

Т.М. Коваленко, І.О. Осадченко, К.Г. Сможаник,
І.Р. Ніконенко, Д. Мюллер, Г.Г. Скібо

Структурна організація зони СА1 гіпокампа щурів при експериментальній ішемії мозку

Исследовали динамику структурных и ультраструктурных изменений зоны СА1 гиппокампа крыс при моделировании нарушения кровоснабжения мозга (глобальной ишемии) путем четырехсосудистой окклюзии на протяжении 10 и 15 мин с последующей реперфузией. Установлено, что первые признаки поражения нервной ткани проявляются в структурных изменениях синаптических терминалей. Эти признаки заключаются как в изменении соотношения различных форм синаптических терминалей, так и организации синаптических везикул. Признаки поражения сомы нейронов при примененной длительности ишемического воздействия появляются к концу первых суток реперфузии, нарастают к 3–6-м суткам, что приводит к отсроченной гибели нейронов.

ВСТУП

Порушення мозкового кровотоку різного генезу супроводжуються розвитком гіпоксії мозку, що призводить до розладів окиснювального фосфорилування в нервових і гліальних клітинах і зниження концентрації макроергічних фосфатів, необхідних для підтримання іонного градієнта плазматичних мембран. Як наслідок, запускається ціла низка процесів, основними з яких є: акумуляція збуджувальних амінокислот у позаклітинному просторі, які діють цитотоксично, перевантаження клітин кальцієм, який призводить до виникнення послідовних цитоплазматичних подій, що викликають пошкодження тканини через активацію протеаз і фосфоліпаз, та індукція вільнорадикального окиснення, яке активує пероксидне окиснення ліпідів і uszkodження мембран [3, 12]. З іншого боку, відновлення кровотоку в мозку також спричиняє uszkodження тканин мозку, пов'язаних з реперфузією та реоксигенацією [1, 11]. Ступінь пошкодження нервової тканини залежить

від тривалості ішемічного впливу. Так, при тривалій ішемії відбувається швидка некротична загибель нейронів. Короткотривала ішемія також викликає значні зміни в тканині мозку, але uszkodження нервових клітин та їх загибель проявляється не одразу, а через певний проміжок часу, який триває години або навіть доби. Це явище визначається як відстрочена загибель нейронів, яка спостерігається в мозку людини [6] та експериментальних тварин – щурів і піщанок [7, 15].

Останнім часом особливого значення надають з'ясуванню механізмів відстроченої загибелі нейронів, оскільки це може надати можливість вплинути на хід розвитку ішемічного uszkodження клітин, яке є фактором ризику виникнення нейродегенеративних хвороб мозку [2, 13].

Одним із кращих методичних підходів для експериментальної оцінки ступеня ураження нервової тканини та пошуку засобів захисту нейронів від ішемії – реперфузії залишається модель глобальної ішемії мозку на тваринах, оскільки вона дозво-

ляє контролювати як часові параметри впливу, так і аналізувати чіткі морфологічні зміни в нервовій тканині. Як об'єкт досліджень, нами було обрано гіпокамп – структура мозку, відповідальна за процеси пам'яті та навчання, і нейрони якого, особливо в зоні СА1, є дуже чутливими до нестачі кисню, порівняно з іншими структурами мозку [8, 17].

Метою цієї роботи було дослідження структурних та ультраструктурних змін нейронів зони СА1 гіпокампа при моделюванні порушення кровопостачання мозку різного ступеня (ішемічного пошкодження).

МЕТОДИКА

Досліди проводили на 22 самцях щурів лінії Вістар масою 300–400 г, у яких створювали експериментальну модель глобальної ішемії мозку за допомогою чотирисудинної оклюзії, як описано Pulsinelli [16], з деякими модифікаціями. Щурів наркотизували каліпсолом (75 мг/кг) і виділяли обидві загальні сонні артерії. Під кожну артерію підводили лігатуру без переривання кровотоку і розріз зашивали. Після цього тварин поміщали в стереотаксичний апарат і коагулювали обидві вертебральні артерії між С1 – С2 хребцями. Тварини відновлювались після операції протягом 24 год. Наступного дня їх знерухомлювали ефіром, знімали шов з переднього шийного розрізу та на загальні сонні артерії для припинення кровотоку накладали атравматичні затискачі, які знімали через 10–15 хв, і кровотік в сонних артеріях відновлювався. Постійно контролювали ректальну температуру прооперованих тварин і підтримували її на рівні 37–37,5 °С за допомогою обігрівачих пристроїв. У постішемічний період, який тривав 1, 2, 3 чи 6 діб, забирали матеріал для досліджень. Контролем були 3 псевдооперовані тварини. Щурів анестезували ефіром і їх мозок фіксували за допомогою

