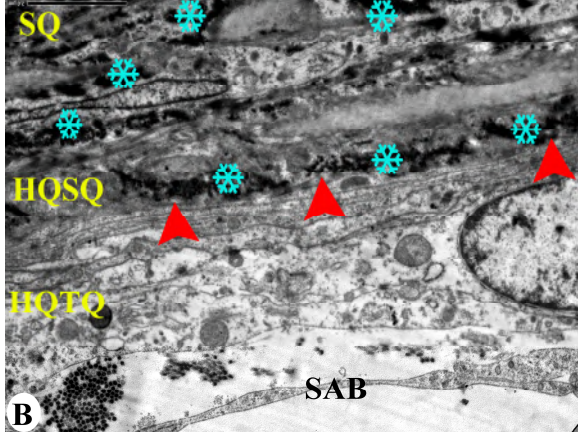
Ağ sıçovullarda beyin qişaları səviyyəsində sədd rolunu oynayan strukturların topoqafik vəziyyətləri haqqında məlumatların demək olar ki, dəqiqləşdirilməməsi makro- və mikromolekulyar trasserlərin tətbiqini xeyli çətinləşdirirdi. Göstərilənləri nəzərə alaraq bizim tərəfimizdən [11] 500 mkm-ə bərabər olan beyin qişalarının 30000 dəfə böyüdülmüş ardıcıl elektron mikroskopik şəkillərindən hazırlanmış rekonstruksiyaların və lazım olan hissələrin 100-200 min dəfə böyüdücülər vasitəsi ilə tədqiqi göstərir ki, beyin qişaları səviyyəsində bioloji sədd rolunu hörümçəktorunabənzər qişanın retikulyar qatından kollagen lifləri dəstələri və bazal səfhə ilə (şək. 2A-da ox başları ilə nişanlanıb) ayrılan, bir-birləri ilə sıx əlaqələr vasitəsi ilə birləşən (şək. 2A-da oxlarla nişanlanıblar) araxnoidal hüceyrələr qatı oynayır.

Aplikasiya olunmuş tanin turşusunun onurğa beynin qişaları səviyyəsində nəqli şəkil 2B-də nümayiş etdirilmiş elektronqrammada təqdim olunmuşdur. Göründüyü kimi öz osmiofillikləri ilə ətraf strukturlardan fərqlənən tanin turşusunun yerləşdiyi yerlər hörümçəktorunabənzər qişanın (şək. 2B-də

qar dənəcikləri ilə nişanlanmışlar) retikulyar qatından kollagen lifləri dəstələri və bazal səfhə ilə (şək. 2B-da ox başları ilə nişanlanıb) ayrılan, araxnoidal hüceyrələrin sədd qatına qədər aşkar olunurlar. Bu elektron mikroskopik səviyyədə əldə olunmuş məlumat bir daha bioloji sədd rolunu oynayan strukturların hörümçəktorunabənzər qişanın retikulyar atmaları arasında cərəyan edən beyinonurğa beyni mayesindən ayıran cəmi bir araxnoidal hüceyrə qatı səviyyəsində yerləşir. Aparılan tədqiqatın nəticələri göstərir ki, makromolekulyar trasserlərlə yanaşı [12], mikromolekulyar trasserlər də istər oturaq sinirində, istərsə də onurğa beyni qısal-arından sərbəst şəkildə cərəyan edən mayələrin (müvafiq olaraq endonevral və beyin-onruğa beyni) yerləşdikləri nahiyələrdən sədd rolunu oynayan bir qat perinevral və araxnoidal hüceyrələr vastəsi ilə ayrılırlar. Sonuncu fikir endonevral və beyin-ohuğa beyni mayələrinin makro- və mikromolekulyar trasserlərin (müvafiq olaraq plazma zülallarının və osmotik aktiv ionların) yerləşdikləri yerlər istiqamətində nəqlinin mümkün olduğu haqqında irəli sürülmüş fikrə [13] qoşulmağa tam əsas verir. 2008-2013-cü illərdə yüksək impact faktoru olan jurnalda dərc olunmuş məqalələrin nəticələrindəki bir-birindən kəskin fərqlənmələrə baxmayaraq son fikirlə razılaşmağa tam əsas verir. [14] insan meyidindən götürülmüş hörümçək torunabənzər qişa dənəciklərinin xüsusi mühitdə saxlamaq şərti ilə (ex vivo modelində) sərt qişanın venoz cibləri istiqamətində daşınmasını təmin edirlər.

Fitslə nişanlanmış polistirin mikrodənəciklərinin qarışdırılmış məhlulla norma daxilində təzyiqlə perfuziya etdikdən sonra müasir histoloji, histokimyəvi və elektronmikroskopik metodların köməkliliyi ilə tədqiq etmişlər. Müəlliflərin nümayiş etdirdikləri materiallar birmənalı göstərir ki, təzə meyiddən belə götürülmüş HTBQD ancaq normal

istiqlamətində uyğun perfuziya zamanı Fitslə nişanlanmış mikrodənəciklərin sərt qışanın venoz cibləri istiqamətində daşınma-sını təmin edirlər.



Şək.2. Baç beyninin hörümçəktorunabənzər qışasının sədd qatının (A) və aplikasiya olunmuş tanin turşusunun onurğa beyni qışalarında yayılmasının electron mikroskopik şəkilləri. A və B - ultranazik kəsiklər. Rəng: uranil-asetat və təmiz qurğuşun-sitrat. İlkin böyüdücüləri: A – x60000; B – 15000. İxtisarlər: KLD – kollagen lifi dəstəsi; SQ – onurğa beyninin sərt qışası; HQSQ - onurğa beyninin hörümçəktorunabənzər qışasının sədd qatı; HQTQ - onurğa beyninin hörümçəktorunabənzər qışasının trabekulyar qatı; SAB – subaraxnoidal boşluq.