транскардіальної перфузії – фіксації 4%-м розчином параформальдегіду і 2,5%-м розчином глютаральдегіду на 0,1 моль/л фосфатному буфері; рН 7,4. Виділений гіпокамп розрізали на поперечні зрізи товщиною приблизно 500 мк і дофіксували у цьому самому розчині 1,5 год, а потім у 1%-му розчині чотириоксиду осмію протягом 1 год. Тканину заливали в епоксидні смоли (Epon – Agaldit) за загальноприйнятою методикою. Напівтонкі зрізи товщиною приблизно 1 мкм, пофарбовані толуїдиновим синім та крезилвіолетом, аналізували на світлооптичному рівні. За допомогою комп'ютерної системи аналізу зображення BIOQUANT (“R&M Biometrics”, США) визначали відносну кількість ушкоджених і загиблих нейронів у зоні СА1 гіпокампа. Ультратонкі зрізи товщиною 50–70 нм, контрастовані в уранілацетаті та цитраті свинцю, вивчали в електронному мікроскопі JEM-100CX (Японія).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Після перенесеної оклюзії 48 % тварин загинуло в різні строки, а у тих, що вижили, спостерігалися виражені відхилення неврологічного статусу різного ступеня важкості – порушення координації рухів, судоми, паралічі. Всі прооперовані тварини втрачали масу тіла в середньому на 5,4 і 8 % через 24 та 48 год відповідно.

При проведенні аналізу ступеня ішемічного ушкодження тканини гіпокампа потрібно було з'ясувати, яка кількість нейронів в зоні СА1 пошкоджується та гине при різних термінах ішемії, коли з'являються перші морфологічні прояви порушень.

Нейрони, які світлооптично виглядали гіперхромними, з погано розрізняваними ядрами, зменшеними розмірами тіла, розглядали як загиблі, а нейрони, які мали просвітлену цитоплазму та світле набрякле ядро – як змінені або ушкоджені (рис. 1). Частина нейронів займала проміжне поло-

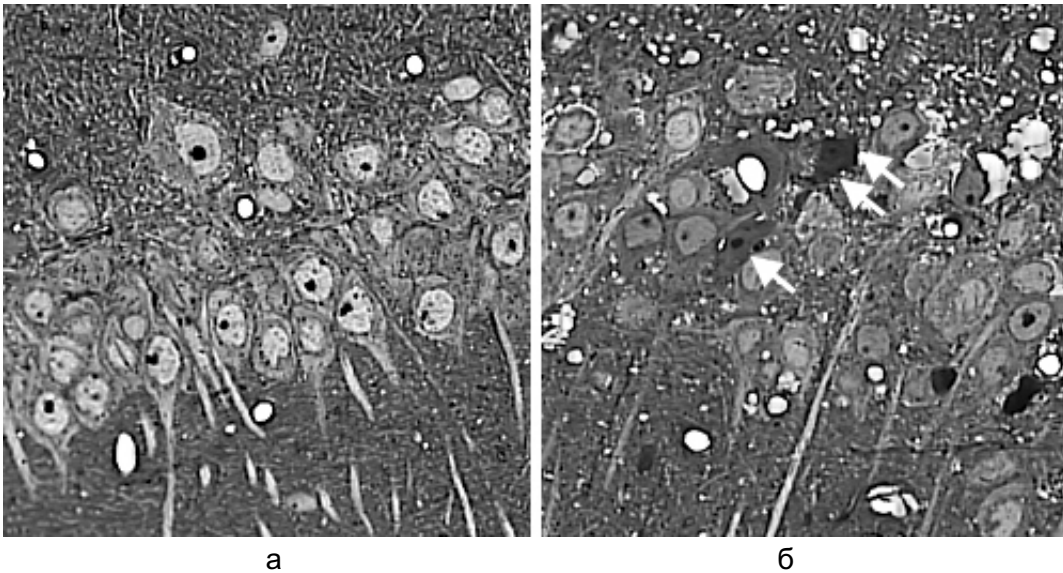


Рис.1. Мікрофотографії фрагментів зони CA1 гіпокампа шурів: а – контроль, б – пошкоджені (стрілка) та загиблі (подвійна стрілка) нейрони через 3 доби після 15-хвилинної чотирисудинної оклюзії. Зб. 240

ження – у них збільшувалася здатність забарвлюватися толуїдиновим синім і крезилвіолетом порівняно з нейронами гіпокампа контрольних тварин, але контури ядер чітко виявлялись. Їх також відносили до ушкоджених клітин.