[15] siçovulun subaraxnoidal boşluğun bazal sisternasına koalin (oda davamla gil) məhlulu yeritdikdən sonra heyvanlarda beyin mədəciklərinin genişlənməsi ilə müşahidə olunan hidrosefaliyanın inkişaf etməsini MR şəkillərində numayiş etdirmişlər. Müəlliflərin fikrinə görə hidrosefaliyanın inkişafına səbəb qoxu sinir lifləri boyunca boyun limfa düyünləri istiqamətində cərəyanın pozulmasıdır. Yəni hörümçək torunabənzər qışa dənəcikləri BOBM-nin cərəyanında mühüm rola malik deyillər.

Son iki başlıqda verilən məlumatların əksinə olaraq [16] kontrast maddələri onurğa beyninin subaraxnoidal boşluğuna yeritdikdən sonra (sisternoqrafiya) ardıcıl maqnit

rezonansı (MR) şəkillərinin tədqiqinə əsasən BOBM-nin bilavasitə onurğa beyni ətrafında yerləşən venoz damarların mənfəzinə daxil olduğunu bildirirlər.

Yekun. Əldə olunmuş məlumatları və bioloji mayələrin cərəyanına həsr olunmuş ədəbiyyat materiallarını yekunlaşdıraraq qeyd etmək lazımdır ki, qan plazmasının tərkibində olan zülalların miqdarının beyin-onurğa beyni və endonevral mayələrlə müqayisədə ən azı 200 dəfə çox olduğunu nəzərə alsaq topoqrafik vəziyyətlərindən asılı olmayaraq bioloji səddlərin mövcud olduğu nahiyələrdə mayenin kolloid-osmotik təzyiqin yüksək olduğu istiqamətdə yerdəyişməsinin müm-künlüyü həmişə ön plana çəkilməlidir.

Maliyyə mənbəyi: yoxdur.

Maraqların toqquşması: yoxdur.

Ədəbiyyat siyahısı.

1. Seitz R., Löhler J., Schwendemann G. Ependyma and meninges of the spinal cord of the mouse. A light-and electron-microscopic study. Cell Tissue Res. 1981;220(1): 61-72.
2. Krisch B. Ultrastructure of the meninges at the site of penetration of veins through the dura mater, with particular reference to Pacchionian granulations. Investigations in the rat and two species of New-World monkeys (*Cebus apella*, *Callitrix jacchus*). Cell Tissue Res. 1988 Mar;251(3):621-631.
3. Reina M., De Leon Casasola O, López A. et al. The origin of the spinal subdural space: ultrastructure findings. Anesth Analg. 2002; 94 (4):991-995
4. Reina M., Prats-Galino A., Sola R. et al. Structure of the arachnoid layer of the human spinal meninges: a barrier that regulates dural sac permeability. Rev Esp Anestesiol Reanim. 2010; 57 (8):486-92
5. Abbott N., Pizzo M., Preston J. et al. The role of brain barriers in fluid movement in the CNS: is there a 'glymphatic' system? Acta Neuropathol. 2018; 135(3):387-407.
6. Siegenthaler J., Pleasure S. We have got you

covered': how the meninges control brain development. *Curr Opin Genet Dev.* 201; 21(3):249-255.

7. *Decimo I., Fumagalli G., Berton V. et al* Meninges: from protective membrane to stem cell niche. *Am J Stem Cells.* 2012;1(2):92-105.

8. *Decimo I., Fumagalli G., Berton V. et al* Meninges: from protective membrane to stem cell niche. *Am J Stem Cells.* 2012;1(2):92-105.

9. *Yasuda K, Cline C, Vogel P. et al.* Drug transporters on arachnoid barrier cells contribute to the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Drug Metal Dispos.* 2013;41(4):923-31.

10. *Stolp H., Liddelow S., Sá-Pereira I., et al.* Immune responses at brain barriers and implications for brain development and neurological function in later life. *Front Integr Neurosci.* 2013; 23(7): 61. doi: 10.3389/fnint.2013.00061.

11. *Qasimov E.K., Hüseynova Ş.Ə.* Ağ siçovulun baş beyin qişalarının struktur elementlərinin elektron mikroskopik quruluş xüsusiyyətləri. *Milli Nevrologiya jurnalı*, 2018; 14(2):63-71.

12. *Гасымов Э.К.* Пучки нервных волокон как транспортная единица в стволе периферических нервов. *Азербайджанский медицинский журнал.* 1996; (9):14-18.

13. *Банин В.В., Гасымов Э.К.* Распределение протеинов в оболочках нерва как фактор реабсорбции эндоневральной (интерстициальной) жидкости. *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии.* 1990; (9):47-54.

14. *Glimcher S., Holman D., Lubow M., Grzybowski D.* Ex vivo model of cerebrospinal fluid outflow across human arachnoid granulations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49 (11): 4721-4728.

15. *Nagra G., Wagshul M., Rashid S. et al.* Elevated CSF outflow resistance associated with impaired lymphatic CSF absorption in a rat model of kaolin-induced communicating hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2010;7(1):4.

16. *Biceroglu H., Albayram S., Ogullar S. et al.* Direct venous spinal reabsorption of cerebrospinal fluid: a new concept with serial magnetic resonance cisternography in rabbits. *J Neurosurg Spine.* 2012; 16(4): 394-401.