Для дослідження пошкодження нервової тканини при відстроченій загибелі нейронів

нами було використано часову шкалу короткотривалого ішемічного впливу – 10 та 15 хв судинної оклюзії. Узагальнені дані про кількісне співвідношення неушкоджених, загиблих та ушкоджених нейронів у зоні CA1 гіпокампа після ішемічного впливу різної тривалості та різні строки після ішемії представлено на рис. 2. Кількісна оцінка

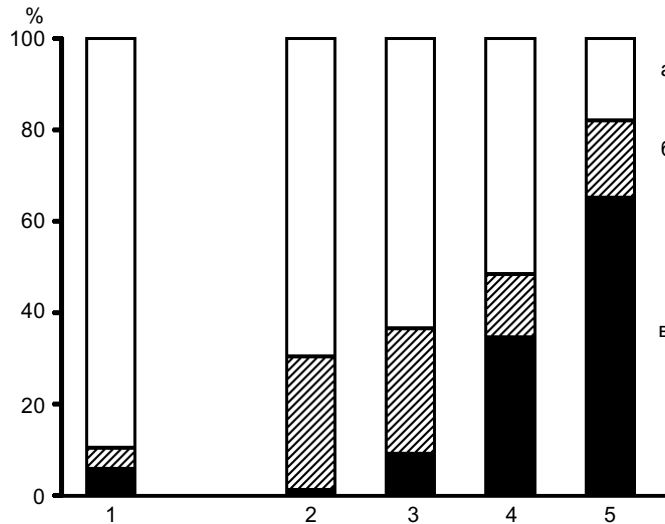


Рис. 2. Кількість непошкоджених (а), пошкоджених (б) і загиблих (в) нейронів у зоні CA1 гіпокампа шурів після короткотривалої ішемії мозку залежно від тривалості постішемічного періоду: 1 – 6 діб після 10-хвилинної ішемії, 2 – 1 доба після 15-хвилинної ішемії, 3 – 2 доби після 15-хвилинної ішемії, 4 – 3 доби після 15-хвилинної ішемії, 5 – 6 діб після 15-хвилинної ішемії

ураження зони СА1 показала, що 10-хвилинна оклюзія призводила до незначного пошкодження нейронів (9,5%), яке розвивалося лише на 6-ту добу після оклюзії. При 15-хвилинній зупинці кровотоку в мозку початкові зміни в нейронах зони СА1 спостерігались уже через 24 год, але загиблі клітини не зустрічалися. Кількість ушкоджених клітин становила 11,3% від загальної кількості пірамідних нейронів. На 2-гу добу спостерігалось збільшення кількості пошкоджених клітин у цій зоні до 19,7%, і поява загиблих нейронів (7,2%). На 3-тю добу після оклюзії кількість загиблих нейронів разом із пошкодженими в зоні СА1 становила 35%. На 6-ту добу

загальна кількість загиблих і пошкоджених нейронів сягала 82%, і лише 18% клітин в зоні СА1 були відносно неушкодженими.

Ушкодження нейронів у постішемичний період мало різноманітний характер. Спочатку переважали явища набряку, спостерігалось просвітлення цитоплазми і збільшення об'єму клітин та їх ядер (рис. 3,а). В подальші строки спочатку спостерігались некротичні зміни, які супроводжувались зморщуванням нейронів. Гіперхромні зморщені тіла нейронів були оточені пустотами, спостерігалось розрідження в пірамідному шарі гіпокампа внаслідок дегенерації частини нейронів (див.рис. 3,б). У пізні строки постішемичного періоду зустрі-

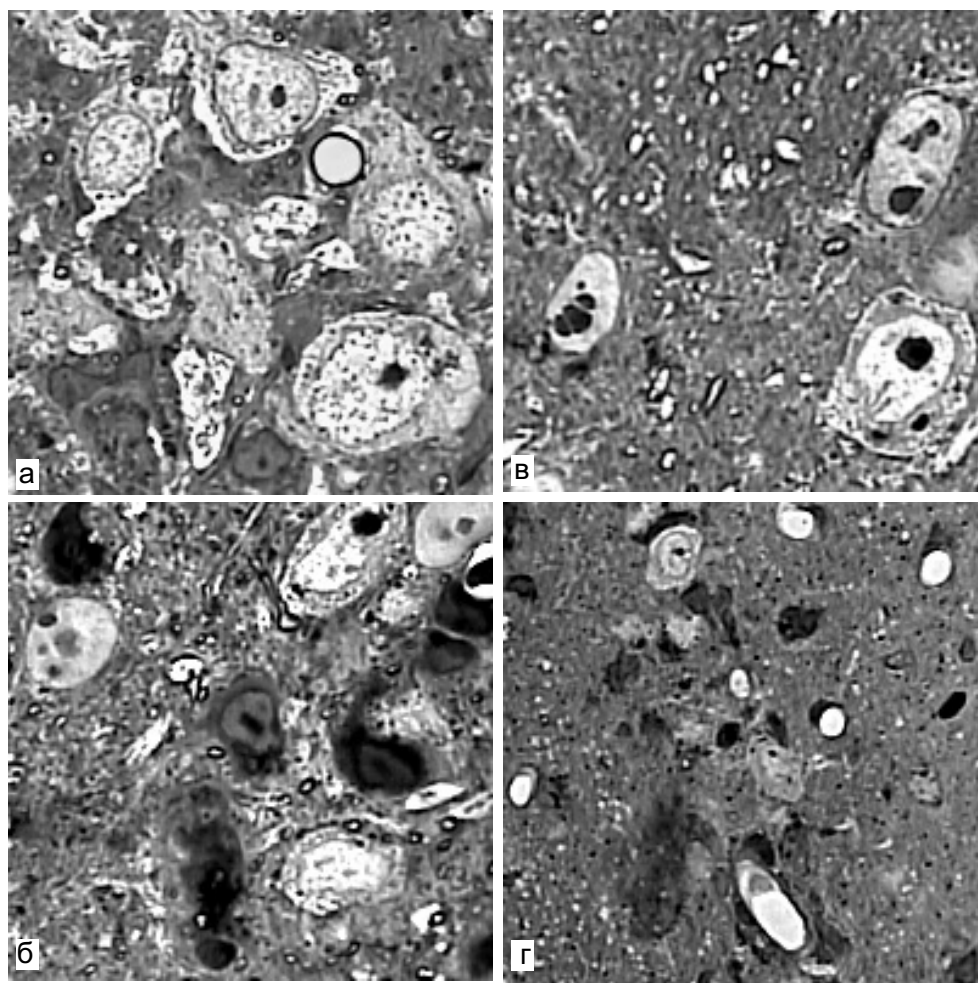


Рис. 3. Види ушкоджень нейронів гіпокампа після оклюзії. а, б, в – зб. 320, г – зб. 160

чалися також апоптотичні зміни нейронів у вигляді фрагментації їх ядер з утворенням апоптотичних тілець (див.рис. 3,в). У мікросудинах виявлявся прогресуючий з часом периваскулярний набряк. З 3-ї доби чітко просліджувалась активація мікрогліальних клітин, які скопичувалися навколо дегенеруючих нейронів (див.рис. 3,г) і периваскулярно. Нейропіль мав губчастий вигляд, у його структурах можна було бачити світлі вакуолі та темні гранули.

Ультраструктурні дослідження на 1-шу добу після 15-хвилинної оклюзії виявили в мітохондріях нейронів розширення проміжків між кристами та просвітлення матриксу внаслідок їх набрякання, розширення цистерн ендоплазматичного ретикулума з подальшим збільшенням його вакуолізації у вигляді численних мембранних структур неправильної форми в дендритах і терміналях зони СА1. Недостатність енергетичного забезпечення нейронів, викликана ішемією, не могла не призвести до порушення білкового та ліпідного обмінів, що виявлялось у фрагментації та вакуолізації ендоплазматичного ретикулума та накопиченні гранул ліпофусцину внаслідок порушення обміну ненасичених жирних кислот (рис. 4,а). Зі збільшенням постішемичного терміну в нейронах посилювались явища дегенерації – вакуолізація цитоплазми, значна осміофілія ядра та цитоплазми. Плазматична та цитоплазматичні мембрани руйнувалися, відбувався лізис органел.

У гліальних клітинах відмічались активація лізосомального апарату, локальний набряк цитоплазми. Такі некробіотичні зміни призводили до загибелі нейронів.

На 3-тю добу після 15-хвилинної ішемії чітко видно участь мікроглії в поглинанні та розщепленні дегенеруючих залишків нейронів. У мієліновій оболонці нейритів часто зустрічалися ділянки локального розшарування та набряку. Що стосується судин, то потрібно відмітити перикапілярний набряк, що, очевидно, є наслідком набряку астроцитарних відростків. Крім того, в ендотеліоцитах помітний активний мікропіноцитозний транспорт, наслідком чого є набрякання базальної мембрани та перикапілярного простору (див. рис. 4,б).

Таким чином, у проведених дослідженнях встановлено, що при 10 і 15-хвилинному терміні оклюзії та наступній постішемичній реперфузії розгорталося відстрочене ураження нейронів в зоні СА1 гіпокампа. І хоча нейрони цієї зони в цілому підтримували свою структурну цілісність протягом першої доби після 15-хвилинної оклюзії, очевидні зміни на ультраструктурному рівні були помічені вже на цій стадії. На більш пізніх етапах починається розвиток дегенеративних змін у нейронах і глії гіпокампа з подальшим їх наростанням. У механізмах розвитку відстрочених змін, які з часом призводять до ішемичного ушкодження та загибелі нейронів, важливу роль відіграють процеси, що запускаються при відновленні

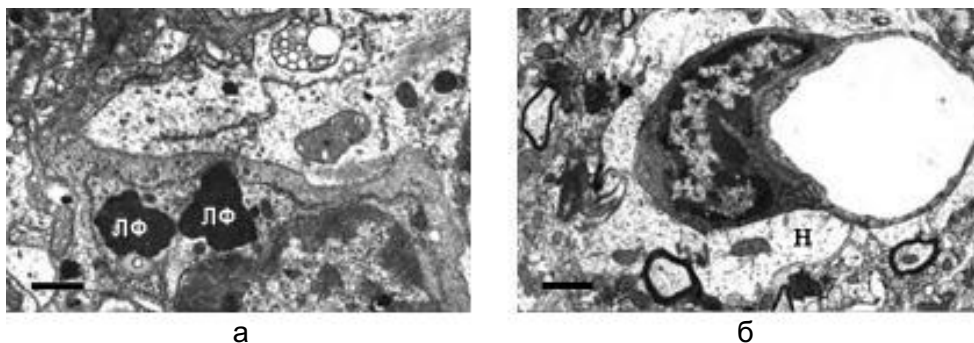


Рис. 4. Ультраструктура тканини гіпокампа на 1-шу (а) та 3-тю (б) добу після 15-хвилинної чотирихвилинної оклюзії. Накопичення включень ліпофусцину (ЛФ) у нейроні та периваскулярний набряк (Н). Зб. 12000

кровотоку та реоксигенації після ішемії. Серед найбільш вірогідно задіяних розглядаються токсичність надлишку збуджувальних амінокислот, порушення метаболічних процесів та оксидативний стрес. Розвиток структурних пошкоджень і відстрочену загибель нейронів також пов'язують з утворенням за умов ішемії – реперфузії великої кількості високореакційних активних форм кисню та азоту, надзвичайно токсичних для метаболізму тканин [9].

Відомо, що осередок ураження, який виникає в мозку після тимчасового припинення його кровопостачання внаслідок тривалого спазму артерії або закупорки її просвіту тромбом чи емболом, складається з двох ділянок – центральної, де відбувається швидка та незворотна загибель нейронів (некротичне ядро), та периферичної, так званої периінфарктної зони або пенумбри, яка розміщена між некротичним осередком та інтактною тканиною [3]. У зоні пенумбри, де енергетичний метаболізм частково збережений внаслідок зниженого кровотоку, клітини знаходяться в критичному стані, і залежно від швидкості, повноти відновлення кровотоку та ефективності вживаних заходів, вони можуть або відновитись, або загинути у відставлені строки. В експериментах з фокальною ішемією, проведених на тваринах за допомогою заклинювання середньої мозкової артерії, встановлено, що розмір ураженої ділянки залежить від тривалості ішемії [10, 14]. Глобальна ішемія мозку, яку ми створювали в наших дослідженнях за допомогою короткочасної оклюзії, насправді моделює умови, в яких опиняється нервова тканина в зоні пенумбри.

Для виявлення змін, які з'являються першими в ультраструктурі нейронів і структурній організації синаптичних терміналей у *stratum radiatum* зони CA1 гіпокампа за умов ішемії – реперфузії, ми провели дослідження ранніх (через 15 хв та 2 год після 15-хвилинної оклюзії) та віддалених

(через 24 год після 15-хвилинної оклюзії) строків після ішемії. На одержаних мікрофотографіях проводили морфометричний аналіз синаптичних терміналей з чітко вирізняваною постсинаптичною щільністю, які мали не менше ніж три пресинаптичні везикули. Підраховували кількість різних типів синапсів (рис. 5): а) простих, б) перфорованих (з наявністю однієї або більше переривчастостей у постсинаптичній щільності) [5] та в) множинних синаптичних бутонів (чи мультисинапсів) при наявності двох та більше окремих дендритних шипиків, які контактують з однією терміналлю [19]. Співвідношення цих типів синапсів на зрізах у середній третині *stratum radiatum* зони CA1 після ішемії змінювалося. Кількість перфорованих синапсів збільшувалася вірогідно (вже на 15-й хвилині реперфузії) і продовжувала далі збільшуватися (див.рис. 5,г). Відносна кількість мультисинапсів збільшувалася вірогідно через 2 год реперфузії (див.рис. 5,д) і знову поверталася до попередніх значень через 24 год після ішемії. Слід відмітити зміни в структурній організації синаптичних терміналей за умов ішемії. Недавніми дослідженнями було показано, що зміни концентрації внутрішньоклітинного кальцію в шипиках можуть призводити до змін їх форми [18], а при індукції LTP спостерігається утворення нових типів синапсів [4, 20].

Ультраструктурно через 15 хв після оклюзії в дендритах і синаптичних терміналях уже спостерігалися зрідка округлі вакуолі з електроннопрозорим вмістом, які, скоріше за все, є розширеними цистернами ендоплазматичного ретикулула. Через 2 год після оклюзії збільшувалася вакуолізація в терміналях у вигляді множинних мембранних структур неправильної форми. Через 24 год спостерігалось на себе увагу значне просвітлення дендритів і шипиків, що може бути пов'язане з їх набряканням. Часто зустрічалися вакуолярні структури, частіше в дендритах і шипиках, ніж у

пресинаптичних терміналях. Проте, значних змін у мітохондріальному апараті не спостерігалось, окрім деякого просвітлення матриксу та розширення проміжків між кристами.

Відмічені нами зміни в синаптичних терміналях наводять на думку, що можливо сигнали, які запускаються ішемією, можуть прогресивно розповсюджуватися від синапсів до клітинного тіла і там з часом викликати відстрочену нейрональну смерть у

постішемічному періоді.

Дослідження за допомогою моделі оклюзії дають широкі можливості для вивчення механізмів ішемічного ушкодження нервової тканини та використання проміжку часу між ішемічним впливом і появою морфологічних змін при відстроченій загибелі нейронів для попередження чи зупинення процесів клітинної смерті за допомогою різноманітних фармакологічних впливів.

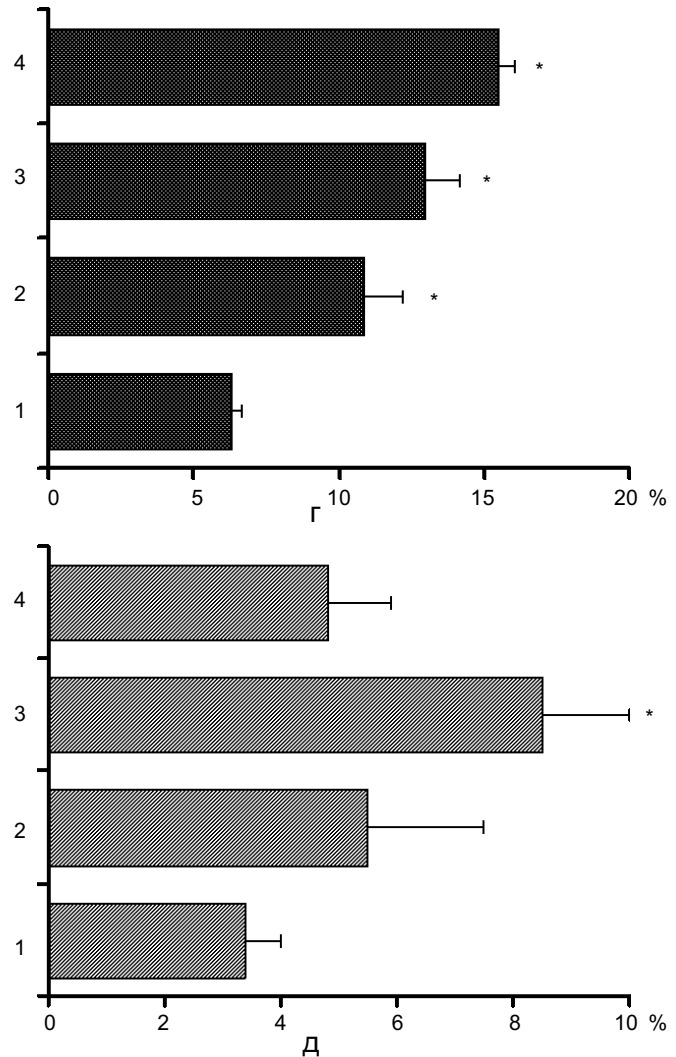
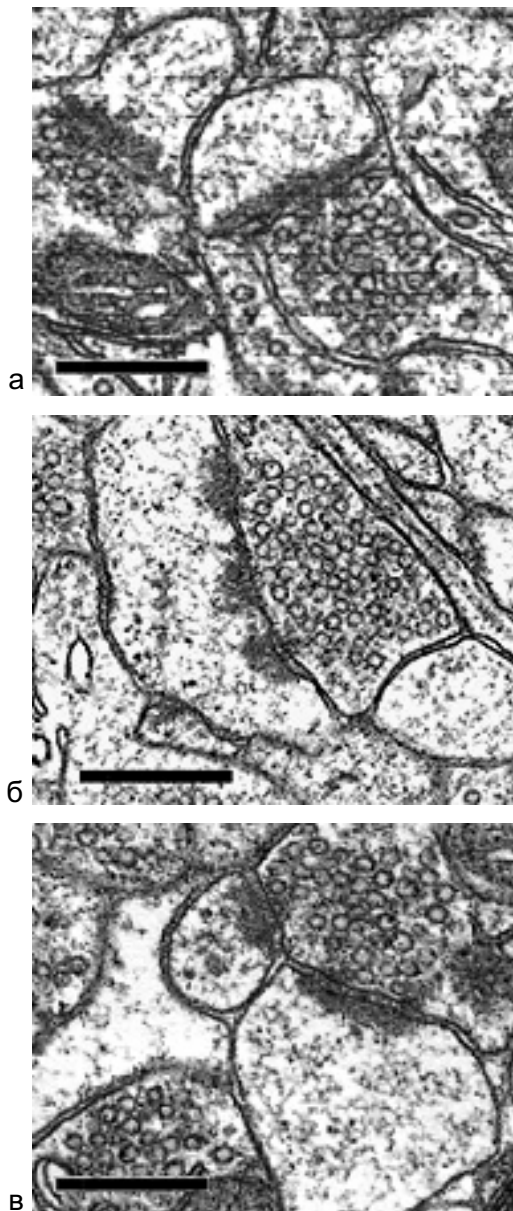


Рис. 5. Типи синаптичних контактів: а – простий, б – перфорований, в – множинний (мультисинапс). Зб. 20000. Зміна кількості перфорованих (г) і множинних (д) синаптичних контактів після оклюзії: 1 – контроль; 2 – 15 хвилин реперфузії; 3 – 2 год реперфузії; 4 – 24 год реперфузії

**T.M.Kovalenko, I.O.Osadchenko, K.G.Smozhanik,
I.R.Nikonenko, D.Muller, G.G.Skibo**

**STRUCTURAL CHARACTERISTICS OF RAT
HIPPOCAMPAL CA1 AREA AFTER
EXPERIMENTAL ISCHEMIA OF THE BRAIN**

The dynamic of structural and ultrastructural changes of CA1 area of the hippocampus was examined in rats after 10 or 15 min of global ischemia (4 vessels occlusion, 4VO) followed by reperfusion. In the early period of reperfusion (15 min, 2 h), the structural changes in synaptic terminals were observed, without any significant signs of neuronal damage. These changes consisted in (i) the increase of the relative number of perforated and multiple synapses, and (ii) the synaptic vesicles rearrangement. Clear neuronal damage appeared morphologically at 24 h, and then developed for 3-6 days and resulted in the delayed damage and death of the hippocampal neurons.

*A.A. Bogomoletz Institute of Physiology
National Academy of Science of Ukraine, Kiev
Medical Center of the University, Geneva, Switzerland*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Das D. K. Cellular, biochemical and molecular aspects of reperfusion injury. – New York: N-Y Acad. Sci, 1994. – P.151.
- De Deyn P.P., Goeman J., Engelborghs S. et al. From neuronal and vascular impairment to dementia // Pharmacopsychiatry. – 1999. – **32**, Suppl. 1. – P.17–24.
- Dirnagl U., Iadecola C., Moskowitz M.A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view // Trends Neurosci. – 1999. – **22**. – P.391–397.
- Engert F., Bonhoeffer T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity // Nature. – 1999. – **399**. – P.66–70.
- Geinisman Y., Morrell F., de Toledo-Morrell L. Axospinous synapses with segmented postsynaptic densities: a morphologically distinct synaptic subtype contributing to the number of profiles of “perforated” synapses visualized in random sections // Brain Res. – 1987. – **423**. – P.179–188.
- Horn M., Schlote W. Delayed neuronal death and delayed neuronal recovery in the human brain following global ischemia // Acta Neuropathol. – 1992. – **85**. – P.79–87.
- Kirino T. Delayed neuronal death // Neuropathology. – 2000. – **20**. – P.S95–S97.
- Kirino T., Tamura A., Sano K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia – reversible and irreversible types of ischemic cell damage // Progr. Brain Res. – 1985. – **63**. – P.39–58.
- Kitagawa K., Matsumoto M., Oda T. et al. Free radical generation during brief period of cerebral ischemia may trigger delayed neuronal death // Neuroscience. – 1990. – **35**, № 3. – P.551–558.
- Lehrmann E., Christensen T., Zimmer J. et al. Microglial and macrophage reactions mark progressive changes and define the penumbra in the rat neocortex and striatum after transient middle cerebral artery occlusion // J. Comparative Neurol. – 1997. – **386**. – P.461–476.
- Li C., Jackson R.M. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury // Amer. J. Physiol. Cell Physiol. – 2002. – **282**, Issue 2. – P.C227–C241.
- Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons // Physiol. Rev. – 1999. – **79**, №4. – P.1431–1568.
- Mattson M.P., Liu D. Energetics and oxidative stress in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders // Neuromolecular. Med. – 2002. – **2**, №2. – P.215–231.
- Mokudai T., Ayoub I.A., Sakakibara Y. et al. Delayed treatment with nicotinamide (vitamin B₃) improves neurological outcome and reduces infarct volume after transient focal cerebral ischemia in Wistar rats // Stroke. – 2000. – **31**. – P.1679–1685.
- Nitatori T., Sato N., Waguri S. et al. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis // J. Neuroscience. – 1995. – **15**, №2. – P. 1001–1011.
- Pulsinelli W. A., Brierley J. B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat // Stroke. – 1979. – **10**, №4. – P. 267–272.
- Schmidt-Kastner R., Freund T. F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. // Neuroscience. – 1991. – **40**, №3. – P. 599–636.
- Segal I., Korkotian I., Murphy D.D. Dendritic spine formation and pruning: common cellular mechanisms? // Trends Neuroscience. – 2000. – **23**. – P. 53–57.
- Sorra K.E., Harris K.M. Occurrence and three-dimensional structure of multiple synapses between individual radiatum axons and their target pyramidal cells in hippocampal area CA1 // J.Neuroscience. – 1993. – **13**. – P. 3736–3748.
- Toni N., Buchs P.A., Nikonenko I.R. et al. LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite // Nature. – 1999. – **402**. – P. 421–425.

*Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України,
Київ;
Мед. центр Женев. ун-ту, Швейцарія*

*Матеріал надійшов до
редакції 21.01.2004*